

МОЖЛИВІ ШЛЯХИ ПЕРЕРИВАННЯ NO-ЗАЛЕЖНИХ ШЛЯХІВ НЕЙРОДЕСТРУКЦІЇ ПРИ ВИКОРИСТАННІ ІНГІБІТОРІВ NO-СИНТАЗИ РІЗНОЇ СЕЛЕКТИВНОСТІ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПОРУШЕННЯ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ

**С. В. Горбачова, канд. біол. наук, доц.,
І. Ф. Бєленічев, д-р біол. наук, проф.**

Вступ

Церебральна ішемія викликає складний комплекс біохімічних і молекулярних механізмів, що погіршує неврологічні функції через роз'єднання фізіологічних процесів і порушення цілісності нейронів. Вони опосередковуються ексайтотоксичною глутаматергічною сигналізацією, іонним дисбалансом, розвитком вільнорадикальних реакцій. Крім того, запальні реакції, ініційовані на судинно-нервовий інтерфейс, і зміни в динамічному зв'язку між ендотеліальними клітинами, астроцитами і нейронами вносять істотний вклад в патогенез церебрального інсульту. Формування окисного стресу, який є неминучим супутником ішемії нервової тканини, нерозривно пов'язане із запаленням. При цьому формується замкнуте «хибне» коло — запалення призводить до активації чутливих до окисно-відновного потенціалу шляхів трансдукції сигналів, що підсилює окиснювальний стресс [1].

Істотна роль у механізмах загибелі нейронів при розвитку глутамат-кальцієвого каскаду належить NO-опосередкованим механізмам. Відкриття NMDA-рецепторів, яке відбувається на тлі токсичних концентрацій глутамату, викликає потік іонів кальцію всередину клітин. Це, в свою чергу, спричиняє активацію кальцій-залежної ізоформи NO-синтази і посилене утворення оксиду азоту, який бере участь в ушкодженні нейронів.

Його токсична дія пов'язана з порушенням мітохондріального окисного фосфорилування та метаболізму рибонуклеотидредуктази, утворенням високотоксичного пероксинітриту, який блокує низку нейрональних рецепторів, інактивує супероксиддисмутазу (СОД) і викликає посилення вільнорадикального окиснення. Механізм токсичності NO включає також ковалентну модифікацію білків при взаємодії з їх тіоловими групами, а також безпосереднє ушкодження ДНК [2].

Сьогодні відомі три ізоформи NO-синтази: ендотеліальна (eNOS), нейрональна (nNOS) і індукцибельна (iNOS). Перші дві є конститутивним, активність яких залежить від концентрації іонів Ca^{2+} , індукція останньої відбувається після активації гліальних клітин, макрофагів, клітин ендотелію ендотоксинами і цитокінами. Одноразовий запуск експресії цієї ізоформи NO-синтази приводить до синтезу NO протягом тривалого часу, її активність не залежить від внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} [3]. Методологічні підходи, спрямовані на обмеження гіперпродукції NO, повинні враховувати належність до певного ізоферменту. Проте є неоднозначні дані про нейропротективну дію інгібіторів різної селективності до різних ізоформ NO-синтази [4].

У наших попередніх дослідженнях була вивчена експресія різних ізоформ NO-синтази і маркерів окисного та нітрозативного стресу в тканинах мозку з експериментальним порушенням мозкового кровообігу (ПМК) [5].

Метою даної роботи є вивчення ефективності різних інгібіторів NO-синтази в умовах експериментальної церебральної ішемії за їхньою здатністю обмежувати розвиток реакцій окисного і нітрозативного стресу.

