

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

**ЛИТВИНЕНКО ОЛЕНА СЕМЕНІВНА**

УДК 612.822.014.1:577.112]:616.831-005.4-092.9

**НЕЙРОПРОТЕКТИВНА АКТИВНІСТЬ МОДУЛЯТОРІВ СИСТЕМИ  
ГЛУТАТІОНУ В УМОВАХ МОДЕЛЮВАННЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ**

14.03.05 - фармакологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті, м. Запоріжжя.

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор  
**Бленічев Ігор Федорович**,  
Запорізький державний медичний університет,  
м. Запоріжжя, завідувач кафедри фармакології та  
медичної рецептури

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, доцент  
**Нефьодов Олександр Олександрович**,  
Державний заклад "Дніпропетровська медична  
академія Міністерства охорони здоров'я України",  
м. Дніпро, доцент кафедри фармакології і клінічної  
фармакології;

доктор медичних наук, професор  
**Кульчицький Олег Костянтинович**,  
Державна установа «Інститут геронтології ім.  
академіка Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»,  
м. Київ, керівник лабораторії регуляції метаболізму.

Захист відбудеться «12» грудня 2018 р. о 13-00 годині, на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

Автореферат розісланий «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01,  
кандидат біологічних наук



І.В. Данова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Незважаючи на значні досягнення в сучасній ангіоневрології, проблема гострих порушень мозкового кровообігу (ГПМК) продовжує зберігати надзвичайну медичну і соціальну значущість [Поліщук М.Є., 2009; Мищенко Т.С., 2010; Сіренко Ю.М., 2011]. Інсульти є другою за значимістю причиною смертності та провідною причиною інвалідності серед жителів України, створюючи серйозне навантаження для системи охорони здоров'я, економіки і всього суспільства [Хобзей М.К. та співавт., 2013]. Аналіз літератури останніх 5 - 7 років свідчить про позитивні ефекти застосування нейропротекторів на догоспітальному та госпітальному етапі терапії ішемічного інсульту [Зозуля І.С. та співавт., 2015; Nathan James, 2018]. Але на жаль, базові ноотропні і нейрометаболітні препарати не завжди надають очікуваний нейропротективний ефект в гострому періоді церебральній ішемії [Євтушенко І.С., 2013; Беленічев І.Ф., 2013-2017]. У зв'язку з цим, надзвичайно актуально застосовувати науково обгрунтований підхід для раціонального вибору лікарських засобів, призначених оптимізувати стандартну терапію. Тому дослідження молекулярно-біохімічних уражень головного мозку при ГПМК та розробка нових підходів до таргетної нейропротекції, найбільш перспективними мішенями якої вважаються підвищення механізмів ендогенної нейропротекції та нейропластичності [Беленічев І.Ф., 20014-2018, McBean G.J., 2017], визначає актуальність цього дослідження з можливістю використання отриманих результатів в клінічній практиці. В механізмах ендогенної нейропротекції значну роль грає тіол-дисульфідна система [Колесник Ю.М., 2013, Горбачова С.В., 2016; Беленічев І.Ф., 2014-2018]. Глутатіон, який є основним компонентом антиоксидантного захисту нейрона і підвищує його стійкість в умовах гіпоксії, також виступає, як резерв цистеїну в клітині, робить регулюючий вплив на синтез та стабільність білків теплового шоку, бере участь у реалізації механізмів програмованої клітинної загибелі [Чекман І.С., 2013]. Збільшення системного рівня глутатіону за допомогою застосування модуляторів синтезу глутатіону є сучасною стратегією поповнення дефіциту глутатіону при окислювальному стресі, імунодефіциті або передозуванні ксенобіотиків [Горбачова С.В., 2016; Беленічев І.Ф., 2014-2017]. Наявність досить активної тіольної антиоксидантної системи забезпечує стійкість нейрона до оксидативного і нітрозативного стресу, а також бере участь у механізмах регуляції ендогенної нейропротекції. Таким чином, пошук і розробка методів лікарської корекції антиоксидантного статусу при церебральній ішемії на основі модуляції системи глутатіону є важливим і перспективним завданням сучасної фармакології. Вище наведена інформація теоретично обгрунтовує перспективність вивчення сучасних препаратів: біс(гама-L-глутаміл)-L-цистеїніл-біс-гліцин динатрієвої солі (глутоксим), селеніту натрію (селеназа) і глутаредоксину в якості нейропротективних засобів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури ЗДМУ «Молекулярно-біохімічні механізми

формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015 рр.) та «HSP<sub>70</sub>/HIF-1 $\alpha$ -опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020 рр).

**Мета і задачі дослідження.** З'ясувати молекулярно-біохімічні механізми впливу глутоксиму, селенази і глутаредоксіну на АФК/GSH-залежні ланки ішемічної нейродеструкції/ендогенної нейропротекції та обґрунтувати їх застосування як нейропротективних засобів.

Для реалізації поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1. Визначити середньо-ефективну дозу селенази, глутоксима і глутаредоксіна на моделі церебральної ішемії.

2. Вивчити вплив селенази, глутоксима і глутаредоксіна в експериментально обґрунтованих дозах на летальність і неврологічний дефіцит в гострому періоді модельованого ПМК.

3. Дослідити дію селенази, глутоксима, глутаредоксіна на рівень маркерів оксидативного і нітрозативного стресу (супероксиддисмутази, каталази, АФГ, КФГ, стабільних метаболітів оксиду азоту, нітротирозину) і активність показників тіол-дисульфідної системи (глутатіону відновленого, глутатіону окисненого, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази) при експериментальному ГПМК.

4. Вивчити дію селенази, глутоксима і глутаредоксіна на функціональну активність мітохондрій (ступінь відкриття мітохондріальної пори і мембранний потенціал), енергетичний обмін (АТФ, АДФ, АМФ, ЕЗ, ЕП, ІФ, ТКД, лактат, піруват, малат) головного мозку тварин з ГПМК.

5. Визначити роль селенази, глутоксима і глутаредоксіна в механізмах ендогенної нейропротекції за впливом на синтез HSP<sub>70</sub>, експресію мРНК HSP<sub>70</sub>, мРНК HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$  в тканинах головного мозку експериментальних тварин.

6. Дослідити нейропротективну дію селенази, глутоксима і глутаредоксіна *in vitro* при додаванні токсичних доз глутамату, CDNB, DNIC по впливу на показники NR-2 пептиду, АФГ, КФГ, СОД, глутатіону відновленого, HSP<sub>70</sub>.

*Об'єкт дослідження:* глутатіон-залежні механізми ендогенної нейропротекції/нейродеструкції головного мозку при гострому порушенні мозкового кровообігу

*Предмет дослідження:* корекція порушень глутатіон - залежних механізмів ендогенної нейропротекції при гострій ішемії головного мозку за допомогою селенази, глутоксима і глутаредоксіна.

*Методи дослідження:* фармакологічні, біохімічні, імунологічні, молекулярно-генетичні, методи математичної статистики і системного аналізу.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше встановлено, що нейропротективна активність селенази, глутоксиму і глутаредоксіну в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку спрямована на активацію глутатіон - залежних ланок ендогенної нейропротекції.

Вперше встановлено, що досліджувані модулятори системи глутатіону - селеназа, глутоксим і глутаредоксін підвищують експресію мРНК HSP<sub>70</sub>, HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$  в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку.

Вперше показано, що курсове введення селенази, глутоксима і глутаредоксіна тваринам з гострою ішемією головного мозку підвищують вміст ендogenousного нейропротектора- білка теплового шоку HSP<sub>70</sub>.

Розширено дані про вплив глутаредоксіна і глутоксима на енергетичний обмін і функціональну активність мітохондрій головного мозку в умовах ішемії.

Встановлено, що селеназа, глутоксим і глутаредоксін гальмують реакції оксидативного та нітрозуючого стресу на тлі нормалізації глутатіонової системи в головному мозку експериментальних тварин.

Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель № 126977 «Спосіб зменшення ексайтотоксичності в умовах експериментального гострого порушення мозкового кровообігу».

**Практичне значення одержаних результатів.** На підставі проведених досліджень експериментально доведена можливість доцільності застосування селенази, глутоксима і особливо, глутаредоксіна в комплексній нейропротекції гострого порушення мозкового кровообігу в якості засобів фармакокорекції порушень глутатіон-залежних ланок ендogenousної нейропротекції.

Отримані дані є експериментальним обґрунтуванням для застосування селенази, глутоксима в комплексній терапії гострого порушення мозкового кровообігу в якості засобів первинної нейропротекції.

Експериментальні дані обґрунтовують перспективу подальших досліджень глутаредоксіну з метою створення на його основі лікарського засобу з нейропротективною дією.

Експериментально встановлені механізми дії модуляторів системи глутатіону можуть сприяти створенню нового покоління ефективних лікарських препаратів, які надають спрямований вплив на ключові ланки механізмів ендogenousної нейропротекції.

