



УДК 615.21:616:831-005.4

Е. В. Супрун

ЕФЕКТИ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІШЕМІЧНОМУ ІНСУЛЬТІ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ РОНКОЛЕЙКІНОМ

Національний фармацевтичний університет, Харків

Важливу участь у формуванні молекулярних і патофізіологічних змін при ішемічному інсульті (ІшІ) відіграє система оксиду азоту. Оксид азоту безперервно продукується в організмі людини та виконує функції універсального регулятора метаболізму, котрому властива безліч функцій. Оксид азоту утворюється шляхом п'ятиелектронного окиснення термінальної гуанідинової групи L-аргініну за участі ферменту NO-синтази (NOS). Сімейство NOS належить до класу гемвісних ферментів і включає три основні ізоформи, які кодуються різними генами, — нейрональну (nNOS, або NOS-I), індуцибельну (iNOS, або NOS-II) й ендотеліальну (eNOS, або NOS-III) [1; 2].

У фізіологічних концентраціях NO виконує регуляторні функції — зумовлює розслаблення судин, гальмування активності тромбоцитів і макрофагів. Вазопротекторні функції NO полягають також у модуляції вивільнення вазоактивних медіаторів, пригніченні адгезії лейкоцитів до судинної стінки. У ЦНС NO є сигнальною молекулою, значення якої неоднозначне — бере участь у процесах пам'яті та мислен-

ня і є нейропротектором. Захисна роль NO проявляється у формуванні нітрозіуму іона NO^+ , який пов'язує регуляторний центр NMDA-рецептора, зменшуючи тим самим його збудливість і ексайтотоксичні явища [3; 4].

При ІшІ в клітинах головного мозку відзначається зростання активності iNOS і нагромадження надлишкових кількостей NO, що супроводжується загибеллю клітин. Зниження кровотоку при ІшІ супроводжується також формуванням мітохондріальної дисфункції та енергетичного дефіциту, розвитком глутамат-кальцієвого каскаду та дестабілізацією клітинних мембран. Особливе значення серед механізмів вторинного ушкодження тканини мозку мають реакції локального запалення навколо зони «ядра» інфаркту, а саме різкий підйом рівнів прозапальних медіаторів — цитокінів, які визначають ступінь вираженості запальної реакції, умови для негайної або відстроченої загибелі клітин навколо первинного некрозу та розміри остаточного постішемічного дефекту мозку [5; 6].

До прозапальних цитокінів належать інтерлейкіни (IL-1, IL-6, IL-8) і фактор некрозу пух-

лин (ФНП- α). Першим із прозапальних цитокінів у зоні ішемії продукується IL-1, якому також властиво стимулювати синтез росткових факторів — IL-2 і IL-4 [7]. IL-2 є важливим учасником формування швидкої імунної відповіді організму (індукує проліферацію В-лімфоцитів, активує цитотоксичні Т-лімфоцити) та бере участь у формуванні «цитокінової мережі» — стимулює синтез та секрецію інших цитокінів (IL-4, IL-6), гамма-інтерферону, колоніестимулювальних факторів і ФНП- α . У клінічній практиці ронколейкін застосовують для корекції вторинного імунного дефіциту при лікуванні сепсису різної етіології, тяжких гнійно-запальних захворювань і онкологічних процесів [8].

Враховуючи, що ступінь патофізіологічних змін, тяжкість клінічного перебігу ІшІ залежать як від ефектів NO, так і від формування «цитокінового каскаду», метою цієї роботи є вивчення впливу рекомбінантного IL-2 (ронколейкіну) на динаміку показників системи NO, функціональної активності мітохондрій, енергозабезпечення й апоптотичних змін у тканинах головного мозку щурів з експериментальним ІшІ.



Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах масою 180–200 г. Щури отримані з розплідника ІФТ НАМН України. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію при природній зміні дня та ночі. Усі процедури й оперативні втручання здійснювали відповідно до «Положення про використання лабораторних тварин в біомедичних дослідженнях». Гостре порушення мозкового кровообігу (ГПМК) спричинювали необоротною двосторонньою оклюзією загальних сонних артерій — під етаміналнатрієвим наркозом (40 мг/кг) за допомогою хірургічного доступу виділяли загальні сонні артерії, підводили під них шовкові лігатури та перев'язували.

