

## Синергізм фармакологічного ефекту гліцину та тіотріазоліну

I. Ф. Беленічев<sup>A,E,F</sup>, А. А. Єгоров<sup>\*B,C,D</sup>

Запорізький державний медичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

### Ключові слова:

гліцин, тіотріазолін, мітохондріальна дисфункція, гостре порушення мозкового кровообігу.

Патологія. 2021.  
Т. 18, № 1(51).  
С. 26-32

\*E-mail:  
datas999@gmail.com

**Мета роботи** – встановити вплив комбінації гліцину з тіотріазоліном (4:1) на показники енергопродукції мітохондрій головного мозку щурів в умовах моделювання гострого порушення мозкового кровообігу.

**Матеріали та методи.** Експериментальна частина виконана на 90 щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г. Для моделювання гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) за ішемічним типом використовували класичну модель, що полягає в одночасному перев'язуванні загальних сонних артерій. Усіх тварин поділили на 5 експериментальних груп: перша – інтактна (несправжньо прооперовані щури, яким під час наркозу відсепарували загальні сонні артерії, не перев'язуючи їх); друга – щури з ГПМК (контроль); третя – щури з ГПМК, які кожного дня протягом 4 днів отримували внутрішньошлунково гліцин у дозі 200 мг/кг як таблеткову масу; четверта – щури з ГПМК, які щодня протягом 4 днів внутрішньошлунково отримували комбінацію гліцину з тіотріазоліном (4:1) як таблеткову масу; п'ята – щури з ГПМК, які щодня отримували пірацетам внутрішньошлунково в дозі 500 мг/кг як таблеткову масу. Біологічний матеріал (головний мозок) для досліджень брали на четверту добу експерименту за стандартною методикою.

Методом диференціального центрифугування в рефрижераторній центрифугі виділяли мітохондріальну фракцію. Явища мітохондріальної дисфункції вивчали спектрофотометрично за ступенем відкриття мітохондріальної пори (МП) і мітохондріального трансмембранного потенціалу ( $\Psi$ ). Інтенсивність оксидативного стресу оцінювали спектрофотометрично маркерами окислювальної модифікації білка – альдегідфенілгідрозон (АФГ) і кетонднітрофенілгідрозон (КФГ). Стан енергетичного обміну визначали за рівнем найбільш значущих інтермедіатів: АТФ, лактату, сукцинату, малату, за активністю сукцинатдегідрогенази (СДГ) та НАД<sup>+</sup>-залежної малатдегідрогенази (НАД-МДГ) за стандартними методиками на спектрофотометрі.

**Результати.** У групі тварин із моделюванням ГПМК виявили зниження рівня АТФ у мітохондріях в 1,55 раза, збільшення вмісту лактату в 1,1 раза, зниження активності СДГ у мітохондріях у 3,8 раза, зменшення концентрації сукцинату в 1,1 раза щодо показників інтактної групи. Введення піддослідним тваринам комбінації гліцину з тіотріазоліном на четверту добу моделювання ГПМК призводило до зменшення відкриття мітохондріальної пори в 1,9 раза, збільшення заряду внутрішньої мембрани мітохондрій у 1,2 раза, збільшення АТФ у мітохондріальній фракції в 1,1 раза, зростання активності СДГ у тричі, активності НАД-МДГ у 3,7 раза на тлі зменшення рівня АФГ на 76,6 % і КФГ на 80,7 % щодо показників групи тварин із моделюванням ГПМК за ішемічним типом.

**Висновки.** Моделювання ГПМК призводить до ініціювання оксидативного стресу та розвитку дисбалансу інтермедіатів енергетичного обміну в мітохондріях головного мозку експериментальних тварин. Введення комбінації гліцину з тіотріазоліном призводить до зниження оксидативного ушкодження мітохондрій, підвищує продукцію АТФ унаслідок активації компенсаторних мітохондріально-цитозольних шунтів, насамперед у малат-аспартатному та сукцинатоксидазному. За ступенем впливу на показники енергетичного обміну комбінація гліцину з тіотріазоліном вірогідно перевершує аналогічну дію і гліцину, і референс-препарату пірацетаму.

### Key words:

glycine, thiothiazoline, mitochondrial dysfunction, cerebrovascular accident.

Pathologia  
2021; 18 (1), 26-32

## Synergism of the pharmacological effect of glycine and thiothiazoline

I. F. Bielenichev, A. A. Yehorov

**Aim.** To establish the effect of the glycine and thiothiazoline (4:1) combination on the parameters of the energy production of the mitochondria of the rat brain under the conditions of simulating an acute cerebrovascular accident.

**Materials and methods.** The experimental part was performed on 90 male Wistar rats weighing 180–200 g. To model acute cerebrovascular accident (ACVA) by ischemic type, a classical model was used, where common carotid arteries had been ligated bilaterally. All animals were divided into 5 experimental groups: the first – intact (sham-operated rats, which during anesthesia had their common carotid arteries separated without ligation); the second – rats with ACVA (control); the third – rats with ACVA, which underwent intragastric administration of glycine at a dose of 200 mg/kg in the form of a tablet mass every day for 4 days; the fourth – rats with stroke, which every day for 4 days underwent intragastric administration of a combination of glycine and thiothiazoline (4:1) in the form of a tablet mass; the fifth – rats with ACVA, which underwent every day intragastric administration of piracetam in the form of a tablet mass at a dose of 500 mg/kg. The sampling of biological material (brain) for research was carried out on the fourth day of the experiment according to the standard method. The mitochondrial fraction was isolated by differential centrifugation in a refrigerated centrifuge. The manifestations of mitochondrial dysfunction, have been spectrophotometrically studied according to the degree of opening of the mitochondrial pore (MP) and mitochondrial transmembrane potential ( $\Psi$ ). The assessment of the intensity of oxidative stress was determined by the markers of protein oxidative modification – aldehydephenylhydrazone (APH) and ketonedinitrophenylhydrazone (KPH) – spectrophotometrically. The state of energy metabolism was determined by the level of the most significant intermediates – ATP, lactate, succinate and malate.

