

УДК 616.831-005:616-018.74]-085.272.014.425]-092.9:599.322.4

С. В. Горбачова, І. Ф. Беленічев, А. В. Абрамов
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**ВПЛИВ ТІОЛОВИХ АНТИОКСИДАНТІВ НА ПРОЯВИ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ В СУДИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ З ПОРУШЕННЯМ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ**

Моделювання порушення мозкового кровообігу за допомогою двосторонньої оклюзії загальних сонних артерій викликало розвиток стабільної ендотеліальної дисфункції, яка проявлялася зростанням рівня гомоцистеїну і нітротирозину. Водночас спостерігали збільшення продукції стабільних метаболітів оксиду азоту і підвищення експресії нейрональної та індуцибельної NO-синтази. Проведення фармакотерапії тіотриазоліном, α -ліпоєвою кислотою, тіоцетамом і ангіоліном продемонструвало здатність препаратів тією чи іншою мірою пригнічувати прояви ендотеліальної дисфункції судин головного мозку. Позитивний вплив препаратів полягав в обмеженні нітрозативного стресу, нормалізації рівня гомоцистеїну й експресії нейрональної NO-синтази. Виявлено патобіохімічні ефекти, зумовлені наявністю в структурі використаних нейтропротекторів тіольної групи, що дозволяє цим препаратам знижувати окисне пошкодження молекул та підвищувати біодоступність оксиду азоту за умов ішемії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ендотеліальна дисфункція, порушення мозкового кровообігу, тіолові антиоксиданти, NO-синтаза.

ВСТУП. Судинні захворювання головного мозку, незважаючи на досягнення в діагностиці та лікуванні, як і раніше, є найважливішою медичною і соціальною проблемою. У країнах Східної Європи та СНД відзначають зростання захворюваності та смертності від судинних уражень мозку, що складає до 13 % щорічно. На даний час в Україні зареєстровано понад 3 млн пацієнтів з різними цереброваскулярними захворюваннями. Смертність від судинних захворювань мозку в нашій країні перевищує аналогічний показник більшості країн Європи та Азії: цереброваскулярна патологія є другою причиною в структурі смертності населення в нашій країні, третьою – у світі. За останні 10 років поширеність цих захворювань в Україні істотно зросла, особливо хронічних форм недостатності мозкового кровообігу [5].

Порушення функції ендотелію – один з універсальних механізмів патогенезу цереброваскулярних захворювань. Цей стан може сприяти розвитку атеросклерозу й атеротромбозу, підвищенню агрегаційної здатності моноцитів і тромбоцитів, модуляції гіперкоагуляції та порушенню вмісту ліпопротеїнів низької щільності. Ендотеліальна дисфункція (ЕД) – патологічний стан, який виникає в результаті порушення регіонального кровообігу та мікроциркуляції, що призводить до посиленого тромбоутворення і посиленої адгезії лейкоцитів. В організмі С. В. Горбачова, І. Ф. Беленічев, А. В. Абрамов, 2015.

нізмі при ЕД відбувається дисбаланс між продукцією вазодилатуючих, ангіопротекторних, ангіопроліферативних факторів – з одного боку і вазоконстрикторних, протромбінних, проліферативних – з іншого [3].

Головними причинами розвитку ЕД при цереброваскулярній патології є гіпоксія та ішемія нейронів мозку. Основна причина негативних наслідків – утворення при неповному відновленні кисню високореакційних, а тому токсичних вільних радикалів або продуктів, що їх генерують. За умов неповної ішемії або при спробі неадекватної реперфузії відбувається подальше постачання мозку глюкозою для анаеробного гліколізу, а це призводить до посилення лактатацидозу і збільшення ураження нейронів [9].

Доцільно включити в комплексну терапію мозкових інсультів препарати, що переривають каскад вільнорадикальних реакцій. Так, з цією метою використовують антиоксидантні препарати, що є пасткою різних активних форм кисню (АФК), – мексидол, емоксипін, тіотриазолін, тіоцетам [10]. Однією з речовин зі збалансованим механізмом дії є α -ліпоєва кислота – природний метаболіт організму, який відіграє важливу роль у мітохондріальних дегідрогеназних реакціях, здатний вступати в реакцію із супероксидним та гідроксильним радикалами, синглетним киснем, захищати мембрани, взаємодіючи з вітаміном С і глутатіоном [1]. Триває вивчення нового препарату (похідного тіотриазоліну) – ангіоліну,

який містить, крім тріазолового циклу і тіолової групи, залишок L-лізину. Використання саме цієї незамінної амінокислоти зумовлене успішним застосуванням препарату "L-лізину есцинат", що володіє вираженим протинабряковим, капіляростабілізуючим і протизапальним ефектами в неврології та нейрохірургії [6].

