

І. Ф. Бєленічев, С. В. Павлов, Л. І. Кучеренко

Нейро- та мітопротективний ефекти Ангіоліну та Цереброкуруину

Запорізький державний медичний університет
НВО «Фарматрон», м. Запоріжжя

Ключові слова: Ангіолін, Цереброкуруин, ішемічне пошкодження *in vitro* та *in vivo*, ультраструктура мітохондрій

За даними міжнародних епідеміологічних досліджень у світі від інсульту щорічно помирає 4,7 млн осіб. Серед усіх видів інсультів переважають ішемічні ураження мозку, які призводять не тільки до зменшення тривалості життя, а й обмежують соціальну активність людини внаслідок розвитку стійкого когнітивного дефіциту [1, 2]. Одним із основних механізмів розвитку порушень у тканинах та органах після ішемії та реперфузії вважають дисфункцію мітохондрій. Показано, що порушення функції цих органел має багатогранний вплив на внутрішньоклітинні процеси: сприяє розвитку дефіциту енергії, окисного стресу, активує механізми програмованої загибелі клітин [3–6]. У зв'язку з цим мітохондрії розглядають як перспективну мішень цитопротекції при розробці технології захисту органів та тканин від ішемічних пошкоджень та корекції їхніх наслідків. Наприкінці ХХ та на початку ХХІ століття з метою корекції мітохондріальної дисфункції використовували препарати енерготропів – коензим Q10, карнітин, вітаміни групи В, похідні бурштинової кислоти. Проте раціональні підходи до їхнього використання недостатньо розроблені, препарати використовують емпірично, без достатніх знань про їхні можливості та особливості дії, без планування стратегії лікування з позиції доцільності [7–8]. Натепер в експериментальних та клінічних дослідженнях антигіпоксантів продемонстровано перевагу препаратів з метаболітотропним типом дії, здатних попереджати розвиток енергодефіциту та оксидативного стресу [7, 9, 10]. До

таких препаратів можна віднести синтезований на кафедрі фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету новий лікарський засіб оригінальної структури – L-лізин 1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат з робочою назвою Ангіолін, який містить структурні фрагменти тіотріазоліну та L-лізину. У попередніх наших дослідженнях *in vivo* та *in vitro* було продемонстровано здатність Ангіоліну проявляти антиоксидантну, енерготропну, мітопротективну та ендотеліотропну дії [10–13]. З іншого боку, як нашими попередніми дослідженнями, так і роботами інших дослідників, продемонстрований виражений енерготропний та нейропротективний ефекти вітчизняного нейропептидного препарату – Цереброкуруину. Показано здатність Цереброкуруину обмежувати розвиток мітохондріальної дисфункції та активувати мітохондріально-цитозольні шляхи продукції енергії за умов гострої церебральної ішемії.

Сьогодні важливим показником ефективності препаратів нейропротекторної дії вважають їхню здатність впливати на збереження морфологічної цілісності нейрональної клітини та її органел [14].

Мета дослідження – вивчення впливу Ангіоліну та Цереброкуруину на ультраструктуру нейронів та їхніх мітохондрій за умов гіпоксії *in vitro* та *in vivo*.

Матеріали та методи. Експериментальні дослідження проведені на 40 самцях щурів масою 200–220 г, отриманих з ПП «Біомодельсервіс». Тривалість карантину становила 14 днів, протягом яких проводили щодобовий огляд кожної тварини (поведінка та загальний стан) [14]. Перед початком дослідження тварин, які відповідали критеріям включення до експерименту, розподіля-

ли 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, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.).

З метою моделювання гіпоксії *in vitro* до нейрональної суспензії вносили нейротоксин, роз'єднувач тканьового дихання – 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин (МФП) у концентрації 0,6 мкМ, що деякою мірою моделює *in vitro* каскад молекулярно-біохімічних змін у тканинах за умов гіпоксії [14]. Досліджувані препарати вносили в інкубаційне середовище (0,6 мкМ МФП, 70 мМ сахарози, 70 мМ КСl, 0,5 – 1 мМ $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, рН 7,4) у наступних концентраціях: Ангіолін – 10^{-3} М; Цереброкурин – 40 мкл/г тканини.

Для досліджень *in vitro* використовували білих самців щурів 4-тижневого віку, масою 70–100 г. Видалену тканину головного мозку промивали в сольовому середовищі (0,15 М КСl) при температурі + 4 °С та гомогенізували в розчині для гомогенізації (70 мМ сахароза, 20 мМ трисамінометан, 1 мМ ЕДТА, рН 7,4) за допомогою гомогенізатора (співвідношення тканини до розчину 1:10). Виділення збагаченої фракції нейронів проводили шляхом диференційного центрифугування при 700 г протягом 7 хв у градієнті щільності сахарози та фіколу. Після 60-хв інкубування суспензії нейронів з МФП та досліджуваними препаратами для подальших біохімічних та електронно-мікроскопічних досліджень шляхом ультрацентрифугування протягом 15 хв при 11 000 г та температурі +4 °С виділяли мітохондріальну фракцію [14].