**Results.** In the group of animals with ACVA modeling, we noted a decrease in the level of ATP in mitochondria by 1.55 times, an increase in lactate content by 1.1 times, a decrease in SDH activity by 3.8 times and a decrease in succinate concentration by 1.1 times relative to the corresponding data of intact groups. Administration of a combination of glycine and thiotriazoline to experimental animals on the fourth day of ACVA modeling led to a 1.9-fold decrease in the opening of the mitochondrial pore and an increase in the charge of the inner mitochondrial membrane by 1.2 times, an increase in ATP in the mitochondrial fraction by 1.1 times, an increase in SDH activity by 3 times, and the activity of NAD-MDH – by 3.7 times, against the background of a decrease in the level of APH by 76.6 % and KPH by 80.7 %, relative to the group of animals with modeling of stroke by ischemic type.

**Conclusions.** Modeling of ACVA leads to the initiation of oxidative stress and the development of an imbalance of energy metabolism intermediates in the brain mitochondria of experimental animals. Administration of a combination of glycine and thiotriazoline leads to a decrease in oxidative damage to mitochondria, increases the production of ATP due to the activation of compensatory mitochondrial-cytosolic shunts, mainly in malate-aspartate and succinate oxidase. In terms of the degree of influence on the indicators of energy metabolism, the combination of glycine and thiotriazoline reliably exceeds the similar actions of glycine and the reference drug – piracetam.

## Синергизм фармакологического эффекта глицина и тиотриазолина

И. Ф. Беленичев, А. А. Егоров

**Цель работы** – установить влияние комбинации глицина с тиотриазолином (4:1) на показатели энергопродукции митохондрий головного мозга крыс в условиях моделирования острого нарушения мозгового кровообращения.

**Материалы и методы.** Экспериментальная часть выполнена на 90 крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г. Для моделирования острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) по ишемическому типу использовали классическую модель, которая заключается в двухсторонней перевязке общих сонных артерий. Животных поделили на 5 экспериментальных групп: первая – интактная (ложнооперированные крысы, которым во время наркоза отсекали общие сонные артерии, не перевязывая их); вторая – крысы с ОНМК (контроль); третья – крысы с ОНМК, которым каждый день в течение 4 суток вводили внутривенно глицин в дозе 200 мг/кг в виде таблеточной массы; четвертая – крысы с ОНМК, которым каждый день в течение 4 суток внутривенно вводили комбинацию глицина с тиотриазолином (4:1) в виде таблеточной массы; пятая – крысы с ОНМК, которым каждый день вводили пирацетам внутривенно в дозе 500 мг/кг в виде таблеточной массы. Забор биологического материала (головной мозг) для исследований проводили на четвертые сутки эксперимента по стандартной методике.

Методом дифференциального центрифугирования в рефрижераторной центрифуге выделяли митохондриальную фракцию. Проявления митохондриальной дисфункции спектрофотометрически изучали по степени открытия митохондриальной поры (МП) и митохондриального трансмембранного потенциала (Ψ). Интенсивность оксидативного стресса оценивали спектрофотометрически маркерами окислительной модификации белка – альдегидфенилгидразон (АФГ) и кетондинитрофенилгидразон (КФГ). Состояние энергетического обмена определяли по уровню наиболее значимых интермедиатов: АТФ, лактата, сукцината, малата, по активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и НАД<sup>+</sup>-зависимой малатдегидрогеназы (НАД<sup>+</sup>-МДГ) по стандартным методикам на спектрофотометре.

**Результаты.** В группе животных с моделированием ОНМК отмечено снижение уровня АТФ в митохондриях в 1,55 раза, увеличение содержания лактата в 1,1 раза, снижение активности СДГ в 3,8 раза и уменьшение концентрации сукцината в 1,1 раза относительно данных интактной группы. Введение подопытным животным комбинации глицина с тиотриазолином на четвертые сутки моделирования ОНМК приводило к уменьшению открытия митохондриальной поры в 1,9 раза и увеличению заряда внутренней мембраны митохондрий в 1,2 раза, увеличению АТФ в митохондриальной фракции в 1,1 раза, росту активности СДГ в 3 раза, активности НАД<sup>+</sup>-МДГ в 3,7 раза на фоне уменьшения уровня АФГ на 76,6 % и КФГ на 80,7 % относительно группы животных с моделированием ОНМК по ишемическому типу.

**Выводы.** Моделирование ОНМК приводит к иницированию оксидативного стресса и развитию дисбаланса интермедиатов энергетического обмена в митохондриях головного мозга экспериментальных животных. Введение комбинации глицина с тиотриазолином приводит к снижению оксидативного повреждения митохондрий, повышает продукцию АТФ за счет активации компенсаторных митохондриально-цитозольных шунтов, в основном в малат-аспартатном и сукцинатоксидазном. По степени влияния на показатели энергетического обмена комбинация глицина с тиотриазолином достоверно превосходит аналогичные действия глицина и референс-препарата – пирацетама.

**Ключевые слова:**  
глицин,  
тиотриазолин,  
митохондриальная  
дисфункция,  
острое нарушение  
мозгового  
кровообращения.

