



ТИОЦЕТАМ В НЕВРОЛОГИЧЕСКОЙ, НЕЙРОХИРУРГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ, НЕОНАТОЛОГИИ, ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ И РЕАНИМАЦИИ

УДК: 615.31:547.792]:615.217.34

И.Ф. Беленичев, С.В. Павлов, Ю.М. Колесник, И.А. Мазур, Л.И. Кучеренко, А.В. Абрамов

НО-МОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОЦЕТАМА: ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ

*Запорожский государственный медицинский университет,**НПО «Фарматрон», г. Запорожье***Ключові слова:** *гостре порушення мозкового кровообігу, індукцйбельна NO-синтаза, нітрозуючий стрес, Тіоцетам.***Ключевые слова:** *острое нарушение мозгового кровообращения, индуцибельная NO-синтаза, нитрозирующий стресс, Тиоцетам.***Key words:** *acute stroke, inducible NO-synthase, nitrosative stress, Thiocetam.*

Моделювання гострого порушення мозкового кровообігу у *Meriones uncinatus* призводить до гіперекспресії індукцйбельної ізоформи NO-синтази, підвищенню концентрації основного маркера нітрозуючого стресу – нітротирозину у мітохондріях. Крім того, спостерігалось порушення морфофункціонального стану нейронів: збільшення кількості апоптично й деструктивно змінених клітин і зменшення в них концентрації РНК. Внутрішньоочеревинне курсове введення Тіоцетама (125 мг/кг) призводило до модуляції активності індукцйбельної NO-синтази мітохондрій, тим самим обмежуючи розвиток нітрозуючого стресу й мітохондріальної дисфункції. Нейропротективна дія Тіоцетама проявлялася зменшенням кількості деструктивно змінених клітин, а також підвищенням концентрації РНК.

Моделирование острого нарушения мозгового кровообращения у *Meriones uncinatus* приводило к гиперэкспрессии индуцибельной изоформы NO-синтазы, повышению концентрации основного маркера нитрозирующего стресса – нитротирозина в митохондриях. Кроме того, наблюдалось нарушение морфофункционального состояния нейронов: увеличение количества апоптически и деструктивно измененных клеток и падение в них концентрации РНК. Внутривентрикулярное курсовое введение Тиоцетама (125 мг/кг) приводило к модуляции активности индуцибельной NO-синтазы митохондрий, тем самым ограничивая развитие нитрозирующего стресса и митохондриальной дисфункции. Нейропротективное действие Тиоцетама проявлялось уменьшением количества деструктивно измененных клеток, а также повышением концентрации РНК.

Modelling of acute stroke in *Meriones uncinatus* led to hyperexpression of inducible NO-synthase and to increasing of concentration of the main marker of nitrosative stress - nitrotyrosine in mitochondria. Disorders of neurons morphofunctional state, such as increasing of apoptotic and destructively changed cells number and decreasing of RNA concentration in them, were observed. Intraperitoneal introduction of Thiocetam (125 mg/kg) modulated activity of inducible mitochondria NO-synthase, which limited progress of nitrosative stress and mitochondrial dysfunction. Neuroprotective action of Thiocetam was shown by reduction of destructively changed cells number, as well as increasing of RNA concentration.

Наметившаяся в середине XX в. тенденция изменения структуры заболеваемости в сторону снижения роли инфекционных и увеличения распространенности неинфекционных болезней в структуре общей заболеваемости и смертности населения, к концу столетия привела к существенному преобладанию последних. При этом, среди неинфекционных заболеваний, определяющих основные показатели средней продолжительности жизни, инвалидизации, смертности, нарушения мозгового кровообращения заняли одно из лидирующих мест [1,2].

В связи с широкой распространенностью, ростом показателей смертности и инвалидизации, весьма актуальной является проблема цереброваскулярных заболеваний.