Ішемію головного мозку моделювали шляхом двобічної оклюзії загальної сонної артерії. Операцію проводили під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) [14]. Досліджувані препарати, Ангіолін – 50 мг/кг; Цереброкурин – 150 мг/кг, вводили внутрішньочеревно, перше введення – одразу після виходу тварин з наркозу, далі – один раз на добу протягом експерименту (4 доби).

Розвиток мітохондріальної дисфункції в дослідях *in vitro* та *in vivo* визначали за відкриттям мітохондріальної пори (МП). У суспензії мітохондрій (1 мг білка в зразку) при + 25 °С після ініціації циклоспорином-А (0,5 мл) та постійного перемішування протягом 25 хв відкриття МП визначали спектрофотометрично за циклоспорин-А-чутливим поглинанням при 540 нм [14].

Для оцінки процесів енергетичного обміну та функціональної активності мітохондрій за умов гострої церебральної ішемії та МФП-індукованої гіпоксії *in vitro* на підставі отриманих нами в попередніх дослідженнях даних [15, 16] щодо вмісту в тканинах головного мозку та суспензії нейронів макроергічних фосфатів – АТФ, АДФ, АМФ розраховували наступні показники енергозабезпечення – енергетичний заряд (ЕЗ), енергетичний потенціал (ЕП), індекс фосфорилування (ІФ), термодинамічний контроль дихання (ТКД) [14].

Показники розраховували за формулами:

- ЕЗ: $\text{АТФ} + 1/2\text{АДФ} / \text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}$;
- ЕП: $\text{АТФ} + \text{АДФ}$;
- ІФ: $\text{АТФ} / \text{АДФ} + \text{АМФ}$;
- ТКД: $\text{АДФ} / \text{АМФ}$.

Для електронно-мікроскопічних досліджень тканину головного мозку (CA1 зона гіпокампа) або суспензію мітохондрій фіксували в 3 % розчині глутаральдегіду. Далі за стандартною схемою заливали в епоксидну смолу Епон-812. Серійні ультратонкі зрізи робили на ультрамікроскопі ЛКВ-III та фарбували свинцем за Рейнольдсом [17].

У дослідях *in vitro* суспензія нейронів була розподілена на наступні експериментальні серії:

- 1) суспензія нейронів без додавання МФП;
- 2) суспензія нейронів з додаванням МФП (0,6 мкМ) (МФП-індукована гіпоксія *in vitro*);
- 3) суспензія нейронів з додаванням МФП (0,6 мкМ) та Ангіоліну (10^{-3} М);
- 4) суспензія нейронів з додаванням МФП (0,6 мкМ) та Цереброкуруину (40 мкл/г тканини).

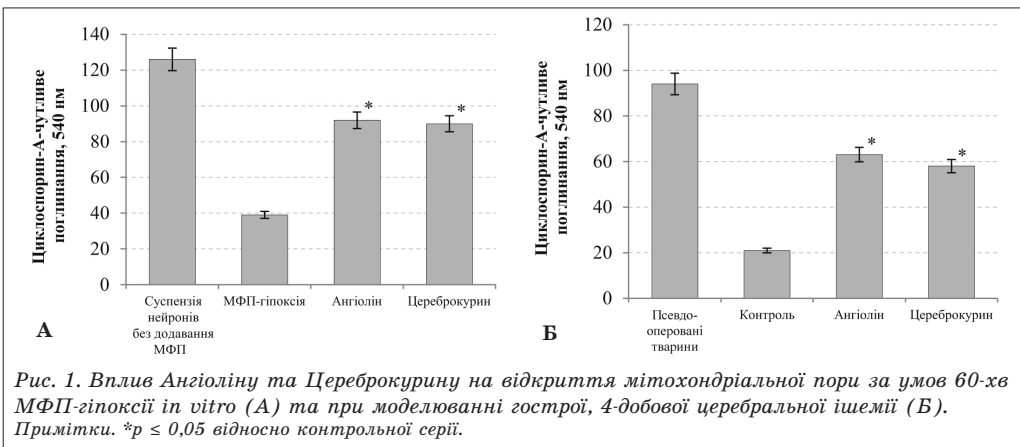
Експериментальні тварини, у свою чергу, були розподілені на нижченаведені серії:

- 1) псевдооперовані тварини (щури, що зазнали усіх маніпуляцій, окрім безпосередньої оклюзії загальної сонної артерії);
- 2) контроль (тварини з 4-добовою оклюзією загальної сонної артерії);
- 3) тварини з 4-добовою церебральною ішемією та курсовим введенням Ангіоліну (50 мг/кг);
- 4) тварини з 4-добовою церебральною ішемією та курсовим введенням Цереброкуруну (150 мг/кг).

