

© Горбачева С. В., Беленичев И. Ф.

УДК: 616.831-091/.092.001.57

Горбачева С. В., Беленичев И. Ф.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ
КОЭФФИЦИЕНТА НИТРОТИРОЗИН/ГЛУТАТИОН
В КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ
ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ МОЗГОВОГО ИНСУЛЬТА
Запорожский государственный медицинский университет (г. Запорожье)
swg18@yandex.ua**

Работа выполнялась на кафедре фармакологии и медицинской рецептуры Запорожского государственного медицинского университета в рамках госбюджетной темы «Молекулярно-биохимические механизмы формирования митохондриальной дисфункции нейронов головного мозга в условиях острой церебральной ишемии: новые мишени для нейропротекции» (№ государственной регистрации 0113, шифр U000797).

Вступление. Сосудистые заболевания головного мозга являются глобальной медицинской и социальной проблемой в связи с высокими показателями заболеваемости, смертности и инвалидизации. Среди них церебральная ишемия формирует наиболее многочисленный и тяжелый контингент неврологических больных, так как сопровождается выраженными когнитивными расстройствами и неврологическим дефицитом в виде парезов и параличей в конечностях [2].

Церебральная ишемия подразумевает динамический процесс и потенциальную обратимость вызываемых изменений. В связи с этим понимание механизмов гибели нейронов при ишемии мозга является современной проблемой и интенсивно изучаются во всем мире. Накопление в нейрональной клетке продуктов окислительной модификации липидов, белков, нуклеиновых кислот приводит к токсической и апоптической гибели нервных клеток и, как следствие развитие когнитивного дефицита. Помимо апоптической гибели части нейронов, в условиях генерации АФК происходят и метаболические изменения в нейрональной клетке. Так, окислительная атака SH- групп NMDA-рецепторов приводит к подавлению их функции. Снижение функции белков в цепи переносчиков электронов, активности АТФ-азы, избирательности действия транспортных пор происходит также в результате окислительной модификации белковых молекул. Изменение Red/Ox- потенциала митохондриальной мембраны может вызывать дисфункцию каскада дыхательной цепи нейрональной клетки. Окислительная деструкция белковых и липидных фрагментов мембран нейроцитов, ухудшает чувствительность и специфичность рецепторов, генерацию, образование и проводимость нервного импульса, нарушает синаптическую передачу. Дан-

ные изменения, в конечном итоге, приводят к нарушению секреторной, инкреторной, транспортной функции нейрона, в конечном итоге приводя к ослаблению когнитивно-мнестических функций организма [1].

В лабораторной диагностике оценки степени тяжести ОНМК прослеживаются существенные недостатки. Выявляемые современными лабораторными и инструментальными методами изменения часто указывают на глубокий, мало обратимый характер повреждений тканей [4]. В то же время нашими предыдущими работами и другими исследователями раскрыта перспективность определения содержания восстановленного глутатиона и метаболитов системы NO в биологическом материале при оценке тяжести ОНМК [1,8]. Экспериментальными исследованиями показано, что роль нарушенной системы глутатиона и NO в патогенезе ишемической нейродеструкции на различные сроки этого процесса и его выраженности далеко не одинакова. Подтверждением этого может служить и низкая эффективность антиоксидантов – нейропротекторов, которые назначаются порой без должных на то показаний. Таким образом, выявление закономерностей реагирования системы глутатиона и NO в головном мозге на острую ишемию является важной проблемой современной клинической биохимии, решение которой может способствовать существенному росту эффективности оказания помощи больным, благодаря целенаправленному совершенствованию средств фармакологической коррекции, точного определения показаний к их назначению.

Цель исследования – на основании экспериментальных данных выявить корреляционную зависимость между неврологическими нарушениями у животных с различной степенью тяжести ОНМК и соотношением нитротирозин/глутатион в головном мозге, а также обосновать использование этого коэффициента в качестве диагностического критерия в клинической биохимии.

