

## ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ ПОРУШЕНЬ У СИСТЕМІ ОКСИДУ АЗОТУ І ГЛУТАТІОНУ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ТВАРИН ПРИ ГОСТРІЙ ЦЕРЕБРАЛЬНІЙ ІШЕМІЇ

Запорізький державний медичний університет

Протягом останніх років відзначається поширення судинних захворювань головного мозку, зокрема гострих порушень мозкового кровообігу (ГПМК) [1]. У більшості країн інсульт посідає 2-ге–3-тє місце у структурі загальної смертності населення [2]. У світлі сучасних уявлень, патогенез ішемічного ушкодження мозку складається з етапів: дисфункція мітохондрій та енергетичний дефіцит, трансмітерний автокоїдоз, шокове відкриття кальцієвих каналів, підвищене утворення активних форм кисню (АФК) у нетипових реакціях мітохондрій, підвищення активності NO-синтази і гіперпродукція оксиду азоту, розвиток нітрозуючого стресу [3].

Незважаючи на досить великий арсенал нейропротективних засобів, їх клінічне застосування при церебральному інсульті не завжди є успішним. Вивчення ролі нітрозуючого стресу в даній патології підвищило інтерес фармакологів до модуляторів системи оксиду азоту. Доведено нейропротективну дію блокаторів NO-синтази [4]. Установлено, що при застосуванні тіольних антиоксидантів — скавенджерів оксиду азоту (тіотриазолін,  $\alpha$ -ліпоєва кислота, ацетилцистеїн) в умовах терапії мозкового інсульту спостерігається позитивний ефект [5]. Тіольні антиоксиданти здатні підвищувати біодоступність

оксиду азоту, зв'язуючи його цитотоксичні деривати, та нормалізувати показники тіолдисульфідної системи, пов'язаної з NO. Це дозволяє вважати тіольні антиоксиданти перспективними засобами вторинної нейропротекції. У зв'язку з цим обґрунтованим і перспективним є пошук вискоєфективних нейропротекторів з антиоксидантним механізмом дії серед нових похідних S-заміщених хіназоліну [6; 7].

**Метою** нашого дослідження є вивчення нейропротекторного ефекту похідного тіохіназоліну NC-224 при моделюванні гострого порушення мозкового кровообігу.

### Матеріали та методи дослідження

У роботі досліджено похідне тіохіназоліну NC-224, що було синтезоване на кафедрі фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету (завідувач кафедри, д-р фарм. наук, проф. І. А. Мазур). Дослідження проводили на 100 білих щурах лінії Вістар масою 170–200 г. Усі дослідні маніпуляції здійснювали у відповідності з «Положенням про використання лабораторних тварин у біомедичних дослідженнях». Гостре порушення мозкового кровообігу викликали необоротною двобічною оклюзією сонних артерій (ДОСА). Оперування проводили під

етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг) [8; 9].

Тварин було розділено на 5 експериментальних груп по 20 особин. Перша група — псевдооперовані тварини, друга — щури з ГПМК (контрольна), третя — тварини з ГПМК, яким внутрішньочеревинно вводили тіотриазолін (50 мг/кг), четверта — щури з ГПМК, яким вводили внутрішньочеревинно NC-224 (25 мг/кг).

Біохімічними методами визначали активність глутатіонпероксидази (ГПР), активність глутатіонредуктази (ГР) [10], флуорометрично визначали відновлений і окиснений глутатіон [10]. У експериментальних тварин видаляли мозок, на 24 год фіксували його у фіксаторі Карнуа і за стандартною схемою [10] заливали у парафінові блоки, з яких готували серійні фронтальні 5-мікронні гістологічні зрізи в ділянці постцентральної звивини (соматосенсорна кора). Інтенсивність експресії індукбельної (iNOS), ендотеліальної (eNOS), нейрональної (nNOS) NO-синтази досліджували імуногістохімічним методом [4]. Після депарафінізації та дегідратації зрізи обробляли 3 % перекисом водню для блокування ендогенної пероксидази, також кожний зріз обробляли первинними поліклональними антитілами кроликів проти iNOS, eNOS, nNOS. Після промивання фосфатним буфером

на зрізи наносили вторні анти-тіла. Інтенсивність експресії ізоформ NOS оцінювали за щільністю iNOS-, eNOS-, nNOS-позитивних клітин у зрізах [9; 10].