Результати дослідження оброблені за допомогою статистичного пакета програм «SPSS 16», «Microsoft Excel 2003», «STATISTICA® for Windows 7.0» (StatSoft Inc.). Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Kolmogorov-Smirnov (D) та Lilliefors, Shapiro-Wilk (W). У випадку розподілення 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 за допомогою критерію χ^2 з аналізом таблиць зв'язаності. Дані представлені у виді середнього арифметичного та стандартної похибки репрезентативності середнього значення. Взаємозв'язок між досліджуваними змінними проводили, використовуючи процедуру бінарного регресійного аналізу. Для всіх видів аналізу статистично значимими вважа-

ли відмінності при рівні значущості не менше 0,05.

Результати та їх обговорення. Моделювання МФП-індукованої гіпоксії *in vitro* призводило до суттєвих змін функціонального стану мітохондрій та розвитку мітохондріальної дисфункції. Звертає на себе увагу різке падіння енергетичного заряду мітохондрій (більш ніж на 70 %) відносно суспензії нейронів без внесення МФП (табл. 2). Крім того, реєстрували збільшення проникності мітохондрій, що виражалося зменшенням циклоспорин-А-чутливого світлопоглинання (рис. 1). Паралельно з цими змінами відбувалося падіння індексу фосфорилування та термодинамічного контролю дихання мітохондрій. Подібні функціональні зміни мітохондрій зумовили погіршення їхньої ультраструктури. Так, МФП-індукована гіпоксія призводила до появи набряклих мітохондрій з конденсованим матриксом та зниженою електронною щільністю. Реєстрували велику кількість пошкоджених крист (рис. 2). Інтенсивність встановлених нами ультраструктурних змін відображалася підвищенням загальної кількості пошкоджених мітохондрій відносно суспензії без внесення МФП (табл. 1). Подібні ультраструктурні зміни були типовими для гіпоксичних пошкоджень тканин, що знайшло своє відображення в роботах М. М. Боголепова [18]. Дійсно, при проведенні дослідів *in vivo* нами було встановлено, що гостра церебральна ішемія супроводжувалася подібними ультраструктурними змінами мітохондрій на тлі розвитку



Вплив Ангіоліну та Цереброкуруну на кількість пошкоджених мітохондрій за умов гіпоксії *in vitro* та *in vivo*

| Серія (n = 10) | Кількість пошкоджених мітохондрій (абсолютне значення) |
|---|--|
| <i>In vitro</i> | |
| Суспензія нейронів без внесення МФП | 8,0 ± 1,5 |
| МФП-гіпоксія (контроль) | 60,0 ± 4,8 |
| МФП-гіпоксія + Ангіолін, 10 ⁻³ М | 29,6 ± 3,8* |
| МФП-гіпоксія + Цереброкурин, 40 мкл/г тканини | 32,0 ± 3,6* |
| <i>In vivo</i> | |
| Псевдооперовані щури | 6 |
| Ішемія, 4 доба (контроль) | 74,0 ± 4,8 |
| Ішемія, 4 доба + Ангіолін, 50 мг/кг | 55,0 ± 3,9** |
| Ішемія, 4 доба + Цереброкурин, 150 мг/кг | 68,0 ± 3,5* |

Примітки. **p* ≤ 0,05 відносно контролю; ***p* ≤ 0,05 відносно Цереброкуруну.

їхніх функціональних порушень (падіння заряду мітохондрій, ІФ, ТКД, відкриття мітохондріальної пори) (табл. 1; 2).

Так, 4-добова церебральна ішемія характеризувалася пошкодженням ультраструктури нейронів та мітохондрій СА1 зони гіпокампа за вакуолярно-літичним типом. Порушення ультраструктури нейронів мали мозаїчний характер, частина нейроцитів була з ознаками некротичних та некробіотичних змін. Більшість нейронів містили ядра з ознаками значного зменшення функціональної активності, фрагментованою нуклеолою. У перикаріоні спостерігали вакуолярно-літичне пошкодження органел. Крім того, у нейронах СА1 зони спостерігали явище хроматоліза – набухання та вакуолізації цистерн

пластинчастого апарату з деформацією цистерн та їхньою фрагментацією. Більшість мітохондрій були збільшені в розмірі, мали фрагментовану зовнішню мембрану, зруйновані кристи. Іноді спостерігали мітохондрії гігантських розмірів за рахунок значного набряку матриксу (рис. 3). Крім того, було зафіксовано незначну кількість мікромітохондрій з гетероморфною структурою. На тлі встановлених нами ультраструктурних порушень нейронів та їхніх мітохондрій було зафіксовано значне збільшення загальної кількості (на 90 %) пошкоджених мітохондрій порівняно з псевдооперованими тваринами, що відображало встановлену нами в досліджах *in vitro* та *in vivo* загальну спрямованість деструктивних процесів за умов гіпоксії (табл. 1).