Матеріали та методи

Дослідження проведені відповідно до Директиви Європейського союзу 2010/10/63 EU щодо експериментів над тваринами. Досліди виконані на білих безпородних щурах масою

180–200 г, обох статей, отриманих із розплідника ДЗ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Виходячи з мети цього дослідження, нами були використані інгібітори трьох вищезазначених ізоформ: неселективний інгібітор eNOS — N-нітро-L-аргінін; високоселективний інгібітор nNOS — N-пропіл-L-аргінін і високоселективний конкурентний інгібітор iNOS — (S)-метилтіосечовина. Експериментальні тварини були розподілені на 5 груп: I — псевдооперовані тварини, II — тварини з експериментальним ПМК (контроль), III — ПМК + N-нітро-L-аргініну метиловий ефір — (L-NAME) (кат. № 0665) дозою 5 мг/кг, IV — ПМК + N-пропіл-L-аргініну гідрохлорид (кат. № 1200) дозою 2,5 мг/кг [6]; V — ПМК + (S)-метилтіосечовини сульфат (кат. № 0776) дозою 1 мг/кг [7].

Усі використані сполуки виробництва фірми Tocris Bioscience (Велика Британія). Порушення мозкового кровообігу викликали оборотною двосторонньою оклюзією загальних сонних артерій. Процедуру виконували під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг), шляхом хірургічного доступу виділяли загальні сонні артерії, підводили під них шовкові лігатури і перев'язували. Враховуючи високу смертність при даній модельній патології, використовували таку кількість тварин, щоб кожна експериментальна група складалася з 10 особин. Препарати вводили внутрішньоочеревинно зазначеними дозами 1 раз на добу протягом 4 днів спостереження, безпосередньо після оклюзії. Тваринам I та II груп протягом дослідження у відповідному об'ємі внутрішньоочеревинно вводили фізіологічний розчин. З експерименту тварин виводили під етаміналнатрієвим наркозом (40 мг/кг) [8].

Для біохімічних досліджень використані фрагменти, що розташовані у ділянці сенсомоторної зони кори головного мозку і гомогенізовані в рідкому азоті. Цитозольну фракцію виділяли методом диференційного центрифугування (15 000 g) при температурі + 4 °C на 0,15 M фосфатному буфері pH 7,8. Вміст окисненого і відновленого глутатіону визначали флюорометрично [8]. Активність глутатіонпероксидази (ГПО), глутатіонредуктази (ГР) і глутатіонS-трансферази досліджували спектрофотометрично [9].

Вираженість окисного стресу оцінювали за нагромадженням продуктів окисної модифікації білків — альдегідних і кетонних похідних білкових молекул у реакції з 2,4-динітрофенілгідрaziном [10], а також за рівнем нітротирозину, який визначали імуноферментним методом з використанням стандартного тестнабору “Nitrotyrosine ELISA Kit” (“HyCult biotechnology”, Нідерланди) згідно з доданою до набору інструкцією. Рівень нітритів визначали спектрофотометрично з реактивом Гріса [11].

Результати дослідження оброблені з використанням статистичного пакету ліцензійної програми “STATISTICA® for Windows 6.0”, а також “Microsoft Excel 2010”. Статистичну обробку проводили із застосуванням t-критерію Стьюдента і U-критерію Манна — Уїтні. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності з рівнем значущості менше 0,05 (95 %) [12].

Результати дослідження та їх обговорення

Експериментальне ПМК викликало формування патобіохімічних реакцій нітрозативного й окисного стресу, ознаки якого проявлялися вже через 12 год після моделювання патології. Генерація активних форм кисню і посилене утворення оксиду азоту в перші 12 год експерименту проявлялися підвищенням рівня маркерів окисної деструкції білків, зниженням вмісту відновленої форми глутатіону з паралельним нагромадженням його окисненої форми (табл. 1). Слід зазначити, що першою реакцією тканини мозку на ішемію було збільшення рівня NO, нітротирозину і зниження відновленого глутатіону, значення цих показників досягали статистично значущих відмінностей ($p < 0,05$). Решта показників мали характер тенденції до підвищення. Вивчаючи ферментативну ланку, виявили компенсаторне підвищення активності, що є адаптивно-приспосувальною реакцією тканини мозку на ішемію.

Введення інгібіторів NO-синтази різної селективності викликало різноспрямований характер змін. Так, L-NAME, який належить до неселективних інгібіторів і викликає необоротне гальмування активності конституціональних і оборотне індукційного ізоферменту, на ранніх етапах виявляє прооксидантні властивості. Зазначена здатність L-

NAME інгібувати eNOS порушує місцеву вазодилатацію і призводить до поглиблення загальної картини патологічного процесу.

