УДК 616.22: 616.127–005.4:612.084

*І.Ю. Яковлєва, І.Ф. Белєнічев**

МІТОПРОТЕКТОРНИЙ МЕХАНІЗМ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ ЯКТОНУ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ

Національний університет фізичного виховання і спорту України (м. Київ)

***Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя)**

Робота є фрагментом наукової тематики, що виконується на замовлення Міністерства України у справах сім'ї, молоді та спорту у Національному університеті фізичного виховання і спорту України „Скринінг методів біологічного впливу, які виявляють позитивний ефект при порушеннях метаболізму, зумовлених інтенсивними фізичними навантаженнями (№ держреєстрації 0105U001391).

Вступ. Попередніми дослідженнями встановлено, що при гострій недостатності мозкового кровообігу в експериментах на щурах похідне бурштинової кислоти яктон співставимий з іншим похідним бурштинової кислоти мексидолом за властивостями попереджати виникнення ішемічних порушень в головному мозку, а саме дефіциту макроергічних фосфатів, дискоординації у циклі Кребса, активації анаеробного гліколізу, розвитку оксидативного стресу і здатний зберігати морфо функціональну активність нейронів [11].

Разом з тим, відомо, що мексидол не тільки, як інші похідні бурштинової кислоти, пригнічує ліпідну пероксидацію, відновлює антиоксидантну систему в органах і тканинах, але також стимулює енергосинтезуючі функції мітохондрій, підвищуючи стійкість мозкової тканини до гіпоксії та ішемії [3, 12].

Мета дослідження. Встановлення механізму нейропротекторної активності яктону в дослідах in vitro, а також при моделюванні гострої недостатності мозкового кровообігу.

Об'єкт і методи дослідження. Для дослідження нейропротекторної активності яктону in vitro нейрони виділяли з кори головного мозку 4-тижневих щурів лінії Вістар. Виділення збагачених фракцій нейронів та нейроглії проводили в два етапи. На першому етапі мозкова тканина дезінтегрувалася з метою отримання клітинної суспензії, на другому – здійснювали диференціальне центрифугування в градієнті щільності цукрози та фіколу. Для отримання нейронів і нейроглії щурів декапітували, швидко виділяли мозок, кору головного мозку відокремлювали від білої речовини, подрібнювали та переносили в розчин, що містить 7,5 % полівінілпіролідону (ПВП), 1% волов'ячого сироваткового альбуміну (ВСА) та 10 мкМ $CaCl_2$. Отриману суспензію фільтрували через три сита під незначним тиском з метою зменшення втрат нейрональних клітин. Після послідовного пропускання через суспензію нашаровували на градієнт, що містив 1 М та 1,73 М цукрози. Центрифугування проводили при 6000 g. в рефрижераторній центрифузі VAC-25. В результаті центрифугування отримували два шари та щільний залишок. Верхній шар був представлений залишками мієлінових оболонок, другий шар складається з гліальних та нейрональних клітин. Залишок представлений тілами нейронів зі ступенем чистоти 90%. Надалі проводили додаткове очищення другого шару шляхом другого фільтрування та ультрацентрифугування. Виділені нейрональні клітини відмивали від цукрози та альбуміну охолодженим фізіологічним розчином [7]. Отриману таким чином клітинну суспензію розділили на серії: інтактну, контрольну і дослідні, в яких індукували розвиток глутаматної ексайтотоксичності внесенням в інкубаційну суміш NMDA (100 мкМ) [9]. В дослідних серіях індукували глутаматну «ексайтотоксичність» з додаванням яктону в концентрації 0,1 мкМ; 10 мкМ; 100 мкМ; 500мкМ. Суспензії інкубували протягом 1 години при t^o =37 °С. Для вивчення морфофункціонального стану нейронів готували мазки, які зафарбували етидіум бромідом (барвник, який вибірково зафарбовує деструктивно змінені клітини) [6]. Зображення нервових клітин отримували на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Німеччина) та за допомогою 8-бітної ССД-камери Cohu-4922 (Cohu inc.,США) вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDA S-386 (Kontron Electronik, Німеччина). Порушення мозкового кровообігу моделювали шляхом незворотньої однобічної перев'язки сонної артерії у монгольських піщанок (Veriones unicula-tus), масою 65-70 г., які за даними літератури останніх років найбільш часто використовують для моделювання порушень мозкового

кровообігу, що обумовлено роз'єднанням великого кола кровообігу, слабо розвиненою системою колатерального кровообігу [4, 16].

