

И. Ф. Беленичев, Е. С. Литвиненко

**Ферментативное и неферментативное звено тиол-дисульфидной системы в головном мозге экспериментальных животных с церебральной ишемией: эффекты селеназы***Запорожский государственный медицинский университет*

*Ключевые слова: селеназа, нейропротективная активность, церебральная ишемия, тиол-дисульфидная система*

Несмотря на достигнутые успехи практической неврологии в борьбе с возникновением и последствиями церебральной патологии, проблема фармакологической коррекции этой группы заболеваний остается одной из актуальных проблем медицины. Исследованиями последних лет установлено, что в патогенезе большинства заболеваний, определяющих большую процент смертности и инвалидизации населения (мозговые инсульты, инфаркт миокарда, онкологические заболевания, гипертоническая болезнь и прочие) важную роль играет оксидативный стресс, включающий свободно-радикальное и перекисное окисление, которые приводят к повреждению мембран и гибели клеток [1–3].

Ключевая роль в защите клетки от оксидативного стресса отводится системе глутатиона [4]. Живая клетка использует три линии ферментативной защиты от активных соединений кислорода с помощью супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы (ГПП); глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (Г-S-T). Эти три линии защиты последовательно восстанавливают супероксидрадикалы, перекиси и гидроперекиси. Глутатион вносит основной вклад в функционирование антиоксидантной системы. Следовательно, глутатионовая антипероксидазная система эффективно защищает клетки от оксидативного стресса, и обычно только при ее недостаточности

или истощении возникают серьезные нарушения [5].

В последнее время в практике лечения больных с нарушениями мозгового кровообращения получили широкое распространение антиоксиданты (мексидол, тиотриозолин, эмоксипин и др.). Однако на сегодняшний день все имеющиеся нейропротекторные препараты, испытанные в мультифокальных клинических исследованиях, недостаточно эффективны [6–8].

Существенное антиоксидантное действие оказывают селеносодержащие соединения. Это связано с тем, что селен входит в активный центр ГПП. Антиоксидантный эффект селена ряд авторов объясняет его накоплением в очаге ишемии и прямым мембраностабилизирующим действием, а также за счет включения селена в Se-зависимую ГПП [9, 10]. Поэтому справедлива будет точка зрения, что механизмы антиоксидантного и других эффектов препаратов селена тесно связаны с процессами подавления образования свободных радикалов и гидроперекисей липидов [9, 10]. Селен в тканях мозга может модулировать аффинность глутаминных рецепторов, в частности NMDA. Снижая гипервозбудимость глутаматных рецепторов, селен уменьшает выброс возбуждающих аминокислот (глутамата и аспартата), тем самым, нейтрализуя проявления глутаматной «эксайтотоксичности». Еще одним немаловажным действием селена является его способность повышать экспрессию ГПП [11, 12].

*Цель исследования* – изучить влияние селеназы на показатели ферментативного и неферментативного звеньев

тиол-дисульфидной системы (ТДС) в условиях церебральной ишемии (в эксперименте).

**Материалы и методы.** Экспериментальная часть выполнена на 40 самцах монгольских песчанок массой 60–80 г. Всех животных содержали на стандартном рационе питания. Исследования на животных проводили в соответствии с Директивой Европейского Союза 2010/10/63 ЕУ. Согласно с программой исследования, использовали общепринятую в данное время модель экспериментального острого нарушения мозгового кровообращения – билатеральную перевязку общей сонной артерии. Операцию выполняли под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг), путем хирургического доступа выделяли общую сонную артерию и накладывали на нее шелковую лигатуру [13]. Для изучения действия препарата 10 животным вводили селеназу (Arzneimittel GmbH, Germany) – 50 мкг/кг в течение всего срока наблюдения (4 суток). Препараты вводили внутривенно 1 раз в сутки. Животным контрольной группы внутривенно вводили физиологический раствор. Животным группы сравнения по той же схеме вводили мексидол в дозе 100 мг/кг. По окончании эксперимента согласно протоколу исследования животных наркотизировали тиопенталом натрия (40 мг/кг), вскрывали черепную коробку и извлекали головной мозг [14]. Для исследования биохимических маркеров получали гомогенат головного мозга. Мозг промывали в 0,25 М сахарозном буфере (рН 7,4), охлажденном до 2 °С и измельчали в 10-кратном объеме (содержание белка 0,8–1,0 г/л) этого же буфера в гомогенизаторе Silent Crusher S (фирмы Heidolph). Грубую часть гомогената удаляли путем центрифугирования при 4 °С на центрифуге Ерpendorf-5804R в течение 30 мин. Для получения цитозольной и митохондриальной фракций, гомогенат центрифугировали при 11 000 g (4 °С) на центрифуге Sigma 3-30K. Полученный материал использовали для проведения биохимических и иммуноферментных методик. Общий белок определяли биуретовым методом. Тиол-дисульфидную систему в гомогенате мозга лаборатор-