З огляду на вищесказане, метою даної роботи було вивчити вплив антиоксидантів, що містяться у своїй структурі тіолову групу, на прояви ендотеліальної дисфункції в судинах головного мозку щурів з порушенням мозкового кровообігу (ПМК) та можливість корекції цього порушення зазначеними препаратами.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 180–220 г, які перебували в стандартних умовах віварію (температура повітря: (22 ± 2) °С, світлий/темний цикл: 12/12 год). Їх поділили на шість груп (по 10 тварин у кожній): 1-ша – псевдооперовані; 2-га – тварини з експериментальним ПМК (контроль); 3-тя – ПМК+тіотриазолін у дозі 100 мг/кг; 4-та – ПМК+тіоцетам у дозі 100 мг/кг; 5-та – ПМК+ α -ліпоєва кислота у дозі 300 мг/кг; 6-та – ПМК+ангіолін у дозі 50 мг/кг. Всі експериментальні процедури й оперативні втручання здійснювали відповідно до Положення про використання лабораторних тварин в біомедичних дослідженнях. Порушення мозкового кровообігу викликали за допомогою незворотної двосторонньої оклюзії загальних сонних артерій. Процедуру виконували під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг), шляхом хірургічного доступу виділяли загальні сонні артерії, підводили під них шовкові лігатури і перев'язували. З експерименту тварин виводили під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг) [8].

Для імуноферментних та біохімічних досліджень використано фрагменти мозку, що розміщені в ділянці середньомозкової артерії і гомогенізовані в рідкому азоті. Вміст нітритозину визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу методом ELISA із застосуванням стандартного тест-набору "Nitro-tirosine ELISA Kit" ("HyCult biotechnology") згідно з доданою до набору інструкцією. Рівень гомоцистеїну в гомогенаті тканин мозку визначали імуноферментним методом за допомогою стандартного тест-набору виробництва "Нотосysteine" ("Axis-Shield Diagnostics") згідно з доданою до набору інструкцією.

Для проведення імуногістохімічних досліджень фрагменти мозку тварин фіксували в рідині Карнуа (18 год) і за стандартною схемою заливали в парапласт-X100, з них виготовляли серійні фронтальні 5-мікронні гістологічні зрізи в

ділянці постцентральної звивини. При цьому в проекції зрізу перебувала зона соматосенсорної кори великих півкуль, гіпокампа, судинної оболонки мозку, судинного сплетення шлуночків мозку, гілок середньомозкової та очної артерій. Інтенсивність експресії індуцибельної, нейрональної та ендотеліальної NO-синтази досліджували імуногістохімічним методом із використанням системи біопероксидази. Після стандартної процедури депарафінізації і дегідратації зрізи обробляли 3 % розчином перекису водню для блокування ендогенної пероксидази з подальшою обробкою кожного зрізу первинними поліклональними антитілами кроликів проти відповідних ізоформ NOS "KON RN5" ("Dako"). Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером та наносили вторинні антитіла. Інтенсивність експресії ізоферментів оцінювали згідно з щільністю NO-позитивних клітин. На флюоресцентному мікроскопі "Axioskop" ("Zeiss", Німеччина) досліджували NOS-позитивні клітини за допомогою відеокамери COHU-4922 (США) і вводили в систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 ("Kontron Electronic", Німеччина). Рівень нітритів визначали спектрофотометрично з реактивом Гріса.

Препарати вводили перорально з використанням зонда в зазначених дозах 1 раз на добу протягом 18 днів, починаючи з 1 дня після перев'язування артерій. Тваринам 1-ї та 2-ї груп протягом дослідження у відповідному обсязі вводили фізіологічний розчин.

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 та U-критерію Манна-Уїтні. Для всіх видів аналізу статистично значимими вважали відмінності з рівнем значимості менше 0,05 (95 %) [7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Ключову роль у формуванні ЕД за умов гіпоксичного ураження мозку відіграє оксид азоту. Ефекти NO залежать від його концентрації, місця синтезу, ступеня дифузії, здатності взаємодіяти з кисневими радикалами. Порушення синтезу фізіологічних концентрацій оксиду азоту відіграє важливу роль у механізмах ініціації та прогресування ендотеліальної дисфункції.