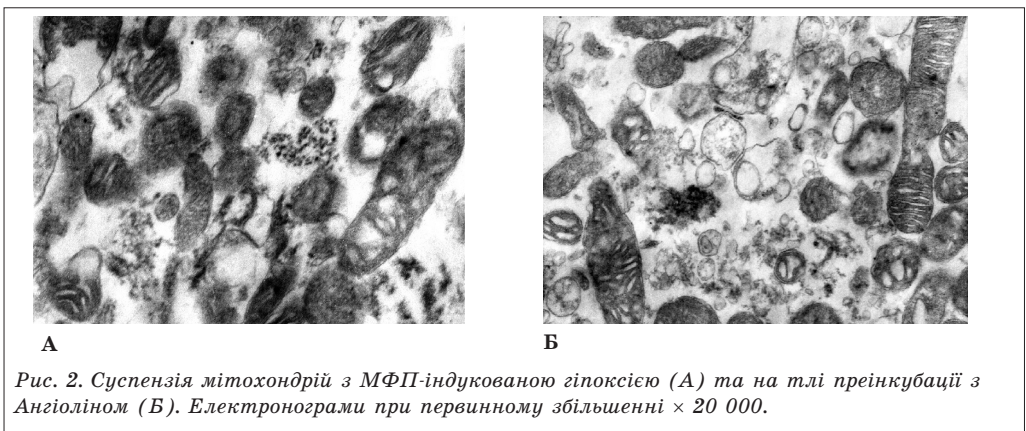


Рис. 2. Суспензія мітохондрій з МФП-індукованою гіпоксією (А) та на тлі преінкубації з Ангіоліном (Б). Електронोगрами при первинному збільшенні × 20 000.

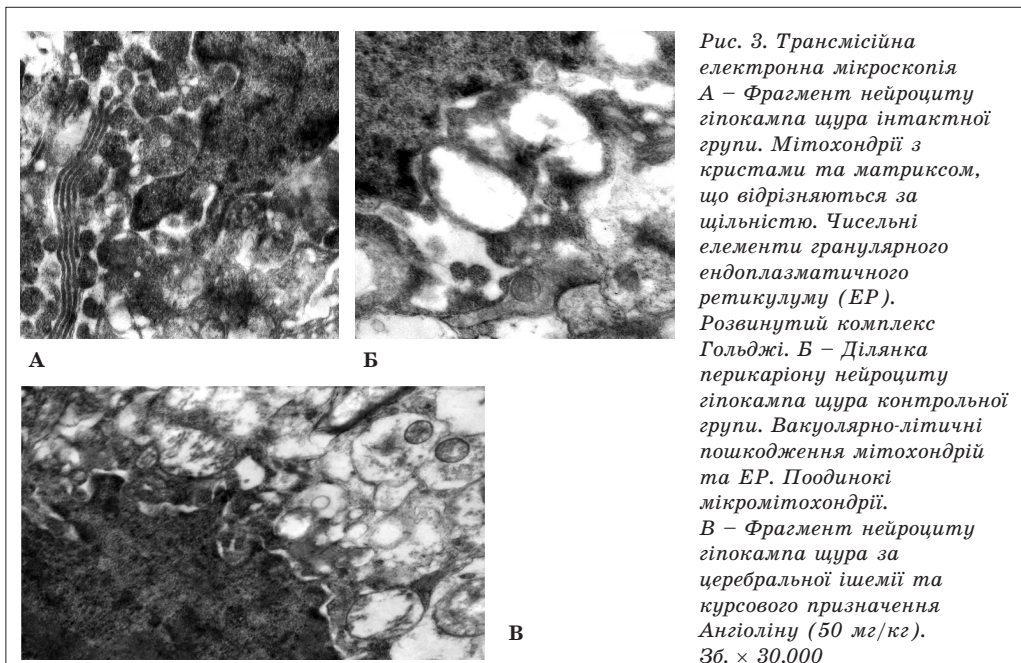
Показники функціональної активності мітохондрій за умов гіпоксії *in vitro* та *in vivo* та за впливу Ангіоліну та Цереброкурурину

| Серія (n = 10) | ЕЗ | ЕП | ІФ | ТКД |
|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| <i>In vitro</i> | | | | |
| Суспензія нейронів без внесення МФП | 2,280 ± 0,061 | 7,50 ± 0,11 | 5,400 ± 0,041 | 22,80 ± 0,13 |
| МФП-гіпоксія (контроль) | 0,68 ± 0,04 | 4,200 ± 0,028 | 2,290 ± 0,048 | 12,700 ± 0,066 |
| МФП-гіпоксія + Ангіолін, 10 ⁻³ М | 1,900 ± 0,058* | 6,800 ± 0,064* | 4,900 ± 0,073* | 18,500 ± 0,031* |
| МФП-гіпоксія + Цереброкурурин, 40 мкл/г тканини | 2,00 ± 0,04* | 7,100 ± 0,085* | 4,70 ± 0,03* | 17,200 ± 0,064* |
| <i>In vivo</i> | | | | |
| Псевдооперовані щури | 0,880 ± 0,017 | 5,60 ± 0,02 | 4,20 ± 0,03 | 16,60 ± 0,05 |
| Ішемія, 4 доба (контроль) | 0,580 ± 0,014 | 1,68 ± 0,02 | 1,20 ± 0,14 | 4,50 ± 0,04 |
| Ішемія, 4 доба + Ангіолін, 50 мг/кг | 0,87 ± 0,02* | 6,10 ± 0,02* | 4,90 ± 0,07* | 17,20 ± 0,06* |
| Ішемія, 4 доба + Цереброкурурин, 150 мг/кг | 0,850 ± 0,034* | 5,400 ± 0,014* | 4,80 ± 0,04* | 16,90 ± 0,031* |

Примітка. * $p \leq 0,05$ відносно контролю.