**Патология. 2021.**  
**Т. 18, № 1(51).**  
**С. 26-32**

Незважаючи на певні успіхи в діагностиці та лікуванні судинних захворювань головного мозку, ця проблема не втрачає актуальності. Її важливість зумовлена поширеністю, частотою інвалідації та летальності. За даними ВООЗ, в економічно розвинених країнах летальність від інсульту посідає друге місце у структурі загальної смертності та є провідною серед усіх причин інвалідації. У країнах СНД показники інвалідації та смертності залишаються одними з найвищих у світі [1,2].

Сучасний стан вивчення молекулярно-біохімічних механізмів загибелі нейрона при гострому порушенні

мозгового кровообігу (ГПМК) формує завдання перед сучасною нейрофармакологією, що полягає в розробленні нових підходів до створення лікарських засобів для нейропротекції [3].

Процеси нейродеструкції, що включають патобіохімічні та молекулярні каскади, характеризуються порушенням енергетичного метаболізму, розвитком трансмітерного аутокоїдозу, формуванням стійкої митохондриальної дисфункції, що супроводжується гіперпродукцією активних форм кисню та NO, експресією проапоптотичних білків і загибеллю клітини за типом апоптозу або некрозу [4].

Нейропротективна терапія передбачає два основних напрямки. Первинна нейропротекція спрямована на переривання швидких механізмів некротичної загибелі нейронів шляхом усунення ексайтотоксичності шляхом зниження активності ерготропних систем мозку – NMDA-, AMPA-трансмітерних, гальмування кальцієвих трансмембранних потоків [5]. Вторинна нейропротекція спрямована на гальмування відстрочених механізмів загибелі нейронів і зменшення віддалених наслідків ішемії [3].

Перспективний напрям первинної нейропротекції – застосування коагоніста NMDA гліцину та його комбінацій із гамма-аміномасляною кислотою (ГАМК) та іонами магнію в гострий період ГПМК. Гліцин і його комбінації знижують загибель нейронів сенсомоторної кори, гальмують нейроапоптоз, нормалізують ГАМК-ергічну систему в гострий період експериментального ГПМК [6].

Роботами останніх років встановлено властивості тіотриазоліну потенціювати ноотропну, анксиолітичну, протиішемічну, нейропротективну дії пірацетаму, триптофану, ГАМК та гліцину [3]. В умовах експерименту виявили: оптимальним співвідношенням гліцину і тіотриазоліну є 4:1, що здатне зменшувати ішемічні порушення головного мозку, нормалізувати ГАМК-ергічну систему, підвищувати енергетичний потенціал нейронів [7]. Але немає чіткої картини енерготропного механізму дії гліцину в комбінації з тіотриазоліном, що і зумовлює актуальність цього дослідження.

## Мета роботи

Встановити вплив комбінації гліцину з тіотриазоліном (4:1) на показники енергопродукції мітохондрій головного мозку щурів в умовах експериментального порушення мозкового кровообігу.

## Матеріали і методи дослідження

Експериментальна частина виконана на 90 щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г. Для моделювання ГПМК за ішемічним типом використовували класичну модель, що полягає в одночасному перев'язуванні загальних сонних артерій. Операцію здійснили під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг/кг). Через розріз на шиї знаходили та відсепарували праву та ліву сонні артерії, підводили під них лігатури та перев'язували.

Усіх тварин поділили на 5 експериментальних груп: перша – інтактна (несправжньо прооперовані щури, яким під час наркозу відсепарували загальні сонні артерії, не перев'язуючи їх); друга – щури з ГПМК (контроль); третя – щури з ГПМК, які кожного дня протягом 4 діб отримували внутрішньошлунково гліцин у дозі 200 мг/кг як таблеткову масу (таблетки Гліцисед, «Артеріум», Україна); четверта – щури з ГПМК, які щодня протягом 4 діб внутрішньошлунково отримували комбінацію гліцину з тіотриазоліном (4:1) у дозі 200 мг/кг як таблеткову масу (НПО «Фарматрон», Україна); п'ята – щури з ГПМК, які кожного дня отримували пірацетам внутрішньошлунково в дозі 500 мг/кг як таблеткову масу (таблетки Пірацетам, «Артеріум»,

Україна). Усі препарати вводили одноразово щодня, починаючи з виходу щурів із наркозу.

Біологічний матеріал (головний мозок) для досліджень брали на четверту добу експерименту. Евтаназію тварин виконували шляхом декапітації під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг/кг). З головного мозку швидко видаляли кров, відокремлювали від мозкової оболонки, шматочки подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану й гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища при 2 °С, що містить (у ммоль): сахарози – 250, трис-НСІ-буфера – 20, ЕДТА – 1 (рН 7,4) [8]. Методом диференціального центрифугування (+4 °С) на рефрижераторній центрифугі Sigma 3-30k (ФРН) виділяли мітохондріальну фракцію при 17000 g. Для тривалого зберігання мітохондрії заморожували при -80 °С. Для визначення швидкості відкриття мітохондріальної пори використовували суспензію 0,5–1,0 мг білка/мл.

Для встановлення можливості препаратів впливати на явища мітохондріальної дисфункції спектрофотометрично вивчили ступінь відкриття мітохондріальної пори (МП) і мітохондріальний трансмембранний потенціал ( $\Psi$ ) із сафроніном O [8]. Інтенсивність окислятивного стресу оцінювали маркерами окислювальної модифікації білка – альдегідфенілгідразон (АФГ) і кетондинітрофенілгідрозон (КФГ) [8] на спектрофотометрі Libra S 32 PC. Стан енергетичного обміну визначали за рівнем найбільш значущих інтермедіатів: АТФ, лактату, сукцинату, малату, за активністю сукцинатдегідрогенази (СДГ) та НАД<sup>+</sup>-залежної малатдегідрогенази (НАД-МДГ) за стандартними методиками [8] на спектрофотометрі Libra S 32 PC.

