

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ СООТНОШЕНИЙ NO И ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ — НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ

Понимание механизмов гибели нейрона при различных заболеваниях ЦНС и их фармакологическая регуляция являются одной из центральных проблем современной нейрофармакологии и интенсивно изучается сейчас во всем мире [1]. Несмотря на интенсивность исследований в этой области и определенные успехи, актуальность данной проблемы не снижается, поскольку нейродеструктивные патологии ЦНС занимают ведущее место в структуре инвалидизации и смертности населения развитых стран. Согласно современным представлениям, нейродеструкция ишемического генеза сопровождается развитием сложных патофизиохимических каскадов в нейроне — нарушением энергетического метаболизма, развитием транзитерного аутокоидоза, формированием стойкой митохондриальной дисфункции, сопровождающейся гиперпродукцией АФК и оксида азота (NO) в «паразитарных» реакциях и экспрессией проапоптотических белков [2, 3]. Известно, что запуск программы, ведущей к смерти нейрона, может осуществляться цитокинами, гормонами, АФК, дериватами NO, окисленными тиолами, продуктами окислительной модификации белков и нуклеиновых кислот. При действии подобных факторов на клетку в ней запускается множество сигнальных путей, ведущих к нейтрализации последствий их отрицательного воздействия или, в случае непоправимого ущерба, к элиминации клетки. Такая элиминация поврежденных клеток происходит по пути апоптоза, или программированной клеточной гибели. В развитии апоптотического процесса участвует множество сигнальных молекул, многие из которых регулируют и другие важные функции организма. К наиболее изученным факторам, способным запускать в нейроне апоптотическую программу, относится оксид азота — одна из ключевых сигнальных молекул, регулирующих функции сердечно-сосудистой, нервной и иммунной систем организма. Уникальная химическая природа и большое число внутриклеточных мишеней для NO и его физиологически активных окислительно-восстановительных форм оставляют открытым вопрос, каким образом и сколь специфично опосредуется повреждающее действие оксида азота на нейрон в условиях ишемии. Многочисленными работами было показано непосредственное участие NO в процессе деструкции нейрона при ишемии при назначении животным с ОНМК селективных ингибиторов нейрональной и индуцибельной изоформ

NOS, а также в опытах на животных с дефицитом гена, кодирующего iNOS. Получены данные о возрастании концентрации NO в мозге животных как с фокальной, так и с глобальной ишемией [4, 5]. Концентрация NO начинает увеличиваться с первых минут ишемии, достигая максимума на 1-е — 3-и сутки. Измерение активности NOS показало резкое увеличение активности этого фермента как в очаге ишемии, так и в пенумбре, однако без учета принадлежности к определенному типу NOS. Участие NO в повреждении и гибели нейрона имеет свою специфику и определяется изоформами NOS, а также видом и стадией развития инсульта. В начальном периоде ишемии превалирует экспрессия конституционной кальцийзависимой NOS, обусловленная транзитерным аутокоидозом. Продукция NO на этом этапе не является фактором, непосредственно определяющим гибель нейрона. На этом этапе NO участвует в косвенных механизмах гибели нейрона — активации фосфолипаз, усилении образования гидроксил-радикала, модуляции активности NMDA-рецепторов. Начиная с 7–14-х суток при глобальной ишемии и с 1–3-х суток при фокальной ишемии, т.е. в отсроченном постишемическом периоде, регистрируется гиперпродукция NO при участии индуцибельной NOS, активированной глии, макрофагов и нейтрофилов. Отсроченный характер экспрессии индуцибельной NOS связан с более поздними сроками появления активированной астро- и макроглии и клеток воспаления. При фокальной ишемии вышеобозначенные клетки — продуценты NO находятся в пенумбре, а при глобальной ишемии — в наиболее чувствительных к дефициту кислорода структурах. Кроме NO-синтаз источником NO в организме теплокровных являются нитрат-/нитрит-редуктазы, способные восстанавливать нитраты и нитриты. Нитроредуктазной активностью обладают глиоциты и тимоциты. Показано, что ксантинооксидаза обладает свойствами восстанавливать нитраты и нитриты до NO. Однако роль этой системы в развитии нейродеструкции не изучена. Сейчас идет активное изучение мишеней оксида азота и выяснение вопроса, является ли NO достаточно цитотоксичным или же более активны его дериваты [5–8]. Известно, что NO в клетках-мишенях образует активные дериваты, такие как нитрозоний (NO⁺), нитроксил (NO⁻) и пероксинитрит (ONOO⁻). Исследованиями последних лет установлено, что NO, и особенно продукты