Яктон вводили один раз на добу протягом експерименту в дозі 100 мг/кг внутрішньочеревно, референс-препарат мексидол в дозі 100 мг/кг. В кожній серії було по 10 тварин. Інтактом були оперовані тварини, у яких під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг) з застосуванням хірургічного підходу виділяли сонні артерії, але не накладали лігатуру.

На 4-у добу тварин виводили з експерименту під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг). Головний мозок швидко виділяли та гомогенізували в рідкому азоті. Шляхом центрифугування виділяли цитозольну та мітохондріальну фракції.

Стан антиоксидантної системи оцінювали за вмістом в мітохондріальній фракції маркерів окислювального пошкодження білків – альдегідфенілгідразонів (АФГ), кетонфенілгідразонів (КФГ) [13] та маркеру окислювальної модифікації нуклеїнових кислот 8-гідроксигуаніну (8-OHG) [13], а також за активністю мітохондріальної Mn-супероксиддисмутази (Mn-SOD) [10]. Стан тіол-дисульфідної системи вивчали за концентрацією цистеїну та метіоніну й за зниженням вмісту гомо цистеїну в цитозольній фракції [8]. Оцінку явищ мітохондріальної дисфункції проводили за спектрофометричною реєстрацією відкриття мітохондріальної пори при 540 нМ ($Д_{540}$), що була викликана набуханням мітохондрій, а також за збереженням заряду мітохондрій [1, 14]. Для оцінки явищ біоенергетичних процесів в окремій пробі гомогенату головного мозку визначали АТФ, малат, активність сукцинатдегідрогенази (СДГ), цитохром-С-оксидази (ЦХО) [7]. Статистичну обробку результатів проводили методами математичної статистики із застосуванням пакетів прикладних программ «Біостатистика для Windows версія 4.03», «Microsoft Exel 2002» ліцензійної «STATISTICA® for Windows 6.0» (Stat soft inc). Для кожної досліджуваної ознаки визначили показники середньої арифметичної (M) та стандартної помилки репрезентативності середньої арифметичної (m). Нормальність розподілу перевіряли з застосуванням тесту Колмогорова-Смірнова. При умові відповідності нормальності розподілу різниці відносних значень оцінювалась із застосуванням критерію χ^2. Статистичну обробку даних проводили із застосуванням параметричного критерію t-Стьюдента, непараметричного критерію Уітні-Ману в рамках програми MS Exel. Вірогідними вважали різницю з рівнем вірогідності більше 95% ($p<0,005$). Також застосовували методи однофакторного дисперсійного аналізу, обґрунтування проведення якого перевіряли за критеріями W.G. Cochran та R. Bartlett [5].

Результати досліджень та їх обговорення. Проведеними експериментальними дослідженнями встановлено, що внесення яктону в концентраціях 100 мкМ в суспензію виділених нейронів з додаванням токсичної концентрації NMDA (100 мкМ) призвело до вірогідного пониження кількості клітин з ознаками некрозу **(табл.1)**. Збільшення концентрації в суспензії яктону до 500 мкМ не підвищувало нейропротекторний ефект препарату. Механізм дії яктону в дослідженнях in vitro можна пояснити обмеженням трансміттерного аутокоідозу завдяки посиленню афінності ГАМК рецепторів. Підтверджують це також роботи інших дослідників, які встановили вплив бурштинової кислоти на секрецію глутамата та модуляцію ГАМК рецепторів [9].

Таблиця 1

Вплив яктону (0,1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ) на кількість дегенеруючих нейронів в суспензії з додаванням NMDA

Серії	Кількість досліджень в серії	Кількість дегенеруючих нейронів у полі, що можна побачити M±m
Інтактні	15	3±1
Контроль (100 mkM NMDA)	15	91±5
0,1 mkM яктон + 100 mkM NMDA	15	92±8
10 mkM яктон + 100 mkM NMDA	15	71±5*
100 mkM яктон + 100 mkM NMDA	15	58±6*
500 mkM яктон + 100 mkM NMDA	15	60±3*

Примітка: *$p \le 0,05$ по відношенню до контролю.