Під час досліджень встановлено значне зростання концентрації стабільних метаболітів оксиду азоту в тканинах мозку експериментальних тварин. Вміст цього показника збільшувався у 3,2 раза порівняно з групою псевдооперованих щурів та становив 16,22 мкмоль/л (табл. 1). Вказане

зростання відбувалося за рахунок активації експресії нейрональної та індукційної ізоформ синтази оксиду азоту (табл. 2). Так, відмічено значну експресію гена NO-синтази в гліальних клітинах та нейронах мозку, яка пов'язана зі зниженням біодоступності оксиду азоту та активацією геному клітини за умов глутаматної "ексайтотоксичності". Підвищення рівня NO при активації індукційної форми NO-синтази може чинити прямий цитотоксичний ефект або, зв'язуючись із супероксид-аніоном, утворювати нову сполуку – пероксинітрит, який володіє значною реакційною здатністю відносно компонентів клітин та молекул білків, викликаючи їхню модифікацію та окиснення. У свою чергу, пероксинітрит пошкоджує ендотеліальну ізоформу NO-синтази, результатом чого є порушення діяльності ензиму, який втрачає здатність переносити електрони до L-аргініну для утворення NO та переносить їх на молекулярний кисень з утворенням супероксид-аніона [2]. Це призводить до формування "порочного кола", в якому невелика кількість АФК викликає синтез більшої їх кількості та загибель клітини. В тканинах мозку експериментальних тварин відзначали значне зменшення NO-позитивних ендотеліоцитів (табл. 2).

Пероксинітрит за умов інтенсивного синтезу окиснює сульфгідрильні групи, залізовмісні центри білків та інших внутрішньоклітинних молекул. Маркером синтезу пероксинітриту є

рівень нітротирозину [4]. Моделювання порушення мозкового кровообігу в щурів призводило до розвитку нітрозативного стресу, що проявлялося значним підвищенням (у 5,3 раза) рівня нейротоксичної сполуки – нітротирозину з одночасною гіперпродукцією оксиду азоту (табл. 1).

Підвищення концентрації гомоцистеїну у тварин контрольної групи свідчить про формування оксидативного стресу, який є наслідком як ішемії, так і гіперпродукції оксиду азоту та його дериватів. Гомоцистеїн піддається окисненню, в результаті якого утворюються вільні радикали, що є токсичними для ендотеліальних клітин. За присутності гомоцистеїну судини втрачають еластичність та здатність до дилатації, крім того, знижується чутливість тканин до оксиду азоту [5]. Вміст гомоцистеїну в тканинах мозку при моделюванні ПМК збільшувався у 5,3 раза, що свідчить про високу інтенсивність оксидативного стресу. Крім того, високий рівень гомоцистеїну самостійно провокує оксидативний стрес за рахунок порушення лактат-піруватного обміну [3].

Введення тіолових нейропротекторів викликало різні за вираженням, проте схожі за направленістю біохімічні ефекти у тканинах мозку піддослідних тварин. Найбільш виражений позитивний вплив виявляли в групах щурів. Яким вводили тіотриазолін та ангіолін. Так, проведення терапії тіотриазоліном протягом 18 діб сприяло зменшенню нітротирозину та гомоцистеїну на

Таблиця 1 – Вміст оксиду азоту, гомоцистеїну та нітротирозину в тканинах мозку тварин із ПМК (M±m)

Група тварин	Гомоцистеїн, мкмоль/г білка	Нітротирозин, нмоль/г білка	NO ₂ ⁻ , мкмоль/л
Псевдооперовані	7,48±1,39	0,45±0,09	4,98±0,94
Тварини з ПМК (контроль)	57,85±9,92	2,41±0,44	16,22±2,82
Тварини з ПМК+тіотриазолін	31,27±3,71*	1,11±0,15*	8,49±1,48*
Тварини з ПМК+α-ліпоєва кислота	37,7±4,06*	1,57±0,29*	8,39±0,90*
Тварини з ПМК+тіоцетам	34,03±7,12*	1,09±0,24*	8,59±0,48*
Тварини з ПМК+ангіолін	30,12±2,93* ^а	0,90±0,20* ^а	7,36±1,51* ^а

Примітки. Тут і в наступній таблиці:

1. * – p<0,01 відносно групи тварин із ПМК.

2. ^а – p<0,001 відносно групи тварин із ПМК, яким вводили α-ліпоєву кислоту.