Результати досліджень впроваджені в навчальну та наукову роботу кафедр фармакології Запорізького державного медичного університету, Державного закладу "Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України", Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, Буковинського державного медичного університету, Харківського національного медичного університету, Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації, Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є особистою науковою працею автора. Робота виконана на базі навчального медико-лабораторного центру (керівник – д.мед.н., професор Абрамов А.В.) та на кафедрі фармакології та медичної рецептури (завідувач – д.б.н., професор Беленічев І.Ф.) Запорізького державного медичного університету. Дисертанткою самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, визначено мету і завдання дослідження, освоєна і відтворена модель гострого порушення мозкового кровообігу. Самостійно виконана оцінка нейропротективної активності селенази, глутоксима і

глутаредоксіна на моделі гострої церебральної ішемії. Дисертантка самостійно провела фармакологічні, біохімічні, імуноферментні, хроматографічні дослідження з вивчення показників оксидативного, нітрозативного стресу, показників тіол-дісульфідної рівноваги і енергетичного метаболізму головного мозку в умовах гострого порушення мозкового кровообігу. Дисертанткою проведена статистична обробка отриманих даних, узагальнені і проаналізовані результати досліджень, сформульовані висновки.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення та висновки дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2014» (Запоріжжя, 2014); восьмій національній науково-практичній конференції з міжнародною участю «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2014); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015» (Запоріжжя, 2015); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я – 2016» (Запоріжжя, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016» (Запоріжжя, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю пам'яті професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (Запоріжжя, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017» (Запоріжжя, 2017); Vму Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017).

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 17 наукових робіт, у тому числі 7 статей у фахових журналах, 3 з яких реферуються міжнародними наукометричними базами даних РІНЦ, Index Copernicus, International Google Scholar, Ulrich`s Periodical Directory, 9 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 1 патент України.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 220 сторінках друкованого тексту та складається з анотацій, списку друкованих праць, основної частини, яка включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, 2 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел та додатків. Робота проілюстрована 26 рисунками, 20 таблицями. Список використаних джерел містить 305 найменувань, з них – 135 кирилицею та 170 латиницею.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи.** Експериментальні дослідження виконані на 242 статевозрілих самцях монгольських піщанок (*Meriones unguiculatus*) масою 60-80г [Gerbils – Canadian Council on Animal Care (CCAC)], 70 білих статевозрілих нелінійних щурах- самцях масою 180 – 220г, 40 чотирьохтижневих білих щурятах. Тварини отримані із розплідника ДУ «Інститут фармакології і токсикології

НАМН України». Утримання експериментальних тварин здійснювалося відповідно до санітарно-гігієнічних норм віварію ЗДМУ (температура повітря  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , за умов природнього чергування дня і ночі, їжа та пиття *ad libitum*). Усі досліди проводили у відповідності до законодавства України, правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою. Всі експерименти проведені на базі Навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ, атестованому МОЗ України (атестат № 039/14). Дотримання етичних норм підтверджено комісією з питань біоетики ЗДМУ (протокол № 8 від 23.11.2017 р.).

Відтворення модельованого гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) у тварин проводили шляхом односторонньої незворотної оклюзії загальної сонної артерії (ЗСА) під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) [С.Р. McGraw, 1977; Чекман І.С., 2016]. Щодня протягом 4 діб (гострий період церебральної ішемії) оцінювали тяжкість неврологічних розладів у балах за шкалою stroke-index [С.Р. McGraw, 1977; Чекман І. С., 2016], реєстрували загибель та розраховували відсоток летальності тварин в експериментальних групах.

Досліджувані препарати – селеніт натрію (селеназа (Biosyn Arzneimittel GmbH, Німеччина), біс(гама-L-глутаміл)-L-цистеїніл-біс-гліцин динатрієву сіль (глутоксим (ЗАТ «ФАРМА ВАМ», Росія) і глутаредоксін (Sigma, USA, Cat. No G5298) вводили тваринам один раз на добу внутрішньоочеревинно протягом 4 діб в середньо-ефективних дозах (ЕД50), які експериментально визначали на моделі гострої церебральної ішемії, викликаній односторонньою незворотною оклюзією ЗСА. Препарат порівняння пірацетам (ТОВ «НІКО», Україна) вводила за тією же схемою дозою 500 мг/кг [Беленичев І.Ф., 2006]. Контрольною була група тварин з ГПМК, яким вводили фізіологічний розчин натрію хлориду у еквівалентному обсязі. У кожній серії експерименту в групах ложно-оперованих, контрольній, в групах досліджуваних і референс-препарата було по 13–15 тварин. Тварин виводили з експерименту під тіопентал натрієвим наркозом (40 мг/кг). Для лабораторних досліджень головний мозок подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану і гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища при  $+2^\circ\text{C}$ , що містить (в ммольях): сахарози – 250, трис-НСІ-буфера – 20, ЕДТА – 1 (рН 7,4). Цитоплазматичну і мітохондріальну фракції виділяли методом диференційного центрифугування за Weinbach [Сереброва В.Ю., 2008, Чекман І. С., 2016] на рефрижераторній центрифугі «Sigma 3-30k» (Німеччина) при 14000g 20 хв при  $+4^\circ\text{C}$ . До проведення лабораторних досліджень отриманий матеріал зберігали при температурі  $-70^\circ\text{C}$ .

Відтворення нейродеструкції *in vitro* проводили шляхом внесення в нейрональну суспензію токсичних доз глутамата 100 мкмоль/л (моделювання глутаматної ексайтотоксичності), 1-хлор-2,4-динітробензену (CDNB) 80 мкмоль/л (депривація системного рівня глутатіону), динітрозольного комплексу заліза з цистеїном (DNIC) 250 мкмоль/л (моделювання розвитку нітрозативного стресу), з подальшою інкубацією протягом 60 хвилин при  $37^\circ\text{C}$  [Чекман І.С., 2016]. Досліджувані препарати: селеназа, глутоксим, глутаредоксін додавали в нейрональну суспензію в дозі ( $10^{-5}\text{M}$ ) за 15 хвилин до внесення нейротоксичних агентів [Губський Ю.І., 2002; Чекман І.С., 2016].

Стан оксидантно - антиоксидантного балансу визначали спектрофотометрично за активністю супероксиддисмутази (СОД) [Чевари С. и соавт., 1988, Чекман І.С., 2016] та каталази [Корольок М. А., 1988; Чекман І. С., 2016] на спектрофотометрі Libra S 32 PC.

Для встановлення глибини розвитку оксидативного стресу визначали ступінь спонтанної та метал-каталізованої окисної модифікації білка за методом В. Halliwell [ В. Halliwell, 1999; Чекман І.С., 2016].

Ступень розвитку нітрозативного стресу в головному мозку визначали за вмістом стабільних метаболітів оксиду азоту та маркеру нітрозуючого стресу – нітротирозину методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) на повноплашковому імуноферментному аналізаторі (SIRIO S, Італія) з використанням тест-систем «Nitrotyrosine ELISA Kit» («HyCult biotechnology») та «Nitric oxide total ELISA» («R&D Systems»).

Стан тіол-дисульфідної системи головного мозку оцінювали за вмістом відновленого глутатіону (ВГ) та окисненого глутатіону (ОГ) флуориметрично з орто-фталевим ангідридом на флуориметрі Quantech [Чекман І.С., 2016]. Рівень загальних SH-груп, активність глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази вимірювали спектрофотометрично [Чекман І.С., 2016] – на спектрофотометрі Libra S 32 PC.

Оцінку показників енергообміну тканин головного мозку визначали за вмістом аденілових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) методом тонкошарової хроматографії [Чекман І.С., 2016]. Направленість та інтенсивність гліколізу оцінювали спектрофотометрично за рівнем пірувату (метод Умбрайт) та лактату (метод Хохорста), активність окиснення в циклі трикарбонових кислот – за вмістом малату (метод Хохорста) [Чекман І.С. та співавт., 2016]. Функціональний стан мітохондрій оцінювали фотометрично на спектрофотометрі Libra S 32 PC по відкриванню мітохондріальної пори (МП) та мітохондріальному трансмембранному потенціалу ( $\Psi$ ) [Чекман І.С., 2016].

Для оцінки стану експресії мРНК HSP<sub>70</sub>, HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР) ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США).

Вміст HSP<sub>70</sub> білку в тканинах мозку визначали методом вестерн-блот аналізу, NR-2 пептид –з використанням тест-набору «Gold Dot NR2 Peptide test», (CIS Biotech, Inc., Атланта, США), IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 визначали тест наборами «e-Bioscience» методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) на повноплашковому імуноферментному аналізаторі (SIRIO S, Італія).

Статистична обробка даних наукових досліджень проводилась з використанням пакету програм «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., №AXXR712D833214FAN5). Перед застосуванням статистичних критеріїв проводилась перевірка гіпотези про нормальний закон розподілу випадкових величин (за критерієм Shapiro-Wilk). За умов нормального розподілу, встановлення достовірності міжгрупових відмінностей по отриманим даним експериментів проводилося за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента. У випадку, коли дані не відповідали законам нормального розподілу,



порівняльний аналіз проводили за допомогою непараметричного  $U$  - критерію Мана-Уїтні. Порівняння груп за якісною ознакою проводили за допомогою критерію  $\chi^2$  з аналізом таблиць спряженості. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох вибірках застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі, або критерій – Kruskal-Wallis для розподілу, відмінного від нормального. Для аналізу закономірностей зв'язку між окремими показниками проведений кореляційний аналіз за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона або Спірмена. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності  $p < 0,05$  (95%).

### Результати дослідження та їх обговорення.

Встановлено що середньо-ефективна доза (ЕД50) на моделі ГПМК для селенази складає 50 мкг/кг, глутоксиму – 50 мг/кг, глутаредоксину – 200 мкл/ кг.