Результати досліджень опрацьовано із застосуванням статистичного пакета ліцензійної програми “Statistica® for Windows 6.0” (StatSoft Inc., N AXXR712D833214FAN5), а також “SPSS 16.0”, “Microsoft Excel 2003”. Окремі статистичні процедури реалізовано у вигляді спеціально написаних макросів у відповідних програмах. Для всіх видів аналізу статистично значущою вважали різницю при  $p \leq 0,05$ .

### Результати дослідження та їх обговорення

Збільшення часу оклюзії до 6 год і, особливо, до 24 год приводило до зменшення вмісту відновленого глутатіону, підвищення його окисненої форми на фоні загального зниження активності ГР і ГПР (табл. 1).

Курсове призначення тіотриазоліну (50 мг/кг) і NC-224

(25 мг/кг) приводило до відновлення тіол-дисульфідної рівноваги: збільшення кількості відновленого глутатіону в гомогенаті на 6-ту годину, 1-шу добу і, особливо, на 6-ту добу експерименту, зниження концентрації окисненого глутатіону. Спостерігалось відновлення активності ферментів тіол-дисульфідної системи — ГР і ГПР з максимальним проявом ефекту на 6-ту добу. Курсове призначення тіотриазоліну збільшувало вміст відновленого глутатіону на 33 %, підвищення активності ГР і ГПР на 42 і 33 % відповідно на 6-ту добу експерименту. Призначення за такою ж схемою NC-224 демонструвало вищий ефект — збільшення рівня відновленого глутатіону на 42 %, підвищення активності ГР на 65 %, ГПР на 49 % щодо контрольної групи тварин (див. табл. 1).

Підвищення активності NOS за рахунок експресії індукцибельної форми на тлі пригнічення глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи призво-

дило до розвитку нітрозуючого стресу. Також зареєстровано підвищення загальної активності NOS на 21 і 66 % внаслідок експресії нейрональної й індукцибельної ізоформ NOS на 6-ту і 24-ту години ішемії. Висновок зроблено на підставі того факту, що нами було зареєстровано підвищення щільності nNOS-позитивних клітин на 64 і 38 %. Також на 6-ту і 24-ту години ішемії підвищувалася кількість iNOS-позитивних клітин на 31 і 56 % відповідно (табл. 2). Усі проаналізовані показники доводять вищу активність сполуки NC-224 порівняно з тіотриазоліном.

На 6-ту і 24-ту годину ішемії у тканинах головного мозку реєструвалося збільшення маркера нітрозуючого стресу нітротирозину на 37 і 70 % відповідно. Зареєстроване підсилення експресії NOS з 6-ї години спостереження, головним чином за рахунок індукцибельної форми у відповідь на ішемію, пов'язане з повторною гіперпродукцією АФК, надлишок яких пригнічує

Таблиця 1

Вплив NC-224, тіотриазоліну на показники тіол-дисульфідної системи головного мозку щурів у різні терміни ішемії,  $M \pm m$

Група тварин	Глутатіон відн., мкМ/г	Глутатіон окисн., мкМ/г	ГР, мкМ/(мг·хв)	ГПР, мкМ/(мг·хв)
Інтактні тварини, n=20	4,00±0,36	0,140±0,012	13,50±1,16	58,10±1,92
ДОСА 1 год (контроль)	3,80±0,20	0,150±0,011	15,80±1,09	65,10±2,00#
ДОСА 1 год + тіотриазолін	3,90±0,20	0,140±0,020	16,60±0,66	63,70±2,60
ДОСА 1 год + NC-224	3,90±0,80	0,140±0,017	16,90±0,74	68,65±2,80
ДОСА 6 год (контроль)	2,90±0,22#	0,210±0,018#	11,00±1,06	45,50±3,60#
ДОСА + тіотриазолін 6 год	2,90±0,22	0,180±0,022	11,70±0,74	45,90±3,90
ДОСА + NC-224 6 год	3,70±0,14	0,140±0,024*	16,00±1,20*	45,20±1,80
ДОСА 24 год (контроль)	2,20±0,12	0,320±0,027#	8,70±0,89#	31,00±2,70#
ДОСА + тіотриазолін 24 год	3,20±0,15	0,210±0,028*	14,0±1,1*	49,90±2,30*
ДОСА + NC-224 24 год	3,30±0,12	0,150±0,023**	17,80±0,86**	54,90±2,30**
ДОСА 6 діб	2,14±0,14#	0,420±0,034#	7,31±0,73#	29,80±1,12#
Тіотриазолін 6 діб (контроль)	3,22±0,17*	0,230±0,160*	12,70±0,43*	44,60±3,00*
ДОСА + NC-224 6 діб	3,72±0,32*	0,160±0,081**	21,20±1,53**	57,90±2,50**