Усі експериментальні дані опрацювали пакетом прикладних та статистичних програм Statistica ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J і Excel 7.0 (Microsoft Corp., США). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії та помилки середньої (m). Для виявлення вірогідності відмінностей результатів досліджень в експериментальних і контрольних групах щурів визначали коефіцієнт Стьюдента (t) для вибірки з нормальним законом розподілу даних, критерій Манна–Вітні (U) визначали для вибірки, дані якої не відповідали нормальному закону розподілу. Достовірними вважали відмінності, для яких  $p < 0,05$  [9].

## Результати

Біохімічні дослідження виявили у групі тварин із ГПМК порушення енергетичного метаболізму головного мозку й енергодефіцит. Так, на 4 добу експерименту спостерігали зниження рівня АТФ у мітохондріях у 1,55 раза (табл. 1). Результати, що отримали, відповідають загальноприйнятому уявленню про порушення енергопостачання головного мозку в умовах ішемічного ураження [10].

Біохімічні дослідження процесів енергопродукції в умовах ішемії головного мозку показали: на тлі зниження аеробного окислювання в мітохондріях і зменшення вмісту АТФ знижується співвідношення АТФ/АДФ+АМФ. Коли їхнє співвідношення низьке, активується гексокіназа, яка дає змогу швидко збільшити

**Таблиця 1.** Вплив комбінації гліцину з тіотриазололіном і референс-препаратів на показники енергетичного обміну в мітохондріальній фракції головного мозку щурів на четверту добу експериментального моделювання ГПМК ( $M \pm m$ )

Група тварин	Лактат, мкмоль/г тканини	НАД-МДГ, мкмоль/мг білка/хв.	СДГ, нмоль/мг білка/хв.	Малат, мкмоль/г тканини	Сукцинат, мкмоль/г тканини	АТФ, мкмоль/г тканини
Інтактна група, n = 10	1,40 ± 0,06	1,44 ± 0,05	5,80 ± 0,31	0,22 ± 0,01	12,1 ± 0,9	2,8 ± 0,11
Контроль, n = 7	2,90 ± 0,11	0,33 ± 0,02	1,20 ± 0,09	0,09 ± 0,01	5,8 ± 0,2	1,10 ± 0,01
ГПМК + комбінація гліцину з тіотриазололіном, n = 18	1,80 ± 0,17**	1,55 ± 0,06**	4,80 ± 0,22**	0,31 ± 0,02**	10,8 ± 0,8**	2,30 ± 0,11**
ГПМК + гліцин, n = 12	2,10 ± 0,09**	0,52 ± 0,02*	2,90 ± 0,08**	0,14 ± 0,01*	7,9 ± 0,4**	1,90 ± 0,12*
ГПМК + пірацетам, n = 10	3,40 ± 0,18	0,37 ± 0,03	1,50 ± 0,11*	0,10 ± 0,02	5,5 ± 0,3	1,80 ± 0,10*

\*: щодо контролю,  $p < 0,05$ ; #: щодо ГПМК + гліцин,  $p < 0,05$ ; ^: щодо ГПМК + пірацетам,  $p < 0,05$ .

пропускну здатність реакцій анаеробного гліколізу, що завершується утворенням тільки двох молекул АТФ і накопиченням лактату [5].

Під час нашого дослідження встановили значущу активацію аеробного гліколізу в головному мозку щурів із ГПМК, про що свідчить збільшення лактату в 1,1 раза. Але за даними, що наведені в таблиці 2, анаеробний гліколіз не здатний протягом часу та в певному обсязі забезпечувати енергетичні потреби головного мозку. Крім того, кінцевий продукт гліколізу – лактат – провокує внутрішньоклітинний ацидоз, який викликає денатурацію деяких білків, блокує активність генів, що лімітує адаптацію [3]. Отже, стійкість до гіпоксії формується шляхом перебудови енергетичних шляхів, що передбачає мобілізацію механізмів постачання протонів до окислювального фосфорилування й економного споживання кисню в умовах його дефіциту.

Вважають, що основним шляхом є сукцинат-оксидазний, і більшість компенсаторних процесів спрямовані на анаеробний синтез сукцинату [5]. Тому є гіпотеза, що найменш чутливою до розвитку ішемії головного мозку є система окислювання бурштинової кислоти [11]. Результати дослідження свідчать, що моделювання ГПМК призводило до зниження активності СДГ у мітохондріях головного мозку щурів у 3,8 раза та зменшення концентрації сукцинату в 1,1 раза (табл. 1).

Зафіксували зниження вмісту малату в 1,4 раза на тлі зменшення активності мітохондріальної НАД-МДГ у 3,4 раза (табл. 1), що свідчить про можливе гальмування малат-аспартатного механізму транспорту відновлених еквівалентів у мітохондрії та формування вторинної мітохондріальної дисфункції [5].