Моделювання ГПМК призводить до порушень тіол-дисульфідної рівноваги головного мозку у вигляді підвищення рівня дисульфідів і зниження рівня тіолів. Такі зміни в ТДС є грізною ознакою порушення захисту мозку від ішемічного пошкодження [Горбачева С.В., 2015, Беленічев І.Ф., 2015-2017]. Так на 4 добу ГПМК спостерігалось зниження рівня ВГ на 85,6 і 81,4 % ( $p < 0,05$ ) з одночасним підвищенням ОГ на 130,3 і 165,7 % ( $p < 0,05$ ) у цитозольної та мітохондріальної фракціях відповідно (табл.1).

Таблиця 1

### Вплив модуляторів системи глутатіону на показники глутатіонової системи у цитозольної фракції головного мозку монгольських піщанок з ГПМК (M $\pm$ m; Q50,(Q25;Q75))

| Показники                        | ЛО,<br>n=13                          | Контрольна<br>група<br>(ГПМК),<br>n=15 | ГПМК+<br>селеназа<br>50 мкг/кг,<br>n=14 | ГПМК+<br>глутоксим<br>50 мг/кг,<br>n=15 | ГПМК+<br>глутаредоксін<br>200мкл/кг,<br>n=15 | ГПМК+<br>пірацетам<br>500 мг/кг,<br>n=14 |
|----------------------------------|--------------------------------------|--|---|---|--|--|
| 1                                | 2                                    | 3                                      | 4                                       | 5                                       | 6  | 7  |
| ВГ, мкмоль/г<br>білка            | 4,30 $\pm$ 0,83<br>4,30(3,90÷4,60)   | 0,62 $\pm$ 0,10**<br>0,64(0,59÷0,69)   | 2,30 $\pm$ 0,75*#<br>2,20(2,00÷2,60)    | 2,90 $\pm$ 0,20*#<br>3,00(2,60÷3,40)    | 2,60 $\pm$ 0,14*#<br>2,90(2,10÷3,00)         | 0,92 $\pm$ 0,20<br>0,94(0,89÷1,30)       |
| ОГ, мкмоль/г<br>білка            | 0,33 $\pm$ 0,08<br>0,32(0,30÷0,35)   | 0,76 $\pm$ 0,10**<br>0,76(0,74÷0,78)   | 0,51 $\pm$ 0,07*#<br>0,52(0,49÷0,55)    | 0,42 $\pm$ 0,05*#<br>0,44(0,40÷0,45)    | 0,49 $\pm$ 0,09*#<br>0,49(0,45÷0,52)         | 0,72 $\pm$ 0,10<br>0,72(0,71÷0,74)       |
| SH, ммоль/г<br>білка             | 19,10 $\pm$ 1,80<br>19,10(19,0÷19,4) | 4,80 $\pm$ 0,62**<br>4,60(3,8÷5,3)     | 10,80 $\pm$ 0,46*#<br>11,40(8,4÷12,9)   | 14,00 $\pm$ 1,34*#<br>14,00(13,9÷14,2)  | 13,60 $\pm$ 3,32*#<br>13,50(13,3÷13,7)       | 6,30 $\pm$ 0,42<br>5,30(5,3-6,0)         |
| ГР, мкмоль/<br>(гбілка*хв)       | 19,50 $\pm$ 1,35<br>19,40(19,4÷19,8) | 5,20 $\pm$ 0,72**<br>5,20(4,8÷5,5)     | 10,10 $\pm$ 0,85*#<br>10,00(9,7÷10,4)   | 9,20 $\pm$ 0,57*#<br>9,10(8,7÷10,0)     | 21,80 $\pm$ 1,70*#<br>21,70(20,0÷21,70)      | 6,50 $\pm$ 0,41<br>5,05(5,20÷5,80)       |
| ГПО,<br>мкмоль/(г<br>білка*хв)   | 61,80 $\pm$ 2,90<br>61,80(60,1÷64,8) | 14,20 $\pm$ 1,54**<br>13,90(13,9÷15,9) | 31,70 $\pm$ 2,19*#<br>31,80(30,0÷33,2)  | 24,90 $\pm$ 2,42*#<br>23,90(23,9÷25,9)  | 25,90 $\pm$ 2,77*#<br>25,90(23,3÷28,1)       | 18,70 $\pm$ 0,91*<br>17,90(16,1÷19,4)    |
| Г-S-T,<br>мкмоль/(г<br>білка*хв) | 15,80 $\pm$ 1,07<br>15,50(15,1÷16,4) | 6,10 $\pm$ 0,97**<br>6,10(5,8÷6,4)     | 10,80 $\pm$ 1,12*#<br>10,60(10,3÷10,8)  | 12,50 $\pm$ 1,12*#<br>12,50(12,0÷13,3)  | 13,20 $\pm$ 1,12*#<br>13,30(12,5÷13,6)       | 6,90 $\pm$ 0,72<br>6,80(6,6÷6,9)         |

Примітки: р–рівень статистичної значущості при порівнянні виборок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA(критерій Краскела-Уолліса),\*– $p < 0,05$  відповідно до контрольної групи, \*\*– $p < 0,05$  відповідно до ЛО групи, #– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала пірацетам,<sup>1</sup>– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала селеназу, глутаредоксін,<sup>2</sup>– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала селеназу, глутоксим,<sup>3</sup>– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала глутоксим, глутаредоксін.

На цьому тлі спостерігалось зниження і активності глутатіон-пов'язаних ферментів - в цитозолі і мітохондріях ГПО (на 77 і 84,2 %,  $p<0,05$ ), ГР (на 73,3 і 81,3%,  $p<0,05$ ), Г-S-T (на 61,4 і 60,2 %,  $p<0,05$ ).

Курсове введення модуляторів глутатіонової системи призвело до підвищення ВГ в діапазоні від 2,7 разів ( $p<0,05$ ) до 4,8 разів ( $p<0,05$ ) та зниження ОГ в діапазоні від 39,2% ( $p<0,05$ ) до 49,5% ( $p<0,05$ ). Модулятори глутатіонової системи підвищували рівень ГПО в діапазоні 1,82-2,37 разів ( $p<0,05$ ). Найбільш виражений ефект показав селеназа. Підвищення активності ГР в діапазоні від 1,73 до 4,19 разів ( $p<0,05$ ), Г-S-T в діапазоні від 14 до 116% ( $p<0,05$ ). Найактивнішим був глутаредоксін. Референс-препарат пірацетам не чинив достовірних відмінностей відносно показників глутатіонової системи, як в цитозольній так і мітохондріальній фракціях у порівнянні з групою контролю за винятком впливу на активність ГПО, і поступався по ефективності всім досліджуваним препаратам (табл.1).

Останнім часом багато робіт присвячене нейропротективній активності малих шаперонів – білків теплового шоку HSP<sub>70</sub>, синтез яких підвищується у відповідь на гіпоксію, ішемію, порушення метаболізму, стрес [Дейко Р.Д., 2014; Беленічев І.Ф., 2009-2018]. Нами відзначено значне підвищення рівня HSP<sub>70</sub> в 1,94 рази ( $p<0,05$ ) в групі контролю станом на першу добу в порівнянні з ЛО, що, на нашу думку пов'язано з шаперон активністю останнього. Зниження рівня HSP<sub>70</sub> на 16,3% ( $p<0,05$ ) станом на 4-ту добу ГПМК говорить про зрив компенсаторно-приспосувальних функцій на тлі виснаження антиоксидантної системи нейрона (табл.2).

Таблиця 2

### Вплив модуляторів системи глутатіону на рівень білку HSP<sub>70</sub> у тканинах головного мозку тварин з ГПМК на 4-ту добу експерименту (M±m)

| Показники                                     | ЛО,<br>n=13 | Контрольна<br>група<br>(ГПМК),<br>n=15 | ГПМК+<br>селеназа<br>50 мкг/кг,<br>n=14 | ГПМК+<br>глутоксим<br>50 мг/кг,<br>n=15 | ГПМК+<br>глутаредоксін<br>200мкл/кг,<br>n=15 | ГПМК+<br>пірацетам<br>500 мг/кг,<br>n=14 |
|---|-------------|--|---|---|--|--|
| 1   | 2           | 3                                      | 4                                       | 5                                       | 6  | 7  |
| HSP <sub>70</sub> , у.о./г<br>білка<br>1 доба | 15,50 ±0,21 | 30,10±0,42**                           | 33,20±0,99*                             | 36,70±0,95*#                            | 37,20±1,00*#                                 | 32,60±0,83                               |
| HSP <sub>70</sub> , у.о./г<br>білка<br>4 доба | 15,70 ±0,11 | 25,20±0,79***                          | 31,90±0,86*                             | 34,60±1,27*#                            | 35,60±1,45*#                                 | 27,50±0,92                               |

Примітки: р–рівень статистичної значущості при порівнянні виборок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA,\* – $p<0,05$  відповідно до контрольної групи,\*\* – $p<0,05$  відповідно до ЛО групи,\*\*\*– $p<0,05$  відповідно до контрольної групи на 1 добу,#– $p<0,05$  відповідно до групи, яка отримувала пірацетам.

Нами встановлено, що зниження системного рівня ВГ безпосередньо корелювало з рівнем HSP<sub>70</sub> головного мозку експериментальних тварин з модельованою патологією (коефіцієнт множинної кореляції Пірсона R=0,92699), що свідчить про тісний односпрямований взаємозв'язок між цими показниками.