Объект и методы исследования. Исследования проведены на белых беспородных крысах массой 180-200 г, обоего пола. Острое нарушение мозгового кровообращения моделировали путем необратимой двухсторонней окклюзией общих

сонных артерий. Процедуру выполняли под этил-на-натриевым наркозом (40 мг/кг), путём хирургического доступа выделяли общие сонные артерии, подводили под них шёлковые лигатуры и перевязывали. Учитывая высокую смертность при данной модельной патологии, общее количество животных включенное в эксперимент составляло 100 особей. На 4 сутки животных выводили из эксперимента под этил-на-натриевым наркозом (40 мг/кг) [6].

Эксперименты на животных проведены в соответствии с Общими принципами работы на животных, одобренными 1-м Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001) и согласованными с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985).

Каждый день определяли выраженность неврологического дефицита по шкале McGrow. Тяжесть состояния определяли по сумме соответствующих баллов: до 3 баллов – лёгкая степень, от 3 до 7 баллов – средняя степень и от 7 баллов и выше – тяжёлая степень. Отмечали парезы, параличи конечностей, тремор, маневные движения, птоз, положение на боку, подвижность, также как проявление неврологического дефицита рассматривали удержание крыс на вращающемся стержне диаметром 15 см со скоростью вращения 3 об/мин. Животных тестировали ежедневно, выставляя сумму баллов [9].

Для биохимических исследований использованы фрагменты, находящиеся в области сенсомоторной зоны коры головного мозга и гомогенизированные в жидком азоте. Цитозольную фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования (15 000 g) при температуре +4°C на 0, 15 М фосфатном буфере pH 7,8. Содержание восстановленного глутатиона определяли флюорометрически [7]. Содержание нитротирозина определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа методом ELISA с использованием стандартного тест-набора «Nitrotirosine ELISA Kit» («HyCult biotechnology») в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией.

Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$). Результаты исследования обработаны с использованием статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), а также «Microsoft Excel 2010». Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия с уровнем значимости менее 0,05 (95%) [5].

Результаты исследования и их обсуждение. Моделирование острого нарушения мозгового кровообращения вызывало формирование неврологической симптоматики у всех экспериментальных животных.

Однако, балы неврологического дефицита по шкале McGrow. Исходя из этого, всех прооперированных животных разделили на 3 группы: первая – животные с легкой неврологической симптоматикой, вторая – средняя степень, третья – группа с тяжелой степенью выраженности нарушений.

Проведенные биохимические исследования показали четкую зависимость неврологических нарушений от изученных показателей (**табл. 1**).

В тканях мозга животных с легким неврологическим дефицитом (средний бал – 2,4) наблюдалось падение содержания восстановленной формы глутатиона на 47,6% и накопление нитротирозина на 93,8% относительно показателей интактных животных, что свидетельствует о развитии оксидативного и нитрозативного стресса. Дальнейшее усугубление неврологических нарушений сопровождалось дальнейшим прогрессированием патобиохимических реакций. Так, в группе 2, которая характеризовалась средней степенью тяжести по шкале McGrow, повышение неврологического балла на 3,7 единицы протекало на фоне падения на 56,5% пула восстановленного глутатиона и повышении нитротирозина на 85,5% относительно показателей группы 1. У животных с тяжелыми неврологическими нарушениями в тканях мозга отмечалось существенное накопление нитротирозина, который считается маркером накопления наиболее токсичного продукта нитрозативного стресса – пероксинитрита. Уровень этого показателя в 7,4 раза превышал показатели интактной группы и был в 2,06 и 3,83 раза больше значений группы 2 и 1 соответственно. Усиленное образование пероксинитрита обусловлено смещением тиол-дисульфидного равновесия в нейронах. Восстановленные тиолы, в первую очередь, глутатион, способны связывать активные формы NO и предупреждать образование пероксинитрита, ограничивая тем самым его токсическое действие [3]. Данное утверждение подтверждается нашими исследованиями. Снижение концентрации восстановленного глутатиона протекало параллельно с накоплением нитротирозина и формированием неврологического дефицита (**табл. 1**). В группе 3 зарегистрировано падение в 12,7 раз по сравнению с интактными животными уровня восстановленного глутатиона, что в конечном итоге обусловило развитие стойкого неврологического дефицита ($15,8 \pm 1,65$ баллов).

