

О. М. Єгоров, І. Ф. Бєленічев, О. П. Соколик

## Стан глутатіонової системи головного мозку пренатально алкоголізованих щурів на фоні курсового призначення цереброкуруну й тіоцетаму

Запорізький державний медичний університет

*Ключові слова:* глутатіонова система, пренатальна алкоголізація, мітохондрія, тіоцетам, цереброкурурин

Починаючи з 1990 року в Україні спостерігається нова хвиля збільшення зловживання алкоголем, і показники алкоголізації населення значно перевищують середньоєвропейський рівень. За даними офіційної статистики більше 2 % українців залучено у хворобливе пияцтво. Останніми роками зростає поширеність захворювань, пов'язаних із вживанням алкоголю серед жінок. Сьогодні відзначається неухильне зниження віку людей, що споживають спиртні напої й збільшення числа жінок, що страждають на алкоголізм [1, 2].

Актуальність жіночого алкоголізму зумовлена тим, що, у першу чергу, наноситься шкода стану здоров'я дітей, народжених від даного контингенту жінок. Незважаючи на досить широке висвітлення порушеної проблеми в літературі, подальший розвиток дітей, які народилися в сім'ях батьків з алкоголізмом, залишається маловивченим. Потребують більш детального розгляду особливості реакцій дитячого організму в ранньому віці, коли нервова, імунна системи та метаболізм організму найуразливіші щодо зовнішніх впливів. Тому розкриття молекулярно-біохімічних механізмів загибелі нейронів за умов пренатальної алкоголізації та розробка способів фармакологічної корекції є одним з актуальних завдань сучасної педіатрії, неврології та фармакології [3, 4].

*Мета дослідження* – вивчення стану глутатіонової системи головного мозку пренатально алкоголізованих щурів на

фоні курсового призначення цереброкуруну й тіоцетаму.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили на самках білих щурів масою 60–70 г, що отримані з ПП «Біомодель-сервіс» (м. Київ). Щури з 5-го по 20-й день вагітності отримували етанол у дозі 6-8 г/кг/день, контрольні щури – ізокалоричний розчин сахарози. Нащадкам алкоголізованих щурів протягом 25 днів внутрішньоочеревинно вводили тіоцетам (125 мг/кг), пірацетам (125 мг/кг) або цереброкурурин (0,05 мл/кг); контрольна група тварин отримувала фізіологічний розчин. У кожній групі було по 20 новонароджених.

Біохімічні дослідження головного мозку проводили на 26 добу експерименту, для цього тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом. Виділення мітохондріальної та цитоплазматичної фракції мозку проводили методом диференційного центрифугування за Мак-Ільвейном і Роднайтом [5]. Досліджували наступні показники: активність ензимів глутатіонового циклу – глутатіонредуктази (ГР), глутатіонпероксидази (ГПР). Стан глутатіонового ланцюга тіолдисульфідної системи вивчали за концентрацією відновленого (GSH) та окисненого (GSSG) глутатіону; відновлених SH-груп та окиснених тіолів [6,7]. Крім того, визначали концентрацію маркерів окисного пошкодження білків – альдегідфенілгідразонів (АФГ), кетонфенілгідразонів (КФГ) та нітротирозину [7], а також активність супероксиддисмутази (СОД).

Функціональну активність мітохондрій визначали за відкриттям мітохондріальної пори (МП), а також за збереженням заряду мітохондрій, виділених

із головного мозку експериментальних тварин. Відкриття МП визначали при  $\lambda = 540$  нм та  $25^\circ\text{C}$  і постійно перемішували протягом 25 хв. Визначення мітохондріального заряду проводили с сафроніном О (9 мкМ на пробу) за різницею світлопоглинання при 515 і 525 нм ( $\Delta A$  515–525 нм) [5].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням стандартного пакету аналізу програм статистичної обробки результатів, версії Microsoft Office Excell 2003. Результати наведено у вигляді вибіркового середнього значення  $\pm$  стандартна помилка середнього значення. Достовірність відмінностей між експериментальними групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента і U-критерієм Уїтні-Манна комп'ютерної програми «STATISTICA for Windows 6.0» (Stat-Soft Inc., № AXXR712D833214FAN5).