Приймаючи до уваги наявність нейропротекторної дії яктону в дослідах in vitro, наступним етапом нашого дослідження було проведення оцінки ефекту препарату на мо-

делі перев'язки сонної артерії монгольським піщанкам з подальшим вивченням впливу на показники оксидативного стресу та мітохондріальної дисфункції енергетичного метаболізму. Так, введення експериментальним тваринам яктону в дозі 100 мг/кг призвело до зменшення вмісту в мітохондріальній фракції маркерів окислювального пошкодження білків – АФГ та КФТ, а також маркера окислювальної деструкції нуклеїнових кислот 8-OHG **(табл.2).**

Важливим моментом в дії яктону стала його активуюча дія на мітохондріальну СОД (Mn SOD) – головний антиокисний фермент в мітохондріях, який регулює відкриття мітохондріальної пори за рахунок гальмування «паразитарних» реакцій. Яктон підвищував, вірогідно, активність Mn SOD **(табл.2).**

Таблиця 2

Вплив яктону на деякі показники антиоксидантної системи і оксидативного стресу в мітохондріальній фракції головного мозку тварин з ГНМК на 4-у добу експерименту

Показники	Інтактні тварини	Тварини з ГНМК (контроль)	Тварини з ГНМК + яктон	Тварини з ГНМК + мексидол
АФГ, у.о./г білку	4,7±0,2	12,7±0,87	7,1±0,7*	10,1±0,7*
КФГ у.о./г білку	2,1±0,3	38,8±3,8	17,4±0,7*	16,4±0,5*
8-OHG нг/л	23,4±7,5	97,4±5,7	83,4±7,2	80,4±5,7
Mn-COD у.о./мг білку/хв	137,5±11,5	78,2±3,7	158,7±14,2*	112,7±12,2*

Примітка: * $p \le 0,05$ по відношенню до контролю.

Призначення яктону тваринам з ГНМК призвело до пониження впливу гомоцистеїну і підвищенню рівня відновленого цистеїну, що свідчить про модулюючий вплив препарату на тіол-дисульфідну рівновагу в головному мозку при ішемії **(табл.3)**

Таблиця 3

Вплив яктону на деякі показники тіол-дисульфідної системи в цитозольній фракції головного мозку тварин з ГНМК на 4-у добу експеримента

Показники	Інтактні тварини	Тварини з ГНМК (контроль)	Тварини з ГНМК + яктон	Тварини з ГНМК + месидол
Цистеїн мкм/г білку	44,7±1,2	15,7±1,8	27,1±2,1*	18,1±3,5
Метонін мкм/г білку	27,1±1,3	12,8±1,8	17,4±0,7	14,4±1,1
Гомоцистеїн мкм/г білку	6,4±0,5	34,4±3,7	11,4±07*	18,4±1,7*

Примітка: * $p \le 0,05$ по відношенню до контролю.

Призначення яктону гальмувало відкриття мітохондріальної пори мітохондрій нейронів ішемізованої півкулі, про що свідчить ріст оптичної щільності в суспензії мітохондрій [15]. При цьому відновлювався мітохондріальний потенціал мітохондрій, що свідчило про підвищення функціональної активності мітохондрій мозку тварини з ГНМК, яким вводили яктон **(табл.4).**

Таблиця 4

Вплив яктону на деякі показники мітохондріальної активності головного мозку тварин з ГНМК на 4-у добу експерименту

Показники	Інтактні тварини	Тварини з ГНМК (контроль)	Тварини з ГНМК + яктон	Тварини з ГНМК + мексидол
Відкриття мітохондріальної пори ($Д_{540}$ нм)	0,789±0,011	0,235±0,002	0,611±0,001*	0,467±0,005*
Мембранного потенціалу ($\Delta\psi$) мітохондрій	0,271±0,003	0,128±0,001	0,214±0,007*	0,164±0,001*

Примітка: * $p \le 0,05$ по відношенню до контролю.

Подібна дія яктону на функціональну активність мітохондрій та його властивість обмежувати активність оксидативного стресу пояснює нормалізацію енергетичного метаболізму в умовах ішемії [2]. Курсове призначення яктону сприяло значній активації окислювальної продукції енергії на дикарбоновій ділянці циклу Кребса (підвищення рівня малату). При цьому спостерігалося підвищення продукції АТФ в мітохондріальній фракції **(табл.5).**

Таблиця 5

Вплив яктону на вміст інтермедіатів енергетичного метаболізму в мітохондріальній фракції головного мозку тварин з ГНМК на 4-у добу експерименту.