Исследованиями последнего десятилетия установлено, что патогенез ишемического повреждения головного мозга состоит из следующих звеньев: митохондриальная дисфункция и энергетический дефицит, трансмиссивный аутооксидоз, глутаматная эксайтотоксичность, шоковое

открытие Са-каналов, повышенное образование АФК в «паразитарных» реакциях митохондрий, повышение активности NO-синтазы и гиперпродукция NO, с последующим развитием нитрозирующего стресса [3–5]. Изучение нитрозирующего стресса и его роли в повреждении мозга повысило интерес фармакологов к модуляторам системы NO. Особые надежды возлагаются на препараты со свойствами scavenger (ловушек) NO и его более агрессивных дериватов – пероксонитрита, нитрозония. К данным препаратам можно отнести тиольные антиоксиданты, а именно тиотриазолин. Такие препараты способны повышать биодоступность NO, связывая его цитотоксические дериваты. В связи с этим, интересным направлением в разработке новых препаратов-модуляторов системы NO является комбинация тиотриазолина с известными ноотропами и церебропротекторами [6,7]. Так, многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями продемонстрирована целесообразность сочетанного применения тиотриазолина и пирарцетама. По-



следующими исследованиями установлено, что широким спектром церебропротекторных и ноотропных эффектов обладает комбинация, состоящая из 50 мг тиотриазолина и 200 мг пирасетама. На ее основе разработан новый отечественный препарат – «Тиоцетам» [8–10]. Однако до конца механизмы действия данного лекарственного препарата не изучены, не выяснены его возможности влиять на систему оксида азота в условиях ишемического повреждения головного мозга.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение влияния Тиоцетама на индуцибельную NO-синтазу, содержание нитротирозина в митохондриях, выделенных из нейронов ишемизированной зоны головного мозга монгольских песчанок, а также на некоторые показатели морфофункционального состояния нейронов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нарушение мозгового кровообращения моделировали путем необратимой односторонней перевязки сонной артерии у монгольских песчанок (*Meriones unculatus*) массой 65–70 г, которые, по данным специальной литературы последних лет, наиболее часто используются для моделирования нарушения мозгового кровообращения, что обусловлено разьединением большого круга кровообращения, слабо развитой системой коллатерального кровообращения [11].

Все экспериментальные процедуры проводили согласно «Положению об использовании животных в биомедицинских исследованиях». Животных выводили из эксперимента под тиопентал-натриевым наркозом (40 мг/кг) внутривенно [11].

Тиоцетам (корпорация «Артериум», №UA/0693/01/01) вводили внутривенно в дозе 125 мг/кг в течение 4 дней после моделирования острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) [9].

На 4 сутки у экспериментальных животных забирали головной мозг. Выделенное ишемизированное полушарие головного мозга тщательно промывали охлажденным 0,9% раствором КС1 (4°C), измельчали и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды: сахарозы – 250 мМ; трис HCl-буфера – 20 мМ, ЭДТА – 1 мМ (рН 7,4). Для выделения митохондрий гомогенат центрифугировали 7 мин при 700 г, (4°C). Затем супернатант центрифугировали повторно 15 мин при 11000 g (4°C). Митохондрии суспендировали в небольшом объеме среды выделения, не содержащей ЭДТА, и хранили на льду [12].

Концентрацию iNOS в суспензии митохондрий определяли методом Вестерн-блот анализа. Белки разделяли в 10% полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли электроолюцией в течение 45 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в растворе TBST с 5% обезжиренным молоком в течение 1 ч. Затем Вестерн-блоты инкубировали в присутствии первичных моноклональных антител (Santa Cruz Biotechnology) против iNOS в разведении 1:1000 в течение 1 ч. После отмывки блоты инкубировали в присутствии вторичных антител (Santa Cruz Biotechnology), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1:2000) в течение 1 ч. Детекцию iNOS осуществляли при помощи

денситометрии в программе Adobe Photoshop [13].

Содержание нитротирозина в суспензии митохондрий определяли методом ELISA (производство Nu Cult biotechnology b.v., Голландия; № каталога НК501; серия 4513К19).

Для морфометрических исследований головной мозг фиксировали в 10% жидкости Буэна (24 ч) и по стандартной схеме заливали в парапласт, из которых готовили серийные фронтальные 5-микронные гистологические срезы в области постцентральной извилины (сомато-сенсорная кора). Для изучения морфофункционального состояния нейронов IV–V слоев коры гистологические срезы депарафинировали по стандартной методике и окрашивали галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону. Изображение коры мозга получали на микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия) и с помощью 8-битной CCD-камеры COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в компьютерную систему анализа изображений VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Морфометрический анализ клеток мозга осуществляли в автоматическом режиме с помощью макро-программы, разработанной в специализированной среде программирования VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Германия) [14]. Определяли следующие показатели: количество апоптотических и деструктивно измененных клеток; концентрацию РНК в нейронах (единицы оптической плотности, $E_{оп}$), которые рассчитывали как логарифм отношения оптической плотности тела клетки к оптической плотности межклеточного вещества.