Тварини були розподілені на 3 групи по 10 щурів. Перша група — хібно оперовані тварини (ХО), друга — тварини з ГПМК (контрольна патологія — група КП), третя — тварини з патологією, яким вводили ронколейкін (група Р) дозою 0,01 мг/кг внутрішньом'язово відразу після виходу тварин із наркозу та надалі 1 раз на добу протягом 18 днів. Після закінчення гострого періоду ішемії (4 дні) та фази відновлення (18 днів) тварин виводили з експерименту під етаміналнатрієвим наркозом шляхом декапітації. Мозок швидко витягували, відокремлювали скроневі частки, які гомогенізували в рідкому азоті. У гомогенаті для оцінки ефектів системи NO визначали активність NO-синтази (за швидкістю убування кількості НАДФН⁺), вміст нітритів (за реакцією Гресса) та кількість L-аргініну. Оцінку процесів енергетичного обміну здійснювали шляхом визначення в гомогенаті мозку рівнів аденілових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) із розрахунком додаткових показників енергозабезпечення [9]:

— енергетичний заряд (ЕЗ) за формулою:

$$E3 = \frac{AT\Phi + 1/2 A\Delta\Phi}{AT\Phi + A\Delta\Phi + AM\Phi};$$

— енергетичний потенціал (ЕП) за співвідношенням:

$$EP = \frac{AT\Phi}{A\Delta\Phi};$$

— індекс фосфорилювання (ІФ) за співвідношенням:

$$IF = \frac{AT\Phi}{A\Delta\Phi + AM\Phi};$$

— термодинамічний контроль дихання (ТКД) за формулою:

$$TKD = \frac{A\Delta\Phi}{AM\Phi}.$$

Також у гомогенаті мозку визначали мембранний потенціал заряду мітохондрій у присутності сафроніну-О. Для виявлення експресії c-Fos-позитивних клітин у сенсомоторній зоні кори щурів використовували імуногістохімічні методи непрямой імунофлуоресценції. Отримані дані були проаналізовані варіаційно-статистичним методом із використанням критерію Стьюдента (t). Вірогідними вважали відмінності з рівнем значення більше ніж 95 % (p<0,05), які відзначали як p^{ХО} (відносно групи хібно оперованих тварин) або p^{КП} (відносно групи контрольної патології).

Результати дослідження та їх обговорення

Ефекти оксиду азоту залежать від його концентрації, місця продукції, ступеня дифузії через судинну стінку, рівня інактивації [5]. Як надлишок, так і нестача NO вкрай несприятливі для організму. Гіпоксія при нейродеструктивних процесах дуже впливає на експресію генів NOS, індукуючи фактори транскрипції — HIF-1, HIF-2 і NFκB. HIF-1 являє собою гетеродимер, що утворюється з α- і β-субодиниць. HIF-1β експресується

конститутивно і, на відміну від HIF-1α, не залежить від концентрації O₂. В експериментах доведено, що після перших 10 хв помірної гіпоксії в клітину починає надходити Ca²⁺ і відбувається активація eNOS. Також відомо, що в умовах гіпоксії рівень внутрішньоклітинного Ca²⁺ за рахунок індукції та стабілізації HIF-1α тісно корелює з експресією iNOS і вивільненням NO [10; 11].

Концентрація NO починає збільшуватися з перших хвилин ішемії, досягаючи максимуму на 1-шу–3-тю добу. На цьому етапі NO бере участь у непрямим механізмах загибелі нейрона — активації фосфоліпаз, посиленні утворення гідроксил-радикала, модуляції активності NMDA-рецепторів. У відстроченому постішемичному періоді (з 7–14-ї доби при глобальній ішемії та з 1–3-ї доби при фокальній ішемії) реєструється гіперпродукція NO з участю індукцибельної NOS-активованої глії, макрофагів і нейтрофілів. Відстрочений характер експресії індукцибельної NOS пов'язаний із більш пізніми термінами появи активованої астро- і макроглії та клітин запалення (рис. 1).

Головний механізм токсичної дії NO при ішемії — його реакція з супероксидом з утворенням у клітинах-мішенях активних дериватів пероксинітриду (ONOO⁻), нітрозонію (NO⁺), нітросилу (NO⁻) та діазоттриоксиду (N₂O₃), які є основними чинниками реалізації нітрозуючого стресу. Внаслідок цього відбувається пряма взаємодія NO з металами (гемове залізо гемоглобіну, міоглобіну, залізовмісних ензимів, а також негемового заліза залізосіркових білків і ДНК, мідь і цинкактивних центрів ферментів), а також непряма взаємодія NO⁺ (S-, N-, O-нітрузування) з тільними, фенольними, гідроксильними й аміногрупами білків і ДНК. Це призводить до десенситації рецепторів, пригнічення активності