При курсовому введенні модуляторів глутатіонової системи рівень HSP<sub>70</sub> у

цитозольній фракції головного мозку тварин підвищувався в діапазоні від 26,6 % ( $p < 0,05$ ) до 41,3% ( $p < 0,05$ ). Найбільшу активність виявив глутаредоксін. Пірацетам не показав значущого впливу на показик HSP<sub>70</sub> протягом усього експерименту.

Нами встановлено, що на 4 добу ГПМК підвищується експресія мРНК HSP<sub>70</sub> у всіх експериментальних групах в діапазоні від 3,6 ( $p < 0,05$ ) до 4,2 ( $p < 0,05$ ) разів. Слід зазначити, що всі досліджувані препарати практично в рівній мірі надавали ефект на даний показник. Препарат порівняння пірацетам достовірних відмінностей від групи контролю не проявив. При порівняльному аналізі рівня білка HSP<sub>70</sub> і експресії *hsp70* на 4 добу ГПМК на тлі проведеної терапії відзначено підвищення експресії гена і збільшення синтезу білка, що свідчить про мобілізацію механізмів ендогенної нейропротекції під дією модуляторів глутатионової системи. Подібний механізм дії досліджуваних препаратів обумовлений їх участю в нормалізації ТДР, і як наслідок, стабілізації білку та активації експресії гена *hsp70* в нейронах [Дейко Р.Д., 2014; Беленічев І.Ф., 2009-2018] (табл.2), (рис.1).

Крім того, однією з основних функцій HSP<sub>70</sub> є індукція, а також збільшення тривалості життя стабільної форми HIF. HIF-1 і HIF-3 грають роль транскрипційних факторів і регулюють експресію генів, що кодують синтез білків, залучених в фізіологічну відповідь на гіпоксію / ішемію [Dery M.A., 2005; Абрамов А.В., та співавт., 2017].

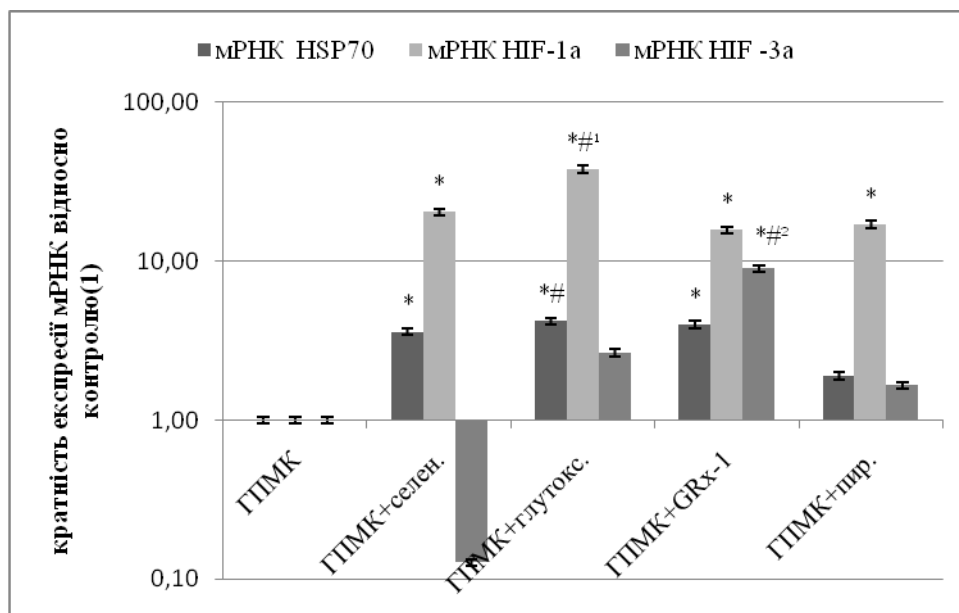


Рис. 1 Вплив модуляторів системи глутатиону на характер експресії мРНК HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  і HSP<sub>70</sub> в головному мозку щіщанок з ГПМК

Примітки: дані представлені у вигляді середнього значення відносної експресії мРНК (+S.E.M.),  $p$ –рівень статистичної значущості при порівнянні виборок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA(тест Тьюкі),\*– $p < 0,05$  відповідно до контрольної групи,#– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала пірацетам,<sup>1</sup>– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала селеназу, глутоксим,<sup>2</sup>– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала селеназу, глутоксим.

HIF підвищують енергетичні ресурси нейрона, беручи участь в активації та регуляції малат-аспартатного човникового механізму продукції АТФ при ішемії мозку [Belenichev I.F., Pavlov S.V., 2012]. Курсове призначення досліджуваних

препаратів протягом 4 діб призводить до підвищення експресії мРНК NIF-1 $\alpha$  - глутоксим (в 37 разів вище контролю,  $p < 0,05$ ) >селеназа (в 20 разів вище контролю,  $p < 0,05$ ) >пірацетам (в 17 разів вище контролю,  $p < 0,05$ )> глутаредоксін (в 15 разів вище контролю,  $p < 0,05$ ). Достовірні відмінності ( $p < 0,05$ ) експресії NIF-3 $\alpha$  відносно контролю показав тільки глутаредоксін (в 9 разів) (рис.1). Виявлений ефект глутаредоксіна може бути обумовлений стабілізуючою і індукуючою роллю аддуктів глутатіону, що утворюються в реакції S- глутатіонілювання під дією GRx-1 в умовах ішемії [Yosuke Watanabea,b , 2013].

Моделювання ГПМК призводить до формування стійкої мітохондріальної дисфункції з подальшим енергодефіцитом нейронів [Беленичев И.Ф. и соавт., 2010-2017]. Так ГПМК викликало збільшення швидкості відкриття мітохондріальної пори на 80% ( $p < 0,05$ ) і падіння трансмембранного потенціалу мітохондрій на 78,2% ( $p < 0,05$ ) (табл.3).

Таблиця 3

**Вплив модуляторів системи глутатіону на показники біоенергетики у тканинах головного мозку тварин з ГПМК на 4-ту добу експерименту (M $\pm$ m; Q50,(Q25;Q75))**

| Показники   | ЛО,<br>n=13                                   | Контрольна<br>група<br>(ГПМК),<br>n=15            | ГПМК+<br>селеназа<br>50 мкг/кг,<br>n=14        | ГПМК+<br>глутоксим<br>50 мг/кг,<br>n=15                      | ГПМК+<br>глутаредоксін<br>200мкл/кг,<br>n=15    | ГПМК+<br>пірацетам<br>500 мг/кг,<br>n=14       |
|---|---|---|--|--|---|--|
| 1   | 2   | 3   | 4  | 5  | 6   | 7  |
| АТФ,<br>мкмоль/г<br>тканини                         | 2,32 $\pm$ 0,09<br>2,90<br>(2,80 $\div$ 3,10) | 0,91 $\pm$ 0,05**<br>0,94<br>(0,67 $\div$ 1,10)   | 1,65 $\pm$ 0,12*<br>1,70<br>(1,50 $\div$ 1,80) | 1,87 $\pm$ 0,11*<br>1,89<br>(1,50 $\div$ 2,00)               | 1,91 $\pm$ 0,09*#<br>1,90<br>(1,80 $\div$ 1,90) | 1,49 $\pm$ 0,12*<br>1,60<br>(1,40 $\div$ 1,70) |
| малат,<br>мкмоль/г<br>тканини                       | 0,38 $\pm$ 0,03<br>0,38<br>(0,31 $\div$ 0,41) | 0,19 $\pm$ 0,01**<br>0,19<br>(0,18 $\div$ 0,22)   | 0,29 $\pm$ 0,04*<br>0,27<br>(0,22 $\div$ 0,39) | 0,47 $\pm$ 0,02*# <sup>1</sup><br>0,43<br>(0,39 $\div$ 0,54) | 0,32 $\pm$ 0,11*<br>0,38<br>(0,24 $\div$ 0,41)  | 0,20 $\pm$ 0,02<br>0,22<br>(0,19 $\div$ 0,24)  |
| циклоспори<br>н-А-чутливе<br>поглинання<br>(540 нм) | 1,05 $\pm$ 0,05<br>1,05<br>(1,00 $\div$ 1,07) | 0,21 $\pm$ 0,11**<br>0,213<br>(0,097 $\div$ 0,25) | 0,44 $\pm$ 0,19*<br>0,30<br>(0,26 $\div$ 0,64) | 0,45 $\pm$ 0,14*<br>0,52<br>(0,29 $\div$ 0,55)               | 0,45 $\pm$ 0,19*<br>0,34<br>(0,29 $\div$ 0,64)  | 0,36 $\pm$ 0,05<br>0,30<br>(0,25 $\div$ 0,32)  |

Примітки: р–рівень статистичної значущості при порівнянні виборок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA(критерій Краскела-Уолліса),\*– $p < 0,05$  відповідно до контрольної групи, \*\*– $p < 0,05$  відповідно до ЛО групи,#– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала пірацетам,<sup>1</sup>– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала селеназу, глутаредоксін.