Сравнение групп проводили при помощи критерия Mann-Whitney. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA for Windows 6.1 (StatSoft Inc., №AXXR712D833214SAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003» [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что моделирование ОНМК на 4 сутки приводило к гиперферментемии индуцибельной изоформы NO-синтазы митохондрий, о чем свидетельствовало повышение ее концентрации более чем на 62% по отношению к интакту (*табл. 1*). Повышение активности NO-синтазы приводило к развитию нитрозирующего стресса в митохондриях нейронов ишемизированного полушария. Так, на 4 сутки регистрировалось значительное увеличение концентрации основного маркера нитрозирующего стресса (нитротирозина) на 78% по отношению к интактной группе животных (*табл. 1*). Выявленное усиление экспрессии iNOS в митохондриях в ответ на ишемию, с последующим развитием нитрозирующего стресса, инициирует развитие митохондриальной дисфункции, которая приводит к нарушению обратного захвата медиаторов (катехоламинов, дофамина, серотонина); нарушению ионного транспорта, генерации и проведения импульса; нарушению синтеза белка *de novo*; нарушению процессов трансляции и транскрипции; активизируются «паразитарные» энергопродуцирующие реакции, что приводит к существенной убыли энергетических запасов нейрональной клетки [4,5]. Кроме того, под действием гидроксил-радикала происходит открытие митохондриальных пор, экспрессия и выход в ци-



Таблица 1
Влияние Тиоцетама на активность iNOS, концентрацию нитротирозина в митохондриях нейронов ишемизированного полшария Meriones unculatus с ОНМК на 4 сутки эксперимента

Группы животных	iNOS, усл. ед.	НТЗ, усл. ед./г/белка
Интакт	2,8±0,51	0,94±0,07
Контроль, ОНМК, 4 сутки	7,4±0,6*	4,3±0,12*
Тиоцетам (125 мг/кг)	3,4±0,38**	1,7±0,15**

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

тозоль проапоптических белков. Открытие пор происходит за счет окисления тиольных групп цистеин-зависимого участка белка внутренней мембраны митохондрий (АТФ/АДФ-антипортере), что превращает его в проницаемый неспецифический канал-пору. Открытие пор превращает митохондрии из «электростанций» в «топку» субстратов окисления без образования АТФ. В точных биохимических исследованиях установлено, что нарушение кислородного режима тканей, гиперпродукция эксайтотоксичных аминокислот, снижение «нормальной» аккумуляции Ca^{++} митохондриями, повреждение мембраны митохондрий АФК и открытие пор приводит к высвобождению апоптогенных белков из поврежденных митохондрий в цитозоль и дальнейшей индукции гибели нейрональных клеток [16].

Развитие нитрозирующего стресса и митохондриальной дисфункции приводило к нарушению морфофункционального состояния нейрональных клеток. Так, гистологическими исследованиями установлено, что на 4 сутки ОНМК в IV–V слоях коры увеличивалось количество апоптотически и деструктивно измененных нейронов на фоне резкого падения в них более чем на 65% концентрации РНК (табл. 2).

Таблица 2
Влияние Тиоцетама на некоторые морфофункциональные показатели нейронов IV–V слоя коры у Meriones unculatus с ОНМК на 4 сутки эксперимента

Группы животных	Количество апоптотических и деструктивно измен. нейронов, 1 мм ²	Конц. РНК, Е _{оп.}
Интакт	3,7±0,64	9,6±0,34
Контроль, ОНМК, 4 сутки	12,4±0,37*	5,8±0,18*
Тиоцетам (125 мг/кг)	6,4±0,38**	8,2±0,26**

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

Курсовое назначение Тиоцетама (125 мг/кг) приводило к уменьшению активности iNOS в митохондриях, о чем свидетельствовало достоверное снижение концентрации данной изоформы NO-синтазы. Кроме того, за счет способности модулировать активность iNOS, Тиоцетам ограничивал деструктивное действие нитрозирующего стресса, снижая концентрацию нитротирозина в митохондриях более чем на 60%, по отношению к контрольной группе животных.