**Результати та їх обговорення.** Встановлено, що пренатальна алкоголізація призводить до значних змін глутатинового ланцюга тіол-дисульфідної системи за рахунок зменшення її відновлених інтермедіатів (значно падає рівень цитозольного та мітохондріального глутатіону, відновлених тіольних груп) та зростання окисного глутатіону та загальної кількості окиснених тіолів як у цитозольній, так і мітохондріальній фракціях головного мозку щурів на 25 добу життя.

Як відомо, глутатіон відіграє важливу роль у забезпеченні антиоксидантно-

го захисту нейронів, бере участь в убіквітинілуванні клітин, що дегенерують, та інактивації цитотоксичних карбонільних дериватів. Крім того, глутатіон проявляє антиапоптичну дію, а також є нейротрансмітером, що модулює активність NMDA рецепторів, обмежуючи їхню гіперполяризацію за рахунок протекції SH-груп останніх [8, 9]. Встановлене значне зниження активності СОД у цитозольній і мітохондріальній фракціях гомогенату мозку пренатально алкоголізованих щурів. Також відмічене зниження активності ферментів глутатинового ланцюга в цитозольній фракції мозку пренатально алкоголізованих щурів та компенсаторна активація ферментів цього ланцюга в мітохондріальній фракції на 25 добу життя щурят після пренатальної алкоголізації на тлі дефіциту глутатіону та інших інтермедіатів тіол-дисульфідної системи. Напруженість цих процесів є досить велика, оскільки в ці терміни рееструється накопичення маркерів окисного стресу: АФГ – на 107 %, КФГ – на 84,2 %, нітротирозину – на 87 % у мітохондріях та на 108, 211 і 44 % відповідно в цитозолі (табл. 1 та 2).

Підвищення рівня окисненого глутатіону в тканинах головного мозку експериментальних тварин призводить до посилення окисного та нітрозуючого стресу, збільшення метилювання нуклеїнових кислот, зниження трансляційної активності мітохондрій, посилення

Таблиця 1

*Вплив досліджуваних препаратів на показники окислативного стресу в цитозольній фракції мозку пренатально алкоголізованих тварин ( $M \pm t$ ,  $n = 10$ )*

Група тварин / Показник	Інтактні	Контроль (пренатальна алкоголізація)	+ Тіоцетам	+ Цереброкурин	+ Пірацетам
Активність СОД, у.о./мг білка · хв	150,6 $\pm$ 12,0	68,9 $\pm$ 9,2*	191,1 $\pm$ 16,0**	214,2 $\pm$ 14,0**	70,5 $\pm$ 7,8*
Вміст нітротирозину, нмоль/г білка	32,1 $\pm$ 1,5	60,0 $\pm$ 3,8*	41,7 $\pm$ 1,4**	36,3 $\pm$ 2,0**	57,5 $\pm$ 5,8*
Вміст АФГ, у.о./г білка	7,40 $\pm$ 0,21	15,40 $\pm$ 0,23*	11,2 $\pm$ 0,1**	9,50 $\pm$ 0,27**	14,1 $\pm$ 0,1*
Вміст КФГ, у.о./г білка	1,80 $\pm$ 0,17	5,90 $\pm$ 0,12*	4,50 $\pm$ 0,17	3,20 $\pm$ 0,13**	4,70 $\pm$ 0,11*

Примітка. Тут і в табл. 2–4: \*  $P \leq 0,05$  відносно інтактних тварин;

\*\* $P \leq 0,05$  відносно контролю.