Таблиця 1

Показники оксидативного стресу та системи глутатіону в тканинах головного мозку через 12 год після моделювання порушення мозкового кровообігу, M±m

Показник	Псевдооперовані	ПМК (контроль)	L-NAME	L-PA	S-MT
АФГ, ум. од./г білка	1,62±0,15	2,00±0,18	2,35±0,26	1,76±0,14	1,91±0,18
КФГ, ум. од./г білка	0,76±0,14	1,04±0,13	1,31±0,20	0,88±0,13	1,06±0,13
NO ₂ , мкмоль/л	5,47±0,58	7,40±0,43#	6,37±0,80	5,57±0,66	7,22±0,57
Нітротирозин, нмоль/г білка	9,63±0,87	13,35±1,59#	15,74±1,30	10,84±1,06	11,33±0,80
СОД, ум. од. / (мг білка хв)	272,00±9,98	292,20±9,22	254,10±9,47	280,70±6,43	293,60±5,99
Глут. віднов., мкмоль/г білка	3,95±0,27	3,00±0,22#	2,92±0,23	3,51±0,19	2,97±0,21
Глут. окис., мкмоль/г білка	0,12±0,02	0,19±0,03	0,22±0,03	0,16±0,02	0,18±0,02
Г-S-T, ммоль/(хв г білка)	27,56±2,35	31,47±2,48	29,30±2,01	30,42±2,45	29,04±1,95
ГР, ммоль/(хв г білка)	13,94±1,53	15,42±0,84	14,90±1,26	15,13±1,63	15,00±1,94
ГПО, ммоль/(хв г білка)	69,9±3,4	71,27±2,71	70,51±2,68	70,07±3,00	70,08±1,84

Примітка. У табл. 1–3: # — p<0,05 щодо групи псевдооперованих тварин; * — p<0,05 щодо групи тварин з ПМК; L-NAME — N-нітро-L-аргініну метиловий ефір; L-PA — N-пропіл-L-аргініну гідрохлорид; S-MT — (S)-метилтіосечовини сульфат.

N-пропіл-L-аргінін протягом перших 12 год ішемії викликав достовірне зниження рівня NO, але вплив на інші показники не досягав статистично значущих відмінностей. Зазначений інгібітор є селективним щодо нейрональної NO-синтази, активність якої значно підвищується в перші години ішемії. Це пояснюється, по-перше, терміном спостереження — до 12 год гіперактивація nNOS, викликана іонами кальцію, починає знижуватися з паралельним підвищенням індукційної ізоформи, а подруге, інгібування nNOS призводить до активації ядерного фактора NF-κB, який викликає індукцію iNOS [13].

Використання селективного інгібітора індукційної ізоферменту на першому етапі спостереження не чинило істотного впливу на досліджувані показники (див. табл. 1). Це пояснюється незначним внеском цього ізоферменту в гіперпродукцію NO у цей часовий проміжок.

Синтезований у перші години ішемії NO взаємодіє з аліфатичними й ароматичними амінами з утворенням N-нітроамінів, про що свідчить підвищення вмісту нітротирозину на 38,6 % (див. табл. 1). Подальше спостереження показало підвищення цього показника. Так, наприкінці 1-ї доби показник в 1,7 разу перевищував значення групи псевдооперованих тварин, на 4-ту добу рівень нітротирозину сягав 29,6 нмоль/г білка, що в 3,1 разу вище, ніж у групі порівняння. Паралельно з формуванням нітрозативного стресу відзначалося порушення функціонування антиоксидантної системи, що проявлялося нагромадженням вільних радикалів і, як наслідок, збільшенням рівня продуктів окисної модифікації білкових молекул.