Таблиця 2 – Вплив тіолових антиоксидантів на інтенсивність експресії NO-синтази у тканинах мозку тварин із ПМК (M±m)

Група тварин	NOS-позитивні гліоцити, кількість клітин у полі зору	NOS-позитивні ендотеліоцити, кількість клітин у полі зору	NOS-позитивні нейрони, кількість клітин у полі зору
Псевдооперовані	15,33±2,19	30,8±4,91	9,33±1,54
Тварини з ПМК (контроль)	30,33±5,09	12,53±2,47	44,07±2,73
Тварини з ПМК+тіотриазолін	20,87±3,54*	22,2±2,67*	32,73±2,91*
Тварини з ПМК+α-ліпоєва кислота	24,33±3,41	18,67±3,11	36,0±2,92
Тварини з ПМК+тіоцетам	23,46±2,72*	23,53±2,9*	32,26±3,08*
Тварини з ПМК+ангіолін	17,07±3,19*	24,47±2,87*	24,33±2,74* ^а

45,8 і 53,8 % відповідно. Паралельно відмічали зниження інтенсивності експресії нейрональної NO-синтази на 25,7 %, що сприяло зменшенню продукції оксиду азоту на 47,6 % ($p < 0,05$).

У тканинах мозку тварин, яким вводили ангіолін, спостерігали зниження маркера нітрозативного стресу – нітротирозину на 47,3 %, що є наслідком нормалізації експресії нейрональної ізоформи NO-синтази (зниження на 44,8 %), та зменшення продукції оксиду азоту на 54,6 %. Особливістю ангіоліну була його здатність відновлювати експресію ендотеліальної NO-синтази, що свідчить про зменшення інтенсивності реакцій оксидативного та нітрозативного стресу при збільшенні біодоступності оксиду азоту. На цей факт вказує достовірне зниження нітротирозину, який є специфічним маркером синтезу пероксинітриту, на 47,3 % відносно показників контрольної групи. Слід відзначити, що серед усіх використаних в експерименті препаратів саме ангіолін мав найбільш виражений вплив відносно нормалізації синтезу ендотеліальної NO-синтази та вмісту оксиду азоту. Зменшення інтенсивності експресії вказаного ізоферменту на 95,3 % може бути пов'язане, на нашу думку, з вмістом у структурі сполуки амінокислоти L-лізину. Залишок лізину в тканинах мозку метаболізується до піпеколінової кислоти, яка посилює афінність ГАМК-бензодіазепінрецепторного комплексу. Цей ефект лізину особливо важливу роль відіграє за умов глутаматної "ексайтотоксичності", яка має місце при ішемії головного мозку та призводить до активації NO-синтази. Не менш важливою є здатність лізину замінити аргінін у реакція

синтезу оксиду азоту, що також сприяє зниженню проявів нітрозативного стресу. Наслідком вказаних ефектів препарату стало зниження рівня гомоцистеїну на 62,6 %, що вказує на нормалізацію метаболічних процесів та зменшення інтенсивності вільнорадикальних реакцій у тканинах головного мозку.

Тіоцетам сприяв нормалізації функціонування системи оксиду азоту, що проявлялося зниженням рівня нітритів на 47,0 %, нітротирозину – на 41,1 %, гомоцистеїну – на 54,7 %. Зменшення інтенсивності експресії нейрональної NO-синтази на 26,8 % спостерігали паралельно з відновленням вмісту ендотеліальної ізоформи. Введення α -ліпоєвої кислоти також мало позитивний ефект, одержані дані статистично відрізнялися від показників контрольної групи, але за вираженням отримані результати поступалися аналогічним показникам інших експериментальних груп.