Примітка. У табл. 1 і 2: # —  $p \leq 0,05$  порівняно з такими в інтактних тварин; \* —  $p \leq 0,05$  порівняно з такими в групі контролю в той же термін досліджу; \*\* —  $p \leq 0,05$  порівняно з такими в групі із введенням тіотриазоліну в той же термін досліджу. Відмінності вірогідні.

**Вплив тіотриазоліну і NC-224 на активність NOS, експресію індукційної, ендотеліальної, нейрональної NOS і вміст нітротирозину в головному мозку щурів у різні терміни експериментальної ішемії,  $M \pm m$**

Група тварин	Щільність клітин			Нітротирозин, нм/г білка	Активність NOS, нм/(г·хв)
	iNOS- позитивних	eNOS- позитивних	nNOS- позитивних		
Інтактні тварини, n=20	137,60±12,11	332,5±18,6	90,0±10,5	9,86±0,73	23,40±1,73
ДОСА (контроль)	160,70±15,60 <sup>#</sup>	421,6±14,8 <sup>#</sup>	159,3±14,2 <sup>#</sup>	10,54±0,21	38,00±1,82
ДОСА 1 год + тіотриазолін	157,80±14,80	444,2±15,8	52,7±12,6	9,96±0,50	37,40±2,32
ДОСА 1 год + NC-224	155,80±11,90	437,2±17,5	157,3±18,3	10,04±0,52	35,70±2,11
Контроль 6 год	200,18±19,60 <sup>#</sup>	279,3±17,1 <sup>#</sup>	252,7±14,9 <sup>#</sup>	16,43±0,42 <sup>#</sup>	48,30±2,77
Тіотриазолін 6 год	190,85±14,20	270,0±16,8	245,2±17,9	16,30±0,31	44,80±3,56
NC-224 6 год	185,60±12,50	272,6±19,3	230,0±14,2	15,76±0,63	41,40±2,33
Контроль 24 год	312,80±21,20 <sup>#</sup>	208,3±16,2 <sup>#</sup>	144,6±10,5 <sup>#</sup>	34,40±0,52 <sup>#</sup>	67,50±2,75
Тіотриазолін 24 год	277,50±27,60	220,0±15,3	121,7±13,8	32,70±0,38	60,80±4,12
NC-224 24 год	184,80±15,60 <sup>*</sup>	270,6±13,6 <sup>*</sup>	114,5±15,2 <sup>*</sup>	30,78±0,58 <sup>*</sup>	40,30±1,87 <sup>*</sup>
Контроль 6 діб	299,70±21,50 <sup>#</sup>	128,5±17,4 <sup>#</sup>	110,4±10,6 <sup>#</sup>	37,60±0,41 <sup>#</sup>	70,60±3,11
Тіотриазолін 6 діб	233,20±18,50 <sup>*</sup>	220,1±15,0 <sup>*</sup>	91,0±9,5 <sup>*</sup>	28,40±0,47 <sup>*</sup>	57,40±2,10
NC-224 6 діб	166,80±17,30 <sup>**</sup>	289,4±13,9 <sup>**</sup>	78,4±7,5 <sup>**</sup>	22,60±0,31 <sup>**</sup>	38,40±1,87 <sup>**</sup>

експресію й активність eNOS, ініціює синтез прозапальних цитокінів, факторів транскрипції (c-fos, jnk) й опосередковано — iNOS.

Таким чином, оклюзія сонних артерій протягом години не приводила до вірогідних змін показника тіол-дисульфідної системи — відновлених та окиснених форм глутатіону. Паралельно реєструвалося збільшення активності ферментів системи ГР і ГПР, що, за нашими припущеннями, має компенсаторний характер, спрямований на захист клітини від токсичної дії АФК. Реєструвалося підвищення загальної NOS-активності та збільшення експресії всіх ізоформ NO-синтази. Доказом цього є підвищення щільності iNOS-, eNOS-, nNOS-позитивних клітин у сомато-сенсорній зоні кори головного мозку. Тим же часом не спостерігалось вірогідного збільшення рівня нітротирозину в мозку тварин із церебральною ішемією.