**Вплив досліджуваних препаратів на показники оксидативного стресу в мітохондріальній фракції мозку пренатально алкоголізованих тварин ( $M \pm m, n = 10$ )**

Група тварин / Показник	Інтактні	Контроль (пренатальна алкоголізація)	+ Тіоцетам	+ Цереброкурин	+ Пірацетам
Активність СОД, у.о./мг білка · хв	164,7±16,0	76,4±5,6*	118,8±6,7**	145,8±4,3**	80,2±12,0*
Вміст нітротирозину, нмоль/г білка	5,7±3,4	8,2±7,1*	6,2±4,3**	5,2±4,7**	8,8±08,3*
Вміст АФГ, у.о./г білка	5,70±0,18	11,80±0,23	9,1±0,2	7,40±0,15**	8,60±0,11
Вміст КФГ, у.о./г білка	0,76±0,06	1,40±0,11*	0,98±0,08**	0,82±0,06**	1,20±0,08
Відкриття МП (ΔE, 540 нм) у.о.	0,059 ± 0,002	0,312 ± 0,001*	0,112 ± 0,001**	0,082 ± 0,001**	0,271 ± 0,002*
Заряд мітохондрій (Ψ), у.о.	58,2±4,1	35,4±1,1*	47,2±1,2**	57,4±1,0**	39,7±1,2*

апоптозу, модифікації глутамінових рецепторів [10]. Таким чином, пренатальна алкоголізація призводить до депривації глутатінової ланки тіолдисульфідної системи головного мозку, що, у свою чергу, викликає неконтрольовану продукцію активних форм кисню та азоту й розвиток оксидативного (підвищення АФГ і КФГ) та нітрозуючого (підвищення нітротирозину) стресу на тлі пригнічення активності ферменту, що регулює рівень АФК – СОД. Нами встановлене значне зниження активності СОД у цитозольній (54,3 %) та мітохондріальній (53,6 %) фракціях гомогенату мозку пренатально алкоголізованих щурів.

На 25 добу життя пренатально алкоголізованих тварин спостерігається відкриття мітохондріальної пори та падіння мітохондріального заряду. Ці дані свідчать про розвиток так званого «мітоптозу», який ініціює апоптичну загибель усієї нейрональної клітини [13, 14] (табл. 3 та 4).

Крім того, падіння заряду мітохондрії робить неможливим імпорт мітохондрією білків-попередників, що синтезуються в цитозолі, оскільки цей процес представляє електрофоретичне переміщення позитивно зарядженої лідерної послідовності білка з цитозолу в матрикс, який заряджений негативно [15].

Таким чином, депривація глутатінової системи цитозолу й мітохондрій за умов пренатальної алкоголізації призводить до зниження показників антиоксидантних систем, а також формується мітохондріальна дисфункція. Очевидно, дефіцит відновленого глутатіону в мітохондріях призводить до посилення утворення активних форм кисню та азоту, а також окиснення цистеїн-залежних ділянок білків, що утворюють мітохондріальну пору. Надлишок активних форм азоту (пероксинітрит, іон нітронія), що утворюються при дефіциті глутатіону в мітохондріях, призводить до окисної модифікації СОД, зниження її активності [16]. Зниження активності Мп-СОД сприяє вторинному «сплеску» вільнорадикальних реакцій і посиленню окисної деструкції Red-Oxi чутливих ділянок мітохондріальної мембрани та формуванню стійкої мітохондріальної дисфункції. Курсове призначення цереброкуруну й тіоцетаму призводило до підвищення активності СОД у цитозолі та мітохондріях головного мозку щурят, що зазнали пренатальної алкоголізації.