Серед причин розвитку мітохондріальної дисфункції при ГПМК розрізняють оксидативний стрес, порушення біосинтезу NO та продукцію його цитотоксичних дериватів, розвиток нітрозуючого стресу. Відомо, що основними проявами мітохондріальної дисфункції є зниження рівня АТФ у клітині, підвищення рівня лактату й зниження пірувату, активізація механізмів загибелі клітини і продукція мітохондріями активних форм кисню (АФК). Найбільше вивчено вплив порушень синтезу АТФ у мітохондріях на функціональну активність нейронів [15]. Під дією АФК, утворених мітохондріями, відбувається стимуляція відкриття мітохондріальних пор, експресія і вихід у цитозоль проапоптотичних білків. Відкриття пор відбувається внаслідок окислення цитотоксичними дериватами NO тіольної групи цистеїн-залежної ділянки білка внутріш-

**Таблиця 2.** Вплив комбінації гліцину з тіотриазололіном і референс-препаратів на відкриття мітохондріальної пори та мембранний потенціал мітохондрій у головному мозку щурів на 4 добу експериментального моделювання ГПМК ( $M \pm m$ )

Група тварин	Відкриття мітохондріальної пори, $\Delta E_{540\text{ нм}}$	Мембранний потенціал мітохондрій, $\Psi$
Інтактна група, n = 10	0,051 ± 0,001	53,1 ± 2,7
Контроль, n = 7	0,640 ± 0,024	17,4 ± 1,2
ГПМК + комбінація гліцину з тіотриазололіном, n = 18	0,220 ± 0,001**	38,8 ± 2,7**
ГПМК + гліцин, n = 12	0,520 ± 0,002**	26,9 ± 1,4*
ГПМК + пірацетам, n = 10	0,600 ± 0,011	22,8 ± 1,7*

\*: щодо контролю,  $p < 0,05$ ; #: щодо ГПМК + гліцин,  $p < 0,05$ ; ^: щодо ГПМК+пірацетам,  $p < 0,05$ .

**Таблиця 3.** Вплив комбінації гліцину з тіотриазололіном і референс-препаратів на вміст продуктів окислювальної модифікації білків мітохондріальної фракції головного мозку щурів на 4 добу експериментального моделювання ГПМК ( $M \pm m$ )

Група тварин	Мітохондріальна фракція	
	АФГ, у. о./г білка	КФГ, у. о./г білка
Інтактна група, n = 10	1,81 ± 0,08	0,55 ± 0,02
Контроль, n = 7	3,32 ± 0,21	1,12 ± 0,09
ГПМК + комбінація гліцину з тіотриазололіном, n = 18	1,88 ± 0,07**	0,62 ± 0,02**
ГПМК + гліцин, n = 12	2,78 ± 0,08*	0,83 ± 0,03**
ГПМК + пірацетам, n = 10	2,89 ± 0,11	1,10 ± 0,07

\*: щодо контролю,  $p < 0,05$ ; #: щодо ГПМК + гліцин,  $p < 0,05$ ; ^: щодо ГПМК + пірацетам,  $p < 0,05$ .

ньої мембрани мітохондрій (АТФ/АДФ-антипортер), що перетворює його в проникний неспецифічний канал-пору [12]. Утворені мітохондріями АФК також беруть участь у передачі внутрішньоклітинних сигналів рецепторів для ендотеліну, TGF- $\beta$ 1, PDGF, AT-II, FGF-2 тощо. АФК також здатні змінювати активність різних транскрипційних факторів, включаючи NF- $\kappa$ B, AP-1 і проапоптотичний білок p66Shc. Підвищення продукції АФК, впливаючи на названі внутрішньоклітинні сигнальні механізми, може спричиняти активізацію в нейроні запального процесу та розвиток гіпертрофічних і фіброзних змін [4].

Біохімічне дослідження головного мозку щурів із ГПМК дало змогу встановити особливості мітопротективної та протиішемічної дії комбінації гліцину з тіотриазололіном. Так, вміст АТФ у мітохондріальній фракції головного мозку щурів, які отримували комбінацію, вірогідно зростав у 1,1 раза, а вміст лактату зменшувався на 61 %, що свідчить про зниження активності малопродуктивного гліколізу (табл. 1). У групі тварин із ГПМК, які отримували комбінацію гліцину з тіотри-

золіном, вірогідно зростала активність СДГ утричі, а активність НАД-МДГ у 3,7 раза щодо групи контролю (табл. 1). Визначення вмісту рівня малату та сукцинату в мітохондріальній фракції головного мозку щурів, які отримували комбінацію гліцину з тіотріазоліном, на тлі моделювання ГПМК показало вірогідне збільшення рівня малату у 2,4 раза, рівня сукцинату на 86 % щодо групи контролю (табл. 1).

Результати свідчать про позитивну динаміку в головному мозку щурів із ГПМК, які отримували комбінацію гліцину з тіотріазоліном, що вказує на зниження проявів мітохондріальної дисфункції та активації компенсаторних цитозольно-мітохондріальних шунтів синтезу АТФ (найбільше – малат-аспартатного, внаслідок дії тіотріазоліну) та зменшення енергодефіциту. Призначення пірацетаму суттєво не впливало на стан аеробної продукції енергії. У групі тварин, що отримували пірацетам, синтез АТФ при церебральній ішемії відбувався шляхом активації гліколізу (підвищення лактату на 17 %). Гліцин підвищував продукцію АТФ унаслідок впливу на сукцинатоксидазний шлях (підвищення СДГ в 1,4 раза та сукцинату на 36 %) (табл. 1).

Курсове призначення щурам із ГПМК комбінації гліцину та тіотріазоліну призводило до зменшення проявів вторинної мітохондріальної дисфункції. Так, у тварин, які отримували цю комбінацію, спостерігали зменшення відкриття мітохондріальної пори в 1,9 раза, збільшення заряду внутрішньої мембрани мітохондрій в 1,2 раза порівняно з контрольною групою (табл. 2). За цими показниками лікарська комбінація вірогідно перевершує показники гліцину та пірацетаму.