его превращения, такие как пероксинитрит (ONOO^-), ион нитрозония (NO^+), нитроксил (NO^-) и диазотриоксид (N_2O_3), являются основными факторами реализации нитрозирующего стресса, в результате которого происходит прямое взаимодействие NO с металлами (гемовое железо гемоглобина, миоглобина, железосодержащих ферментов), а также негемовое железо железосодержащих белков и ДНК, медь и цинк активных центров ферментов), а также не прямое взаимодействие NO^+ (S-, N-, O-нитрозирование) с тиольными, фенольными, гидроксильными и аминокетильными группами белков и ДНК. Подобное взаимодействие приводит к десенситизации рецепторов, угнетению активности митохондриальных ферментов и фрагментации нуклеиновых кислот. Так, NO , обратимо связываясь с Fe^{3+} активного центра каталазы, значительно ингибирует ее как в начальном периоде ишемии, так и в постшемическом периоде фокальной ишемии мозга. Избыток NO угнетает гемовые ферменты электронно-транспортной цепи митохондрий. Значительные количества NO , наблюдаемые в постшемический период, могут взаимодействовать с гемовым железом и парными тиольными группами, образуя динитрозольный комплекс железа (DNIC). DNIC в отличие от NO является более сильным нитрозирующим агентом, взаимодействует с тиолами белков, гистидином, аспаратом, глутамином, метионином, цистеином, глутатионом и образует N- и S-нитрозиотии. DNIC в условиях ишемии подвергается необратимому нитрозированию железосодержащие кластеры митохондриальных белков (НАДН-убихинон-оксиредуктаза, сукцинат-убихинон-оксиредуктаза, цисаконитаза), тем самым участвуя в формировании митохондриальной дисфункции [4, 9–12]. Нашими исследованиями установлено, что DNIC значительно подавляет активность супероксиддисмутазы, а также активность ферментов, регулирующих тиол-дисульфидное равновесие в клетке, — глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и глутатионпероксидазы в суспензии нейронов (рис. 1).

Смещение тиол-дисульфидной системы происходит за счет снижения ее восстановленных интермедиатов, значительно снижается уровень митохондриального глутатиона. В физиологических условиях образование DNIC способствует депонированию и транспортировке NO , повышая его биодоступность и препятствуя образованию пероксинитрита. Однако в условиях ишемического повреждения мозга при гиперпродукции NO DNIC играет сугубо отрицательную роль в процессе нейродеструкции [7, 9].

NO является мощным нитрозирующим агентом, мишенями которого могут быть нуклеофильные группы активных тиолов, амины, карбоксилы, гидроксилы и ароматические кольца. NO^+ образуется из избытка NO при участии двухвалентного железа и кислорода. NO^- обладает восстановительными свойствами, оказывает позитивное инотропное, луситропное действие на миокард, снижает порог судорожной готовности. В условиях ишемии, когда наблюдается гиперпродукция NO^- на фоне лактат-ацидоза, проявляются прооксидантные свойства этого деривата оксида азота по отношению к тиолам и аминам. Результаты исследований *in vitro* показывают, что внесение в суспензию нейронов

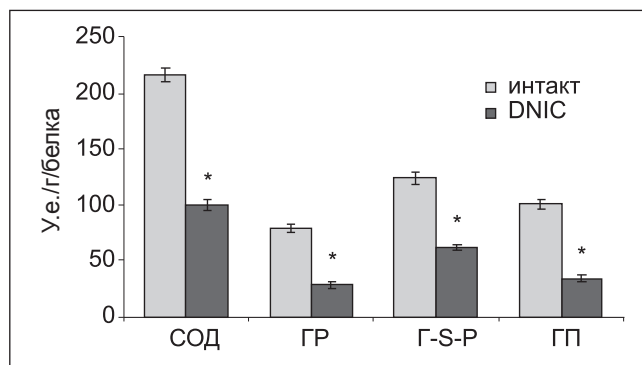


Рисунок 1. Влияние DNIC на активность ферментов, регулирующих тиол-дисульфидное равновесие в суспензии нейронов

Примечания: * — $p \leq 0,05$ по отношению к интакту; интакт — суспензия нейронов без внесения DNIC; СОД — супероксиддисмутазы; ГР — глутатионредуктаза; Г-S-P — глутатион-S-редуктаза; ГП — глутатионпероксидаза.

донатора NO^- соли Ангели снижает содержание глутатиона. Также с помощью соли Ангели было установлено, что NO^- нарушает электрическую активность нейронов, угнетает активность натриевых каналов. По всей видимости, разнонаправленность NO^- связана с его концентрацией, повышение которой приводит к образованию токсичного нитрит-аниона. N_2O_3 , являясь источником NO^+ , проявляет свойства сильного нитрозирующего агента, взаимодействует с алифатическими и ароматическими аминами и образует N-нитроамины. Нитроамины, а именно продукты их превращения под действием P450 (ион диазония и формальдегид) являются факторами, алкилирующими нуклеиновые кислоты, дезаминирующими пурины, они угнетают O^6 -метилгуанин-ДНК-метилтрансферазу, увеличивают образование 8-гидроксигуанина. N_2O_3 взаимодействует с цистеином с образованием S-нитрозоцистеина и с глутатионом с образованием S-нитроглютамина. S-нитроглютамин является основной транспортной молекулой переноса NO [13–16]. Некоторыми исследованиями установлено, что транспорт NO происходит с образованием N_2O_3 , который затем нитрозирует тиолы. Затем при участии дисульфидизомеразы высвобождается NO [17–18]. Существует еще механизм высвобождения NO из S-нитрозоглютамина при участии глутамилтранспептидазы с образованием S-нитрозоцистеинилглицина, из которого высвобождается NO . В транспорте S-нитрозоглютамина принимает участие цистин, который восстанавливается до цистеина, а последний, реагируя с S-нитрозоглютамином, образует S-цистеин. S-цистеин участвует в быстрой передаче нейронов, формируя адаптационные реакции нейрона на ишемию. Данные реакции контролируются глутатионредуктазой и глутатионтрансферазой. При ингибировании этих ферментов в условиях ишемии происходит окислительная модификация низкомолекулярных тиолов, образование гомоцистеина и, как следствие, нарушение транспорта NO с образованием его цитотоксических дериватов, еще более усиливающих окисление тиолов. Наличие в нейроне достаточно активной ти-