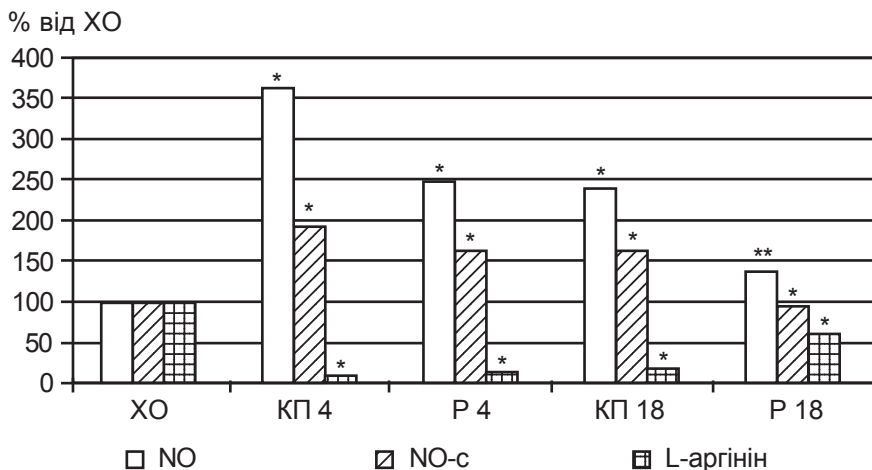


Рис. 1. Вміст показників системи оксиду азоту в мозку щурів із церебральною ішемією. На рис. 1–5: ХО — група хвибно оперованих тварин; КП 4, КП 18 — група контрольної патології на 4-ту та 18-ту добу досліджу; Р 4, Р 18 — група тварин, які отримували ронколейкін, на 4-ту та 18-ту добу досліджу. Відхилення вірогідні ($p \leq 0,05$): * — відносно ХО; ** — відносно КП

мітохондріальних ферментів і фрагментації нуклеїнових кислот [12].

У тварин групи КП у гомогенаті головного мозку на 4-ту добу досліджу відзначено значне збільшення активності NO-синтази та рівнів стабільних метаболітів NO відповідно в 2 та 2,8 рази ($p^{ХО} < 0,001$) на тлі зниження на 90 % вмісту L-аргініну ($p^{ХО} < 0,001$). На 18-ту добу в групі КП активність NO-синтази та рівні стабільних метаболітів NO залишилися підвищеними відносно групи ХО відповідно на 75 і 155 % ($p^{ХО} < 0,001$), вміст L-аргініну при цьому практично не змінився ($p^{ХО} < 0,001$).

Введення тваринам із церебральною ішемією ронколейкіну вже на 4-ту добу досліджу призвело до зниження в тканині головного мозку на 30 % відносно контрольних тварин активності індуцибельної та мітохондріальної NOS ($p^{КП} < 0,05$), яка в періоді відновлення досягла рівня групи ХО ($p^{КП} < 0,01$). Відповідно в періоді відновлення відзначена стабілізація вмісту NO (за рівнем нітритів) ($p^{КП} < 0,01$) і L-аргініну ($p^{КП} < 0,001$).

Відкриття пор відбувається за рахунок окиснення або нітрозилування тіольних груп

цистеїн-залежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій (АТФ/АДФ-антипортер), що перетворює його на проникний неспецифічний канал-пору. Пригнічення мітохондріального дихання призводить до падіння заряду мітохондрій, що може ініціювати ушкодження внутрішньої мембрани мітохондрій і відкриття неселективної пори (permeability transition pore — PTP) і в подальшому загибель клітини. Є дані про пряму активацію відкриття гігантської пори оксидом азоту, що приводить до виходу цитохрому С, запуску каспазного каскаду, експресії та виходу в цитозоль проапоптичних білків [13].

У експерименті досліджували показник потенціалу, що генерується на внутрішній мітохондріальній мембрані, у присутності сафроніну-О як потенціал-залежного зонда. Утворення неселективної пори мітохондрій визначали за зниженням мембранного потенціалу заряду мітохондрій (МПЗМ). Цей показник у групі КП значно знизився — у гострому постішемичному періоді на 70 % ($p^{ХО} < 0,001$) і на 18-ту добу на 80 % ($p^{ХО} < 0,001$). Уведення тваринам із цереб-

ральною ішемією ронколейкіну стабілізувало деполяризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани та мембранний потенціал заряду мітохондрій — уже на 4-ту добу він досяг 60 % від рівня ХО тварин ($p^{КП} < 0,05$), у відновлювальному періоді — 66 % ($p^{КП} < 0,01$) (рис. 2).