ных животных оценивали по содержанию восстановленного глутатиона [15], свободных SH-групп [15], активности ферментов ГП [15], ГПП [15] и Г-S-T [15]. Анализ нормальности распределения оценивали по критериям Колмогорова-Смирнова (D) и Lilliefors, а также Shapiro-Wilk (W). В случае распределения, отличающегося от нормального, использовали U-критерий Mann-Whitney для 2 несвязанных выборок, для большего числа выборок – критерий Kruskal-Wallis с дальнейшим сравнением по Games-Howell.

Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003». Все результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где M – среднее значение, m – ошибка среднего; p – уровень значимости. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** При формировании у монгольских песчанок острого нарушения мозгового кровообращения (по типу ишемического инсульта) на 4 сутки эксперимента отмечено изменение в ТДС головного мозга животных. В этот срок наблюдения регистрировали повышение значений окисленных форм ТДС на фоне дефицита ее восстановленных форм в сравнении с группой интактных животных, что можно объяснить истощением антиоксидантной защиты на фоне окислительного стресса. Так, активности ГПП, ГП и Г-S-T снизились на 43,1 %, 36,9 % и 61,4 % соответственно. Снизились показатели содержания восстановленного глутатиона на 85,5 % и SH-групп – на 74,9 % при одновременном увеличении фракции окисленного глутатиона на 56,6 %. Это свидетельствует о том, что в условиях церебральной ишемии в нервной ткани формируется неблагоприятный метаболический фон (снижение активности ферментов тиол-дисульфидной системы), приводящий к развитию оксидативного стресса. В нашем исследовании мы попытались нивелировать окислительные сдвиги, ведущие в конечном итоге к гибели ней-

рона, посредством введения модулятора ТДС – селеназы. Введение селеназы приводило к нормализации тиол-дисульфидного равновесия и уменьшению окислительного стресса в нервной ткани.

Из данных таблиц видно, что у животных экспериментальной группы, получавших селеназу, к 4 суткам происходит статистически достоверное повышение (в 2,23 раза) активности ГПР, в 1,9 раза активности ГР и в 1,7 раза активности Г-S-T ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями животных без лечения. Изменения неферментативного звена

ТДС на фоне лечения селеназой представлены в таблице 2. Наблюдается повышение содержания восстановленных форм (глутатион восстановленный в 3,7; SH-группы в 2,25 раза) и снижение окисленных форм ТДС (снижение уровня окисленного глутатиона в 1,49 раза) ( $p < 0,05$ ). Референс-препарат мексидол уступал селеназе по степени влияния на исследуемые показатели ТДС. Это согласуется с результатами других исследований, которыми показано, что антиоксидантное действие мексидола направлено на торможение окислитель-

Таблица 1

**Состояние ферментативного звена тиол-дисульфидной системы в ткани головного мозга животных с острым нарушением мозгового кровообращения,  $M \pm t$**

Группа животных	Активность ГР, мкмоль/мг·хв	Активность ГПР, мкмоль/мг·хв	Активность Г-S-T, мкмоль/мг·хв
Интактные животные, n = 10	19,50 ± 1,35	61,80 ± 2,90	15,80 ± 1,07
Острое нарушение мозгового кровообращения (контроль), n = 10	5,20 ± 0,72	14,20 ± 1,54	6,10 ± 0,97
Острое нарушение мозгового кровообращения + селеназа 50 мкг/кг, n = 10	10,10 ± 0,85*	31,70 ± 2,19*	10,80 ± 1,12
Острое нарушение мозгового кровообращения + мексидол 100 мг/кг, n = 10	6,50 ± 0,41*	18,70 ± 0,91*	6,90 ± 0,72

Примечание. Здесь и в табл. 2: \*изменения достоверны по отношению к группе контроля ( $p < 0,05$ ), n – количество животных в группе.