ольной антиоксидантной системы, способной регулировать транспорт NO, обеспечивает и устойчивость клетки к нитрозирующему стрессу — наиболее раннему нейродеструктивному механизму в условиях ишемии. Известно, что в первые минуты ишемии мозга NO (макрофагальный или экзогенный) ингибирует окислительное фосфорилирование в митохондриях клеток мишеней за счет обратимого связывания с цитохром-С-оксидазой митохондрии. Подавление электронного транспорта в митохондрии приводит к генерации супероксида и, как следствие, образованию ONOO⁻. Синтез пероксинитрита наблюдается в клетках с высокой активностью NO-синтазы и ферментов, продуцирующих АФК (ксантиноксидаза, НАДН-оксиредуктаза, циклооксигеназа, липоксигеназа, ферменты электронно-транспортной цепи). Последними исследованиями установлено, что на начальных стадиях ишемии уровень пероксинитрита может снижаться посредством митохондриальной нитроредуктазы, которая восстанавливает его с помощью НАДФН и НАДН в NO. Мишенями окислительной и нитрозирующей атаки пероксинитрита являются тиолы, CO₂, металлопротеиды, нуклеиновые кислоты, метаболитотропные транмиттеры и липиды [2, 4, 13]. Пероксинитрит, являясь относительно стойким соединением, при смещении рН в кислую сторону быстро протонируется с образованием основного продукта — нитрат-аниона, а также гидроксил-радикала и диоксида азота, что обуславливает его окислительные свойства. Поэтому на начальных стадиях ишемии пероксинитрит взаимодействует с тиолами по типу нитрозилирования, в результате чего образуются нитрозотиолы, в дальнейшем при прогрессировании процесса и проявлениях лактат-ацидоза взаимодействие происходит по типу окисления с образованием более стойких дисульфидов. Эти реакции вносят существенный вклад в механизмы нейродеструкции посредством смещения тиол-дисульфидной системы в сторону окисленных тиольных соединений, снижения восстановительного потенциала клетки, нарушения экспрессии генов за счет необратимого окисления цистеиновых остатков редоксизависимых доменов, разобщения MAP-киназного каскада. Пероксинитрит тормозит активность взаимодействующих метаболических циклов метионина и цистеина, подавляя ключевые ферменты, регулирующие уровень цистеина, и повышая образование гомоцистеина. Пероксинитрит реагирует и с метаболитотропным транмиттером CO₂ с образованием сильного нитрозирующего агента — нитрозопероксикарбоната. Важным механизмом нейротоксического действия пероксинитрита является его реакция с тиозином и образование нитротирозина. Пероксинитрит значительно угнетает активность Cu-Zn-СОД и Mn-СОД посредством нитрования ее 34 тирозинового остатка, а также связывания с медью и изменения ее валентности. Пероксинитрит является специфическим агентом, необратимо угнетающим митохондриальное дыхание при ишемии, непосредственно взаимодействуя с железом активных центров ключевых энзимов, а также нитрозируя по S-, N-, O-элементам тиольные, фенольные, гидроксильные и аминогруппы белковой части этих энзимов, а

при более выраженном проявлении нитрозирующего стресса необратимо окисляя их. Подавление митохондриального дыхания приводит к снижению заряда митохондрий, что может инициировать апоптотический процесс, а при отсутствии глюкозы — и к некрозу [4, 7, 12, 19]. Имеются данные и о прямой активации открытия гигантской поры оксидом азота, приводящей к выходу цитохрома С и запуску каспазного каскада. Эти данные получены при воздействии на митохондрии таких цитотоксических дериватов NO, как пероксинитрит и ион нитрозония, в механизме которых лежит модификация тиольных белков митохондриальной поры. NO и его дериваты могут вызывать перекисное окисление фосфолипидов. Так, под действием цитотоксических дериватов NO и гидроксил-радикала происходит открытие митохондриальных пор с экспрессией и выходом в цитозоль проапоптотических белков. Открытие пор происходит за счет окисления или нитрозилирования тиольных групп цистеинзависимого участка белка внутренней мембраны митохондрий (АТФ/АДФ-антипортера), что превращает его в проницаемый неспецифический канал-пору. Открытие пор превращает митохондрии из «электростанций» в «топку» субстратов окисления без образования АТФ [20, 21]. Известно, что нарушение кислородного режима тканей, транмиттерный аутокоидоз, нарушение аккумуляции Ca²⁺ митохондриями, повреждение мембраны митохондрий АФК и NO усиливают открытие пор и высвобождение апоптогенных белков из поврежденных митохондрий. Митохондриальная пора представляет собой канал, проходящий через обе митохондриальные мембраны и состоящий из трех белков: транслокатора адениновых нуклеотидов, потенциалзависимого анионного канала (порина) и бензодиазепинового рецептора. Когда этот комплекс связывается с Ca²⁺, через мембранную пору могут проходить вещества с небольшой молекулярной массой. Это приводит к снижению мембранного потенциала и набуханию матрикса, целостность внешней мембраны неизбежно нарушается, и из межмембранного пространства в цитоплазму выходят белки апоптоза. Нитрозилирование белков по остаткам тирозина, осуществляемое ONOO⁻, может иметь серьезные функциональные последствия, так как оно подавляет фосфорилирование тирозина, то есть нарушает некоторые пути передачи сигнала в клетке [20]. Пероксинитрит может нитрозилировать и цитохром С в митохондриях, что приводит к изменению его функций, в частности он становится неспособным поддерживать перенос электронов в дыхательной цепи и не восстанавливается аскорбатом [5, 6, 16]. Поскольку одновременно происходит выход цитохрома С (в том числе и нитрованного) в цитоплазму, то можно предполагать участие такого нитрозилирования и в каких-то сигнальных процессах. Пероксинитрит приводит к нитрозилированию гуанина и разрыву цепочек ДНК. В отношении повреждений генома известен еще один эффект NO: его дериваты с супероксидрадикалом ингибируют ферменты, ответственные за репарацию ДНК. В зависимости от источника (разные доноры NO) показано действие NO на алкилтрансферазу, формамидопиримидин-ДНК-гликозилазу и лигазу.