Також в групі контрольної патології нами зареєстровано дискоординацію в циклі Кребса (зниження малату на -50%,  $p < 0,05$ ), активацію анаеробного гліколізу і формування лактат-ацидозу (підвищення лактату на +285,7%,  $p < 0,05$ ) та розвиток енергетичного дефіциту (зменшення вмісту АТФ на 60,8% ( $p < 0,05$ ), АДФ на 42,5% ( $p < 0,05$ )) на тлі зростання пулу АМФ на 91,7% ( $p < 0,05$ ) (табл.3).

Курсове введення модуляторів системи глутатіону знижувало прояви мітохондріальної дисфункції, що виражалось в зниженні швидкості відкриття мітохондріальної пори в діапазоні від 2,04 ( $p < 0,05$ ) до 2,14 разів ( $p < 0,05$ ) і підвищенні трансмембранного заряду мітохондрії в діапазоні від 2,65 ( $p < 0,05$ ) до 3,48 разів ( $p < 0,05$ ) (табл. 3). Модулятори системи глутатіону призводять до підвищення ЕЗ, ЕП, ІФ та ТКД, що свідчить про зниження порушень

співвідношення АТФ/АДФ+АМФ і зменшення енергетичного дефіциту в ішемізованому головному мозку. Введення дослідних препаратів сприяло відновленню енергозабезпечення, а саме зростанню рівнів АТФ та АДФ на тлі зменшення вмісту АМФ. За ступенем впливу на ці показники препарати розмістилися наступним чином: глутаредоксін (АТФ + 109,9%; АДФ + 73,9%; АМФ - 56,5%,  $p < 0,05$ ) > глутоксим (АТФ + 105,5%; АДФ + 65,2%; АМФ - 47,8%,  $p < 0,05$ ) > селеназа (АТФ + 81,3%; АДФ + 30,4%; АМФ - 43,5%,  $p < 0,05$ ) > пірацетам (АТФ + 63,7%,  $p < 0,05$ ; АДФ + 17,4%; АМФ - 30,4%).

Застосування пірацетаму протягом 4 діб ГПМК призводило до підвищення АТФ тільки за рахунок подальшої активації анаеробного гліколізу (збільшення лактату на 51,9% щодо контрольної групи), тим самим посилюючи прояви лактат - ацидозу.

Енерготропний механізм модуляторів системи глутатіону в умовах ГПМК пояснюється їх антиоксидантною і прямою мітопротективною дією за рахунок зниження негативного впливу АФК на мітохондрії та вплив на НІФ-залежні механізми активації компенсаторних шунтів продукції енергії.

Накопичення нейротоксичних продуктів оксидативного і нітрозативного стресів призводить до ініціації і активного протікання апоптозу і, в кінцевому підсумку, формування стійкого неврологічного та когнітивного дефіциту [Губський Ю.І., Беленічев І.Ф., 2008; Нагорна Н.В., 2010].

Введення селенази, глутоксиму і глутаредоксину тваринам з експериментальним ГПМК призводить до зниження летальності на 37,1; 46,7; 38,4% і зменшення неврологічних порушень до 4,56; 4,03; 4,27 бала відповідно за шкалою Р. McGraw на 4-ту добу експерименту.

Пірацетам за ступенем впливу на регрес неврологічної симптоматики (за шкалою Р. McGraw 5,57 балів) та зниження летальності (на 8,9%) поступався досліджуваним препаратам.

Нами відзначена кореляційна залежність між вагою неврологічних проявів і рівнем відновленого глутатіону та нітротирозину (по Пірсону). Отримані результати вказують на значну точність лінійної моделі: коефіцієнт множинної кореляції  $R = 0,852$ ; коефіцієнт детермінації  $R^2 = 0,726$ ; скоригований  $R^2 = 0,722$  при  $F = 227,6$ ; коефіцієнт Beta для глутатіону – 0,85 ( $p < 0,0001$ ), для нітротирозину 0,783 ( $p < 0,0001$ ).

Для уточнення механізмів нейропротективної дії модуляторів системи глутатіону нами були проведені дослідження *in vitro*, якими встановлено, що внесення нейротоксичних доз глутамату в нейрональну суспензію призводить до значного зростання (в 5 разів,  $p < 0,05$ ) NR2-пептиду – раннього маркера перезбудження NMDA-рецепторів.

Внесення глутамату викликало гіперпродукцію АФК і NO та активацію нітрозативного стресу в культурі нейронів, про що свідчить підвищення нітротирозину в 2 рази ( $p < 0,05$ ) на тлі зниження рівня відновленої форми глутатіону на 65,5% ( $p < 0,05$ ) і концентрації HSP<sub>70</sub> на 52,7% ( $p < 0,05$ ) (рис.2).

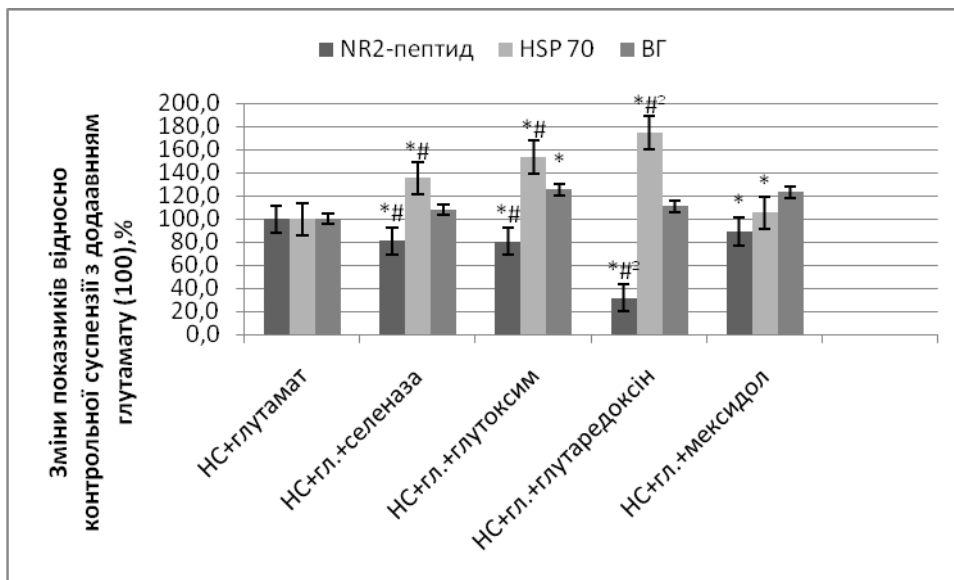


Рис. 2 Вплив модуляторів системи глутатіону на рівень HSP<sub>70</sub>, ВГ та NR2 – пептиду в суспензії нейронів підданої дії токсичних доз глутамату.

Примітки: р–рівень статистичної значущості при порівнянні виборок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA(критерій Краскела-Уолліса),\*– $p < 0,05$  відповідно до контрольної групи, #– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала мексидол,<sup>2</sup>– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала селеназу, глутоксим.

Нами відзначено, що низький рівень ВГ безпосередньо корелював з низьким рівнем HSP<sub>70</sub> в нейрональній суспензії (коефіцієнт множинної кореляції Спірмена  $R = 0,82137$ ) Нами також було визначено тісний негативний кореляційний зв'язок між HSP<sub>70</sub> і NR2-пептидом (коефіцієнт множинної кореляції Спірмена  $R = -0,8426$ ).

Преінкубація нейрональної суспензії з селеназою, глутоксимом і глутаредоксіном призвела до зниження рівня NR2-пептиду на 18,8; 19,6; і 68,5% ( $p < 0,05$ ), зниження нітротирозину на 12,5; 25; і 49,1% ( $p < 0,05$ ) відповідно, що свідчить про деяке обмеження реакцій нітрозативного і оксидативного стресу (рис.2). Під дією досліджуваних препаратів відбувається підвищення рівня ВГ та HSP<sub>70</sub> – селеназа +7,9%; +35% ( $p < 0,05$ ); глутоксим +25,2% ( $p < 0,05$ ); +53,4% ( $p < 0,05$ ); глутаредоксін +10,2%;+74,7% ( $p < 0,05$ ); мексидол +5,5%;+22,8% ( $p < 0,05$ ) (рис.2).

Внесення в інкубаційне нейрональне середовище CDNB призвело до депривації глутатіонової ланки ТДС. На користь цього твердження свідчить різкий дефіцит ВГ (-86,4%,  $p < 0,05$ ) (рис.3). Виснаження системного рівня глутатіону викликає неконтрольовану продукцію токсичних дериватів оксиду азоту, доказом чого служить підвищення рівня нітротирозину в суспензії нейронів (+70,7%,  $p < 0,05$ ) на 60 хвилин інкубації, а також зниження рівня HSP<sub>70</sub> (-50,3%,  $p < 0,05$ ). Біохімічними дослідженнями встановлено, що попередня інкубація з селеназою, глутоксимом та глутаредоксіном підвищує рівень ВГ на 136% ( $p < 0,05$ ); 154% ( $p < 0,05$ ); 144% ( $p < 0,05$ ) і HSP<sub>70</sub> на 35% ( $p < 0,05$ ); 53,4% ( $p < 0,05$ ); 74,7% ( $p < 0,05$ ) на тлі зниження рівня нітротирозину на 40,3% ( $p < 0,05$ ); 44,9% ( $p < 0,05$ ) і 47% ( $p < 0,05$ ) відповідно (рис 3).