Таблица 2

**Состояние неферментативного звена тиол-дисульфидной системы в ткани головного мозга животных с острым нарушением мозгового кровообращения,  $M \pm t$**

Группа животных	Содержание SH-группы мкмоль/г белка	Содержание глутатиона восстановленного мкмоль/г ткани	Содержание глутатиона окисленного мкмоль/г ткани
Интактные животные, n = 10	19,10 ± 1,82	4,300 ± 0,830	0,330 ± 0,080
Острое нарушение мозгового кровообращения (контроль), n = 10	4,80 ± 0,62	0,620 ± 0,051	0,760 ± 0,610
Острое нарушение мозгового кровообращения + селеназа 50 мкг/кг, n = 10	10,80 ± 0,46*	2,300 ± 0,75*	0,510 ± 0,072
Острое нарушение мозгового кровообращения + мексидол 100 мг/кг, n = 10	6,30 ± 0,42*	0,923 ± 0,073*	0,722 ± 0,062

ной модификации белков [16]. Увеличение функционирования системы глутатиона в определенной степени позволяет восстановить редокс-равновесие и защитить мозг от активных форм кислорода и продуктов пероксидации [17, 18]. Проведение экспериментальной церебропротекторной терапии селеназой у монгольских песчанок с острой ишемией головного мозга способствует снижению интенсивности оксидативного стресса в нервной ткани. Подобное действие селеназы связано с реактивирующим влиянием на ГПР. В ходе метаболического процесса селен в виде селеноцистеина специфично встраивается в пептидную цепочку ГПР, повышая экспрессию последней [19, 20].

## Выводы

1. В результате проведенных исследований установлено, что эксперимен-

тальное острое нарушение мозгового кровообращения приводит к смещению тиол-дисульфидного равновесия (уменьшение восстановленных и увеличение окисленных форм ТДС).

2. Введение селеназы (50 мкг/кг/сут) животным с церебральной ишемией приводит к активации одного из компонентов эндогенной нейропротекции – ТДС: повышению активности ГПР в 2,23 раза, ГР – в 1,9 и Г-S-T – в 1,7 раза. Уровень глутатиона восстановленного увеличился в 3,7 раза, SH-групп – в 2,25 раза. На этом фоне содержание окисленного глутатиона снизилось в 1,49 раза.

3. Полученные результаты исследования являются экспериментальным обоснованием применения модулятора экспрессии ГПР – селеназы в качестве средства комплексной нейропротективной терапии.

1. Гомазков О. А. Нейрохимия ишемических и возрастных патологий мозга / О. А. Гомазков. – М. : Высшая школа, 2003. – 200 с.
2. Современные представления о механизмах патогенеза повреждений мозга и нейропротекторной терапии / Шанько Ю. Г., Танин А. Л., Наледько А. Н. [и др.] // ARS MEDICA. – 2009. – № 3 (13). – С. 97–105.
3. Исайкин А. И. Патогенетические аспекты терапии ишемического инсульта / Исайкин А. И. // Трудный пациент. – 2010. – Т. 8, № 4. – С. 27–30.
4. Антиоксиданти: клініко-фармакологічний аспект / Чекман І. С., Беленічев І. Ф., Горчакова Н. О. [та ін.] // Український медичний часопис. – 2014. – № 1 (99). – С. 22–28.
5. Орлова А. С. Соматические расстройства и свободнорадикальные процессы при цереброваскулярной болезни / Орлова А. С. // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 8. – С. 220–224.
6. Рациональная нейропротекция / Беленічев І. Ф., Черний В. І., Колесник Ю. М. [и др.]. – Донецк : Издатель Заславский А. Ю., 2009. – С. 262.
7. Современные возможности терапии мозгового инсульта. В прицеле – нейропротекция / Одинак М. М., Янишевский С. Н., Цыган Н. В. [и др.] // Обзорение психиатрии и медицинской психологии. – 2012. – № 4. – С. 98–102.
8. Луцкий М. А. Некоторые особенности этиологии и патогенеза ишемического инсульта / Луцкий М. А., Фролов В. М., Бочарникова Н. М. // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 652–655.
9. Aldwin Suryo Rahmanto. Selenium-containing Amino Acids as Direct and Indirect Antioxidants / Aldwin Suryo Rahmanto, Michael J. Davies // Life. – 2012. – № 64 (11). – P. 863–871.
10. Selenium preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and reduces infarct volume after focal cerebral ischemia / Suresh L. Mehta, Santosh Kumari, Natalia Mendeleev, P. Andy Li // BMC Neuroscience. – 2012. – № 12 (3). – P. 45–50.
11. Selenium effectively inhibits 1,2-dihydroxynaphthalene-induced apoptosis in human lens epithelial cells through activation of PI3-K / Xiangjia Zhu, Kun Guo, Yi Lu // Akt pathway. Molecular Vision. – 2011. – № 17. – P. 2019–2027.
12. Ганцгорн Е. В. Патфизиологические основы современной фармакотерапии острой нейропротекции / Ганцгорн Е. В., Хлопонин Д. П., Макляков Ю. С. // Медицинский вестник Юга России. – 2013. – № 2. – С. 4–12.
13. Frequency and determinants of lipid testing in ischemic stroke and transient ischemic attack: findings from get with the guidelines–stroke / Smith E. E., Pan W., Olson D. [et al.] // Stroke. – 2010. – V. 41 (2). – P. 232–238.
14. Арушанян Э. Б. Инсульт и эпифиз / Арушанян Э. Б., Наумов С. С. // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2009. – № 12, (Вып. 2). – С. 67–74.

15. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: методические рекомендации // Чекман И. С., Губский Ю. И., Беленичев И. Ф. [и др.]. – К., 2010 – 81 с.
16. Буй Тхи Минь Тху. Фармакологическая характеристика селеносодержащих соединений (обзор) / Буй Тхи Минь Тху // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. Вып. 62. – Пятигорск : Пятигорск. ГФА, 2007. – С. 448–450.
17. Экспрессия васкулоэндотелиального фактора роста и характеристика эндотелиоцитов сосудов головного мозга животных с церебральной ишемией: Фармакологические эффекты нового метаболитропного препарата Лизиний / Колесник Ю. М., Беленичев И. Ф., Мазур И. А. [и др.] // Патология. – 2011. – Т. 8, № 2. – С. 89–95.
18. Изучение глутатиона и ферментов его метаболизма у больных старших возрастных групп с хронической церебральной ишемией / Кулинский В. И., Колесниченко Л. С., Шпрах В. В. [и др.] // Бюллетень ВЦНЦ СО РАМН. – 2005. – Т. 1 (39). – С. 63–65.
19. Halliwell B. Free radical in Biology and Medicine / Halliwell B., Gutteridge M. C. – Oxford. Clarendon press, 1999. – 320 p.
20. Велесницкая Д. В. Использование глутатиона для перорального приема в целях увеличения его концентрации в крови крыс / Велесницкая Д. В., Пехота Н. Н., Ценкель Н. А. // Фундаментальные науки – медицине. Материалы международной научной конференции: тез. док. – Минск, 2013. – С. 122–124.

**И. Ф. Беленичев, Е. С. Литвиненко**

### **Ферментативное и неферментативное звено тиол-дисульфидной системы в головном мозге экспериментальных животных с церебральной ишемией: эффекты селеназы**

*Цель исследования* – изучить влияние селеназы на показатели ферментативного и неферментативного звеньев тиол-дисульфидной системы (ТДС) в условиях церебральной ишемии (в эксперименте).

Ишемию моделировали путем необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий у монгольских песчанок (*Meriones unguiculatus*). Животным с церебральной ишемией селеназу вводили внутривентрикулярно в дозе 50 мкг/кг один раз в сутки в течение 4 суток после операции, эталонный антиоксидант мексидол – по той же схеме в дозе 100 мг/кг. Антиоксидантное действие селеназы оценивали по показателям ферментативного (активность глутатионпероксидазы (ГПР), глутатионредуктазы (ГР), глутатионтрансферазы (Г-S-T)) и неферментативного (содержание глутатиона восстановленного, глутатиона окисленного и SH-групп) звеньев тиол-дисульфидной системы, которые определяли биохимическими методами в цитозольной фракции гомогената головного мозга.

Показано, что у животных контрольной группы на 4 сутки после окклюзии сонных артерий наблюдались нарушения в тиол-дисульфидной системе головного мозга – дисбаланс между восстановленными и окисленными интермедиатами на фоне угнетения активности ГПР, ГР и Г-S-T по сравнению с интактной группой. Введение селеназы в течение 4 суток приводило к нормализации баланса восстановленных/окисленных форм глутатиона на фоне повышения активности глутатион-зависимых ферментов, особенно ГПР, по сравнению с группой контроля. Мексидол по влиянию на изучаемые показатели ТДС уступал селеназе.