ВИСНОВКИ. Отримані дані свідчать про перспективність використання нейропротекторів з антиоксидантним механізмом дії, які містять у своїй структурі тіолові групи (SH-), з метою корекції ендотеліальної дисфункції судин головного мозку за умов ішемічного ураження. Тіолові антиоксиданти є "пастками" (скавенджерами) оксиду азоту і його дериватів – пероксинітриту та іона нітрозонію, які утворюють із SH-групами стійкі комплекси, обмежуючи при цьому їх негативний вплив на молекули внутрішньоклітинних білків, результатом чого є обмеження нітрозативного та оксидативного стресу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В. А. Альфа-липоевая – дигидролипоевая кислоты – активная биоантиоксидантная и биорегуляторная система / В. А. Барабой // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 3. – С. 20–26.
2. Болдырев А. А. Свободные радикалы в нормальном и ишемизированном мозге / А. А. Болдырев, М. Л. Куклей // Нейрохимия. – 1996. – № 3. – С. 271–278.
3. Булаева Н. И. Эндотелиальная дисфункция и оксидативный стресс: роль в развитии кардиоваскулярной патологии / Н. И. Булаева, Э. Д. Голухова // Креативная кардиология. – 2013. – № 1. – С. 14–22.
4. Губський Ю. І. Антиоксидантна та церебропротективна дія N-, S-вмісного похідного хіназолону за гострої ішемії / Ю. І. Губський, І. Ф. Беленічев, С. І. Коваленко // Укр. біохім. журн. – 2012. – 84, № 5. – С. 89–96.
5. Завгородняя А. Н. Эндотелиальные механизмы патогенеза цереброваскулярной патологии / А. Н. Завгородняя, В. А. Малахов // Укр. мед. часопис. – 2006. – № 2 (52). – С. 32–39.
6. Павлюк И. В. Молекулярные аспекты нейропротективного действия нового препарата "Ангиолин" при формировании хронической алкогольной интоксикации у крыс / И. В. Павлюк // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. – 2013. – № 2 (Д). – С. 30.
7. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : Медиасфера, 2002. – 312 с.
8. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / О. В. Стефанов. – К. : Авіцена, 2002. – 527 с.

9. Супрун Е. В. Значення системи оксиду азоту в процесах нейродеструкції / Е. В. Супрун, Л. О. Громов, І. Ф. Беленічев // Нейронауки: теоретичні та практичні аспекти. – 2012. – № 1. – С. 10–14.

10. Турпаев К. Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов / К. Т. Турпаев // Биохимия. – 2002. – № 3. – С. 339–352.

С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев, А. В. Абрамов
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ВЛИЯНИЕ ТИОЛОВЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА ПРОЯВЛЕНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В СОСУДАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С НАРУШЕНИЕМ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Резюме

Моделирование нарушения мозгового кровообращения с помощью двусторонней окклюзии общих сонных артерий вызывало развитие стабильной эндотелиальной дисфункции, которая проявлялась в возрастании уровня гомоцистеина и нитротирозина. В то же время наблюдали увеличение продукции стабильных метаболитов оксида азота и повышение экспрессии нейрональной и индуцибельной NO-синтазы. Проведение фармакотерапии тиотриазолином, α -липоевой кислотой, тиоцетамом и ангиолином продемонстрировало способность препаратов в той или иной степени подавлять проявления эндотелиальной дисфункции сосудов головного мозга. Положительное влияние препаратов проявлялось в ограничении нитрозативного стресса, нормализации уровня гомоцистеина и экспрессии нейрональной NO-синтазы. Обнаружены патобioхимические эффекты, обусловленные наличием в структуре использованных нейропротекторов тиольной группы, что позволяет этим препаратам снижать окислительное повреждение молекул и повышать биодоступность оксида азота при ишемии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эндотелиальная дисфункция, нарушение мозгового кровообращения, тиоловые антиоксиданты, NO-синтаза.

S. V. Horbachova, I. F. Bielenichev, A. V. Abramov
ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

INFLUENCE OF THIOL ANTIOXIDANTS ON MANIFESTATION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN CEREBRAL VESSELS IN RATS WITH DISTURBANCE OF CEREBRAL CIRCULATION

Summary

Modelling of brain blood circulation violation by means of bilateral occlusion of the common carotid artery caused the development of stable endothelial dysfunction, which is manifested in the increased level of homocysteine and nitrotyrosine. At the same time there was observed an increase of production of stable metabolites of nitric oxide and increased expression of neuronal and inducible NO-synthase. Holding pharmacotherapy thiotriazoline, α -lipoic acid, tiocetam and angiolin showed the ability of medications in varying degrees depress the manifestations of the endothelial dysfunction of cerebral vessels. The positive influence of medications manifested in limiting nitrosative stress, normalize homocysteine levels and the expression of NO-synthase. Revealed pathobiochemical effects, caused by the presence in the structure of these neuroprotectors of the thiol group, what allowing these medicines abridge oxidative damage to molecules and increase the bioavailability of nitric oxide in ischemia.

KEY WORDS: endothelial dysfunction, disturbance of cerebral circulation, thiol antioxidants, NO-synthase.

Отримано 17.03.15

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