

ОКСИД АЗОТУ ТА ФЕРМЕНТИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ПРИ ІШЕМІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

В.О. Куровська, І.Р. Тимофійчук

*Буковинський державний медичний університет
Кафедра фізіології (зав. - проф. С.С. Ткачук)*

Реферат

Наведено дані власних досліджень та літературних джерел щодо впливу оксиду азоту на стан перекисного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантного захисту за умов експериментальної ішемії головного мозку. Наявність нейропротекторних ефектів оксиду азоту складає потенційну терапевтичну цінність цієї молекули у лікуванні інсульту.

Ключові слова: оксид азоту, антиоксидантні ферменти, ішемія, головний мозок

Abstract

NITRIC OXIDE AND ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE ISCHAEMIC BRAIN

V.O. KUROVS'KA, I.R. TIMOFIICHUK

The Bukovinian State Medical University

This paper presents a synthesis based on our experience and a review of the literature related to the effects of nitric oxide on the state of the oxidant-antioxidant system in the ischaemic brain. It was found that nitric oxide has a neuroprotective function and can be useful in the treatment of stroke.

Key words: nitric oxide, antioxidant enzymes, ischaemia, brain

Активні форми кисню (АФК) генеруються в різних біологічних системах у ході нормального аеробного дихання мітохондрій, які є їх переважним ендogenous джерелом. За умов фізіологічної норми вільнорадикальний процес, знаходячись під контролем антиоксидантної системи, приймає участь у виконанні фізіологічних процесів в організмі - модуляції судинного тону, механізмів пам'яті, реакціях запалення, проведення збудження і здатності генерувати потенціал дії, регуляції клітинного росту, секреції нейромедіаторів, репарації нервових волокон. При цьому вільнорадикальне окиснення ліпідів протікає на відносно низькому рівні і його інтенсивність залежить від статі, віку, а також від сезону, фази циркадіанного ритму.

За надлишкової генерації вільних форм кисню, зумовленою впливом екзогенних та ендogenous чинників вільнорадикального окиснення, процес може набувати каскадного харак-

теру, що призводить до ліпідних і білкових порушень у структурі клітинних мембран, роз'єднання процесів окиснювального фосфорилювання і тканинного дихання. В результаті розвивається метаболічний дисбаланс, одним із наслідків якого є перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ). Зі збільшенням концентрації субстратів ПОЛ у зоні ішемії наростає інтенсивність генерації АФК, накопичуються прооксиданти - стимулятори ПОЛ. Ці умови поєднуються зі зниженням активності антиоксидантних ферментів і порушенням функцій фізіологічних систем захисту. Ішемія і наступне відновлення кровотоку (реоксигенація) - процеси, які призводять до генерації активних форм кисню. У випадку неможливості нейтралізувати надлишок вільних радикалів, що генеруються за умов ішемії мозку, відбувається активація каскаду реакцій, що викликає загибель клітини [6, 2, 14, 19, 27, 26, 17].

Існує думка, що підвищення рівня вільних радикалів є необхідною умовою активації антиоксидантних систем. Підвищення рівня протекторних систем, які знижують активність АФК спричиняє гальмування синтезу захисних молекул і в клітині виникають нові прооксидантні відносини.

Так, якщо дія має надмірну інтенсивність, а швидкість компенсації замала, то в ядрі включається не програма синтезу комплексу захисних білків, а програма загибелі клітини - апоптоз. Це відбудеться, якщо рівень вільнорадикальних процесів буде ще вищим. Швидке руйнування клітинних структур, не опосередковане геномом, оскільки апоптозний сигнал не встигає реалізуватись [5].

Динаміка процесів ПОЛ вивчена на різних моделях ішемії мозку різних тварин. У всіх випадках відмічається підвищення вмісту маломолекулового альдегіду та зниження рівня водорозчинних і жиророзчинних антиоксидантів. Ішемія впродовж 30-хвилин руйнує близько 16% мембранного фосфатидилетаноламіна і вивільняє

близько 37% вільної арахідонової кислоти. Метаболізм арахідонової кислоти спряжений із утворенням простагландинів, тромбоксанів, лейкотрієнів, ліпоперекисів і реактивних вільних радикалів, а недостатність антиоксидантного захисту призводить до розвитку оксидативного стресу, який є універсальним механізмом ушкодження тканин. Активність ферментативних антиоксидантних систем (каталази, глутатіонпероксидази) в мозку значно нижча, ніж в інших тканинах, що ще більше підвищує ризик розвитку оксидативного стресу. В подальшому, оскільки церебральна ішемія супроводжується збільшенням рівня тромбоксану, який має судиннозвужувальний ефект і призводить до відносної гіпоксії в реперфузійний період, запобігається подальше накопичення продуктів ПОЛ. Є дані, що вказують на процеси інтенсифікації ПОЛ після ішемії. Це є розбіжністю з більшістю літературних даних, в яких процеси ПОЛ інтенсифікуються під час реперфузійного періоду. [4].