NO повышает активность PARP в клетках Беца и ADP-рибозилирование при глобальной ишемии, возможно, вследствие разрывов ДНК, но это скорее приводит к некрозу из-за истощения пула NAD и АТР. В связи с действием NO и его производных на ДНК интересны данные о его влиянии на экспрессию p53. Белок p53, подавляющий рост опухолей, поддерживает целостность генома и может вызывать остановку клеточного цикла или апоптоз. Известно, что p53 может индуцировать экспрессию Bax, Fas, p53AIP (apoptosis inducing protein) и других апоптогенных белков, а также сам перемещается в митохондрию при апоптозе, что может быть одной из причин выработки АФК и снижения заряда митохондрий. В норме концентрация p53 в нейроне очень мала и он быстро деградирует. Повреждение ДНК ведет к накоплению p53. В экспериментах на культуре грушевидных нейронов мозжечка выявлено накопление p53 при гибели клеток, вызванной избытком донатора NO — нитропрусида натрия. Интересны данные о совместном участии в его регуляции гибели нейрона митохондрии и NO при ишемии мозга. Сделано заключение, что Bcl-2 работает посредством снижения до нуля NO-индуцированного повышения экспрессии белка Bax. Взаимодействие NO с членами суперсемейства Bcl-2 выражается также в том, что при действии оксида азота на клетку сильно понижается уровень внутриклеточного Bcl-2 белка, возможно, через каспазиндуцированное расщепление или p53-зависимое подавление его экспрессии [22–24]. Проапоптотический эффект оксида азота выражается также в индуцируемом им повышении экспрессии апоптогенных белков Bax. В дополнение к описанным выше функциям митохондрий следует упомянуть последние исследования в этой области, показывающие, что митохондрия имеет отношение не только к восприятию апоптотического сигнала от NO, но и к производству самого NO. Действительно, в последних работах показано наличие конститутивной формы NOS в митохондриях. Было показано, что эта изоформа NOS локализована в митохондриальной мембране, судя по всему во внутренней. Оказалось, что mNOS очень схожа с макрофагальной iNOS, но экспрессируется конститутивно. Пока не ясно, считать ли mNOS отдельной изоформой, или это iNOS, содержащая посттрансляционные модификации, которые ведут к иной субклеточной локализации. Очищенная mNOS при дефиците L-аргинина способна продуцировать супероксидрадикал [22]. Логично предположить участие этой mNOS в регуляции апоптоза за счет влияния на тиол-дисульфидное равновесие белков митохондриальной поры в реакции как нитрозилирования, так и окисления. Кроме того, получены данные о роли mNOS в регуляции уровня кальция в митохондрии. В норме mNOS препятствует поступлению избытка кальция в митохондрию, в условиях ишемии при повышении активности mNOS происходит повышение внутримитохондриального кальция и открытие митохондриальной поры. По всей видимости, на начальных стадиях ишемии эта реакция играет защитную роль, т.к., регулируя кальцийзависимые механизмы открытия гигантской поры, mNOS способна активировать компенсаторные

энергетические шунты [7, 11, 13]. В дальнейшем, особенно в постишемический период, нарастающая активность mNOS приводит к неконтролируемому открытию поры митохондрий и инициирует митоптоз. Кроме того, mNOS посредством выработки дозируемого уровня NO способна регулировать митохондриальное дыхание в норме и на начальных, компенсированных стадиях ишемии, модулируя активность цитохром-С-оксидазы, комплексы I и II электронной транспортной цепи и уровень НАДФН, ФАД и коэнзима Q₁₀, а также изменяя доступность O₂ для акцептирования электронов. В дальнейшем роль mNOS меняется на кардинально противоположную; она участвует в активации паразитарных реакций образования АФК митохондриями. Особого внимания в расширении представлений о механизмах цитотоксичности NO и гибели нейронов заслуживает тиол-дисульфидная система. Интермедиаты тиол-дисульфидной системы обладают транспортными свойствами в отношении NO, тем самым повышая его биодоступность, кроме того, многие тиолы — глутатион, цистеин, метионин способны значительно ограничивать цитотоксичность NO и его дериватов, увеличивая шанс нейрона выжить при ишемии [5, 9, 18].

Нашими исследованиями было установлено, что внесение в супернатант, содержащий митохондрии мозга крыс, восстановленного глутатиона или цистеина на фоне присутствия в среде (50 мкМ) DNIC приводило к увеличению активности малатдегидрогеназы, повышению заряда митохондрии и снижению маркеров окислительной модификации белка — альдегидфенилгидразонов (АФГ) и кетонфенилгидразонов (КФГ) [25]. Другими исследованиями показано, что восстановленный глутатион в суспензии митохондрий мозга крыс ограничивал ингибирующее действие пероксинитрита *in vitro* на фосфорилирование белков с молекулярной массой 60, 45, 29, 22 и 19 кД и увеличивал содержание белка теплового шока HSP 70 [22].