Корекція морфофункціональних порушень мітохондрій Ангіоліном та Цереброкурурином призводила до статистично значимих змін. Як видно з таблиці 2, внесення до інкубаційного

середовища Ангіоліну (10⁻³ М) та Цереброкурурину (40 мкл/г тканини) та їхнє курсове призначення тваринам з гострою церебральною ішемією призводило до покращання функціонального



стану мітохондрій. З таблиці 2 видно, що на тлі внесення в інкубаційне середовище Ангіоліну відбувалося підвищення ЕЗ, ЕП, ІФ та ТКД у середньому на 64 %, 38 %, 53 % та 31 % відносно показників суспензії нейронів з МФП-індукованою гіпоксією відповідно. Важливо зазначити, що паралельно з цим відбувалося статистично достовірне відносно контрольної суспензії обмеження відкриття мітохондріальної пори. Подібна дія Ангіоліну також була встановлена при проведенні досліджень *in vivo*. На тлі введення Ангіоліну щурам з 4-добовою ішемією було зареєстровано покращання енергетичного метаболізму (підвищення ЕЗ, ЕП, ІФ, ТКД – на 33 %, 72 %, 75 %, 73 %) та зменшення проникності мембран мітохондрій порівняно з показниками контрольної групи тварин.

При вивченні ефектів Цереброкуруину нами також було зареєстровано його вплив на досліджені показники. Ефекти Цереброкуруину були односпрямовані з ефектами Ангіоліну. Так, при внесенні його в суспензію нейронів з МФП-гіпоксією реєстрували покращання енергетичного метаболізму (підвищення ЕЗ, ІФ, ТКД) на тлі зменшення відкриття МП. Подібна дія була зареєстрована також за умов моделювання церебральної ішемії. Курсове призначення Цереброкуруину (150 мг/кг) сприяло коригуванню енергетичного метаболізму тканини головного мозку та зменшенню явищ мітохондріальної дисфункції порівняно з контрольною групою тварин.

Позитивна дія Ангіоліну та Цереброкуруину на клітинний енергетичний метаболізм та схоронність мітохондрій за умов гострої ішемії проявлялася в покращанні під їхнім впливом морфологічної ультраструктури нейронів та їхніх мітохондрій (табл. 1; рис. 3). На тлі призначення досліджуваних препаратів порушення ультраструктури нейронів мали більш різноманітний характер порівняно з тваринами контрольної групи. У перикаріоні реєстрували помірну дезорганізацію гранулярного ретикулуму з утворенням вакуолеподібних цистерн. Більшість нейронів містили ядра з активною нуклеоплаз-

мою. Нуклеолема була стабільною, без фрагментації. Окрім поодиноких нейронцитів з ознаками некробіотичних змін спостерігали фігури апоптозу. В основному – це початкові стадії апоптичних процесів, що розвивалися за мітохондріальним типом. Подібний вплив Ангіоліну та Цереброкуруину на процесі клітинної гибелі є, на нашу думку, ключовим моментом їхньої дії. Відомо, що апоптотична загибель нейронів є оптимальним, упорядкованим процесом припинення життєдіяльності деструктивно змінених нейронів, при якому стабілізуються клітинні мембрани, уміст клітин утилізується шляхом утворення фігур апоптотичних тілець та їхнього фагоцитозу, без розвитку запального процесу. На тлі терапії Ангіоліном і Цереброкуруином мітохондрії нейронів були різноманітними за структурою. Спостерігали збільшені в розмірах мітохондрії з вакуолярним типом пошкодження, без ознак пошкодження зовнішніх мембран з помірним кристалізмом, електронно-прозорим матриксом; не виявляли гігантських мітохондрій. Частина мітохондрій була з відносно стабільними кристами, невеликих розмірів. Кількість мікромітохондрій суттєво не відрізнялася від контрольної групи, однак усі вони мали стабільні зовнішні мембрани та кристи, гомогенний матрикс без електронно-щільних включень.

Привертало увагу суттєве зменшення загальної кількості пошкоджених мітохондрій. У досліджах *in vitro* та *in vivo* досліджувані препарати зменшували кількість мітохондрій з ознаками пошкодження. Так, за умов МФП-гіпоксії зменшення склало в середньому 50 %. За моделювання церебральної ішемії на тлі введення Ангіоліну кількість пошкоджених мітохондрій знижувалася більше, ніж на 26 % відносно контролю. Ефекти Ангіоліну, як видно з таблиці 1, статистично достовірно перевищували показники Цереброкуруину, при введенні якого зменшення кількості пошкоджених мітохондрій склало 8 %.