Дисфункція мітохондріального апарату виражається в послідовних фазних змінах активності мітохондріальних ферментних комплексів і призводить до пригнічення аеробного синтезу енергії, енергозалежних функцій і метаболізму клітин, тобто до розвитку біоенергетичної гіпоксії.

При церебральній ішемії мітохондріальна дисфункція розвивається внаслідок ушкоджуючої дії як самого NO, так і його дериватів. Надлишок NO нітрозилує і тим самим інгібує білки-ферменти дихального ланцюга мітохондрій і циклу Кребса, що веде до зниження синтезу АТФ. Ушкодження ДНК активує ядерний фермент полі(АДФ-рибозо)полімеразу (PARP). Масивна активація PARP призводить до АДФ-рибозилування та виснаження запасів НАД. У спробі ресинтезу НАД виснажується АТФ.

При ішемії пероксинітрид необоротно пригнічує мітохонд-

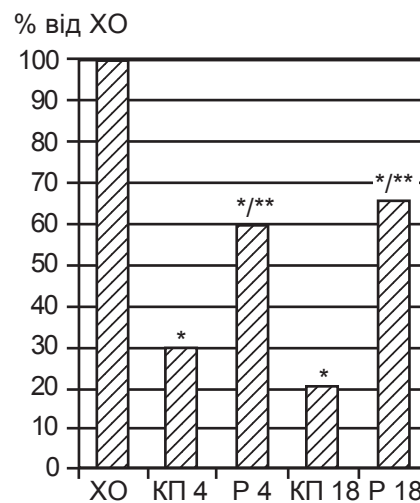


Рис. 2. Показник мембранного потенціалу заряду мітохондрій у мозку щурів із церебральною ішемією



риальне дихання, безпосередньо взаємодіючи із залізом активних центрів ключових ензимів, а також нітрозуючи за S-, N-, O-елементами тіольні, фенольні, гідроксильні й аміногрупи білкової частини цих ензимів, при більш значному прояві нітрозуючого стресу окиснює їх необоротно [14].

В умовах порушення генерації енергії в клітині, що спричинене дисфункцією мітохондрій, втрата НАД і АТФ призводить до загибелі клітин шляхом некрозу або апоптозу.

Для поглибленого аналізу стану енергозабезпечення провели вивчення додаткових параметрів енергообміну (рис. 3). Показники енергетичного заряду в групі КП на 4-ту та 18-ту добу були знижені відносно групи ХО на 20–15 % ($p^{ХО} < 0,05$), що відображає значне зниження ступеня заповнення системи АТФ-АДФ-АМФ високоенергетичними зв'язками. На тлі застосування ронколейкіну відзначено зростання показника ЕЗ до рівня ХО ($p^{КП} < 0,01$).

У гострому та відновлювальному періодах церебральної ішемії в групі КП був знижений також показник енергетичного потенціалу на 70 % ($p^{ХО} < 0,001$), що свідчить про різке зниження активності дихального ланцюга мітохондрій і корелює зі змінами вмісту аденілових нуклеотидів. Уведення тваринам із церебральною ішемією ронколейкіну привело до стабілізації мітохондріальних порушень і показника ЕЗ, особливо в періоді відновлення ($p^{КП} < 0,001$).

Аналогічні зміни відзначено стосовно показника ІФ (рис. 4). У групі КП він був знижений у різні терміни спостереження на 75–60 % ($p^{ХО} < 0,001$), що відображає дисбаланс співвідношення між АТФ і пулом АДФ-АМФ. У тварин із патологією, яким вводили ронколейкін, показник ІФ на 18-ту добу досяг рівня ХО, що підтверджує нормалізацію співвідно-

% від ХО

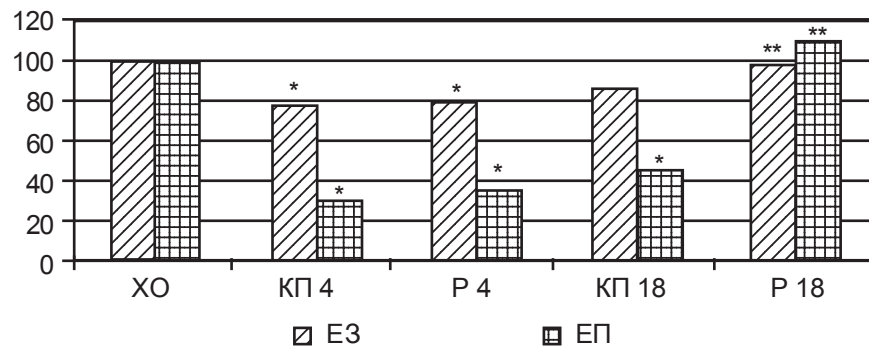


Рис. 3. Показники енергетичного заряду й енергетичного потенціалу в мозку щурів із церебральною ішемією

