

ВПЛИВ ТІОЛЬНИХ АНТИОКСИДАНТІВ НА РОЗВИТОК МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ГОСТРОЇ ІШЕМІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ.

© С. В. Павлов

Запорізький державний медичний університет

РЕЗЮМЕ. Проведеними експериментальними дослідженнями встановлена здатність тіольних антиоксидантів (тіотриазолін, мексидол, емоксипін) в умовах моделювання гострої церебральної ішемії зменшувати явища окисдативного стресу та розвиток мітохондріальної дисфункції в тканинах головного мозку. За своєю дією тіотриазолін та мексидол статистично вірогідно перевищували емоксипін за всіма досліджуваними показниками, що пов'язано, на нашу думку, з більш вираженою здатністю тіотриазоліну та мексидолу активувати антиоксидантну систему та забезпечувати редокс-контроль енергетичних та антиоксидантних ферментів клітин та мітохондрій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мітохондріальна дисфункція, гостра церебральна ішемія, тіольні антиоксиданти.

Вступ. Останнє десятиріччя ХХ століття Всесвітньою організацією охорони здоров'я було оголошено «десятиріччям мозку» – і це не випадково. Церебральні ішемії за поширеністю займають третє місце серед країн Європейського союзу та країн СНД, поступаючись лише захворюванням серцево-судинної системи та злоякісним новоутворенням [1, 2]. Тому подальші дослідження механізмів розвитку церебральної ішемії та розробка методів їх фармакологічної корекції є актуальною задачею сучасної медичної науки.

При захворюванні мозку деструктивного і дегенеративного генезу відбувається порушення дихального ланцюга мітохондрій, енергетичного обміну, іонного гомеостазу клітини з підвищенням вмісту іонів кальцію, розвиток глутаматної ексайтотоксичності і пошкоджувальної дії нітрозуючого і окисдативного стресу, ініціація нейроапоптозу і загибелі клітини [3, 4]. Серед чинників запуску апоптозу слід зазначити утворення активних форм кисню (АФК) в процесі «збоченого» шляху окиснювального метаболізму в клітині. Існують переконливі докази того, що центральна роль в продукції АФК і подальшому розвитку апоптозу і некрозу належить мітохондріям, зміні проникності їх мембран у результаті формування специфічного комплексу мітохондріальних пор та ініціації «мітоптозу» [3, 5]. Відкриття пор перетворює мітохондрії з «електростанцій» в «топку» субстратів окиснення без утворення АТФ.

Все вищевикладене є обґрунтуванням для розробки ефективних спільних методів фармакокорекції церебральної ішемії, направлених на усунення негативних наслідків мітохондріальної дисфункції. На сьогодні з метою корекції мітохондріальної дисфункції здійснюються спроби використовувати препарати енерготропів – коензим Q10, карнітин, вітаміни групи В, похідні янтарної кислоти. Проте раціональні основи для їх застосування погано розроблені, ліки застосовуються хаотично, без достатніх знань про їх можливість і особли-

вості дії, без планування стратегії лікування з позицій доцільності [6, 7]. Крім того, при мітохондріальній дисфункції, що вже сформувалася, і «запуску» апоптотичних процесів ці препарати мало-ефективні, оскільки не здатні брати участь в регуляції тонких ланок енергетичного метаболізму, інтермедіатами яких вони є. Розглядається й інший напрямок корекції мітохондріальної дисфункції – застосування тіольних антиоксидантів (Мексидол, Емоксипін, Тіотриазолін), що конкурують з SH-групами цистеїнзалежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій за АФК і створюють з останніми стійкі комплекси. Це дозволяє запобігти відкриттю мітохондріальних пор в умовах окисдативного стресу [3, 7].

Метою дослідження є встановлення здатності тіольних антиоксидантів (мексидол, емоксипін, тіотриазолін) запобігати розвитку мітохондріальної дисфункції в умовах моделювання гострої церебральної ішемії головного мозку.

Матеріал і методи дослідження. Експериментальні досліді проведені на 50 самцях щурів лінії Вістар масою 200–220 г, отриманих з віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України». Тривалість карантину становила 14 днів, протягом котрих проводився щодобовий огляд кожної тварини (поведінка та загальний стан) [8]. Перед початком дослідження тварин, які відповідали критеріям включення до експерименту, поділили на експериментальні групи за допомогою методу рандомізації. Дослідних тварин утримували на однаковому раціоні у звичайних умовах віварію. Їх утримання відповідало правилам Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в наукових дослідженнях (Страсбург, 1986) [8].