С учетом вышеизложенного перспективным направлением современной нейропротекции является фармакологическая регуляция соотношения тиол-дисульфидной системы и оксида азота нейрона.

Среди большого арсенала нейропротективных средств особого внимания заслуживает новый отечественный нейропептидный препарат — Цереброкурин.

Кроме того, определенный интерес представляет тиотриазолин, который с успехом применяется в настоящее время в клинической практике [28, 29]. Наше внимание он привлек в связи с наличием в его химической структуре тиольной группы. В связи с этим интересным является исследование его активности при моделировании ишемического повреждения головного мозга (ГМ) и установление способности тиотриазолина влиять на показатели тиол-дисульфидной и антиоксидантной систем, а также на процессы апоптотической гибели нейрональной клетки.

Экспериментальные исследования на модели острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) (перевязка общих сонных артерий у белых беспородных крыс) показали, что Цереброкурин (0,01 мл/кг) и

Таблица 1. Влияние Цереброкурина и тиотриазолина на показатели тиол-дисульфидной системы на 1-е сутки ОНМК

Группа животных	бSH, мМ/г/белка	бSS, мМ/г/белка	нбSH, мМ/г/белка	нбSS, мМ/г/белка	Глутатион восстановленный	Глутатион окисленный	ГР, у.е./мг/белка	ГПР, у.е./мг/белка	АФГ, у.е./г/белка	NO, мкМ/л	NOS, нмоль/мг/б/мин
Интакт	19,20 ± 2,15	6,19 ± 1,55	1,38 ± 0,07	0,35 ± 0,08	2,90 ± 0,02	0,11 ± 0,05	14,5 ± 0,8	67,5 ± 2,1	0,41 ± 0,03	1,16 ± 0,09	9,43 ± 3,20
ОНМК (контроль)	6,20 ± 0,99	14,3 ± 1,8	0,70 ± 0,17	2,10 ± 0,14	0,560 ± 0,017	0,87 ± 0,06	6,20 ± 0,64	26,7 ± 1,3	1,30 ± 0,07	5,6 ± 0,9	30,7 ± 2,7
ТТЗ	13,7 ± 1,1*	9,20 ± 1,33*	1,23 ± 0,06	0,440 ± 0,073	1,85 ± 0,04*	0,56 ± 0,05	9,30 ± 0,52	43,90 ± 1,12*	0,71 ± 0,02	3,00 ± 0,74	29,7 ± 1,2
ЦРК	17,8 ± 1,6*	7,1 ± 1,1*	1,30 ± 0,07	0,38 ± 0,06	2,100 ± 0,063*	0,26 ± 0,41*	12,70 ± 0,34*	55,70 ± 1,21*	0,44 ± 0,06*	2,20 ± 0,63*	21,2 ± 2,1*

Примечания (здесь и далее): * — $p \leq 0,05$ по отношению к контролю; ТТЗ — тиотриазолин; ЦРК — цереброкурин.

Таблица 2. Влияние Цереброкурина и тиотриазолина на тип морфологической гибели нейрональной клетки на 1-е и 4-е сутки эксперимента

Группа животных	Ноеcht ⁺ -нейроны (апоптоз), 1-е сутки, количество клеток в видимом поле	ЭБ ⁺ -нейроны (некроз), 1-е сутки, количество клеток в видимом поле	Ноеcht ⁺ -нейроны (апоптоз), 4-е сутки, количество клеток в видимом поле	ЭБ ⁺ -нейроны (некроз), 4-е сутки, количество клеток в видимом поле
Интакт	5,0 ± 1,5	2,0 ± 0,5	4,0 ± 2,1	2,00 ± 0,87
ОНМК (контроль)	43,6 ± 3,3*	18,0 ± 2,7*	12,0 ± 3,4*	47,8 ± 3,4*
ТТЗ	20,0 ± 4,3**	11,8 ± 2,4	11,0 ± 3,1	12,1 ± 2,1**
ЦРК	13,0 ± 2,1**	7,0 ± 1,3**	9,0 ± 1,3	7,0 ± 2,1**

Примечания: * — $p \leq 0,05$ по отношению к интакту; ** — $p \leq 0,05$ по отношению к контролю.

тиотриазолин (50 мг/кг) в первые сутки ишемии способны ограничивать действие нитрозирующего стресса на нейрональную клетку, ингибируя образование нитрозотиолов, альдегидфенилгидразонов; уменьшая количество окисленного глутатиона, нормализуя активность глутатионтрансферазы (ГТ), глутатионпероксидазы (ГПР), а также снижая концентрацию в тканях головного мозга стабильных метаболитов NO и активность NO-синтазы в суспензии митохондрий (табл. 1). Данные эффекты исследуемых препаратов обуславливают антиапоптотическое действие в ранние сроки ишемии, что выражалось в снижении количества Ноеchest-положительно окрашенных нейронов (флюоресцентный краситель, избирательно окрашивающий апоптозирующие нейроны) относительно контрольной группы (табл. 2, рис. 2). Как видно из табл. 1 и 2, Цереброкурин по исследуемым эффектам статистически достоверно превышает показатели тиотриазолина.