Моделювання ГПМК призводило до ініціювання оксидативного стресу в мітохондріях головного мозку експериментальних тварин (табл. 3). Відомо, що активні форми кисню є головними руйнівними чинниками ексайтотоксичності при церебральній ішемії, що зумовлюють окислювальну модифікацію білкових структур рецепторів та іонних каналів, знижують заряд мембран мітохондрій і спричиняють формування мітохондріальної дисфункції [13]. Отримали дані, що АФК, взаємодіючи з цистеїн-залежними ділянками гігантської пори мітохондрій, призводять до її відкриття та формування стійкої мітохондріальної дисфункції, енергодефіциту й ініціації апоптозу [14]. Відомо, що найранішими об'єктивними маркерами оксидативного пошкодження мітохондрій є продукти окислювальної модифікації білків (ОМБ). Аналізуючи експериментальні дані, слід зазначити, що у щурів із ГПМК істотно (порівняно з інтактною групою) підвищується прооксидативний потенціал мітохондрій нейронів.

Вміст продуктів окислювальної модифікації білків (АФГ і КФГ) найбільше підвищується в мітохондріальній (на 83 % і 104 % відповідно) фракції головного мозку, що свідчить про вільнорадикальний механізм пошкодження мітохондрій при цій моделі ГПМК (табл. 3). Призначення тваринам із ГПМК комбінації гліцину з тіотріазоліном призводило до істотного гальмування реакцій оксидативного стресу в головному мозку, що виявлялося зниженням маркерів ОМБ у мітохондріальній фракції. Цей факт можна розглядати через призму мітопротекції, розцінюючи це як підтвер-

дження наявності в цієї комбінації антиоксидантної дії, що спрямована на неспецифічний захист мітохондрій. Введення гліцину та пірацетаму мало менш виразний антиоксидантний ефект.

## Обговорення

Аналізуючи результати біохімічних досліджень енергетичного метаболізму головного мозку при експериментальному моделюванні ГПМК та при застосуванні комбінації гліцину з тіотріазоліном, можна зробити висновок, що основним механізмом протиішемічної дії досліджуваної комбінації є її вплив на дисфункцію мітохондрій. На нашу думку, комбінація гліцину з тіотріазоліном завдяки зменшенню утворення АФК і вільних радикалів на SH-групах цистеїн-залежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій, імовірно, запобігає відкриттю мітохондріальної пори та зберігає функціональну активність мітохондрій; це надалі покращує енергетичний обмін головного мозку в умовах ішемії [16].

У попередніх дослідженнях отримали результати, що свідчать про наявність у комбінації гліцину з тіотріазоліном, на відміну від пірацетаму та інших ноотропів, властивостей знижувати летальність, імовірність неврологічних порушень, а також прискорювати відновлення мнестичних функцій у піддослідних тварин із ГПМК [6]. Раніше встановили, що фармакологічний ефект лікарської комбінації зумовлений взаємопотенціюючим впливом тіотріазоліну й гліцину на гіперзбудливість NMDA рецепторів (потенціювання Red/Oxi-механізму), а також на енергетичний метаболізм головного мозку (внаслідок посилення функціонування компенсаторних механізмів вироблення АТФ) [16].

## Висновки

1. Моделювання ГПМК у щурів призводить на четверту добу експерименту до пошкодження мітохондрій головного мозку в реакціях оксидативного стресу й зниження їхньої енергопродукції: дефіциту АТФ на тлі підвищення лактату, зниження сукцинату й малату, пригнічення активності НАД-залежної малатдегідрогенази і сукцинатдегідрогенази.

2. Введення тваринам із ГПМК протягом 4 діб комбінації гліцину з тіотріазоліном (4:1) внутрішньошлунково призводило до зниження оксидативного ушкодження мітохондрій (АФГ на 76,6 % і КФГ на 80,7 %) і гальмування формування мітохондріальної дисфункції (відкриття МП в 1,9 раза, мембранний потенціал мітохондрій  $\Psi$  в 1,2 раза).

3. Комбінація гліцину та тіотріазоліну підвищувала продукцію АТФ в ішемізованому мозку тварин в 1,1 раза внаслідок активації компенсаторних мітохондріально-цитозольних шунтів, насамперед у малат-аспартатному (підвищення малату в 2,44 раза та НАД-МДГ у 3,7 раза), а також у сукцинатоксидазному (підвищення СДГ утричі та сукцинату на 86,2 %).

4. За ступенем впливу на показники енергетичного обміну комбінація гліцину з тіотріазоліном вірогідно перевершує аналогічну дію і гліцину, і референс-препарату пірацетаму.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні нейропротективних властивостей комбінації гліцину з тіотриазоліном в умовах експериментального моделювання гострого порушення мозкового кровообігу.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 11.01.2021

Після доопрацювання / Revised: 09.02.2021

Прийнято до друку / Accepted: 15.02.2021

#### Відомості про авторів:

Беленичев І. Ф., д-р біол. наук, професор, зав. каф. фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медичний університет, Україна.  
Егоров А. А., канд. мед. наук, старший викладач каф. фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

#### Information about authors:

Bielenichev I. F., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Medical Formulation with the Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
Yehorov A. A., MD, PhD, Senior Lecturer of the Department of Pharmacology and Medical Formulation with the Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

#### Сведения об авторах:

Беленичев И. Ф., д-р биол. наук, профессор, зав. каф. фармакологии и медицинской рецептуры с курсом нормальной физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.  
Егоров А. А., канд. мед. наук, старший преподаватель каф. фармакологии и медицинской рецептуры с курсом нормальной физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