Таким чином, проведеними експериментальними дослідженнями *in vitro* та *in vivo* встановлено, що новий оригі-

нальний препарат Ангіолін та вітчизняний нейропептидний препарат Цереброкурин проявляють комплексну енерготропну дію, яка обумовлена їхньою здатністю підвищувати енергетичний заряд мітохондрій, індекс фосфорилування, термодинамічний контроль дихання, а також обмежувати розвиток мітохондріальної дисфункції. Проявом їхньої енерготропної дії було покращання ультраструктури нейронів та їхніх мітохондрій, а також зменшення загальної кількості пошкоджених мітохондрій.

Механізм дії Цереброкуруну, на нашу думку, пояснюється, перш за все, його високою антиоксидантною активністю, що було продемонстровано нашими попередніми дослідженнями [19, 20]. Так, Цереброкурин здатен модулювати експресію глобальних факторів транскрипції, відповідальних за синтез ключових ферментів антиоксидантної активності – каталази, супероксиддисмути. Антиоксидантна активність дозволяє Цереброкуруну протидіяти окисній деструкції білків – переносників у дихальному ланцюгу мітохондрій за розвитку оксидативного стресу при ішемічному пошкодженні головного мозку, обмежуючи тим самим розвиток мітохондріальної дис-

функції та покращуючи енергообмін мозкової тканини.

Механізм дії Ангіоліну пов'язаний, по-перше, з наявністю в його молекулярній структурі SH-груп та його здатністю зв'язувати цитотоксичні деривати АФК, тим самим обмежуючи розвиток оксидативного стресу, що, у свою чергу, запобігає відкриттю мітохондріальної пори. Крім того, за рахунок SH-груп Ангіолін захищає транскрипційні фактори від окисної модифікації, а також підтримує редокс-гомеостаз у клітині. По-друге, Ангіолін здатен підвищувати вміст в тканинах головного мозку цитопротекторних HSP- та HIF-білків, що ймовірно зумовлено потенціюванням його антиоксидантного ефекту за рахунок введення до хімічної структури залишку лізину, який, у свою чергу, стабілізує третинну структуру HSP-білків.

Таким чином, новий вітчизняний препарат оригінальної структури L-лізин 1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат з робочою назвою Ангіолін, а також вітчизняний нейропептидний препарат Цереброкурин є високоєфективними препаратами з енерготропним механізмом дії, здатними доповнити базисну терапію та підвищити ефективність лікування гострої стадії ішемічного інсульту.

1. Клініко-нейрофізіологічна оцінка когнітивних функцій у хворих за хронічної ішемії головного мозку в період відновлення після хірургічного втручання / Л. Л. Чеботарьова, І. В. Степаненко, М. В. Глоба [та ін.] // Укр. нейрохірургіч. журн. – 2014. – № 1. – С. 10–15.
2. Дубенко О. Є. Причини і наслідки лакунарних інсультів головного мозку / О. Є. Дубенко, Г. Є. Костровська, С. Л. Костровський // Укр. неврологіч. журн. – 2007. – № 1. – С. 7–10.
3. Swerdlow R. H. Mitochondrial Medicine and the Neurodegenerative Mitochondriopathies / R. H. Swerdlow // Pharmaceuticals. – 2009. – № 2. – P. 150.
4. Лукьянова Л. Д. Регуляторная роль митохондриальной дисфункции при гипоксии и ее взаимодействие с транскрипционной активностью / Лукьянова Л. Д., Дудченко А. М. // Вестн. РАМН. – 2007. – № 2. – С. 3–13.
5. Mitochondrial preconditioning: a potential neuroprotective strategy / S. C. Correia, C. Carvalho, S. Cardoso [et al.] // Front Aging Neurosci. – 2010. – V. 26, № 2. – P. 138.
6. Huss J. D. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance / J. D. Huss, D. P. Kelly // J. Clin. Invest. – 2005. – V. 115. – P. 547–555.
7. Лукьянова Л. Д. Дисрегуляция аэробного энергетического обмена – типовой патологический процесс / Л. Д. Лукьянова // Дисрегуляторная патология. – М.: Медицина, 2002. – С. 188–215.
8. Антигипоксическая активность бис(N-ацетил-L-цистеинато)цинк(II)сульфат октагидрата в динамике острой нормобарической гипоксии / А. В. Евсеев, М. А. Евсеева, Э. А. Парфенов, В. А. Правдивцев // Психофармакология, биология, наркология. – 2006. – Т. 6, № 3. – С. 1270–1274.
9. Скромец А. А. Новые возможности нейропротекции в лечении ишемического инсульта / А. А. Скромец, Л. В. Стаховская, А. А. Белкин // Журн. неврологии и психиатрии. – 2008. – Т. 22. – С. 32–38.
10. Егоров А. А. Эндотелиотропные свойства L-лизина эсцината при моделировании ОНМК / Егоров А. А. // Тез. докл. II Междунар. молодежного мед. конгресса, С.-Петербург, 5-7 дек. 2007 г. – СПб., 2007. – С. 180.