Результаты исследования экспериментально обосновывают целесообразность применения селеназы в комплексной терапии ишемического инсульта.

*Ключевые слова:* селеназа, антиоксидантная активность, церебральная ишемия, тиол-дисульфидная система

**І. Ф. Беленічев, О. С. Литвіненко**

### **Ферментативна та неферментативна ланки тиол-дисульфідної системи в головному мозку експериментальних тварин з церебральною ішемією: ефекти селенази**

*Мета дослідження* – вивчення впливу селенази на показники ферментативної та неферментативної ланок тиол-дисульфідної системи (ТДС) за умов церебральної ішемії (в експерименті).

Ішемію моделювали шляхом незворотної білатеральної оклюзії загальних сонних артерій у монгольських піщанок (*Meriones unguiculatus*). Тваринам з церебральною ішемією селеназу вводили внутривентрикулярно в дозі 50 мкг / кг один раз на добу протягом 4 діб після операції. Еталонний антиоксидант мексидол вводили за такою самою схемою в дозі 100 мг/кг. Антиоксидантну дію селенази оцінювали за показниками ферментативної (активність глутатионпероксидази (ГПР), глутатионредуктази (ГР), глутатионтрансферази (Г-S-T)) і неферментативної (уміст глутатиону відновленого, глутатиону окисленого та SH-груп) ланок тиол-дисульфідної системи, які визначали біохімічними методами в цитозольній фракції гомогенату головного мозку.

Показано, що в тварин контрольної групи на 4 добу після оклюзії сонної артерії спостерігали порушення в тиол-дисульфідній системі головного мозку – дисбаланс між відновленими та окисле-

---

---

ними інтермедіатами на тлі пригнічення активності ГПР, ГР та Г-S-T порівняно з інтактною групою. Введення селенази протягом 4 днів призводило до нормалізації балансу відновлених/окиснених форм глутатіону на тлі підвищення активності глутатіон-залежних ферментів, особливо ГПР, порівняно з групою контролю. Мексидол за впливом на досліджувані показники ТДС поступався селеназі.

Результати дослідження експериментально обґрунтовують доцільність застосування селенази в комплексній терапії ішемічного інсульту.

*Ключові слова: селеназа, антиоксидантна активність, церебральна ішемія, тиол-дисульфідна система*

**I. F. Belenichev, E. S. Litvinenko**

### **Enzymatic and non-enzymatic links of thiol-disulfide system in the brain of experimental animals with cerebral ischemia: effects of selenase**

*The aim of this study* was to estimate the influence of selenase on the markers of enzymatic and non-enzymatic links of thiol-disulfide system (TDS) in conditions of cerebral ischemia (in the experiment).

Ischemia was induced by irreversible bilateral occlusion of the common carotid arteries in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Selenase was injected to the animals with cerebral ischemia once a day during 4 days after surgery in a dose of 50 g/ kg intraperitoneally. Reference antioxidant mexidol was injected by the same schedule in a dose of 100 mg/kg. Antioxidant activity of selenase was assessed by the markers of enzymatic (glutathione peroxidase (GPR), glutathione reductase (GR), glutathione (TST)) and non-enzymatic (recovered glutathione, oxidized glutathione and SH-group) links of thiol-disulfide system which were determined by biochemical methods in the cytosolic fraction of the brain homogenate.

Ischemic animals showed significant changes of thiol-disulfide system markers in the brain: the disbalance between reduced and oxidized intermediates for background suppression activity of GPR, GR and TST in comparison with the intact group. The animal group treated with selenase for 4 days demonstrated significantly increased levels of enzymatic and non enzymatic TDS markers, especially GPR, in comparison with the control group. Mexidol was inferior to selenase by the influence on the studied TDS parameters.

The results demonstrate the possibility of applying selenase in the complex therapy of cerebral ischemia.

*Key words: selenase, antioxidant activity, cerebral ischemia, thiol-disulfide system*

---

Поступила: 26.01.2015 г.

**Контактное лицо:** Беленичев Игорь Федорович, доктор биологических наук, профессор, кафедра фармакологии и медицинской рецептуры, Запорожский государственный медицинский университет, д. 26, просп. Маяковского, г. Запорожье, 69035. Тел.: +38 0 61 34 27 41. Электронная почта: ifb1914@mail.ru