Ішемію головного мозку моделювали шляхом оклюзії загальної сонної артерії. Операцію проводили під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг), який вводили внутрішньочеревно [9]. Досліджувані препарати вводили одразу після виходу тварин з-під

наркозу внутрішньочеревно протягом 4 діб (гострий період) – тіотриазолін (АО «Галичфарм». Розробка НВО Фарматрон) – у дозі 50 мг/кг; мексидол (МЦ ЕЛЛАРА) – 50 мг/кг; емоксипін (Таллінський фармацевтичний завод) – 100 мг/кг.

Оцінку явищ мітохондріальної дисфункції проводили за спектрофотометричною реєстрацією у суспензії мітохондрій відкриття мітохондріальної пори та мембранного заряду. Вилучення мітохондрій з нейронів проводили за методикою Прохорової, 1982 р. [9]. Функціональну активність мітохондрій визначали за енергетичним зарядом, який розраховували за формулою:

$$\text{АТФ} + 1/2\text{АДФ} / \text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}.$$

АТФ, АДФ, АМФ визначали у суспензії мітохондрій шляхом хроматографії у системі діоксанізопропанол-вода-аміак (4:2:4:1), з подальшою спектрофотометрією ($\lambda=260$ нм) [9].

Інтенсивність оксидативного стресу досліджували за рівнем нітротирозину (НТЗ) у гомогенаті головного мозку, який визначали за допомогою імуноферментного аналізу [9].

Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Kolmogorov-Smirnov (D) та Lilliefors, Shapiro-Wilk (W). У випадку розподілу, відмінного від нормального, або аналізу порядкових змінних використовували Mann-Whitney U. Для двох не пов'язаних вибірок та для більшого числа вибірок – критерій Kruskal-Wallis H з подальшим порівнянням за Games-Howell. Порівняння груп за якісною ознакою проводили з використанням критерію χ^2 з аналізом таблиць зв'язаності. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного та стандартної похибки репрезентативності середнього значення. Взаємозв'язок між досліджуваними змінни-

ми визначали, використовуючи процедуру бінарного регресійного аналізу. Результати дослідження оброблені із застосуванням статистичного пакета програми «SPSS 16», «Microsoft Excel 2003», «STATISTICA® for Windows 7.0» (StatSoft Inc.), для всіх видів аналізу статистично значимими вважали відмінності при рівні значущості не менш 0,05 [10].

Результати й обговорення. Моделювання гострої церебральної ішемії на 4 добу дослідження супроводжувалось інтенсифікацією процесів вільнорадикального окиснення у тканинах головного мозку, про що свідчило суттєве збільшення, більш ніж на 86 %, вмісту цитотоксичного маркера окисного пошкодження білків – нітротирозину (НТЗ). Подібне збільшення в тканинах головного мозку НТЗ свідчить про розвиток оксидативного стресу та гіперпродукцію АФК (рис. 1).

З ряду літературних джерел відомо, що АФК здатні пригнічувати активність ферментів, які відповідальні за репарацію ДНК. Це призводить до зміни активності різноманітних транскрипційних факторів, відповідальних за синтез Bax, Fas, p53AIP (apoptosis inducing protein) та інших проапоптичних білків, виникало падіння трансмембранного потенціалу на внутрішній мембрані та відкриття мітохондріальної проапоптичної пори з подальшим вивільненням з неї апоптоз-індукувального фактора (AIF), ендонуклеази G [3, 5 11]. Подібні патологічні зміни призводили до розвитку мітохондріальної дисфункції та загибелі всієї нейрональної клітини.

Вищенаведені дані підтвердились нашими дослідженнями. Так, на 4 добу церебральної ішемії нами було зареєстровано відкриття мітохондріальної циклоспорин-А-залежної пори (падіння цик-