11. Effect of Spin Trapping Compound PBN and Thiotriazoline on the Outcome from experimental Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats / I. Belenichev, S. Pavlov, E. Sokolik [et al.] // *Molecular Pharmacology*. – 2011. – V.1, Issue 3. – P. 90–95.
12. Павлов С. В. Вплив тільних антиоксидантів на вміст стрес-білка HSP 70 у гіпокампі монгольських щіданок з гострою ішемією головного мозку / С. В. Павлов // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2012. – № 1 (26). – С. 15–18.
13. Энерготропный механизм церебропротективной дії нового оригінального препарату «Лізиній» за умов моделювання гострого порушення мозкового кровообігу / І. Ф. Беленічев, С. В. Павлов, Л. І. Кучеренко, І. А. Мазур // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2013. – № 4–5. – С. 14–18.
14. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев [и др.]. – К.: ДФЦ МОЗ Украины, 2010. – 81 с.
15. Павлов С. В. Влияние нейропептидных препаратов на показатели энергетического метаболизма в головном мозге крыс с экспериментальной острой ишемией / С. В. Павлов // *Загальна патологія та патологічна фізіологія*. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 84–89.
16. Павлов С. В. Вплив тільних антиоксидантів на розвиток мітохондріальної дисфункції при моделюванні гострої ішемії головного мозку / С. В. Павлов // *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. – 2013. – № 1 (18). – С. 112–115.
17. Авцын А. П. Ультраструктурные патологии клетки / А. П. Авцын, В. А. Шалхамов. – М.: Наука, 1979. – 320 с.
18. Боголепов Н. Н. Ультраструктура мозга при гипоксии / Н. Н. Боголепов. – М.: Медицина, 1979. – 163 с.
19. Павлов С. В. Влияние нейропептидных препаратов на показатели энергетического метаболизма в головном мозге крыс с экспериментальной острой ишемией / С. В. Павлов // *Загальна патологія та патологічна фізіологія*. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 84–89.
20. Павлов С. В. Влияние Цереброкурина на содержание HSP 70 белка в ткани мозга крыс в условиях моделирования церебральной ишемии / С. В. Павлов // *Перспективы медицины та біології*. – 2012. – Т. IV, № 2. – С. 95–98.

І. Ф. Беленічев, С. В. Павлов, Л. І. Кучеренко

Нейро- та мітопротективний ефекти Ангіоліну та Цереброкуруну

Експериментальними та клінічними дослідженнями антигіпоксантив показано перевагу препаратів з метаболітопним типом дії. До таких препаратів можна віднести синтезований у Запорізькому державному медичному університеті новий лікарський засіб оригінальної структури – L-лізин 1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат з робочою назвою Ангіолін. З іншого боку, як нашими попередніми дослідженнями, так і роботами інших дослідників, встановлено виражений енерготропний та нейропротективний ефекти вітчизняного нейропептидного препарату Цереброкуруну. *Мета дослідження* – вивчення впливу Ангіоліну та Цереброкуруну на ультраструктуру нейронів та їхніх мітохондрій за умов гіпоксії *in vitro* та *in vivo*.

З метою моделювання гіпоксії *in vitro* до нейрональної суспензії вносили роз'єднувач тканинкового дихання – метилфенілтетрагідропіридин (МФП). Ішемію головного мозку моделювали шляхом двобічної оклюзії загальної сонної артерії. Відкриття мітохондріальної пори визначали спектрофотометрично за циклоспорин-А-чутливим поглинанням при 540 нм. Для оцінки процесів енергетичного обміну та функціональної активності мітохондрій розраховували наступні показники – енергетичний заряд, енергетичний потенціал, індекс фосфорилування, термодинамічний контроль дихання. Для електронно-мікроскопічних досліджень тканину головного мозку або суспензію мітохондрій фіксували в 3 % розчині глутаральдегіду. Далі за стандартною схемою заливали в епоксидну смолу Епон-812.

Проведеними експериментальними дослідженнями *in vitro* та *in vivo* встановлено, що Ангіолін та Цереброкурун проявляють комплексну енерготропну дію, зумовлену їхньою здатністю підвищувати енергетичний заряд мітохондрій, індекс фосфорилування, термодинамічний контроль дихання, а також обмежувати розвиток мітохондріальної дисфункції. Проявом їхньої енерготропної дії було покращання ультраструктури нейроцитів та їхніх мітохондрій. Крім того, при МФП-гіпоксії *in vitro* Ангіолін та Цереброкурун зменшували кількість пошкоджених мітохондрій у середньому на 50 %. За умов моделювання церебральної ішемії та введення Ангіоліну кількість пошкоджених мітохондрій знижувалася більш ніж на 26 % відносно контролю; Цереброкурун був менш ефективний, зменшення кількості пошкоджених мітохондрій склало 8 %.

Встановлений спектр дії досліджуваних препаратів є експериментальним обґрунтуванням їхнього введення до базисної терапії з метою підвищення ефективності лікування гострої стадії ішемічного інсульту.