% від ХО

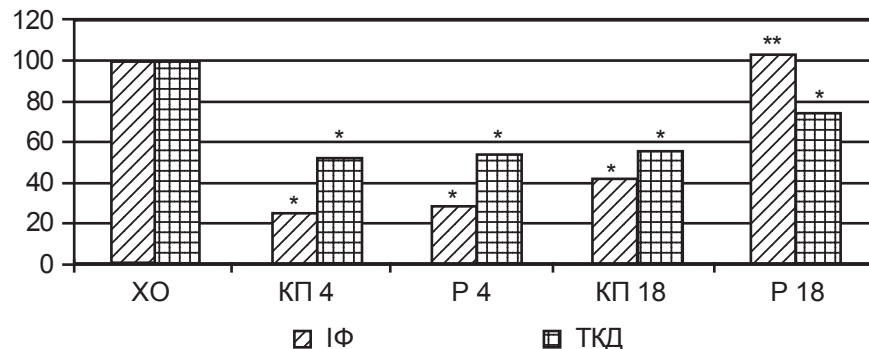


Рис. 4. Показники індексу фосфорилювання та термодинамічного контролю в мозку щурів із церебральною ішемією

шення окремих макроергічних фосфатів.

Також у групі КП був знижений показник ТКД майже вдвічі протягом усього періоду дослідження ($p^{ХО} < 0,001$), що відображає залежність активності дихального ланцюга мітохондрій від інтенсивності фосфорилювання в цілому. При введенні ронколейкіну показник ТКД збільшився на 18-ту добу до 76 % відносно рівня ХО ($p^{КП} < 0,01$).

Таким чином, на тлі застосування ронколейкіну стабілізувалися усі вивчені додаткові показники енергозабезпечення.

Зміни в пулі макроергів передумовлюють зміни інших функціонально-метаболических показників життєдіяльності клітини. У період стадії енергетичних порушень відбувається збільшення проникності мембран і активація вільнорадикальних процесів, у тому числі посилення процесів пе-

рекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та ОМБ, а також гіперпродукція оксиду азоту. Ушкодження надлишковими рівнями NO й активними радикалами кисню мембрани мітохондрій також посилює відкриття пор і вивільнення апоптогенних білків із ушкоджених мітохондрій. Проапоптичний ефект оксиду азоту виражається також у індукованому ним підвищенні експресії апоптогенних білків Вах. В умовах дефіциту кисню при ІшІ енергетичний дефіцит і надлишок NO активують термінові регуляторні компенсаторні механізми, індуюють експресію генів раннього реагування — переважно JunD і c-Fos [15].

В експерименті відзначено зниження рівня білка c-Fos (c-Fos-позитивних клітин) більше ніж удвічі на 4-ту добу дослідження, що відображає перевагу некротичних процесів постішемичної загибелі клітин над проце-

сами апоптозу в гострому періоді (рис. 5). У подальшому співвідношення загибелі клітин шляхом некрозу й апоптозу змінилося на користь програмованої загибелі, більш виражено у тварин з патологією, які отримували ронколейкін, що свідчить про оптимізацію у відновлювальному періоді репаративних процесів і мінімізацію постінсультних наслідків.

Каскад молекулярних і біохімічних патологічних змін при гострій церебральній ішемії формується у чіткій послідовності та має певні часові межі. Для ефективного лікування ІІІ необхідно застосовувати нейропротективні препарати, які переривають ланцюг постішемичного патогенезу на більш ранніх етапах.