Вірогідніше за все, це пов'язано з нормальним функціо-

нуванням системи глутатіону, яка здатна підвищувати біодоступність NO, утилізувати його цитотоксичні деривати та стримувати розвиток нітрозуючого стресу.

Застосування тіотриазоліну і NC-224 демонструвало позитивну дію щодо активності NOS і експресії її ізоензимів. Введення тіотриазоліну не мало ефекту на 1-шу–24-ту годину розвитку ішемії, але ефект відзначено на 6-ту добу ішемії, тобто на початку відновного періоду. Можливо, що даний ефект зумовлено здатністю тіотриазоліну регулювати транскрипційні фактори за рахунок впливу їх Red-Oxi ділянок і таким чином впливати на експресію NOS [2; 3]. Введення NC-224, починаючи з 1-ї доби ішемії, нормалізувало активність NOS і зменшувало щільність iNOS-, nNOS-позитивних клітин, збільшувало щільність eNOS-клітин. Про те, що NC-224 знижує дію нітрозуючого стресу, свідчить зменшення рівня нітротирозину, починаючи з 1-ї доби ішемії. Тіотриазолін

демонстрував подібну дію з 6-ї доби.

Отже, NC-224 є ефективним тіольним скавенджером NO, демонструє нейропротекторну дію у гострому періоді церебральної ішемії. Виявлений механізм дії NC-224 пов'язаний як із відновленням тіол-дисульфідної рівноваги, так і з обмеженням гіперпродукції NO. Також NC-224 впливає на модуляцію експресії ізоензимів NOS в умовах ішемії. Так, NC-224, починаючи з 1-ї доби, обмежував експресію iNOS (на 59,07%), nNOS (на 79,19%), які безпосередньо беруть участь у розвитку нітрозуючого стресу. Спостерігалось підвищення експресії eNOS як умови у механізмах довгострокової адаптації та нейропротекції. Нейропротекторну дію тіотриазоліну можна пояснити наявністю у хімічній структурі тіоацетату, який, конкуруючи з SH-групами цистеїнзалежних ділянок клітинних білків за пероксонітрид, створює стійкі комплекси, обмежуючи нейротоксичну дію дериватів оксиду азоту [11; 12].

Більшу нейропротекторну активність сполуки NC-224 порівняно з тіотриазоліном можна пояснити не тільки здатністю зв'язувати цитотоксичні деривати оксиду азоту, але й обмежувати гіперекспресію індукційної NOS.

Відомо, що однією з ланок патогенезу деяких захворювань є гіперпродукція АФК біоенергетичними і нейрохімічними системами клітини. Патогенез ішемічного ушкодження головного мозку включає в себе підвищення активності NOS, гіперпродукцію NO, розвиток нітрозуючого стресу [4; 11]. Указані фактори потребують аналізу та вивчення їх ролі у патології. Однією з них є роль ізоензимів NO-синтази у різних термінах ішемії та вираженість нейропротекторної дії тіольних скавенджерів NO щодо впливу на експресію NOS і активності нітрозуючого стресу. У результаті досліджень встановлено, що ДОСА приводить до зміни співвідношення систем оксиду азоту і важливої ланки тіол-дисульфідної системи — глутатіону.

## Висновки

1. Сполука NC-224 має нейропротекторні властивості, здатна до відновлення тіол-дисуль-

фідної рівноваги й обмеження гіперпродукції NO.

2. Введення NC-224 привело до нормалізації активності NOS, зменшення щільності iNOS- і nNOS-позитивних клітин, збільшення щільності eNOS-клітин у сенсомоторній зоні кори головного мозку.

3. Сполука NC-224 при оцінці нейропротекторної дії перевершувала препарат порівняння тіотриазолін.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Корнацький В. М. Медико-соціальні аспекти хвороб системи кровообігу / В. М. Корнацький, Т. С. Маноїленко. – К., 2009. – 145 с.

2. Виничук С. М. Лакунарные и нелакунарные инфаркты в вертебрально-базиллярном бассейне / С. М. Виничук // Нові стратегії в неврології : матеріали 11-ї Міжнар. конф. Судак, 26–29 квітня 2009 р. / за ред. С. М. Кузнецової. – К., 2009. – С. 35–37.