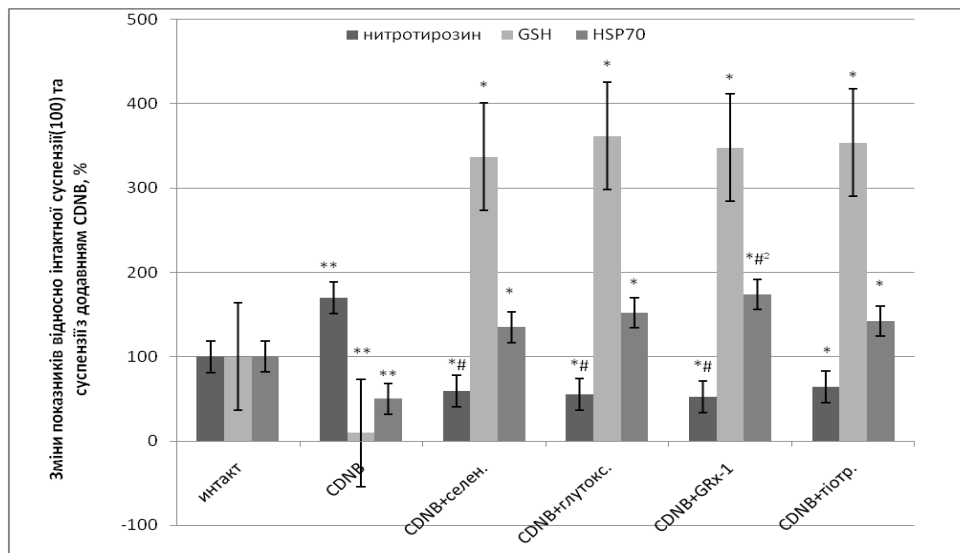


Рис. 3 Вплив модуляторів системи глутатіону на рівень HSP<sub>70</sub>, ВГ та нітротирозину в суспензії нейронів підданій дії 1-хлор-2,4динітробензолу.

Примітки: р–рівень статистичної значущості при порівнянні виборок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA(критерій Краскела-Уолліса),\*– $p < 0,05$  відповідно до контрольної групи, \*\*– $p < 0,05$  відповідно до ЛО групи, #– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала пірацетам,<sup>2</sup>– $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала селеназу, глутоксим.

Таким чином встановлено, що селеназа, глутоксим, і особливо, глутаредоксін, проявляють значний нейропротективний ефект при ГПМК, який спрямований на обмеження глутаматної ексайтотоксичності, поліпшення енергетичного метаболізму головного мозку, гальмування оксидативного стресу, нормалізацію глутатіонової ланки ТДС і підвищення концентрації HSP<sub>70</sub> і HIF, що в підсумку призводить до зниження летальності та зменшення неврологічного дефіциту. Механізм нейропротективної дії модуляторів системи глутатіону пов'язаний з активацією глутатіон-залежних ланок ендогенної нейропротекції, а саме – із підвищенням експресії HSP<sub>70</sub> і HIF, що призводить до посилення адаптаційних механізмів (експресія антиоксидантних ферментів, активація компенсаторних енергетичних шунтів), які підвищують резистентність нейронів до ішемії [Belenichev I.F., 2014].

Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для застосування селенази, глутоксима і, особливо, глутаредоксіна в комплексній терапії мозкових інсультів в якості засобів первинної нейропротекції.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше наведено теоретичне обґрунтування і експериментальне рішення актуального завдання фармакології – оптимізації лікування гострих порушень мозкового кровообігу, яке полягає в застосуванні селенази, глутоксима і, особливо, глутаредоксіна в якості засобів активації GSH-залежних механізмів ендогенної нейропротекції.

1. Були встановлені ED<sub>50</sub> (при внутрішньоочеревинному введенні) модуляторів системи глутатіону при моделюванні гострого порушення мозкового кровообігу за їхньою здатністю впливати на зменшення рівня

- нітротирозину, підвищення концентрації відновленого глутатіону та активності глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази. ED<sub>50</sub> для селенази становить 50 мкг/кг, для глутоксиму 50 мг/кг та для глутаредоксіну 200 мкл/кг (0,4 мг білку).
2. Курсове застосування досліджуваних препаратів в експериментально обгрунтованих дозах тваринам з експериментальним ГПМК призводить до зниження ( $p < 0,05$ ) летальності на 37,1; 47,6 і на 38,4%, а також – до зменшення неврологічних порушень до 4,56 бала (селеназа), до 4,03 бала (глутоксим), до 4,27 бала (глутаредоксін) за шкалою Р. McGraw на 4-ту добу експерименту.
  3. Призначення тваринам з ГПМК селенази, глутоксима і глутаредоксіна призводить до зменшення інтенсивності оксидативного і нітрозативного стресів в головному мозку, до зниження ( $p < 0,05$ ) АФГ (39,6 – 54,4%), КФГ (49,4 – 63,3%) і нітротирозину (55 – 75%) на тлі підвищення ( $p < 0,05$ ) активності антиоксидантних ферментів СОД (22,2 – 33,2%), каталази (23,9 – 36,9%), і ферментативної та не ферментативної ланки тіол-дисульфідної системи – ГПО (75,4 – 123%), ГР (76,9 – 319%), Г-S-T (14 – 116%), ВГ (270 – 383%), та зниження ОГ (32,9 – 49,5%).
  4. Селеназа, глутоксим і глутаредоксін покращують енергетичний обмін головного мозку тварин з ГПМК за рахунок активації аеробної продукції енергії, підвищують ( $p < 0,05$ ) рівень АТФ (81,3 – 210%), малата (52,6 – 147,4%), ЕП (26,2 – 43,6%), ІФ (89,8 – 98,5%), знижують ( $p < 0,05$ ) рівень лактату (37,0 – 40,7%) і покращують функціональну активність мітохондрій (зниження швидкості відкриття пори (в 2,04 – 2,14 разів,  $p < 0,05$ ) і підвищення заряду мембрани (в 2,65 – 3,48 разів,  $p < 0,05$ )).
  5. Призначення тваринам з ГПМК селенази, глутоксима і глутаредоксіна призводить до підвищення концентрації HSP<sub>70</sub> (26,6 – 41,3%,  $p < 0,05$ ), експресії мРНК HSP<sub>70</sub> (в 3,6 – 4,2 разів,  $p < 0,05$ ), мРНК HIF-1 $\alpha$  (в 15 – 37 разів,  $p < 0,05$ ) і мРНК HIF-3 $\alpha$  (в 2,7 – 9,0 разів), що беруть участь в механізмах ендогенної нейропротекції на тлі зниження  $p < 0,05$  факторів нейродеструкції TNF- $\alpha$  (на 31,6 – 75,9%), IL-1b (на 2,5 – 22,5%).
  6. Попереднє внесення в суспензію нейронів селенази, глутоксима і глутаредоксіна ( $10^{-5}$ М) з подальшим моделюванням нейродеструкції *in vitro* (глутамат, CDNB, DNIC) призводило до зниження ( $p < 0,05$ ) маркерів ушкодження нейронів: NR2 (на 18,8 – 68,5%); АФГ сп. (на 8,68 – 43,6%) КФГ сп. (на 6,7 – 41,5%) і підвищення СОД (на 7,6 – 59%), глутатіону відновленого (на 7,87 – 154%).
  7. За силою нейропротективного ефекту глутаредоксін перевершує ( $p < 0,05$ ) селеназу, глутоксим за такими показниками як підвищення мРНК HIF-3 $\alpha$ , HSP<sub>70</sub>, і зниження NR-2, а референс-препарат пірацетам за зниженням летальності і неврологічного дефіциту, підвищенням АТФ, ГВ, HSP<sub>70</sub>, мРНК HSP<sub>70</sub>, мРНК HIF-3 $\alpha$ , зниження NR-2. Важливою ланкою нейропротективної дії селенази, глутоксима і глутаредоксіна в умовах ГПМК є активація GSH-залежних механізмів ендогенної нейропротекції, які реалізуються за



рахунок підвищення експресії HSP<sub>70</sub> і HIF, що призводить до посилення адаптаційних механізмів і підвищує резистентність нейронів до ішемії.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Литвиненко Е.С. Модуляция активности сопряженных систем NO/глутатион в ишемизированном головном мозге экспериментальных животных препаратом «Селеназа» в различных дозах / Е.С. Литвиненко, И.Ф. Беленичев// Вестник новых медицинских технологий. 2015. Т. 22, № 1. С. 33 – 38. (*Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації*).

2. Литвиненко Е.С. Ферментативное и не ферментативное звено тиол-дисульфидной системы в головном мозге экспериментальных животных с церебральной ишемией: эффекты селеназы/ И.Ф. Беленичев, Е.С. Литвиненко// Фармакологія та лікарська токсикологія. 2015. № 1 (42). С. 13 – 18. (*Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації*).

3. Литвиненко Е.С. Влияние модуляторов системы глутатиона-селеназы и глутоксима на энергетический обмен головного мозга в условиях экспериментального острого нарушения мозгового кровообращения/И.Ф. Беленичев, Е.С. Литвиненко//Фармакологія та лікарська токсикологія. 2015. № 6 (46). С. 41 – 46. (*Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації*).

4. Литвиненко Е.С. Маркеры окислительной модификации белка и нитрозирующего стресса при экспериментальном ишемическом инсульте и фармакологической модуляции системы глутатиона / И.Ф. Беленичев, Е.С. Литвиненко, Т.И. Субачова // Фармакологія та лікарська токсикологія. 2016. № 2 (48). С. 30 – 36. (*Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації*).