Таблица 1.

Неврологический дефицит и биохимические показатели у экспериментальных животных

Группы животных	McGrow Stroke-index	Глутатион восстановл. (GSH), мкмоль/ г белка	Нитротирозин, нмоль/ г белка
Интактная (n = 10)	0	$3,95 \pm 0,05$	$5,31 \pm 0,16$
Группа 1 (n = 5)	$2,4 \pm 0,29$	$2,07 \pm 0,07^*$	$10,29 \pm 0,85^*$
Группа 2 (n = 7)	$6,07 \pm 0,5^{**}$	$0,9 \pm 0,06^{**}$	$19,07 \pm 0,62^{**}$
Группа 3 (n = 57)	$15,36 \pm 1,54^{**\&}$	$0,31 \pm 0,02^{**\&}$	$39,4 \pm 1,24^{**\&}$

Примечание: * – $p < 0,001$ по отношению к интактным животным; # – $p < 0,001$ по отношению к группе 1; & * – $p < 0,001$ по отношению к группе 2.

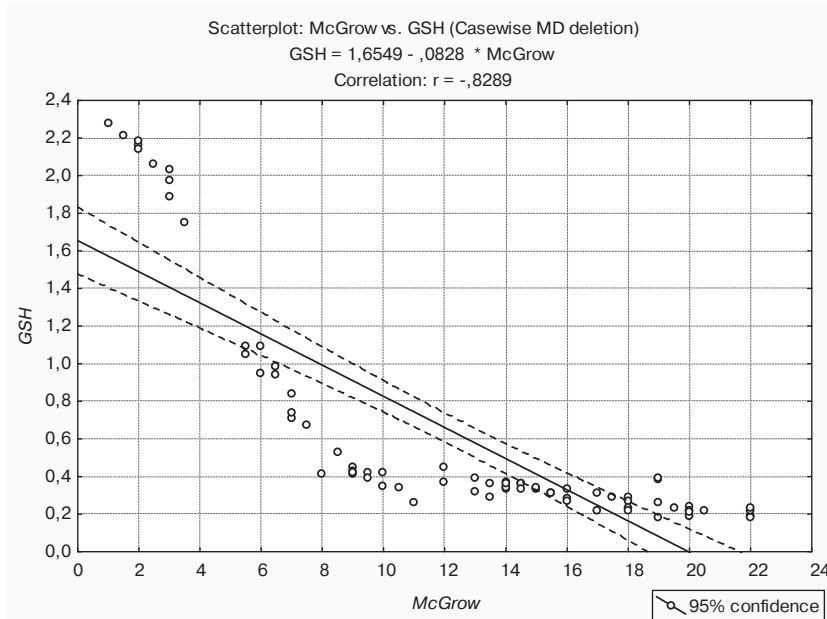


Рис. 1. Зависимость степени неврологического дефицита от уровня восстановленного глутатиона у экспериментальных животных.