Позитивний вплив цереброкуруну й тіоцетаму був відмічений і на стан компонентів глутатінового ланцюга тіолдисульфідної системи, що проявлялось

*Вплив досліджуваних препаратів на показники тіол-дисульфідної системи в цитозольній фракції мозку пренатально алкоголізованих тварин ( $M \pm m, n = 10$ )*

Група тварин / Показник	Інтактні	Контроль (пренатальна алкоголізація)	+Тіоцетам	+Цереброкурин	+Пірацетам
Активність, ГР, мкмоль/хв · мг білка	15,3±0,76	8,70±0,13*	12,4±0,2**	15,60±0,16**	7,60±0,16*
Активність, ГПР, мкмоль/хв · мг білка	61,2±5,8	42,7±3,1*	73,8±4,1*	74,3±2,7*	44,6±4,6*
Глутатіон відновлений, мкмоль/мг білка	2,60±0,14	0,780±0,065*	1,100 ±0,078**	1,80±0,12**	0,75±0,17*
Глутатіон окиснений, мкмоль/мг білка	0,15±0,13	0,47±0,15*	0,34±0,21*	0,23±0,18**	0,43±0,20*
Відновлені SH-групи, ммоль/мг білка	16,20±0,27	5,60±0,14*	10,40 ±0,54**	14,20±0,13**	6,8±0,2*
Окиснені тіоли, ммоль/мг білка	3,50±0,18	15,30±0,23*	9,4±0,2**	7,40±0,17**	14,50±0,21*

Таблиця 4

*Вплив досліджуваних препаратів на показники тіол-дисульфідної системи в мітохондріальній фракції мозку пренатально алкоголізованих тварин ( $M \pm m, n = 10$ )*

Група тварин / Показник	Інтактні	Контроль (пренатальна алкоголізація)	+Тіоцетам	+Цереброкурин	+Пірацетам
Активність, ГР, мкмоль/хв · мг білка	3,8±0,6	5,20±0,13*	7,70±0,14**	9,80±0,11**	5,30±0,15*
Активність, ГПР, мкмоль/хв · мг білка	11,7±1,4	14,6±0,2*	16,60 ±0,12*	18,2±0,16**	14,1±0,2*
Глутатіон відновлений, мкмоль/мг білка	0,500 ±0,012	0,150±0,011*	0,220 ±0,015	0,290 ±0,013**	0,150 ±0,015
Глутатіон окиснений, мкмоль/мг білка	0,0130 ±0,0029	0,0860 ±0,0037*	0,051 ±0,002**	0,0440 ±0,0027**	0,0720 ±0,0033
Відновлені SH-групи, ммоль/мг білка	6,03±0,12	2,50±0,15*	4,16±0,07**	5,36±0,08**	2,40±0,14
Окиснені тіоли, ммоль/мг білка	0,90±0,04	4,10±0,06*	2,90±0,14**	1,70±0,10**	4,40±0,07

у підвищенні кількості відновленого глутатіону, відновлених SH-груп, підвищенні активності ГР і ГПР на тлі зниження окисненого глутатіону, окиснених тіолів і маркерів оксидативного стресу – АФГ, КФГ, нітротирозину в

цитозольній і мітохондріальній фракціях гомогенату головного мозку тварин із пренатальною алкоголізацією. Дія всіх досліджуваних препаратів була односпрямована, але активність цереброкуруину була найбільшою. Так,

у тварин, які отримували цереброкурин після пренатальної алкоголізації, відзначалося зниження нітритирозину на 40 і 37,5 %, окисненого глутатіону на 51 та 49 %, АФГ на 9 та 37 %, КФГ на 46 та 41 %, окисненнях тіолів на 52 та 59 % відповідно в цитозольній та мітохондріальній фракціях гомогенату мозку.

Паралельно в мозку цієї серії тварин спостерігалось підвищення відновленого глутатіону на 131 та 93 % і відновлених тіолів на 154 та 114 % відповідно в цитозольній та мітохондріальній фракціях, і підвищення активності ГР і ГПР у відповідних фракціях гомогенату мозку. Тіоцетам проявляв подібний за спрямованістю, але менш виражений за силою ефект. Пірацетам не чинив достовірного впливу на досліджувані показники тіол-дисульфідної системи та оксидативного стресу.

Подібний вплив досліджуваних препаратів на показники глутатіонового ланцюга цитозольної та мітохондріальної фракцій ішемізованого мозку пояснює їхню мітопротективну дію. Так, тіоцетам і цереброкурин знижували відкриття мітохондріальної пори (МП) на 25 добу експерименту, а також сприяли збереженню заряду мітохондрій.