Церебропротективное действие Тиоцетама в условиях ОНМК проявлялось достоверным снижением количества апоптотических и деструктивно измененных нейронов в IV–V слоях коры, а также повышением концентрации РНК на 30%, по отношению к контролю.

Таким образом, Тиоцетам, являясь эффективным тиоль-

ным скавенджером NO, проявляет выраженное нейропротективное действие в острый период церебральной ишемии, модулируя активность индуцибельной NO-синтазы митохондрий, тем самым ограничивая развитие нитрозирующего стресса и митохондриальной дисфункции. Механизм подобного нейропротективного действия Тиоцетама, по нашему мнению, объясняется его способностью ограничивать гиперэкспрессию индуцибельной NOS. Кроме того, за счет наличия в его химической структуре тиоацетата, Тиоцетам, конкурируя с SH-группами цистеинзависимых участков клеточных белков за пероксонитрит, образует с последними стойкие комплексы, что позволяет в некоторой степени ограничить нейротоксическое действие оксида азота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зозуля С. Гострі порушення мозкового кровообігу як критичні стани в невропатології / С. Зозуля, В.І. Боброва // Укр. неврологіч. журнал. – 2006. – №1. – С. 5–8.
2. Гусев Е.И. Проблема инсульта в России / Е.И. Гусев // Инсульт. – 2003. – №9. – С. 3–7.
3. Беленічев І.Ф. Антиоксидантна система захисту організму (огляд літератури) / І.Ф. Беленічев, Ю.І. Губський, Є.Л. Левицький // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – №3. – С. 24–31.
4. Рациональная нейропротекция / И.Ф. Беленічев, В.И. Черный, Ю.М. Колесник, С.В. Павлов. – Донецк: ИД Заславский, 2009. – 260 с.
5. Лю Б.Н. Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма / Б.Н. Лю // Успехи совр. биологии. – 2001. – Т. 121, №5. – С. 488–501.
6. Соловьев А.И. Фармакология и токсикология оксида азота: два лица одной и той же молекулы / А.И. Соловьев, А.В. Стефанов // Соврем. проблемы токсикологии. – 1998. – №1. – С. 35–38.
7. Vanin A.F. Evidence that intrinsic iron but not intrinsic copper determines S-nitrosocysteine decomposition in buffer solution / A.F. Vanin, B. Muller, J.L. Alencar [et al.] // Nitric Oxide. – 2002. – Vol. 7 (3). – P. 194–209.
8. Беленічев І.Ф. Антиоксиданти: сучасне уявлення, перспективи створення / І.Ф. Беленічев, С.І. Коваленко, В.В. Дунаєв // Ліки. – 2002. – №1. – С. 25–29.
9. Беленічев І.Ф. Дослідження церебропротективних властивостей деяких похідних 3 – метил – 1,2,4 – триазоліл – 5 – тіокарбонічних кислот за умов моделювання ішемічного пошкодження головного мозку / І.Ф. Беленічев // Одеський мед. журн. – 1998. – №4 (48). – С. 5–9.
10. Беленічев І.Ф. Фармакокорекція патобіохімічних порушень мозкової ткани в період моделювання гострої ішемії і реперфузії мозкової ткани некоторими производными 1,2,4 – триазола / І.Ф. Беленічев // Актуал. питання фармац. та мед. науки та практики: зб. наук. ст. – Запоріжжя, 1998. – Вип. 2. – Т. II. – С. 10–16.
11. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / О.В. Стефанов – К.: «Авіацена», 2002. – 527 с.
12. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / М.И. Прохорова – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – 272 с.
13. Avrames S. Monoclonal IgG and autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies / S. Avrames, T. Termynck // Mol. Immunol. – 1993. – Vol. 30. – P. 119–127.
14. Kolesnik Y.M. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement / Y.M. Kolesnik, A.V. Abramov // Microscopy and Analysis. – 2002. – №5. – P. 12–16.
15. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С.Н. Ланач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич – К.: «МОРИОН», 2002. – 640 с.
16. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином / И.Ф. Беленічев, Ю.М. Колесник, С.В. Павлов, А.В. Абрамов, Н.В. Бухтиярова // Междунард. неврологіч. журнал. – 2008. – №4 (20). – С. 20–26.