Групи тварин	АТФ мкм/г тканини	Малат мкм/г тканини	СДГ мкм/г тканини	ЦХО мкм/г тканини
Інтактні тканини	3,54±0,06	0,46±0,02	12,8±0,21	23,1±2,1
Тварини з ГНМК (контроль)	1,50±0,02	0,21±0,01	7,1±0,12	12,2±0,8
Тварини з ГНМК + яктон	2,88±0,01*	0,48±0,03*	16,8±0,18*	18,1±1,7*
Тварини з ГНМК + мексидол	2,63±0,03*	0,41±0,03*	12,8±0,09*	16,8±1,7

Примітка: * $p \leq 0,05$ по відношенню до контролю.

Таким чином, внаслідок досліджень можна припустити, що в механізмі нейропротекторної дії яктону лежить його пряма мітопротекторна активність, яка реалізується внаслідок позитивного впливу на стан тіолдисульфідної системи та модуляції відкриття мітохондріальної пори (що відбувається за рахунок окиснення тіолових груп цистеїн залежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій: АТФ/АДФ-антипортер), так і за рахунок прямої енерготропної дії (інтенсифікація окислювальної продукції енергії). Яктон має односпрямовану нейропротекторну дію з мексидолом при ГНМК.

Висновки. В механізмі нейропротекторної дії яктону лежить обмеження трансмітерного аутокоідозу через посилення афінності ГАМК рецепторів. В дослідженні на монгольських піщанках при перев'язці сонної артерії яктон зменшував вміст мітохондріальної фракції маркерів окислювального пошкодження білків, активував мітохондріальну супероксиддисмутазу. Препарат також понижував вміст гомоцистеїну, підвищував рівень відновленого цистеїну, гальмував відкриття мітохондріальної пори, відновлював мембранний потенціал мітохондрій, підвищував активність СДГ, ЦХО малату і продукції АТФ співставимо з мексидолом.

Перспективи подальших досліджень. Представляє інтерес подальше дослідження можливих механізмів органопротекторної дії яктону в умовах впливу екстремальних факторів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акопова О.В. Инструкция открытия митохондриальной поры под действием Ca^{2+} в миокарде крыс / О.В. Акопова, В.Ф. Сагач // Укр. биохим. журнал. – 2004. – Т. 76., №1. – С. 48–50.
2. Беленичев И.Ф. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция Цереброкурином / И.Ф. Беленичев, Ю.М. Колесник, С.В. Павлов // Международный неврологический журнал. – 2008. – Т. 20, №4. – С. 23–29.
3. Воробьева О.В. Оксидантный стресс, ассоциированный с цереброваскулярной дисфункцией: возможности терапии / О.В. Воробьева // Фарматека. – 2010. – Т. 199, №5. – С. 1–5.
4. Галица В.В. Сравнительная оценка антиоксидантного действия производного [1,2,4]-триазино[4,3-Ci]-хиназолина, тиотриазолина и эмоксипина в условиях экспериментальной церебральной ишемии / В.В. Галица // Акт. питання фарм. та мед. науки та практики. Т.2. – Запоріжжя: Вид. ЗДМУ, 2008. – Вип. 21. – С. 196–199.
5. Лапач С.Н. Статистика в науке и бизнесе / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Изд-во «Морион». – 2002. – 639 с.
6. Пирс Э. Гистохимия / Э. Пирс. – Москва, 1962. – 962 с.
7. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): Под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та. – 1982. – 272 с.
8. Соколовский В.В. Тиодисульфидные соотношения крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма / В.В. Соколовский. – СПб, 1996. – 30 с.
9. Хижняк А.А. Участие возбуждающих аминокислотных трансмиттеров в механизме нейродеструкции и перспективные методы патогенетической коррекции / А.А. Хижняк, С.В. Курсов // Біль, знеболення, інтенсивна терапія. – 2003. – №1. – С. 43–46.
10. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и методы ее определения в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Сеней // Лаб. дело. – 1988. – №11. – С. 678–681.
11. Яковлєва І.Ю. Нейропротекторна дія яктону / І.Ю. Яковлєва, І.Ф. Белєнічев // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – Вип. 1. – С. 145–150.
12. Dhar-Mascareno M. Hypoxia – reoxygenation – induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells / M. Dhar-Mascareno, J.M. Cacramo // Free Radic. Biol. Med. – 2005. – Vol. 38. №10. – P. 1548–1554.
13. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M. Gutteridze. – Oxford: Clarendon Press, – 1985. – 346 p.
14. Lenartowicz E. Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria / E. Lenartowicz, P. Bernardi, G.F. Azzone / J. Bioenerg. Biomembr. – 1999. – Vol. 23, №4. – P. 679–688.
15. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing / G. Lenaz // Biochim. Biophis. Acta. – 1998. – Vol. 1366, №1/2. – P. 53–67.
16. Mc Grow C.P. Experimental cerebral infarction. Effects of phentobarbital in Mongolian Gerbils / C.P. Mc Grow // Arch. Neurol. – 1977. – Vol. 34, №6. – P. 334–336.