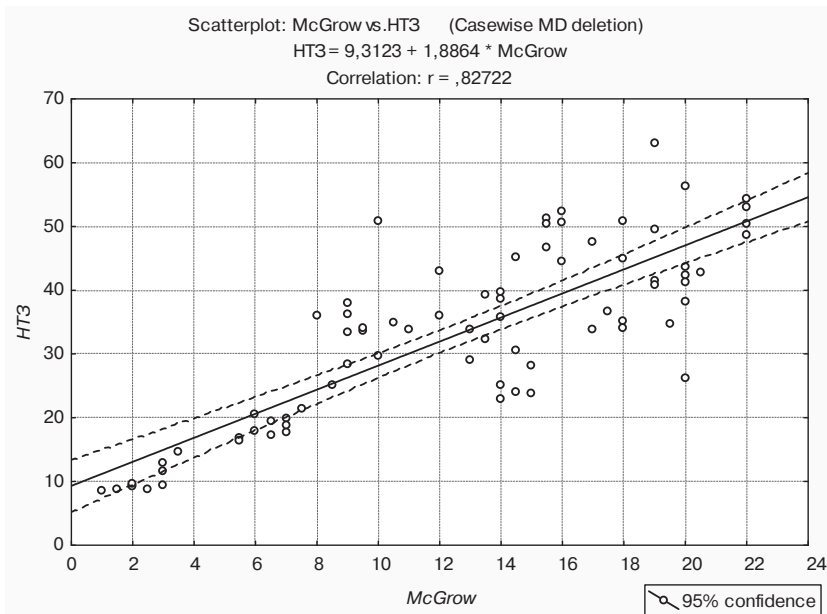


Рис. 2. Зависимость степени неврологического дефицита от уровня нитротирозина у экспериментальных животных.

Таблица 2.

Коэффициент соотношения нитротирозин/восстановленный глутатион в группах животных с разной выраженностью неврологического дефицита

Группа животных	Коэффициент нитротирозин/GSH
Интактная	1,35 ± 0,04
Группа 1	5,03 ± 0,57
Группа 2	22,06 ± 2,1
Группа 3	138,5 ± 7,92

Для статистической оценки результатов сначала исследовали характер распределения изучаемых переменных. Проверку нормальности распределения проводили с применением W-теста Шапиро-Уилка и критерия Колмогорова-Смирнова [5]. Наличие или отсутствие линейной связи между двумя количественными показателями, а также их тесноту и статистическую значимость определяли вычислением критерия корреляции Пирсона. Представленные диаграммы рассеяния для выбранных переменных (**рис. 1-2**) указывают на наличие выраженной прямолинейной зависимости проанализированных данных. Для неврологической симптоматики отмечена отрицательная зависимость с восстановленным глутатионом ($r = -0,8289$) и положительная с уровнем нитротирозина ($r = 0,8272$). Вычисленные коэффициенты корреляции Пирсона подтверждаются визуальной 3D-диаграммой (**рис. 3**), на которой графически изображена взаимосвязь динамики концентраций глутатиона и нитротирозина с выраженностью неврологического дефицита.

Учитывая наличие четкой зависимости между исследованными показателями, нам представляется возможным вычисление коэффициента соотношения уровня нитротирозина к восстановленному глутатиону и возможность его использования для диагностики неврологических нарушений. Полученные данные представлены в **табл. 2**. Из рассчитанных коэффициентов следует, что в нормальных условиях соотношение нитротирозин/глутатион ($K_{H/GSH}$) составляет около 1,3. Легкая степень неврологического дефицита характеризуется $K_{H/GSH}$ близким к 5,0; при тяжелых неврологических нарушениях $K_{H/GSH}$ увеличивается и составляет около 138,5.

Выводы

Таким образом, сопряженность в системе «NO – восстановленные тиолы» играет существенную роль в механизмах нейродеструкции и эндогенной нейропротекции, а ее соотношение определяет судьбу нейрона в условиях церебральной ишемии. Ключевым фактором равновесия в этой системе является поддержание на определенном уровне пула

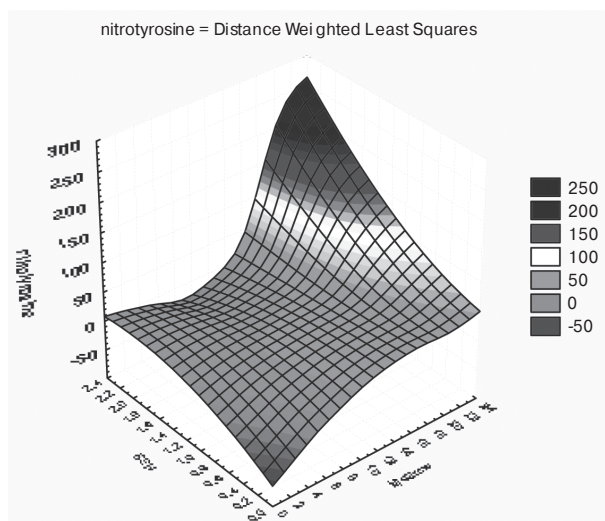


Рис. 3. Сопряженість змін рівня нітротирозина і відновленого глутатіону з неврологічним дефіцитом.