Ключові слова: Ангіолін, Цереброкурун, ішемічне пошкодження *in vitro* та *in vivo*, ультраструктура мітохондрій

И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, Л. И. Кучеренко

Нейро- и митопротективный эффекты Ангиолина и Цереброкурина

Экспериментальными и клиническими исследованиями антигипоксантов показано преимущество препаратов с метаболитотропным типом действия. К таким препаратам можно отнести синтезированный в Запорожском государственном медицинском университете новый лекарственный препарат оригинальной структуры L-лизин 1,2,4-триазолил-5-тиоацетат с рабочим названием Ангиолин. Кроме того, нашими предыдущими исследованиями и работами других авторов продемонстрирован выраженный энерго- и нейротропный эффекты отечественного нейропептидного препарата Цереброкурина. *Цель исследования* – изучение влияния Ангиолина и Цереброкурина на ультраструктуру нейронов и их митохондрий в условиях гипоксии *in vitro* и *in vivo*.

С целью моделирования гипоксии *in vitro*, в нейрональную суспензию вносили разобщитель тканевого дыхания – метилфенилтетрагидропиридин (МФП). Ишемия головного мозга моделировали путем двусторонней окклюзии общей сонной артерии. Открытие митохондриальной поры регистрировали спектрофотометрически по циклоспорин-А-чувствительному поглощению при 540 нм. Для оценки процессов энергетического обмена и функциональной активности митохондрий рассчитывали следующие показатели: энергетический заряд, энергетический потенциал, индекс фосфорилирования, термодинамический контроль дыхания. Для электронно-микроскопических исследований ткань головного мозга или суспензию митохондрий фиксировали в 3 % растворе глутаральдегида. Далее по стандартной схеме заливали в эпоксидную смолу Эпон-812.

Проведенными экспериментальными исследованиями *in vitro* и *in vivo* установлено, что Ангиолин и Цереброкурин проявляют комплексное энерготропное действие, которое обусловлено их способностью повышать энергетический заряд митохондрий, индекс фосфорилирования, термодинамический контроль дыхания, а также ограничивать развитие митохондриальной дисфункции. Проявлением их энерготропного действия было восстановление ультраструктуры нейронов и их митохондрий. Кроме того, при МФП-гипоксии *in vitro* Ангиолин и Цереброкурин уменьшали количество поврежденных митохондрий в среднем на 50 %. В условиях моделирования церебральной ишемии, на фоне введения Ангиолина количество поврежденных митохондрий уменьшалось более чем на 26 % по отношению к контролю; цереброкурин оказался менее эффективным, снижение количества поврежденных митохондрий составило 8 %.

Установленный спектр действия исследуемых препаратов является экспериментальным обоснованием введения их в базисную терапию с целью повышения эффективности лечения острой стадии ишемического инсульта.

Ключевые слова: Ангиолин, Цереброкурин, ишемическое повреждение *in vitro* и *in vivo*, ультраструктура митохондрий

I. Belenichev, S. Pavlov, L. Kucherenko

Neuro- and mitoprotective effects of the Angiolin and Cerebrocurin

Nowadays it was showed priority of the antihypoxants with methabolitotropic effect in experimental and clinical studies. Such medication is L-lysine 1,2,4-triasolil-5-thioacetate, named Angiolin that was synthesized in the pharmaceutical chemistry department in Zaporizhia state medical university. This medication includes structural fragments of the thiotriasolin and L-lysine. Our previous studies, as other investigator's too, showed high energotropic and neurotropic effects of the other neuropeptide drug Cerebrocurin. *Aim of the study* was to investigate influence of the Angiolin and Cerebrocurin on the ultrastructure of the neurons and their mitochondria in conditions of the *in vivo* and *in vitro* hypoxia.

Methylphenylpyridinium (MPP) was added to the neuronal suspension to disunite tissue breathing for modeling of the *in vitro* hypoxia. Cerebral ischemia was modeled by bilateral arteria carotis occlusion. Energy methabolism and functional activity of the mitochondria were assessed on energy charge, energy potential, phosphorylation index, thermodynamic breathing control. Brain tissue was fixed with 3% solution of the glutaraldehyde for further microscopic studies. Then it was coated in epoxy resin Epon-812.

Experimental *in vitro* and *in vivo* data indicated that new original medication Angiolin and Cerebrocurin have complex energotropic activity. They increased energy potential, phosphorylation index, thermodynamic breathing control of the mitochondria, prevented mitochondrial dysfunction onset. There were positive changes of the neurocyte ultrastructure, decrease of the general quantity of the injured mitochondrias indicated as energotropic activity. In conditions of the model pathology with MPP (*in vitro*) mitochondria ultrastructure recovered in average of the 50 % after Angiolin usage. *In vivo* Angiolin had positive effect on the mitochondria structure in 26 %, Cerebrocurin – in 8 % in compared with control group. Such action of the investigated medications is an experimental rationale for their inclusion in the basic therapy to increase the effectiveness an acute stage of ischemic stroke treatment.

Key words: Angiolin, Cerebrocurin, ischemic injury *in vivo* and *in vitro*, ultrastructure of the mitochondria

Надійшла: 08.06.2014 р.

Контактна особа: Павлов Сергій Васильович, кафедра фармакології, Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035.
Тел.: + 38 0977970884. Електронна пошта: zsmu.smu@yandex.ua