3. Цереброваскулярні захворювання та можливості фармакотерапії / В. Й. Мамчур, В. І. Жилко, К. О. Кравченко, С. М. Дронов // Український медичний вісник. – 2009. – № 9. – С. 49–55.

4. Беленичев И. Ф. Митохондриальная NO-синтаза — перспективная мишень нейропротекции / И. Ф. Беленичев, В. В. Пархоменко // Фармакология та лікарська токсикологія. – 2011. – № 5 (24). – С. 25–26. (4-й Національний з'їзд фармакологів України. Київ, 10–12 жовтня 2011 р.)

5. Беленичев И. Ф. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник. – Донецк : Изд. дом Заславского, 2009. – 267 с.

6. Мазур И. А. К вопросу создания препаратов нейропротекторного действия / И. А. Мазур, И. Ф. Беленичев // Вісник фармакології та фармації. – 2006. – № 4. – С. 28–32.

7. Пошук фізіологічно активних гетероциклічних речовин як потенційних складових нових лікарських засобів / Ю. І. Губський, О. В. Вельчинська, А. Б. Драпайло [та ін.] // Експериментальна і клінічна медицина. – 2009. – № 4. – С. 62–68.

8. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації / О. В. Стефанов. – К. : Авіценна, 2002. – 527 с.

9. Беленичев И. Ф. Экспериментальні моделі ішемії головного мозку у фармакологічних дослідженнях / И. Ф. Беленичев, Н. В. Бухтиярова, Л. О. Громов // Ліки. – 2006. – № 3/4. – С. 11–19.

10. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М. И. Прохоровой. – Л. : Изд-во ЛГУ, 1982. – 272 с.

11. Фармакологическая модуляция соотношений NO и тиол-дисульфидной системы — новое направление нейропротекции / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, Н. В. Бухтиярова [и др.] // Медицина неотложных состояний. – 2010. – № 2. – С. 83–89.

12. Jones P. Radical-free biology of oxidative stress / P. Jones // J Physiol Cell Physiol. – 2008. – N 8. – P. 283–290.

UDC 615.31:547.856.1].015.4:616.831-005.4-036.1-092.9

S. A. Morguntsova

ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ ПОРУШЕНЬ У СИСТЕМІ ОКСИДУ АЗОТУ І ГЛУТАТІОНУ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ТВАРИН ПРИ ГОСТРІЙ ЦЕРЕБРАЛЬНІЙ ІШЕМІЇ

Ішемічний інсульт характеризується низкою особливостей, серед яких описуються первинні та вторинні ушкодження. Незважаючи на існуючий арсенал нейропротективних засобів, їх клінічне застосування при церебральному інсульті не завжди є успішним. Це робить актуальним пошук високо-ефективних нейропротекторів. Патогенез ішемічного ушкодження головного мозку складається з кількох ланок, серед яких розвиток нітрозуючого стресу. При моделюванні експериментальної ішемії, вивчали вплив похідного тіохіназоліну NC-224 на тіол-дисульфідну систему й експресію ізоформ NO-синтази. Отримано результати, що підтверджують здатність похідного тіохіназоліну NC-224 обмежувати деструктивну дію нітрозуючого стресу.

**Ключові слова:** ішемія, інсульт, стрес, нейропротектор.

UDC 615.31:547.856.1].015.4:616.831-005.4-036.1-092.9

S. A. Morguntsova

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF VIOLATIONS IN NITRIC OXIDE AND GLUTATHIONE SYSTEM IN ANIMALS' BRAIN UNDER ACUTE CEREBRAL ISCHEMIA

Ischemic stroke has some peculiarities; primary and secondary lesions are among them. In spite of wide arsenal of neuroprotective remedies, their clinical application in cerebral stroke is not always successful. It grounds the search for highly effective neuroprotectors. Pathogenesis of ischemic lesion of brain has some links, one of them is the development of nitrosating stress. The influence of the derivative of thioquinazoline NC-224 on thiol-disulphide system and expression of isoforms of NO synthase was studied on the model of experimental ischemia. Received data proved an ability of the derivative of thioquinazoline NC-224 to limit destructive effect of nitrosating stress.

**Key words:** ischemia, stroke, stress, a neuroprotective agent.