5. Литвиненко Е.С. Нейропротективные эффекты при модуляции глутатионовой системы головного мозга: влияние на летальность и неврологический дефицит, оксидативный стресс в условиях экспериментальной ОНМК/ И.Ф. Беленичев, Е.С.Литвиненко// Вісник проблем біології і медицини. 2016. Т. 3 (130), Вип.2. С. 94 – 99. (*Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації*).

6. Литвиненко Е.С. Нейропротекторная активность модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*/ И.Ф. Беленичев, Е.С. Литвиненко// Фармакологія та лікарська токсикологія. 2017. № 4 – 5 (55). С. 20 – 26. (*Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації*).

7. Литвиненко Е.С. Характер экспрессии мРНК HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$ , уровень нитротирозина, цГМФ и интерлейкинов в гомогенате мозга монгольских песчанок с острым нарушением мозгового кровотока и на фоне проводимой терапии модуляторами системы глутатиона/ И.Ф. Беленичев, Е.С. Литвиненко, А. М. Камышный// Вісник проблем біології і медицини . 2018. Т. 1(142), Вип. 1. С. 103 – 108. (*Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації*).

8. Пат. 126977 Україна, МПК А61К 31/00 (2018.01). Спосіб зменшення ексайтотоксичності в умовах експериментального гострого порушення мозкового кровообігу/ Беленічев І.Ф., Бухтіярова Н.В., Литвиненко О.С., Ковальчук Д.О.; заявник Запорізький державний медичний університет. – № у 201801583; заявл. 19.02.2018; опубл. 10.07.2018. Бюл. № 13. (*Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів*).

9. Литвиненко Е.С. Влияние модулятора активности Se-ГПП селеназы на состояние глутатионового звена тиол-дисульфидной системы и NO в нейронах коры животных с церебральной ишемией/ Е.С. Литвиненко // Збірка тез Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2014», (15–16 травня 2014, м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2014. С 21.

10. Литвиненко Е.С. Влияние модулятора активности Se-глутатионпероксидазы селеназы на экспрессию HSP70 и апоптоз в нейронах коры при депривации системного уровня восстановленного глутатиона *in vitro*/ Е.С. Литвиненко, И.Ф. Беленичев// Зборник тезисов Восьмой национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека», (25 – 29 мая 2014, г. Смоленск), Смоленск, 2014. С. 115 – 117.

11. Литвиненко Е.С. Влияние селективного модулятора Se-зависимой глутатионпероксидазы на показатели нитрозирующего стресса и нейроапоптоза при экспериментальном остром нарушении кровообращения./ И.Ф. Беленичев, Е.С. Литвиненко, С.В. Горбачова//Матеріали XI Українського біохімічного конгресу.//(6 – 10 жовтня 2014, Київ), 2014//The Ukrainian Biochemical Journal.Київ: КНУ ім. Т Шевченка, 2014. Т 86, №5. С. 128.

12. Литвиненко Е.С. Влияние глутоксима на показатели нитрозирующего стресса и состояние тиол-дисульфидной системы в условиях острого нарушения мозгового кровообращения (в эксперименте)/ Е.С. Литвиненко// Збірка тез Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015», (14 – 15 травня 2015. м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2015. С 25.

13. Литвиненко Е.С. Влияние модулятора системы глутатиона глутаредоксина на маркеры оксидативного и нитрозирующего стрессов./Е.С. Литвиненко, А.В. Литвиненко // Збірка тез Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини- в практику охорони здоров'я – 2016», (24 – 25 березня 2016, м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2016. С.62 – 63.

14. Литвиненко Е.С. Нейропротективные эффекты при модуляции глутатионовой системы головного мозга: влияние на летальность, неврологический дефицит и уровень TNF- $\alpha$  при моделировании ОНМК. / Е.С. Литвиненко, А. В. Литвиненко// Збірка тез Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016», (12 – 13 травня 2016, м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2016. С. 33 – 34.

15. Lytvynenko E.S. //The antioxidant properties of glutathione system modulators/ I.F. Belenichev, E.S. Lytvynenko//Збірка тез Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, пам'яті професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології», (24 – 25 листопада 2016, м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2016. С. 20 – 21.

16. Литвиненко Е.С. Экспрессия мРНК HIF-1 после терапии модуляторами системы глутатиона в условиях острого нарушения мозгового кровообращения в эксперименте/ Е.С. Литвиненко/ Збірка тез Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017», (11 – 12 травня 2017, м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2017. С. 28 – 29.

17. Литвиненко Е.С. Фармакологическая модуляция глутатионowego звена тиол-дисульфидной системы головного мозга – новое звено нейропротекции/ И.Ф. Беленичев, Е.С. Литвиненко// Тези доповідей V Національного з'їзду фармакологів України. (18 – 20 жовтня 2017, м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2017. С. 5 – 6.

## АНОТАЦІЯ

**Литвиненко О.С. Нейропротективна активність модуляторів системи глутатіону в умовах моделювання церебральної ішемії. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ - 2018.

Дисертаційна робота присвячена експериментальному дослідженню нейропротективних властивостей селенази, глутоксима і глутаредоксіна в якості засобів глутатіон-залежних механізмів ендогенної цитопротекції в досліджах *in vivo* та *in vitro*.

Встановлено, що нейропротективна активність селенази, глутоксиму і глутаредоксіну в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку спрямована на активацію глутатіон - залежних ланок ендогенної нейропротекції.

З'ясовано, що досліджувані модулятори системи глутатіону – селеназа, глутоксим і глутаредоксін підвищують експресію мРНК HSP<sub>70</sub>, HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$  в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку.

Експериментально продемонстровано позитивний вплив модуляторів системи глутатіону в досліджах *in vivo* та *in vitro* на вміст ендогенного нейропротектора – белка теплового шоку HSP<sub>70</sub>.

Доведено, що застосування селенази, глутоксима і глутаредоксіна в досліджах *in vitro* призводить до зниження вмісту NR-2 пептиду, що супроводжується пригніченням процесів глутаматної ексайтотоксичності.

Розширені дані про вплив глутаредоксіна і глутоксима на енергетичний обмін і функціональну активність мітохондрій головного мозку в умовах ішемії.

Встановлено, що селеназа, глутоксим і глутаредоксін гальмують реакції оксидативного та нітрозуючого стресу на тлі нормалізації глутатіонової системи в головному мозку, знижують летальність та неврологічний дефіцит експериментальних тварин. Визначено, що дія цих засобів має виразніший характер, ніж дія пірацетаму.

**Ключові слова:** церебральна ішемія, нейропротекція, тіол-дисульфідна система, оксидативний стрес, нітрозативний стрес, глутаматна ексайтотоксичність, HSP<sub>70</sub>, HIF-1, HIF-3, NR-2 пептид, селеназа, глутоксим, глутаредоксін

## SUMMARY

**Lytvynenko E.S. Neuroprotective activity of glutathione - system modulators in the conditions of cerebral ischemia modeling.- Manuscript.**

Thesis to obtain the academic degree of Candidate of Biological Sciences in speciality 14.03.05 – Pharmacology. - State enterprise "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv-2018.

The thesis is dedicated to the experimental investigation of molecular biochemical mechanisms of glutoxim, selenase and glutaredoxin influence on energetropic and ROS links of ischemic neurodegeneration, and justification of their use as neuroprotective agents. According to the results of the research, mechanisms of neuroprotective action of selenase, glutoxim and glutaredoxin have been established. Specifically, the researched examined the effects of modulators of the glutathione system during *in vitro* and *in vivo* studies on target endogenous neuroprotection mechanisms, and their effect on the synthesis of HSP70, the expression of the HSP70 mRNA, the HIF-1 $\alpha$  mRNA, and HIF -3 $\alpha$  mRNA. The research also examined and determined the mechanisms of selenase, glutoxim and glutaredoxin influence on the functional activity of mitochondria, and energy metabolism of the brain in the state of ischemia. It has been established that selenase, glutoxim and glutaredoxin inhibit the oxidative and nitrosative stress responses against the normalization of the glutathione system in the brain of test animals in the acute period of cerebral ischemia. For the very first time, this research provides the theoretical foundation and an experimental solution of the actual task of pharmacology – treatment optimization of acute cerebrovascular disorders, which consists of the use of selenase, glutoxim and glutaredoxin as the means of activation of GSH-dependent mechanisms of endogenous neuroprotection. The results of the research indicated that simulation of an acute cerebrovascular accident in test animals leads to a stable energy deficit (decrease of the ATP level by 60.8%), mitochondrial dysfunction (drop in the transmembrane potential of mitochondria by 78.2%, and an increase in the degree of mitochondrial pore opening by 80%), an increase in oxidative reactions (increase of AFH level by 125.2%, KFH by 201.8%) and nitrosative stress (increase of