восстановленных тиолов и, особенно глутатиона. Восстановленные эквиваленты глутатиона обеспечивают не только биодоступность NO, но и безопасность функционирования системы NO для нейрона, предупреждая образование его нейротоксических дериватов. Выявлена статистически достоверная линейная зависимость степени выраженности неврологического дефицита от функционирования сопряженной системы «NO – восстановленные тиолы».

Перспективы дальнейших исследований.

Полученные результаты являются экспериментальным обоснованием применения в клинической биохимии коэффициента нитротирозин/восстановленный глутатион в качестве диагностического критерия степени тяжести мозгового инсульта. Представляется перспективным проверить его эффективность при лабораторном обследовании больных с нарушениями мозгового кровообращения.

Литература

1. Беленичев И. Ф. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Е. А. Нагорна [и др.]. – Киев: Логос, 2015. – 512 с.
2. Гусев Е. И. Информированность населения о факторах риска сосудистых заболеваний головного мозга и клинических проявлениях инсульта / Е. И. Гусев, Я. Е. Фрис, Л. А. Шелякина // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2010 – Т. 110, № 9. – С. 3-12.
3. Калинина Е. В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // Успехи биол. наук. – 2014 – Т. 54. – С. 299-348.
4. Кандыба Д. В. Алгоритм диагностики и оценки эффективности медикаментозного и хирургического лечения больных с ишемическими нарушениями мозгового кровообращения при патологии экстракраниальных артерий / Д. В. Кандыба, А. А. Скоромец, Т. Н. Трофимова // Инсульт. – 2007. – Вып. 20. – С. 58-65.
5. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М., Медиасфера, 2002, 312 с.
6. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / О. В. Стефанов. – Київ: «Авіацена», 2002. – 527 с.
7. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. – К.: ГФЦ МОЗ Украины, 2010. – 81 с.
8. Belenichev I. F. The Thiol-Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow: The Therapeutic Effects of Nootropic Drugs / I. F. Belenichev, S. V. Gorbacheva, N. V. Bukhtiyarova // Neurochemical Journal. – 2014. – Vol. 8, № 1. – P. 24-27.
9. McGrow C. P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils / C. P. McGrow // Arch. Neurol. – 1977. – Vol. 34, № 6. – P. 334-336.

УДК: 616.831-091/.092.001.57

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ДІАГНОСТИЧНОЇ ЗНАЧУЩОСТІ КОЕФІЦІЄНТА НІТРОТИРОЗИН/ГЛУТАТІОН В КЛІНІЧНІЙ БІОХІМІЇ ДЛЯ ОЦІНКИ СТУПЕНЯ ТЯЖКОСТІ МОЗКОВОГО ІНСУЛЬТУ

Горбачова С. В., Беленичев І. Ф.

Резюме. Спряженість в системі «NO – відновлені тиолі» відіграє істотну роль у механізмах нейродеструкції та ендогенної нейропротекції, а її співвідношення визначає долю нейрона в умовах церебральної ішемії. Ключовим фактором рівноваги в цій системі є підтримка на певному рівні пулу відновлених тиолів і, особливо глутатіону. Відновлені еквіваленти глутатіону забезпечують не тільки біодоступність NO, а й безпеку функціонування системи NO для нейрона, попереджаючи утворення його нейротоксичних дериватів. Виявлена статистично достовірною лінійною залежністю ступеня тяжкості неврологічного дефіциту від функціонування системи «NO – відновлені тиолі». Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням застосування в клінічній біохімії коефіцієнта нітротирозин/відновлений глутатіон в якості діагностичного критерію ступеня тяжкості мозкового інсульту

Ключові слова: нітротирозин, глутатіон, оксид азоту, гостре порушення мозкового кровообігу.