У животных контрольной группы в отличие от животных, получавших Цереброкурин и тиотриазолин, в гомогенате головного мозга в первые сутки ишемии регистрировалось значительное количество окисленных тиолов, глутатиона; снижение уровня активности ГТ и ГПР, а также значительное увеличение АФГ (табл. 1). Параллельно с биохимическими изменениями в головном мозге отмечались и морфологические, проявляющиеся увеличением по отношению к интакту количества апоптозирующих и некротирующих нейронов с преобладанием гибели клеток по типу апоптоза (табл. 3, рис. 2).

Биохимические исследования тканей головного мозга животных с ОНМК на 4-е сутки эксперимента

показали более значительный в сравнении с 1-ми сутками прирост окисленных SH-групп и окисленного глутатиона, а также снижение активности ГТ и ГПР. Кроме того, отмечалось увеличение в головном мозге кетонфенилгидразонов (КФГ) — более позднего маркера окислительной деструкции белков, образующихся в условиях окислительного и карбонильного стресса, а также стабильных метаболитов NO и NO-синтазы (табл. 3). Подобные нейробиохимические изменения на 4-е сутки эксперимента приводят к существенным необратимым функциональным изменениям в нейрональной клетке. За счет окисления тиольных групп цистеинзависимого участка белка внутренней мембраны митохондрий способствуют открытию гигантской поры митохондрий и ее ферментных систем, приводя к развитию стойкой митохондриальной дисфункции и, как следствие, к ее гибели [21]. Важно отметить, что на 4-е сутки ишемии преобладал некротический тип гибели нейрона (повышение количества этидиум бромид (ЭБ) — положительно окрашенных нейронов — избирательная окраска некротически измененных клеток), что связано с развитием митохондриальной дисфункции, истощением ее энергетических запасов, значительным накоплением окисленных тиолов.

Курсовое назначение Цереброкурина и тиотриазолина (табл. 2) позволило в некоторой степени влиять на патологические процессы в головном мозге экспериментальных животных на 4-е сутки ишемии. Эффекты Цереброкурина и тиотриазолина были однонаправленными и выражались в их способности снижать количество окисленных тиолов, КФГ и восстанавливать активность ГТ и ГПР, а также уменьшать

Таблица 3. Влияние Цереброкурина и тиотриазолина на показатели тиол-дисульфидной системы на 4-е сутки ОНМК

Группа животных	бSH, мМ/г/белка	бSS, мМ/г/белка	нбSH, мМ/г/белка	нбSS, мМ/г/белка	Глутатион восстановленный	Глутатион окисленный	ГР, у.е./мг/белка	ГПР, у.е./мг/белка	КФГ, у.е./г/белка	NO, мкМ/л	NOS, нмоль/мг/б/мин
Интакт	18,3 ± 1,8	5,90 ± 0,87	1,30 ± 0,06	0,45 ± 0,07	2,740 ± 0,032	0,13 ± 0,07	12,1 ± 0,6	60,4 ± 1,9	0,28 ± 0,07	1,87 ± 0,06	10,4 ± 2,7
ОНМК (контроль)	4,20 ± 0,56	21,7 ± 1,3	0,25 ± 0,10	6,70 ± 0,12	0,27 ± 0,02	1,700 ± 0,045	4,50 ± 0,53	17,7 ± 1,5	1,50 ± 0,06	7,8 ± 0,6	41,2 ± 3,8
ТТЗ	10,9 ± 1,3*	14,8 ± 2,2*	0,67 ± 0,05*	2,9 ± 0,2*	1,30 ± 0,07*	0,80 ± 0,06	7,10 ± 0,53*	36,8 ± 2,6*	0,81 ± 0,04*	5,60 ± 0,43	23,1 ± 4,3
ЦРК	15,8 ± 1,2*	9,60 ± 0,98*	0,71 ± 0,04*	1,56 ± 0,09*	2,10 ± 0,06*	0,45 ± 0,08*	10,80 ± 0,21*	58,1 ± 1,8*	0,56 ± 0,07*	3,3 ± 0,3*	18,4 ± 2,8*

содержание стабильных метаболитов NO и активность NO-синтазы. Исследуемые препараты снижали количество некротически измененных нейронов. Возможно, Цереброкурин и тиотриазолин модулировали морфологический тип нейронов, переключая некротический тип гибели на апоптотический (соотношение ЭБ- и Ноеcht-положительных нейронов), который является оптимальным, упорядоченным процессом прекращения жизнедеятельности деструктивно измененных нейронов, при котором стабилизируются клеточные мембраны, содержание клеток утилизируется путем образования апоптотических телец и их фагоцитоза, без развития воспалительной реакции. Механизм действия Цереброкурина, по всей видимости, связан с его способностью позитивно действовать на геном клетки в условиях ишемии, в частности увеличивая экспрессию глобального фактора транскрипции AP-1, усиливать синтез ключевых ферментов антиоксидантной защиты — каталазы и супероксиддисмутазы. Кроме того, по некоторым данным, которые согласуются с нашими предыдущими исследованиями [20], Цереброкурин модулирует активность митохондриальной NO-синтазы, ограничивая нитрозирующий стресс, регулируя открытие митохондриальной поры и, как следствие, уменьшая проявления митохондриальной дисфункции. Возможно, осуществляется и влияние на активность митохондриальной нитроредуктазы, ограничивающей образование пероксинитрита.