Підвищення вмісту альдегідних і кетонних похідних білків щодо значень псевдооперованих тварин відбувалося на тлі зниження активності антиоксидантних ферментів (табл. 2, 3). Зниження активності СОД, яка відіграє ключову роль у знешкодженні супероксид-радикала, викликало зміщення тиол-дисульфідної системи у бік окиснених інтермедіатів. При цьому деяка частина синтезованого NO, зв'язуючись з високотоксичним супероксид-радикалом, утворює молекулу пероксинітриту. При цьому, по-перше, нагромаджуються значні кількості надзвичайно нейротоксичного ONOO⁻, а по-друге, значно знижується біодоступність самого NO. Проведення терапії інгібітором nNOS — N-пропіл-L-

аргініном на 1-шу і 4-ту добу не чинило істотного впливу на досліджувані показники, тому що в більш відстрочені періоди внесок цього ізоферменту у формування нітрозативного стресу є несуттєвим.

Таблиця 2

Показники оксидативного стресу та системи глутатіону в тканинах головного мозку через 24 год після моделювання порушення мозкового кровообігу, M±m

Показник	Псевдооперовані	ПМК (контроль)	L-NAME	L-PA	S-MT
АФГ, ум. од./г білка	1,62±0,15	2,60±0,25#	1,97±0,19*	2,49±0,32	2,28±0,13*
КФГ, ум. од./г білка	0,76±0,14	1,39±0,16#	1,03±0,14	1,33±0,14	1,03±0,18
NO ₂ ⁻ , мкмоль/л	5,47±0,98	9,10±0,92#	6,04±1,03*	8,95±0,87	6,33±0,94*
Нітротирозин, нмоль/г білка	9,63±0,87	16,50±1,16#	11,40±1,38*	16,30±1,31	12,40±1,22*
СОД, ум. од. /(мг білка хв)	272,00±9,98	234,20±8,55#	261,2±10,2	239,50±8,25	257,60±9,72
Глут. віднов., мкмоль/г білка	3,95±0,27	1,87±0,13#	2,24±0,26	1,89±0,17	2,27±0,21
Глут. окис., мкмоль/г білка	0,12±0,02	0,29±0,02#	0,21±0,03	0,27±0,03	0,20±0,03
Г-S-T, ммоль/(хв г білка)	27,56±2,35	20,40±1,83#	21,80±1,87	20,30±1,74	23,60±2,05
ГР, ммоль/(хв г білка)	13,94±1,53	10,20±1,08#	12,90±1,33	10,60±1,16	11,70±1,79
ГПО, ммоль/(хв г білка)	69,9±3,4	41,90±2,61#	45,20±3,28	42,30±2,73	46,40±3,17

Таблиця 3

Показники оксидативного стресу та системи глутатіону в тканинах головного мозку на 4-ту добу після моделювання порушення мозкового кровообігу, M±m

Показник	Псевдооперовані	ПМК (контроль)	L-NAME	L-PA	S-MT
АФГ, ум. од./г білка	1,62±0,15	3,90±0,27#	2,94±0,18*	3,70±0,23	2,46±0,15*
КФГ, ум. од./г білка	0,76±0,14	2,20±0,14#	1,89±0,17	2,13±0,25	1,22±0,12*
NO ₂ ⁻ , мкмоль/л	5,47±0,98	10,50±0,79#	7,92±0,92	9,26±2,03	6,95±1,04*
Нітротирозин, нмоль/г білка	9,63±0,87	29,60±2,06#	17,30±1,84*	25,40±2,15	18,80±1,66*
СОД, ум. од. /(мг білка хв)	272,00±9,98	93,40±7,64#	176,40±9,43*	98,30±7,63	179,2±10,1*
Глут. віднов., мкмоль/г білка	3,95±0,27	0,65±0,11#	1,84±0,36*	0,68±0,13	2,57±0,16*
Глут. окис., мкмоль/г білка	0,12±0,02	0,77±0,14#	0,52±0,09	0,75±0,11	0,49±0,08*
Г-S-T, ммоль/(хв г білка)	27,56±2,35	7,60±0,85#	12,90±1,37*	7,50±0,83	17,40±1,57*
ГР, ммоль/(хв г білка)	13,94±1,53	6,40±0,59#	8,54±1,44	6,62±0,76	9,98±1,31*
ГПО, ммоль/(хв г білка)	69,9±3,4	25,10±2,13#	40,80±3,29*	26,60±2,24	41,30±2,54*