nitrotyrosine level by 4.36 times), an increase in the level of pro-inflammatory cytokines as a result of the disruption in the antioxidative system functions, deprivation of glutathione (decrease of GSH level by 85.6%), and a decrease in activity of endogenous neuroprotection indicators - HSP70 chaperone proteins (by 16.3%). We observed a close direct correlation between the level of reduced glutathione and HSP70 in the cytosolic and mitochondrial fractions of the brain of the test animals. Similar results and data was obtained by us in the process of neurodegeneration experiments *in vitro*. We observed a close direct correlation between the glutathione recovered and HSP70 when toxic doses of glutamate, CDNB and DNIC were administered. Additionally, a close reverse correlation was observed between the NR-2 peptide and HSP70 in the modeling of glutamate excitotoxicity, and between nitrotyrosine and HSP70 during the deprivation of the systemic level of glutathione and modeling of nitrosative stress. The result of the aforementioned conditions is the presence of severe neurological disorders (53.3% of the test animals), decreased cognitive functions, and a high percentage of deaths in test animals (63.3%) during the acute period of cerebral ischemia. Administration of selenase, glutoxim and glutaredoxin to animals suffering from an acute cerebrovascular accident leads to a normalization of the thiol redox - status of a neuron, as evidenced by a 2.7 – 4.8 time increase in GSH levels, a 32.9 – 49.5% decrease in GSSG levels, a 1.82 – 2.37 time increase in GPR levels, a 1.73 – 4.19 time increase in GR, and a 14 – 116% increase in GST levels. The normalization of the thiol-disulfide exchange equilibrium under the influence of TDS modulators leads to an increase in the stability of protein molecules, in particular, the HSP70 chaperone proteins. A course of therapy with selenase, glutoxim and glutaredoxin over 4 days results in an increase in the concentration of HSP70 by 26.6 – 41.3%. An increase in the levels of endogenous neuroprotection factors occurs in conjunction with a decrease in TNF- $\alpha$  (31.6 – 75.9%) and IL-1 $\beta$  (by 2.5 – 22.5%) neurodegeneration factors. The conducted PCR studies demonstrate an increase in the expression of the mRNA of the HSP70 gene by 3.6 – 4.2 times, the mRNA of the HIF-1 $\alpha$  gene - by 15 – 37 times, and the mRNA of the HIF-3 $\alpha$  gene by 2.7 – 9.0 times above the control group (with glutoxim and glutaredoxin) as a result of therapy with modulators of glutathione in the acute period of ischemia. Selenase, glutoxim, and glutaredoxin improve the energy metabolism of animals suffering from an acute cerebrovascular accident through the activation of aerobic energy production, increasing the level of ATP (81.3 – 210%), malate (52.6 – 147.4%), EP (26.2 – 43.6%), FI (89.8 – 98.5%), reducing the level of lactate (37.0 – 40.7%), and improving the functional activity of mitochondria (decrease in the rate of opening of the pores (by 2.04 – 2.14 times) and increasing the charge of the membrane (by 2.65 – 3.48 times). A 4-day course of therapy with modulators of the glutathione system applied to test animals inhibits the intensity of the reactions to oxidative and nitrosative stress, as evidenced by a significant decrease in the markers of oxidative degradation of the AFH proteins (39.6 – 54.4%), KFH (49.4 – 63.3%) and nitrotyrosine (55 – 75%) against the backdrop of increased activity of the antioxidant enzymes SOD (22.2 – 33.2%) and catalase (23.9 – 36.9%). In addition, it has been established that selenase, glutoxim and glutaredoxin improve the energy metabolism of animals suffering from an acute cerebrovascular accident due to the activation of

aerobic energy production with an increase of ATP levels (81.3 – 210%), malate (52.6 – 147.4%), EP (26.2 – 43.6%), FI (89.8 – 98.5%), a reduction in the level of lactate (37.0 – 40.7%), and an improvement in the functional activity of mitochondria (decrease in the rate of opening of the pores (by 2.04 – 2.14 times) and an increase in the charge of the membrane (2.65 – 3.48 times). Preliminary placement into a suspension of selenase, glutoxim, and glutaredoxin ( $10^{-5}$ M) neurons with subsequent modeling of neurodegeneration in vitro (glutamate, CDNB, DNIC) led to a decrease in neuron damage markers - NR2 (by 18.8 – 68.5%) AFH (8.7 – 43.6%), KFH (by 6.7 – 41.5%), and an increase in SOD (by 7.6 – 59%), and glutathione recovery (by 7.8 – 154%). A course of therapy utilizing experimentally substantiated doses of selenase - 50  $\mu$ g / kg, glutoxim-50 mg / kg and glutaredoxin-200  $\mu$ l / kg in animals with induced acute cerebrovascular accidents leads to a reduction in mortality by 37.1, 46.7 and 38.4 %, as well as to a decrease in neurological disturbances of 4.56 points (selenase), 4.03 points (glutoxim), and 4.27 points (glutaredoxin) on the McGraw scale following the 4th day of the experimental treatment. The strength of the neuroprotective effects of selenase, glutoxim and glutaredoxin exceeds ( $p < 0,05$ ) the effects achieved using the referenced control -piracetam.

**Key words:** cerebral ischemia, neuroprotection, thiol- disulphide system, oxidative stress, nitrosative stress, glutamate excitotoxicity, HSP70, HIF-1, HIF-3, NR-2 peptide, selenase, glutoxim, glutaredoxin.

## АННОТАЦИЯ

**Литвинко Е.С. Нейропротективная активность модуляторов системы глутатиона в условиях моделирования церебральной ишемии. - Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.05 - фармакология. - ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев-2018.

Диссертационная работа посвящена экспериментальному исследованию нейропротективных свойств селеназы, глутоксима и глутаредоксина в качестве средств глутатион-зависимых механизмов эндогенной цитопротекции в опытах *in vivo* и *in vitro*.

Установлено, что нейропротективная активность селеназы, глутоксима и глутаредоксина в условиях острой экспериментальной ишемии головного мозга направлена на активацию глутатион-зависимых звеньев эндогенной нейропротекции.

Установлено, что исследуемые модуляторы системы глутатиона - селеназа, глутоксим и глутаредоксин повышают экспрессию мРНК HSP<sub>70</sub>, HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в условиях острой экспериментальной ишемии головного мозга.

Экспериментально продемонстрировано положительное влияние модуляторов системы глутатиона в опытах *in vivo* и *in vitro* на содержание эндогенного нейропротектора- белка теплового шока HSP<sub>70</sub>.

Доказано, что применение селеназы, глутоксима и глутаредоксина в опытах *in vitro* приводит к снижению содержания NR-2 пептида, что сопровождается угнетением процессов глутаматной эксайтотоксичности.

Расширены данные о влиянии глутаредоксина и глутоксима на энергетический обмен и функциональную активность митохондрий головного мозга в условиях ишемии.

Установлено, что селеназа, глутоксим и глутаредоксин тормозят реакции оксидативного и нитрозативного стресса на фоне нормализации глутатионовой системы в головном мозге, снижают летальность и неврологический дефицит экспериментальных животных. Определено, что действие исследуемых препаратов имеет более выраженный эффект, чем действие пирацетама.

**Ключевые слова:** церебральная ишемия, нейропротекция, тиол-дисульфидная система, оксидативный стресс, нитрозативный стресс, глутаматная эксайтотоксичность, HSP<sub>70</sub>, HIF-1, HIF-3, NR-2 пептид, селеназа, глутоксим, глутаредоксин.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

|                |  |
|----------------|--|
| АДФ            | – аденозиндифосфат                                 |
| АМФ            | – аденозинмонофосфат                               |
| АТФ            | – аденозинтрифосфат                                |
| АФГ            | – альдегідфенілгідрозони                           |
| ВГ             | – відновлений глутатіон                            |
| ГПМК           | – гостре порушення мозкового кровообігу            |
| ГПО            | – глутатіонпероксидаза                             |
| ГР             | – глутатіонредуктаза                               |
| Г-S-T          | – глутатіон-s-трансфераза                          |
| ЕД50           | – середня ефективна доза                           |
| ЕЗ             | – енергетичний заряд                               |
| ЕП             | – енергетичний потенціал                           |
| ЗСА            | – загальна сонна артерія                           |
| ЗТ-ПЛР         | – полімерна ланцюгова реакція в реальному часі     |
| ІФ             | – індекс фосфорилування                            |
| КФГ            | – кетонфенілгідрозони                              |
| ЛО             | – ложнооперовані                                   |
| мРНК           | – матрична рибонуклеїнова кислота                  |
| ОГ             | – окиснений глутатіон                              |
| ОМБ            | – окиснювальна модифікація білків                  |
| СОД            | – супероксиддисмутаза                              |
| ТКД            | – термодинамічний контроль дихання                 |
| ТДС            | – тіол-дисульфідна система                         |
| ТДР            | – тіол-дисульфідна рівновага                       |
| CDNB           | – 1-хлор-2,4-динітробензен                         |
| DNIC           | – дінитрозольний комплекс заліза                   |
| HIF-1 $\alpha$ | – фактор, індукований гіпоксією 1-альфа            |
| HIF-3 $\alpha$ | – фактор, індукований гіпоксією 3-альфа            |
| HSP70          | – білки теплового шоку з молекулярною масою 70 кДа |
| IL-1 $\beta$   | – інтерлейкін -1 $\beta$                           |
| IL-4           | – інтерлейкін 4                                    |
| NMDA           | – N-метил-D-аспартат                               |
| NR-2           | – пептидний фрагмент NMDAR                         |
| пептид         |  |
| TNF- $\alpha$  | – фактор некрозу пухлин                            |

Підписано до друку 30.10.2018. Гарнітура Times New Roman  
Папір друкарський. Формат 60×90 1/16. Умовн. друк. арк. 1,83.

Наклад – 100 прим. Замовлення № 8026.

Надруковано з оригінал-макету в типографії  
Запорізького державного медичного університету  
69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26