Механизм действия тиотриазолина связан, как было отмечено выше, с наличием в его структуре тиольных групп, конкурирующих с SH-группами цистеинзависимого участка белка внутренней мембраны

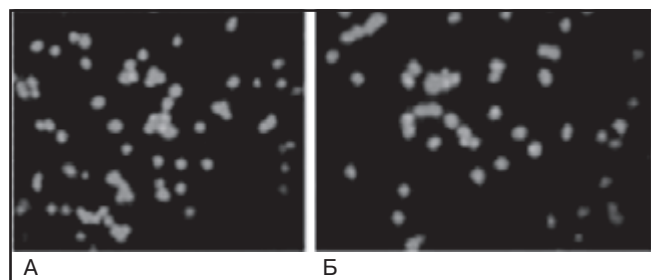


Рисунок 2. Флуоресцентное свечение Ноеcht-положительных нейронов на 1-е сутки эксперимента (А — контроль; Б — Цереброкурин)

митохондрий за АФК и пероксинитрит, которые и образуют с последним стойкие комплексы. Это позволяет предотвратить открытие митохондриальной поры в условиях оксидативного и нитрозирующего стресса, обеспечивая тем самым его нейропротективный эффект.

Заключение

Соотношение оксида азота и тиол-дисульфидной системы является фактором, определяющим дальнейшую судьбу нейрона в условиях ишемии, а именно тип его гибели. В условиях ишемических повреждений головного мозга в ранние сроки развивается нитрозирующий стресс, приводя к нитрозированию тиолов, изменяя тиол-дисульфидное равновесие белков митохондриальной поры. На этой стадии митохондриальная NO-синтаза играет защитную роль, регулируя клеточную гибель, переключая ее на более выгодный тип — апоптоз. Далее развиваются оксидативный и карбонильный стрессы, которые существенно смещают тиол-дисульфидное равновесие в сторону окисленных тиолов, развивается стойкая митохондриальная дисфункция с дефицитом энергетических запасов клетки, развитием аутокоидоза, изменением ответа генома, и, как следствие, клетка погибает по типу некроза.

При ЧМТ на догоспитальном и интраоперационном этапах действия бригад СМП, анестезиологов и нейрохирургов направлены на коррекцию внутричерепной гипертензии, остановку кровотечения и борьбу с отеком ГМ от первичных факторов повреждения ЦНС. В послеоперационном периоде интенсивная терапия направлена на минимизацию вторичных повреждений мозга.

Вторичные повреждения мозга являются ишемическими по своей природе и характеризуются нарастающим расстройством ауторегуляции сосудов ГМ, эксайтотоксичностью, или «клеточной интоксикацией», и проявляются стойким вазоспазмом и труднокорригируемой зоной перифокального отека, сохраняющейся дислокацией срединных структур ГМ, несмотря на расширение уровня сознания, восстановление витальных функций и разрешение патологических неврологических симптомов. Сроки развития вторичных повреждений определяются с 3-х по 7-е сутки с момента ЧМТ.

Целью нейропротекторной терапии является ограничение вторичных повреждений мозга, связанных с накоплением внутри клеток Ca^{2+} медиаторами ПОЛ, что приводит к деструкции нейронов.

Схема лечения больных со среднетяжелой ЧМТ (11–13 баллов по шкале комы Глазго)

Оксигенотерапия.

Анальгезия седуксеном 0,6–0,8 мг/кг/сут.

Восстановление функции клеточных и сосудистых мембран: аскорбиновая кислота 4–12 мг/кг, дицинон 6–28 мг/кг/сут.

Восстановление мозгового кровотока: нимотоп 1–2 мг/час.

Снижение интенсивности оксидативного и нитрозирующего стресса и нормализация тиол-дисульфидной системы: тиотриазолин 10 мг/кг/сут в/в, α -липоевая кислота 0,5% 10 мл/сутки в/в кап. в течение 1 месяца, цистеина г/х 1–2 мл 2% р-ра в/м.

Восстановление микроциркуляции: трентал 2–3 мг/сут в/в кап.

Противоотечная терапия: фуросемид 0,3–1,4 мг/кг/сут.

Эффективность восстановления аэробного энергообмена ГМ и метаболизма нервных клеток и торможение формирования митохондриальной дисфункции обусловлены снижением ВЧД менее 20–25 мм рт.ст., устранением вазоспазма и восстановлением ауторегуляции сосудов ГМ и направлены на снижение степени инвалидизации больных в посттравматическом периоде: Цереброкурин 2,0 мл/сут, мексидол 100–250 мг/сутки в течение 21–30 суток.

Фармакологическая коррекция, направленная на ограничение нитрозирующего, оксидативного и карбонильного стрессов, позволяет снизить количество деструктивно измененных клеток, а также «переключить» тип гибели клетки с некроза на апоптоз.