Пірацетам продемонстрував менш виражену мітопротективну дію.

Виявлена нами активність тіоцетаму за умов пошкодження мозку, викликаного пренатальним уведенням алкоголю, пояснюється наявністю в структурі його компоненту – 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5 тіоцетату, який, на нашу думку, регулює тіол-дисульфідну рівновагу, конкурує з SH-групами цистеїн-залежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій за АФК та пероксонітриту, утворює з останнім стійкі комплекси та підвищує резистентність мітохондрій до вільних радикалів і активних форм кисню та азоту [17].

Механізм дії цереброкуруину, на нашу думку, пов'язаний із його здатністю впливати на геном нейронів в екстремальному стані, а саме: підвищує експресію глобального фактора транскрипції AP-1, підсилює синтез ключових ферментів антиоксидантного захисту – каталази та СОД, експресію глутатіон-залежних ферментів. Крім того, за деякими даними, що співпадають з нашими попередніми дослідженнями, цереброкурин модулює активність мітохондріальної NO-синтази, обмежує нітрозуючий стрес, внаслідок чого зменшує прояви мітохондріальної дисфункції [18].

1. Мінко А. І. Алкогольна хвороба: Новітній довідник / А. І. Мінко. – М.: Ексмо, 2004.
2. Richard P. Donahue, Robert D. Abbott, Dwayne M. Reed, Katsuhiko Yano Alcohol and Hemorrhagic Stroke. The Honolulu Heart Program. (англ.) // JAMA. – 1986. Т. 255, № 17. – С. 2311–2314.
3. Циганков Б. Д. Невідкладні стани в наркології / Б. Д. Циганков. – М.: Медпрактика-М, 2002.
4. Тхостова А. Ш. Психологічні аспекти залежностей / А. Ш. Тхостова, С. П. Єлшанський. – М.: Наук. світ, 2000.
5. Данилова Л. А. Довідник з лабораторних методів дослідження / Л. А. Данилова. – СПб: Пітер, 2003. – 736 с.
6. Halliwell V. Free radical in Biology and Medicine / В. Halliwell. – Oxford: Clarendon Press, 1995. – 345 р.
7. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / Чекман И. С., Громов Л. А., Беленичев И. Ф. [и др.] // Методические рекомендации ГФЦ МЗ Украины. – Киев, 2010. – 83 с.
8. Арцукевич А. М. Біохімічні аспекти життєдіяльності біологічних систем / Арцукевич А. М., Мальцев А. М., Зінчук В. В. // Сбір. наук. праць з'їзду біохіміків Білорусії. – Гродно, 2000. – С. 19–23.
9. Денисов Є. Т. Хімічна кінетика / Денисов Є. Т., Саркісов О. М., Ліхтенштейн Г. І. // Хімія. – Москва, 2000.
10. Окислювальна модифікація білків сироватки крові людини, метод її визначення / Дубініна Є. Є., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов І. Г. // Пит. мед. хімії. – 1995. – № 41. – С. 24–26.
11. Клиньский В. І. Активні форми кисню та оксидативна модифікація макромолекул: користь, шкода та захист / Клиньский В. І. // Успіхи суч. біології. – 1993. – Т. 113, № 1. – С. 107–122.
12. Клиньский В. І. Система глутатіону та інші ферменти, тіол-дисульфідний обмін, запалення, імунітет, функції / Клиньский В. І., Колесніченко Л. С. // Біомедична хімія. – 2009. – № 4. – С. 365–379.
13. Манських В. Н. Шляхи загибелі клітини та їх біологічне значення / Манських В. Н. // Цитологія. – 2007. – Т. 49, № 11. – С. 909–915.