Отримані в проведеному дослідженні результати підтверджують, що розвиток церебральної ішемії в експериментальних тварин супроводжувався значною активізацією системи оксиду азоту та її агресивним впливом на функціональний стан мітохондрій із формуванням мітохондріальної дисфункції, дисбалансу показників енергозабезпечення та загибелі нейронів. Застосування ронколейкіну дозою 0,01 мг/кг вірогідно блокує прояви агресивного впливу нітрозуючого стресу при церебральній ішемії — знижує ак-

тивність NO-синтази та рівні метаболітів NO на тлі корекції рівнів L-аргініну, що приводить до стабілізації функціонального стану мембран мітохондрій, нормалізації процесів енергозабезпечення клітин та оптимізації апоптотичних і репаративних процесів. Отже, ронколейкін має значний антиоксидантний та енергомобілізуючий ефекти, що дозволяє розглядати його як перспективний церебропротектор із комплексною патогенетичною дією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase / H. Kleinert, P. Schwarz, U. Forstermann // *Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 384, N 10/11. – P. 1343–1364.
2. Dysfunctional regulations of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene / A. Kojda, Y. C. Cheng, J. Burchfield, D. G. Harrison // *Circulation.* – 2001. – N 103. – P. 2839–2844.
3. Завалишин И. А. Гибель нейрона — кардинальная проблема неврологии и психиатрии / И. А. Завалишин, М. Н. Захарова // *Вестник Российской АМН.* – 2000. – № 2. – С. 28–33.
4. Защищающие и повреждающие эффекты периодической гипоксии: роль оксида азота / Е. Б. Манухина, Х. Ф. Дауни, Р. Т. Маллет [и др.] // *Вестник Российской АМН.* – 2007. – № 2. – С. 27–33.
5. Беридзе М. З. Механизмы отсроченной гибели нейронов при острой церебральной ишемии в эксперименте / М. З. Беридзе, И. Т. Урушадзе, Р. Р. Шакаришвили // *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Инсульт (приложение).* – 2001. – № 3. – С. 35–40.
6. Жданов Г. Н. Изучение содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных в остром периоде ишемического инсульта / Г. Н. Жданов, М. М. Герасимова // *Цитокины и воспаление.* – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 27–30.
7. Reduced IL-2 but elevated IL-4, IL-6, and IgE serum levels in patients with cerebral infarction during the acute stage / H. M. Kim, H. Y. Shin, H. J. Jeong [et al.] // *J. Mol. Neurosci.* – 2000. – Vol. 14 (3). – P. 191–196.
8. Козлов В. К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии / В. К. Козлов. – К. : АННА-Т, 2007. – 296 с.

9. Мейлер Д. Биохимия : в 3 т. / Д. Мейлер ; пер. с англ. – М. : Мир, 1980. – Т. 2. Химические реакции в живой клетке. – 606 с.

10. Фактор транскрипции HIF-1 α , белки срочного ответа и резистентность мембранных структур в динамике после острой гипоксии / Т. Г. Сазонтова, А. Г. Жукова, Н. А. Анчишкина [и др.] // *Вестник Российской АМН.* – 2007. – № 2. – С. 17–25.

11. Dhar-Masareno M. Hypoxia-reoxygenation — induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells / M. Dhar-Masareno, J. M. Sacramo // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38, N 10. – P. 1548–1554.

12. Основні шляхи утворення активних форм кисню в нормі та при ішемічних патологіях (Огляд літератури) / Ю. І. Губський, І. Ф. Беленічев, С. І. Коваленко [та ін.] // *Современные проблемы токсикологии.* – 2004. – № 2. – С. 8–15.

13. Митохондриальна дисфункція при церебральній патології. Нейропротекція цереброкурином / И. Ф. Беленічев, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов [и др.] // *Международный неврологический журнал.* – 2008. – № 4 (20). – С. 23–29.

14. Скворцова В. И. Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и новые терапевтические стратегии / В. И. Скворцова // *Инсульт.* – 2003. – № 9. – С. 20–22.

15. Лю Б. Н. Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма / Б. Н. Лю // *Успехи современной биологии.* – 2001. – Т. 121, № 5. – С. 488–501.

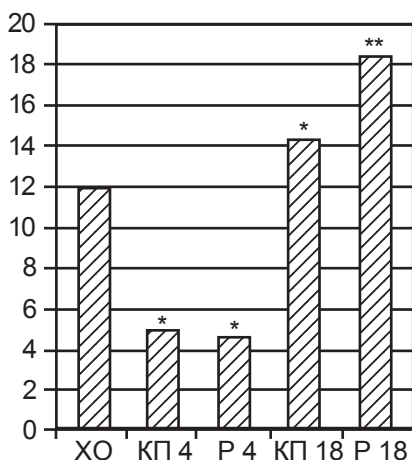


Рис. 5. Вміст c-Fos-позитивних клітин в 1 мм² у мозку щурів із церебральною ішемією