Гіперпродукція NO на цих етапах викликана участю iNOS гліальних клітин, макрофагів і нейтрофілів. Віддалений характер підвищення iNOS пов'язаний з більш пізньою активацією астроглії. На відміну від nNOS і eNOS, iNOS залишається активною протягом тривалого часу і синтезує значні концентрації NO. Цим пояснюється виявлений нами позитивний ефект інгібіторів, які селективно пригнічують активність індукбельного ізоферменту на пізніх термінах спостереження (див. табл. 2, 3). Наприкінці 1-ї доби після моделювання ПМК уведення (S)-метилтіосечовини викликало істотне зниження проявів нітрозативного стресу, її ефект був більш тривалим і зберігався до закінчення спостереження. Зазначений препарат на 4-ту добу експерименту знижував рівень АФГ на 36,9 %;

КФГ — на 44,5 %, активність СОД підвищувалася у 2,6 разу, що стало наслідком зниження рівня нітритозину на 53,3 %.

Застосування L-NAME викликало схожі за спрямованістю, але менш виражені зміни, що пов'язано з гальмівним впливом цієї сполуки на eNOS. У наших роботах відзначена роль інтермедіатів і ферментів тиол-дисульфідної системи у механізмах біодоступності NO як у дослідях *in vitro*, так і при моделюванні експериментального ПМК [14–15]. Зниження активності ферментів системи глутатіону, у першу чергу ГПО, яка забезпечує розщеплення нітрозотіолів з вивільненням NO, в умовах окисного стресу є однією з причин зниження його біодоступності.

Таким чином, нейротоксичний ефект NO залежить від певного ізоферменту NO-синтази. Аналіз отриманих даних вказує на обмежену роль нейрональної ізоформи в умовах експериментального ПМК. Найбільш доречною мішенню для фармакологічної регуляції NO-залежних механізмів нейродеструкції є iNOS, тому що її активність підвищується через 12 год після розвитку ішемії, а дія здійснюється протягом наступних кількох діб.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Нейропротекция и нейропластичность* / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Е. А. Нагорная [и др.] – К. : Логос, 2015. – 512 с.
2. *Гусев Е. И. Ишемия головного мозга* / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова – М. : Медицина, 2001. – 328 с.
3. *Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges* / J. Vitecek, A. Lojek, G. Valacchi, L. Kubala // *Mediators of Inflammation*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 2541–2563.
4. *Nikki S. R. Inhibition of the Endothelial Isoform of Nitric Oxide Synthase Impairs Long-Term Memory Formation in the Chick* / S. R. Nikki, E. G. Marie, T. N. Kim // *Learn Mem*. – 1999. – N 6. – P. 458–466.
5. *Горбачова С. В. Вплив тіолових антиоксидантів на прояви ендотеліальної дисфункції в судинах головного мозку щурів з порушенням мозкового кровообігу* / С. В. Горбачова, І. Ф. Беленічев, А. В. Абрамов // *Медична хімія*. – 2015. – № 2. – С. 9–14.
6. *Klamer D. The neuronal selective nitric oxide synthase inhibitor, N-omegapropyl-L-arginine, blocks the effects OF phencyclidine on prepulse inhibition and locomotor activity in mice* / D. Klamer // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 503, N 103. – P. 358–364.
7. *Максимович Н. Е. Использование L-аргинина и ингибиторов образования оксида азота для коррекции воспалительного процесса в мозге крыс при его ишемии-реперфузии* / Н. Е. Максимович // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. – 2014. – № 3. – С. 14–17.
8. *Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов* / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. – К. : ГФЦ МЗ Украины, 2010. – 81 с.
9. *Асатиани В. С. Ферментные методы анализа* / В. С. Асатиани. – М. : Наука, 1969. – 739 с.
10. *Halliwell B. Free radical in Biology and Medicine* / B. Halliwell, M. C. Yutteridge. – Oxford : Clarendon Press, – 1999. – 320 p.
11. *Горбунов Н. В. Активация образования окиси азота, опосредованная метаболитами глутаматными рецепторами в первичных культурах клеток — зерен мозжечка* / Н. В. Горбунов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 1995. – № 7. – С. 40–48.
12. *Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA* / О. Ю. Реброва. – М. : Медиасфера, 2002. – 312 с.
13. *Nitric Oxide and Superoxide Contribute to Motor Neuron Apoptosis Induced by Trophic Factor Deprivation* / A. G. Este'vez, N. Spear, M. Manuel, R. Radi // *The Journal of Neuroscience*. – 1998. – N 18 (3). – P. 923–931.
14. *Горбачева С. В. Антиоксидантная модуляция нейроапоптоза в условиях дисбаланса тиол-дисульфидной системы и накопления окисленных промежуточных соединений*