Список литературы

1. Iadecola C. *Mechanisms of cerebral ischemic damage // Cerebral ischemia*. — New Jersey: Humana Press, 1999. — P. 3-33.
2. Dhar-Mascareno M., Sacramo J.M. *Hypoxia-reoxygenation — induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells // Free Radic. Biol. Med.* — 2005. — Vol. 38, № 10. — P. 1548-1554.
3. Беленичев И.Ф., Губський Ю.І., Левицький Є.Л. та ін. Антиоксидантна система захисту організму (огляд літератури) // *Совр. пробл. токсикол.* — 2002. — № 3. — С. 24-31.
4. Соловьев А.И., Стефанов А.В. *Фармакология и токсикология оксида азота: два лица одной и той же молекулы // Современ. проблемы токсикологии.* — 1998. — № 1. — С. 35-38.
5. Dimatteo M.A., Loweth A.C., Thomas S. *Superoxide, nitric oxide, peroxynitrite and cytokine combinations all cause functional impairment and morphological changes in rat islets of Langerhans and insulin secreting cell lines, but dictate cell death by different mechanisms // Apoptosis.* — 1997. — № 2. — P. 164-169.
6. Carmody R.J., Cotter T.G. *Signalling apoptosis a radical approach // Redox. Rep.* — 2001. — 6. — P. 77-90.
7. Atlante A. *Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells: a major role for xanthine oxidase in oxygen radical formation // J. Neurochem.* — 1997. — Vol. 68, № 4. — P. 2038-2045.
8. Strick A.T., Hogg N., Thomas J.P. *Nitric oxide donor compounds inhibit the toxicity of oxidized low-density lipoprotein to endothelial cells // FEBS Lett.* — 1995. — 361. — P. 291-294.
9. Губський Ю.І., Беленичев И.Ф., Павлов С.В. и др. *Токсикологические последствия окислительной модификации*

белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) // *Совр. пробл. токсикол.* — 2005. — № 3. — С. 20-26.

10. Лю Б.Н. *Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма // Усп. совр. биологии.* — 2001. — Т. 121, № 5. — С. 488-501.

11. Kehrer J.P. *Cause-effect of oxidative stress and apoptosis // Teratology.* — 2000. — 62. — P. 235-246.

12. Gopalakrishna R., Jaken S. *Protein kinase C signaling and oxidative stress // Free Radic. Biol. Med.* — 2000. — 28. — P. 1349-1361.

13. Vanin A.F., Muller B., Alencar J.L. et al. *Evidence that intrinsic iron but not intrinsic copper determines S-nitrosocysteine decomposition in buffer solution // Nitric Oxide.* — 2002. — Vol. 7 (3). — P. 194-209.

14. Sandstrom P.A., Tobbey P.W. *Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cell displaying a HIV-associated glutathione peroxidase deficiency // J. Biol. Chem.* — 1994. — 269. — P. 798-804.

15. Kishimoto J., Tsuchiya T., Emson P.C., Nakayama Y. *Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats // Brain Res.* — 1996. — № 720. — P. 159-171.

16. Leza J.C., Salas E., Sawicki G. *The effect of stress on homeostasis in JCR-LA-cprats: the role of nitric oxide // Pharmacol. Exp. Ther.* — 1998. — № 286. — P. 1397-1403.

17. Rivier C. *Role of nitric oxide and carbon monoxide in modulating the ACTH response to immune and nonimmune signals // Neuroimmunomodulation.* — 1998. — № 5. — P. 203-213.

18. Armstead W.M. *Nitric oxide contributes to opioid release from glia during hypoxia // Brain Res.* — 1998. — № 813. — P. 398-401.

19. Досенко В.Є., Загорій В.Ю., Мойбенко О.О. *Патофізіологічні аспекти генетичного поліморфізму ендотеліальної NO-синтази // Фізіол. журнал.* — 2002. — Т. 48, № 6. — С. 86-101.

20. Беленичев И.Ф., Колесник Ю.М., Павлов С.В., Абрамов А.В., Бухтиярова Н.В. *Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция Цереброкурином // Международный неврологический журнал.* — 2008. — № 4 (20). — С. 23-29.

21. Ховряков А.В., Кругляков П.П., Айрапетянц М.Г., Сосуннов С.А. *Влияние NO-синтазы на поведенческие и структурные изменения головного мозга при хроническом стрессе // Морфология.* — 2002. — Т. 121, № 2-3. — С. 167.

22. Malyshev I.Yu., Malugin A.V., Golubeva L.Yu. et al. *Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells // FEBS Lett.* — 1996. — № 391. — P. 167-170.

23. Dobashi K., Pahan K., Chahal A., Singh I. *Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C-6 glial cells // J. Neurochem.* — 1997. — № 68. — P. 1806-1903.

24. Carmody R.J., Cotter T.G. *Signalling apoptosis a radical approach // Redox. Rep.* — 2001. — 6. — P. 77-90.

25. Беленичев И.Ф., Черний В.И., Колесник Ю.М., Павлов С.В. и др. *Рациональная нейропротекция.* — Донецк: Изд. дом «Заславский», 2009. — 261 с.

26. Черний В.И., Колесников А.Н., Городник Г.А., Островая Т.В., Чернявский Р.И. *Ишемия головного мозга в медицине критических состояний. Нейропротекция (Патофизиология, терминология, характеристика препаратов): Метод. рек.* — Киев, 2007. — 72 с.

27. Ена Л.М., Кузнецова С.М., Кузнецов В.Н. и др. *Материалы экспериментальных и клинических испытаний препарата Цереброкурин®.* — Киев, 1997. — 115 с.

28. Беленичев И.Ф., Мазур И.А., Коваленко С.И. *Некоторые аспекты противоишемического действия тиотриазолина в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения // Акт. питания фармац. та мед. науки і практ. — Запоріжжя.* — 2002. — Випуск VIII. — С. 43-48.

29. Беленичев И.Ф., Коваленко С.И., Дунаев В.В. *Антиоксиданти: сучасне уявлення, перспективи створення // Ліки.* — 2002. — № 1. — С. 25-29.

Получено 31.03.10