- 
14. *Баришніков А. Ю.* Імунологічні проблеми апоптозу / А. Ю. Баришніков, Ю. В. Шишкін.– М.: Едиторіал УРСС, 2002.– 320 с.– 1000 екз.
  15. Вільнорадикальне окислення та старіння / [Хавінсон В. Х., Барінов В. А., Арутюнян А. В., Малинін В. В.].– СПб: Наука, 2003.– 327 с.
  16. *Arnoult D.* Apoptosis-associated mitochondrial outer membrane permeabilization assays / *D. Arnoult // Methods.*– 2008.– V. 44, № 3.– P. 229–234.
  17. Метаболитотропные препараты / И. А.Мазур, И. С.Чекман, И. Ф. Беленичев [и др.].– Запорожье, 2008.– 278 с.
  18. *Беленичев И. Ф.* Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник.– Донецк, 2009.– 283 с.

**А. Н. Егоров, И. Ф. Беленичев, Е. П. Соколик**  
**Состояние глутатионовой системы головного мозга пренатально**  
**алкоголизованных крыс на фоне курсового назначения цереброкурина**  
**и тиоцетама**

Актуальность женского алкоголизма обусловлена тем, что, в первую очередь, наносится вред состоянию здоровья детей, рожденных от данного контингента женщин. Проведенными экспериментальными исследованиями установлено, что пренатальная алкоголизация приводит к значительным изменениям глутатионового звена тиол-дисульфидной системы за счет уменьшения ее восстановленных интермедиатов (значительно падает уровень цитозольного и митохондриального глутатиона, восстановленных тиольных групп), увеличения окисленного глутатиона и общего количества окисленных тиолов как в цитозольной, так и митохондриальной фракциях головного мозга крыс на 25 сутки жизни. Назначение исследуемых препаратов приводило к повышению активности супероксиддисмутазы (СОД), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГПР). Наиболее активными препаратами оказались цереброкурин и тиоцетам на фоне лидерства первого, который повышал активность СОД на 91 % в митохондриальной фракции, а ГПР на 25 % соответственно. Положительное влияние исследуемых препаратов было отмечено и на состояние компонентов глутатионового звена тиол-дисульфидной системы, что проявлялось в повышении количества восстановленного глутатиона и снижении содержания АФГ, КФГ, нитротирозина в головном мозге животных с пренатальной алкоголизацией.

*Ключевые слова:* глутатионовая система, пренатальная алкоголизация, митохондрия, тиоцетам, цереброкурин

**А. N. Egorov, I. F. Belenichev, E. P. Sokolik**  
**State of glutathions` system in the brain of rats with prenatal alcoholism and**  
**under course treatment by cerebrocurin and tiocetam**

The relevance of women`s alcoholism is caused by the fact that, in the first turn, causes harm to the health of children born from this group of women. It have been established, that prenatal alcoholism leads to significant changes in glutathions` link of thiol-disulfide system by reduction of its reduced intermediates (significantly decreases the level of cytosole and mitochondrial glutathion, restored thiols` groups) and growth of oxidized glutathione and total amount of oxidized thiols in cytosole and mitochondrial fractions of the brain of rats on the 25 day of life. The prescription of investigational products resulted in an increase of activities SOD, GR and GPR. The most active drugs were cerebrocurin and tiocetam on the background of the leadership of the first, which promoted an increase the activity of SOD – by 91 % in mitochondrial fractions, and the GPR – by 25 %, respectively. The positive impact of investigational drugs, has been reported on the state of components of glutathions` link of thiol- disulfide system, which manifested itself in the increase of the amount of reduced glutathione and decrease the amountsiof, APG, KPG, nitrotyrosine in the brain of animals with prenatal alcoholisation.

*Key words:* glutathions` system, prenatal alcoholism, mitochondria, cerebrocurin, tiocetam

Надійшла: 02.02.2012 р.

---

**Контактна особа:** Беленічев І. Ф., професор, докт. біол. наук, зав. кафедри фармакології і лікарської рецептури, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: (612) 24-64-69. E-mail: olybelenicheva@mail.ru