in vitro/ С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев // Вісник проблем біології та медицини. – 2015. – № 3. – С. 124–129.

15. *Belenichev I. F.* The Thiol-Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow: The Therapeutic Effects of Nootropic Drugs / I. F. Belenichev, S. V. Gorbachova, N. V. Bukhtiyarova // *Neurochemical Journal*. – 2014. – Vol. 8, N 1. – P. 24–27.

УДК 547.495.9:615.225:661.982

**МОЖЛИВІ ШЛЯХИ ПЕРЕРИВАННЯ NO-ЗАЛЕЖНИХ ШЛЯХІВ
НЕЙРОДЕСТРУКЦІЇ ПРИ ВИКОРИСТАННІ ІНГІБІТОРІВ NO-СИНТАЗИ РІЗНОЇ
СЕЛЕКТИВНОСТІ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПОРУШЕННЯ
МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ**

С. В. Горбачова, І. Ф. Беленічев

Робота присвячена вивченню нейропротективної активності інгібіторів різних ізоформ NO-синтази на моделі експериментального порушення мозкового кровообігу. Установлено, що на ранніх термінах церебральної ішемії розгортаються реакції окисного і нітрозативного стресу, опосередковані гіперпродукцією оксиду азоту. Аналіз одержаних даних указує на обмежену роль нейрональної ізоформи в умовах експериментального порушення мозкового кровообігу. Найдоречнішою мішенню для фармакологічної регуляції NO-залежних механізмів нейродеструкції є індукбельна NOS, оскільки її активність підвищується через 12 год після розвитку ішемії, а дія здійснюється протягом наступних кількох днів.

Ключові слова: оксид азоту, ізоферменти NO-синтази, інгібітори, нейродеструкція.

UDC 547.495.9:615.225:661.982

**POSSIBLE WAYS OF NO-DEPENDENT PATHWAYS IN NEURODESTRUCTION USING
INHIBITORS OF NOSYNTASE OF DIFFERENT SELECTIVITY UNDER CONDITIONS
OF EXPERIMENTAL CEREBRAL CIRCULATION IMPAIRMENT**

S. V. Gorbachova, I. F. Byelenichev

The purpose of the given work is to study an efficiency OF different inhibitors of NO-synthase under conditions of experimental cerebral ischemia by their capability to limit reactions of oxidative and nitrosative stress.

It has been established that neurotoxic NO effect depends on definite enzyme of NO-synthase. Analysis of the obtained data shows a limited role of neuronal isoform in conditions of experimental impairment of blood circulation. The most relevant target for pharmacological regulation of NO-dependent mechanisms of neurodestruction is iNOS because of the fact that its activity begins to increase in 12 hours after ischemia development and its action is realized during next several days.

Key words: nitric oxide, isoenzymes of NO-synthase, inhibitors, neurodestruction.

Опубліковано:

Горбачова С. В. Возможні шляхи переривання NO-залежних шляхів нейродеструкції при використанні інгібіторів NO-синтази різної селективності в умовах експериментального порушення мозкового кровообігу / С. В. Горбачова, І. Ф. Беленічев // *Досягнення біології та медицини*. - 2015. - № 2. - С. 21-25.