#### Список літератури

- [1] Strategies to Extend Thrombolytic Time Window for Ischemic Stroke Treatment: An Unmet Clinical Need / I. Peña, C. Borlongan, G. Shen, W. Davis *Journal of stroke*. 2017. Vol. 19, Iss. 1. P. 50-60. <https://doi.org/10.5853/jos.2016.01515>
- [2] Беленичев И. Ф., Литвиненко Е. С., Субачева Т. И. Маркеры окислительной модификации белка и нитрозирующего стресса при экспериментальном ишемическом инсульте и фармакологической модуляции системы глутатиона. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016. № 2. С. 30-36.
- [3] Место тиотриазолина в галерее современных метаболитотропных лекарственных средств / И. Ф. Беленичев, В. А. Визир, В. И. Мамчур, А. В. Курята. *Запорожский медицинский журнал*. 2019. Т. 21, № 1. С. 118-128. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2019.1.155856>
- [4] Тиол-дисульфидная система: роль в эндогенной цито- и органопротекции, пути фармакологической модуляции / И. Ф. Беленичев и др. Киев: ТОВ «Видавництво «Юстон», 2020. 232 с.
- [5] Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Е. А. Нагорная и др. Киев: Логос, 2015. 512 с.
- [6] Influence of the fixed combination of glycine with thiotriazoline on energy metabolism parameters in brain in conditions of experimental cerebral ischemia / L. Kucherenko, I. Belenichev, I. Mazur et al. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 2018. Vol. 42, Iss. 1. P. 14-21. <https://doi.org/10.1501/Eczfak-0000000598>
- [7] Пат. 114270 Україна, МПК А61К 31/198 (2006.01), А61К 31/41 (2006.01) А61Р 9/10 (2006.01). Комбінований лікарський засіб для первинної нейропротекції / Л. І. Кучеренко, О. В., Хромильова І. А. Мазур та ін. № а201612503; заявл. 08.12.2016; опубл. 10.05.2017, бюл. № 9.
- [8] Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції: методичні рекомендації / упоряд.: І. С. Чекман, І. Ф. Беленичев, О. О. Нагорна та ін. Київ, 2016. 93 с. <http://repo.knmu.edu.ua/handle/123456789/15026>

- [9] Голованова І. А., Белікова І. В., Ляхова Н. О. Основи медичної статистики. Полтава: Українська медична стоматологічна академія, 2017. 113 с.
- [10] Mitochondrial preconditioning: a potential neuroprotective strategy / S. C. Correia, C. Carvalho, S. Cardoso et al. *Frontiers in aging neuroscience*. 2010. Vol. 2. P. 138. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00138>
- [11] Состояние энергетического обмена при остром нарушении мозгового кровообращения и его модуляция производными L-лизина / А. А. Егоров, И. Ф. Беленичев, И. А. Мазур и др. *Патологія*. 2010. Т. 7, № 1. С. 38-42.
- [12] Беленичев И. Ф., Егоров А. А., Мазур И. А. Исследование влияния новой соли L-лизина на показатели окислительного стресса и развитие неврологического дефицита у животных с острым нарушением мозгового кровообращения. *Запорожский медицинский журнал*. 2009. Т. 11, № 6. С. 48-50.
- [13] The molecular and ultrastructural aspects of the formation of mitochondrial dysfunction in the modeling of chronic cerebral ischemia: the mitoprotective effects of angiolin / I. F. Belenichev, I. A. Mazur, L. I. Kucherenko et al. *Neurochemical Journal*. 2016. Vol. 10, Iss. 2. P. 131-136. <https://doi.org/10.1134/S1819712416010025>
- [14] Roles of Oxidative Stress, Apoptosis, PGC-1 $\alpha$  and Mitochondrial Biogenesis in Cerebral Ischemia. / S. D Chen, D. I Yang, T. K. Lin et al. *International journal of molecular sciences*. 2011. Vol. 12, Iss. 10. P. 7199-7215. <https://doi.org/10.3390/ijms12107199>
- [15] Тиол-дисульфидное равновесие – определяющий фактор резистентности нейронов к нитрозирующему стрессу в условиях ишемии мозга (обзор литературы) / Ю. М. Колесник, И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев и др. *Журнал НАМН України*. 2013. Т. 19, № 1. С. 3-11. URL: <http://dspace.zsmu.edu.ua/handle/123456789/708>
- [16] Горбачева С. В., Беленичев И. Ф. Экспериментальное обоснование диагностической значимости коэффициента нитротирозин/глутатион в клинической биохимии для оценки степени тяжести мозгового инсульта *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип. 1, т. 1. С. 157-161.