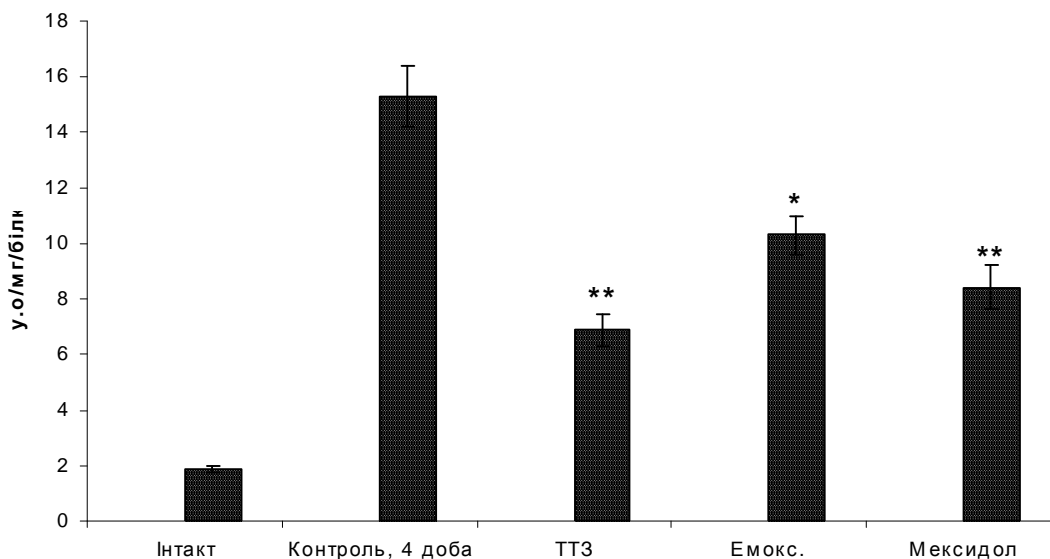


Рис. 1 Вплив тиольних антиоксидантів на вміст нітротирозину у тканинах головного мозку.

Примітки: * – $p \leq 0,05$ по відношенню до контрольної групи;

** – $p \leq 0,05$ по відношенню до емоксипіну.

лоспоринчутливого поглинання більш ніж на 73 % стосовно інтактної групи тварин) на тлі падіння мембранного потенціалу заряду (ДШ) мітохондрій (більш ніж на 70 %) (табл. 1). Крім того, у контрольній групі тварин нами було зафіксовано падіння функціональної активності мітохондрій, про що свідчило зниження їх енергетичного заряду – на 30 % стосовно інтактної групи тварин.

Курсове призначення всіх досліджуваних лікарських засобів приводило до покращення стану антиоксидантної системи у тварин з гострою ішемією, про що свідчило зменшення вмісту у тканинах головного мозку НТЗ. З рисунка 1 видно, що найбільшу активність проявляли тіотриазолін та мексидол, котрі зменшували концентрацію НТЗ у середньому на 53 % та 45 % відповідно. Призначення емоксипіну призводило до менш суттєвого ефекту.

нюється на нашу думку, по-перше, їх антиоксидантною дією, яка направлена на усунення токсичної дії вільних радикалів на функціонально активні клітинні та мітохондріальні білки. По-друге, наявність у молекулярній будові тіольних антиоксидантів сульфгідрильних груп відіграє велике значення у процесах каталізу, який забезпечує синхронізацію подій у метаболічних, енергетичних біологічних процесах [6, 7]. Редокс-перетворення SH-груп органічних компонентів клітин забезпечує схоронність показників гомеостазу на оптимальному рівні. Завдяки наявності SH-груп тіотриазолін, мексидол та емоксипін здатні виступати у якості редокс-буфера клітини, що забезпечує встановлення SH-груп ферментів енергозабезпечення мітохондрій при їх окисненні [3, 7, 12]. У зв'язку з цим дефіцит тіолового редокс-контролю активності ферментів в умовах оксидативного стресу цілком може бути компенсований завдяки

Таблиця 1. Вплив тіольних антиоксидантів на показники мітохондріальної дисфункції у тварин з модельованою гострою ішемією головного мозку

Серії	Циклоспорин-А-чутливе поглинання (540 нм)	Мембранний потенціал заряду мітохондрій, (сафронін-О, ΔΨ)	E3
Інтакт	110,8±2,4	63,8±3,7	0,99±0,03
Контроль, ішемія 4 доба	29,9±4,2	25,9±2,2	0,68±0,024
Тіотриазолін 50 мг/кг	77,2±2,1**	55,8±1,8**	0,84±0,03**
Мексидол, 50 мг/кг	81,7±3,5**	61,4±1,6**	0,88±0,028**
Емоксипін, 100 мг/кг	57,8±3,7*	51,7±1,5*	0,77±0,018*

Примітки: * – $p < 0,05$ по відношенню до контрольної серії;

** – $p < 0,05$ по відношенню до емоксипіну.

Відомо, що тіотриазолін, мексидол та емоксипін є високоефективними інгібіторами вільно-радикального окиснення у клітинах, так званими «пастками» АФК. В умовах оксидативного стресу вони здатні зменшувати накопичення у тканинах мозку вільних радикалів, тим самим зменшуючи окисне пошкодження функціонально активних макромолекул [3, 6, 12].