УДК 616.22:616.127–005.4:612.084

МИТОПРОТЕКТОРНЫЙ МЕХАНИЗМ НЕЙПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ЯКТОНА В УСЛОВИЯХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Яковлева И.Ю., Беленичев И.Ф.

Резюме. Представлены in vitro механизмы реализации нейропротекторного действия яктона in vivo и in vitro в сопоставлении с мексидолом. Установлено, что в суспензии нейронов крыс препараты могут повышать аффинитет ГАМК рецепторов, при перевязке сонной артерии монгольских пищанок препараты в митохондриальной фракции гомогенизата головного мозга, понижали содержание маркеров окислительной модификации белков, восстанавливали показатели антиоксидантной, тиол-дисульфидной системы, уровень АТФ, реализировали митопротекторную активность.

Ключевые слова: яктон, мексидол, острая недостаточность мозгового кровообращения, митопротекторная активность.

UDC 616.22:616.127–005.4:612.084

MITOPROTECTIVE MECHANISM of YACTON NEUROPROTECTIVE ACTIVITY in the CONDITIONS of EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA

Yakovleva I. U., Belenichev I.F.

Summary. In the experiments in vitro and in vivo mechanisms of yakton neuroprotective activity in comparison with mexidol are presented. It is stated that in the rats' neurons' suspension the drugs are able to increase the affinity to GABA receptors. In the conditions of arteria carotis bandagins of Veriones uniculatus the drugs in the mitochondrial fraction of encephalon homogenats decrease the markers of oxidative proteins' modification' content, restore antioxidative, thiol-dysulfate systems data, ATP level, realise mitoprotective activity.

Key words: yacton, mexidol, acute failure of cerebral circulation, mitoprotective activity.

Стаття надійшла 18.05. 2010 р.

УДК 616.8–009.1:616.711–007.5–092:612.76

А.А.Ярошевский

ОСОБЕННОСТИ ПАТОБИОМЕХАНИЧЕСКИХ ПАТТЕРНОВ У ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ЦЕРВИКАЛЬНЫМИ РЕФЛЕКТОРНЫМИ МЫШЕЧНО-ТОНИЧЕСКИМИ СИНДРОМАМИ

Харьковская медицинская академия последипломного образования (г. Харьков)

Работа выполнена согласно плана научно-исследовательских работ Харьковской медицинской академии последипломного образования «Диференційоване використання методів рефлексотерапії при міофасціальних синдромах», № госрегистрации 0108U002119.

Вступление. Широкое распространение мышечно-скелетной боли, среди лиц трудоспособного возраста (от 60 до 85 % населения) побудила экспертов ВОЗ обьявить 2000-2010 гг. декадой костно-суставных болезней, причем одним из пяти приоритетных направлений являются боли в спине [1,2,7]. Мышечно-скелетные болевые синдромы могут наблюдаться как вне зависимости от вертеброгенной патологии (первичная миофасциальная дисфункция), так и осложнять практически любые вертеброгенные боли (вторичная миофасциальная дисфункция). [6, 7, 8, 9, 11]. Европейская ассоциация боли с учетом частоты и влияния на качество жизни миофасциальных дисфункций обьявила 2010 год как раз годом мышечно-скелетной боли.

В Украине вертеброгенные болевые синдромы в общей структуре заболеваемости с временной утратой трудоспособности занимают второе место и составляют до 20-30%, а в структуре заболеваемости периферической