#### References

- [1] Peña, I. D., Borlongan, C., Shen, G., & Davis, W. (2017). Strategies to Extend Thrombolytic Time Window for Ischemic Stroke Treatment: An Unmet Clinical Need. *Journal of stroke*, 19(1), 50-60. <https://doi.org/10.5853/jos.2016.01515>
- [2] Belenichev, I. F., Lytyvnenko, E. S., & Subachova, T. I. (2016). Markery oksidativnoho modifikatsii belka i nitroziruyushchego stressa pri eksperimental'nom ishemicheskomo insul'te i farmakologicheskoi moduliyatsii systemy glutatiiona [Markers of oxidative modification of proteins and nitrosating stress in the experimental ischemic stroke and pharmacological modulation of glutathione system]. *Farmakolohiia ta likarska toksykolohiia*, (2), 30-36. [in Russian].
- [3] Bielenichev, I. F., Vizir, V. A., Mamchur, V. Yo., & Kuriata, O. V. (2019). Mesto tiotriazolina v galeree sovremennykh metabolitotropnykh lekarstvennykh sredstv [Place of thiotriazoline in the gallery of modern metabolitotropic medicines]. *Zaporozhye Medical Journal*, 21(1), 118-128. [in Russian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2019.1.155856>
- [4] Belenichev, I. F., Nagornaya, E. A., Gorbacheva, S. V., Gorchakova, N. A., & Bukhtiyarova, N. V. (2020). Tiol-disulfidnaya sistema: rol' v endogennoi tsito- i organoproteksii, puti farmakologicheskoi moduliyatsii [Thiol-disulfide system: role in endogenous cyto- and organoprotection, pathways of pharmacological modulation]. Kiev: TOV «Vidavnitstvo «Yuston». [in Russian].
- [5] Belenichev, I. F., Chernii, V. I., Nagornaya, E. A., Pavlov, S. V., Chernii, T. V., Gorchakova, N. A., Bukhtiyarova, N. V., Andronova, I. A., & Kucherenko, L. I. (2015). Neuroproteksiya i neuroplastichnost' [Neuroprotection and neuroplasticity]. Logos. [in Russian].
- [6] Kucherenko, L., Belenichev, I., Mazur, I., Khromylova, O., & Parniuk, N. (2018). Influence of the fixed combination of glycine with thiotriazoline on energy metabolism parameters in brain in conditions of experimental cerebral ischemia. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 42(1), 14-21. <https://doi.org/10.1501/Eczfak-0000000598>
- [7] Kucherenko, L. I., Khromylova, O. V., Mazur, I. A., Belenichev, I. F., & Horbacheva, S. V. (2017). Ukrainian Patent No. 114270. *Kombinovanyi likarskyi zasib dlia pervynnoi neuroproteksii* [Combination drug for primary neuroprotection]. [in Ukrainian].
- [8] Chekman, I. S., Belenichev, I. F., Nahorna, O. O., Horbacheva, N. O., Lukianchuk, V. D., Bukhtiyarova, N. V., Horbacheva, S. V., & Syrova, H. O. (2016). *Doklinichne vyvchennia spetsyifichnoi aktivnosti potentsiynykh likarskykh zasobiv pervynnoi ta vtornyynoi neuroproteksii*: metodichni rekomendatsii [Preclinical study of specific activity of potential drugs of primary and secondary neuroprotection: guidelines]. Kyiv. [in Ukrainian]. <http://repo.knmu.edu.ua/handle/123456789/15026>
- [9] Holovanova, I. A., Bielikova, I. V., & Liakhova, N. O. (2017). *Osnovy medychnoi statystyky* [Fundamentals of medical statistics]. Ukrainska medychna stomatolohichna akademiia. [in Ukrainian].

- [10] Correia, S. C., Carvalho, C., Cardoso, S., Santos, R. X., Santos, M. S., Oliveira, C. R., Perry, G., Zhu, X., Smith, M. A., & Moreira, P. I. (2010). Mitochondrial preconditioning: a potential neuroprotective strategy. *Frontiers in aging neuroscience*, 2, 138. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00138>
- [11] Egorov, A. A., Belenichev, I. F., Mazur, I. A., Abramov, A. V., & Kucherenko, L. I. (2010). Sostoyanie energeticheskogo obmena pri ostrom narushenii mozgovogo krovoobrashcheniya i ego modulyatsiya proizvodnymi L-lizina [State of energy metabolism in acute stroke and its modulation by L-lysine derivatives]. *Pathologia*, 7(1), 38-42. [in Russian].
- [12] Belenichev, I. F., Egorov, A. A., & Mazur, I. A. (2009). Issledovanie vliyaniya novoi soli L-lizina na pokazateli oksiditel'nogo stressa i razvitiye nevrologicheskogo defitsita u zhivotnykh s ostrym narusheniem mozgovogo krovoobrashcheniya [Investigation of the effect of a new salt of L-lysine on oxidative stress and the development of neurological deficits in animals with acute cerebrovascular accident]. *Zaporozhye medical journal*, 11(6), 48-50. [in Russian].
- [13] Belenichev, I. F., Mazur, I. A., Kucherenko, L. I., Nagornaya, E. A., Gorbacheva, S. V., & Bidnenko, A. S. (2016). The molecular and ultrastructural aspects of the formation of mitochondrial dysfunction in the modeling of chronic cerebral ischemia: The mitoprotective effects of Angiolin. *Neurochemical Journal*, 10(2), 131-136. <https://doi.org/10.1134/s1819712416010025>
- [14] Chen, S. D., Yang, D. I., Lin, T. K., Shaw, F. Z., Liou, C. W., & Chuang, Y. C. (2011). Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 $\alpha$  and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *International journal of molecular sciences*, 12(10), 7199-7215. <https://doi.org/10.3390/ijms12107199>
- [15] Kolesnik, Yu. M., Chekman, I. S., Belenichev, I. F., Gorbachyova, S. V., Gorchakova, N. A., & Bukhtiyarova, N. V. (2013). Tiol-disul'fidnoe ravновесie – opredelyayushchii faktor rezistentnosti neuronov k nitroziruyushchemu stressu v usloviyakh ishemii mozga (obzor literatury) [Thiol-disulfide balance – a determining factor of neurons' resistance to nitrosifying stress in conditions of cerebral ischemia (review of literature)]. *Zhurnal NAMN Ukrainy*, 19(1), 3-11. [in Russian].
- [16] Gorbacheva, S. V., & Belenichev, I. F. (2016). Eksperimental'noe obosnovanie diagnosticheskoi znachimosti koeffitsienta nitrotirozin/glutation v klinicheskoi biokhimii dlya otsenki stepeni tyazhesti mozgovogo insulta [Experimental justification of diagnostic significance of nitrotyrosine/glutathione coefficient in clinical biochemistry in order to give an estimation of cerebral stroke severity]. *Bulletin of problems biology and medicine*, 1(1), 157-161. [in Russian].