Нашими попередніми дослідженнями *in vitro* була показана здатність тіольних антиоксидантів зменшувати розвиток мітохондріальної дисфункції в умовах внесення у суспензію мітохондрій вільних радикалів [12]. Подібна дія була нами зафіксована й в умовах модельної патології. Так, призначення на 4 добу експерименту тіотриазоліну, мексидолу та емоксипіну приводило до збільшення мембранного заряду мітохондрій на тлі гальмування відкриття мітохондріальної пори. Крім того, за рахунок «мітопротективної дії» тіотриазолін, мексидол та емоксипін були здатні підвищувати функціональну активність мітохондрій, підвищуючи їх енергетичний заряд у середньому на 19 %, 22 % та 13 % відповідно та стосовно контрольної групи тварин.

Встановлена нами мітопротективна дія тіольних антиоксидантів в умовах модельної патології, пояс-

стабілізувальному впливу тіольних антиоксидантів; що можна розглядати як допоміжний механізм їх «мітопротективної» дії.

Висновок. Проведеними експериментальними дослідженнями була встановлена здатність тіольних антиоксидантів (тіотриазолін, мексидол, емоксипін) в умовах гострої ішемії головного мозку зменшувати явища оксидативного стресу та розвиток мітохондріальної дисфункції на тлі підвищення функціональної активності мітохондрій. За своєю дією тіотриазолін та мексидол статистично вірогідно перевищували емоксипін за всіма досліджуваними показниками, що пов'язано, на нашу думку, з більш вираженою здатністю тіотриазоліну та мексидолу активувати антиоксидантну систему та забезпечувати редокс-контроль енергетичних та антиоксидантних ферментів клітин та мітохондрій. Встановлені «мітопротективні» ефекти тіольних антиоксидантів обумовлюють актуальність та перспективність їх подальших експериментальних та клінічних досліджень.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним є встановлення еротропних ефектів тіольних антиоксидантів при гострій ішемії головного мозку в умовах клініки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дубенко О. Є. Причини і наслідки лакунарних інсультів головного мозку / О. Є. Дубенко, Г. Є. Костровська, С. Л. Костровський // Укр. неврологічний журнал. – 2007. – № 1. – С. 7–10.
2. Мурашко Н. К. Хронічне порушення мозкового кровообігу: акцент на діагностику та лікування / Н. К. Мурашко, Р. В. Сулік // Ліки України – 2011. – № 9 (155). – С. 58–63.
3. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов – Донецк: Издательский дом Заславский, 2009. – 348 с.
4. Giulivi C. Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by protease / C. Giulivi, V.J. Davies // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol.12, №11. – P. 8759–8762.
5. Yoshida S. Influence of transient ischemia on lipid-soluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain / S. Yoshida, K. Abe // Brain Res. – 2002. – Vol.245, №5. – P.307–316.
6. Суслина З. А. Антиоксидантная терапия при ишемическом инсульте / З. А. Суслина, Т. Н. Федорова, М. Ю. Максимова // Журн. неврол. и псих. – 2000. – Т.100, № 10. – С. 34–38.
7. Беленичев И. Ф. Вплив модуляторів системи оксиду азоту на морфологічний тип загибелі нейронів в умовах ініціювання нітрозуючого стресу *in vitro* / І. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, А. В. Абрамов // Фармакологія та лікарська токсикологія – 2009. – № 4. – С. 9–13.
8. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / О. В. Стефанов. – К.: Авіацена, 2002. – 527 с.
9. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов. – К.: ДФЦ МОЗ Украины, 2010. – 81 с.
10. Лапач С. Н. статистика в науке и бизнесе / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич – К.: – МОРИОН, 2002. – 639 с.
11. Евсеев А. В. Цинксодержащий антигипоксантаминопиридина ряда Q 1104 и его влияние на функциональную активность митохондрий клеток головного мозга / А. В. Евсеев, Э. А. Парфенов, В. А. Правдивцев // Психофармакология и биол. наркологи. – 2007. – Т. 7, Вып. 1. – С. 1423–1430.
12. Павлов С. В. Мітопротективна дія тиольних антиоксидантів в умовах моделювання нітрозуючого стресу *in vitro* / С. В. Павлов // Здобутки клініч. та експерим. медицини. – 2011. – № 2. – С. 95–98.

INFLUENCE OF THE THIOL ANTIOXIDANTS ON THE DEVELOPMENT OF THE MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AT A MODELLING OF AN ACUTE BRAIN ISCHEMIA

©S. V. Pavlov

Zaporizhian State Medical University

SUMMARY. Results showed that thiol antioxidants (Tiotriasoline, Mexidol, Emoxipine) in the model of an acute cerebral ischemia can decrease the oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the brain tissue. Tiotriasoline and Mexidol statistically increase Emoxipine that can activate antioxidant system and provide redox-control of the energetic and antioxidant enzymes in the cells and mitochondrias.

KEY WORDS: mitochondrial dysfunction, acute cerebral ischemia, thiol antioxidants.