УДК: 616.831-091/.092.001.57

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ КОЭФФИЦИЕНТА НИТРОТИРОЗИН/ГЛУТАТИОН В КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ МОЗГОВОГО ИНСУЛЬТА

Горбачева С. В., Беленичев И. Ф.

Резюме. Сопряженность в системе «NO – восстановленные тиолы» играет существенную роль в механизмах нейродеструкции и эндогенной нейропротекции, а ее соотношение определяет судьбу нейрона в условиях церебральной ишемии. Восстановленные эквиваленты глутатиона обеспечивают не только биодоступность NO, но и безопасность функционирования системы NO для нейрона, предупреждая образование его нейротоксических дериватов. Выявлена статистически достоверная линейная зависимость степени выраженности неврологического дефицита от функционирования сопряженной системы «NO – восстановленные тиолы». Полученные результаты являются экспериментальным обоснованием применения в клинической биохимии коэффициента нитротирозин/восстановленный глутатион в качестве диагностического критерия степени тяжести мозгового инсульта

Ключевые слова: нитротирозин, глутатион, оксид азота, острое нарушение мозгового кровообращения.

UDC: 616.831-091/.092.001.57

EXPERIMENTAL JUSTIFICATION OF DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF NITROTYROSINE/GLUTATHIONE COEFFICIENT IN CLINICAL BIOCHEMISTRY IN ORDER TO GIVE AN ESTIMATION OF CEREBRAL STROKE SEVERITY

Gorbacheva S. V., Belenichev I. F.

Abstract. Essential disadvantages take place in laboratory diagnostics of estimation the severity of acute cerebral circulation impairments. Modern laboratory parameters and instrumental methods used nowadays reveal deeper and not very reversible cerebral tissue damages. Experimental investigations reflect a role of impairments of glutathione and NO system in pathogenesis of ischemic neurodestruction. Detection of glutathione and NO system regularities response in brain to acute cerebral ischemia is an important problem of modern clinical biochemistry. The decision of the given problem could promote a significant growth in rendering assistance to the patients due to purposeful improvement of the methods of pharmacological correction.

The purpose of the given investigation is to reveal correlation dependence on the base of experimental data between neurological impairments among the animals with acute cerebral circulation impairment of different degree of severity and nitrotyrosine/glutathione ratio in brain.

The conducted investigations showed that in cerebral tissues of animals with slight neurologic deficiency (average grade – 2,4) it was observed the drop of reduced glutathione form contents on 47,6% and accumulation of nitrotyrosine on 93,8%. That is the evidence of oxidative and nitrosative stresses development. Further worsening of neurologic impairments was accompanied by pathobiochemical reactions progress. Among the animals with severe neurologic impairments in cerebral tissues it was observed essential increase of nitrotyrosine level that is a marker of the most toxic product of nitrosative stress such as peroxynitrite. Intensified formation of peroxynitrite is specified by thiol-disulfide balance shift inside neurons. The decrease of reduced glutathione concentration was occurring simultaneously with the process of nitrotyrosine accumulation and neurologic deficiency formation.

Conjugation in the system “nitric oxide – reduced thiols” plays a significant role in mechanisms of neurodestruction and endogenous neuroprotection and its correlation defines neuron destiny in conditions of cerebral ischemia. Key factor of balance in this system is a maintenance at definite level the pool of reduced thiols in particular glutathione. Reduced equivalents of glutathione provide not only bioavailability of nitric oxide but also safety of NO system functioning for a neuron preventing a formation of its neurotoxic derivatives. A statistically significant linear dependence of neurologic deficiency manifestation degree from functioning of conjugated system “nitric oxide – reduced thiols” was established. The obtained results are considered to be an experimental justification of nitrotyrosine/reduced glutathione coefficient application in clinical biochemistry as a diagnostic criterion of cerebral stroke severity.

Keywords: nitrotyrosine, glutathione, nitric oxide, acute cerebral circulation impairment.

Рецензент – проф. Литвиненко Н. В.

Стаття надійшла 30.01.2016 року