Скільки часу нервові клітини можуть зберегти свою життєдіяльність після важкої гіпоксії? У клінічній медицині загальноприйнято, що припинення кровопостачання мозку на декілька секунд вже викликає порушення його функцій, а через 5-6 хв ішемія призводить до суттєвих ушкоджень нервових клітин, що є межею їх виживання. Вже трихвилинне припинення кровотоку викликає різке порушення процесів життєдіяльності нервових клітин. Через 5-6 хв після клінічної смерті інтенсивність енергетичного обміну мозкової тканини зменшується настільки, що не може забезпечити збереженість структури клітин і їх життєдіяльність. Основні біохімічні зміни в мітохондріях розвиваються за ішемії також у перші 5 хв. Структурні зміни мітохондріальних мембран стають незворотніми через 10 хв після початку ішемії.

Протягом 5-7 хв починають формуватися морфологічні ознаки незворотніх змін нервових клітин.

Однак відомо, що нервові клітини без значних змін можуть переносити ішемію чи аноксію значні періоди. Цікавим є факт практично повного відновлення ультраструктури нейронів після ішемії 30 хв. Відновлення ультраструктури, в цьому разі, погоджується з нормалізацією ряду основних показників обміну

клітини (активності сукцинатдегідрогенази, ацетилхолінестерази, АТФ-ази, лужної фосфатази). Показано відновлення окисного фосфорилування в мітохондріях, виділених з мозку після 20 хв ішемії. Продемонстрована можливість відновлення через 15 хв після смерті всіх функцій ЦНС в перші 14-19 год [1].

Ми поставили за мету встановити вплив оксиду азоту (NO) на показники ПОЛ за умов експериментальної ішемії мозку, зважаючи на можливість його участі в нейропротективних механізмах. Як донор використали амінокислоту L-аргінін.

У наших дослідженнях встановлено зростання рівня дієнових кон'югатів у всіх полях гіпокампа майже у 2 рази та рівня малонового альдегіду приблизно в 1,5 рази за 20-хвилинної ішемії. За 1-годинної реперфузії тенденція до зростання продовжувалась. Показники рівня дієнових кон'югатів зросли у 3 рази, а малонового альдегіду в 2-2,5 рази. 24-годинна реперфузія характеризується максимальними рівнями показників перекисного окиснення ліпідів. Власне уведення L-аргініну не вплинуло на стан перекисного окиснення ліпідів.

Уведення L-аргініну та 20-хвилинна ішемія характеризуються зростанням рівнів дієнових кон'югатів, причому показники вищі, ніж за звичайної 20-хвилинної ішемії. Зростання рівнів малонового альдегіду за уведення L-аргініну та 20-хвилинної ішемії також підвищене, відповідає показникам ішемічного ушкодження. За уведення L-аргініну та 1- і 24-годинних періодів реперфузії ми отримали зростання рівня показників перекисного окиснення ліпідів у всіх полях гіпокампа, однак ці величини були менші за отримані в таких же дослідних групах без уведення L-аргініну. Отже, уведення даного донора оксиду азоту попереджало зростання ПОЛ в нашому експерименті [3].

Дані дослідників щодо цього явища виступають у підтримку протекторного впливу L-аргініну, уведеного одразу перед реперфузією. Так, відмічено, що інфузія L-аргініну перед початком реперфузійного періоду сприяла зменшенню порушень прооксидантно-антиоксидантного стану [8, 9]. У дослідженнях проведених на серці щурів із використанням моделі експериментального рабдоміолізу показано, що по-

передне уведення L-аргініну повністю попереджає підвищення вмісту ТБК-реагуючих продуктів і протеїнових карбонільних похідних у даному органі. Автори також пов'язують встановлений ними ефект із підвищенням утворення оксиду азоту в NO-синтазних реакціях за умов попереднього уведення L-аргініну [10].

Що ж до безпосереднього впливу оксиду азоту за ішемії головного мозку дані суперечливі. Активация nNOS є асоційована з ішемічним інсультом, але NO не діє як прямий нейротоксин, а шляхом його перетворення у пероксинітрид, що пов'язане з загибеллю клітин [21]. Водночас є і протилежні дані, коли NO викликає нейропротекторний ефект. Це протиріччя пояснюється тим, що ефект монооксиду азоту на клітину залежить від окисно-відновлювального стану його молекули: із NO легко утворюється пероксинітрид, а NO⁺ володіє здатністю нітрозилувати NMDA-рецептори, блокуючи тим самим вхід позаклітинного кальцію і синтез NO. Ідеальним терапевтичним агентом для лікування інсульту мав би бути такий препарат, який би попереджав появу NO[•], але в той же час сприяв би накопиченню NO⁺ [7].

Згідно визначення нами активності ферментів антиоксидантного захисту, отримані такі результати. Рівні одного з основних ферментів супероксиддисмутази (СОД) значно піднялися за 20-хвилинної ішемії. За 1-годинної реперфузії рівень СОД також є підвищеним, однак ця активність є менша, ніж за періоду ішемії. Що ж до періоду 24-годинної реперфузії, то активності СОД не спостерігається. Таку ж картину ми отримали в дослідних групах з уведенням L-аргініну. Отже, позитивного впливу на активність даного ферменту не виявлено [3].

Щодо складової системи обміну глутатіону - глутатіонпероксидази (ГПО), отримано зростання її рівня в полях гіпокампа за 20-хвилинної ішемії. Щоправда активність її падає за обох реперфузійних періодів. Уведення L-аргініну зумовило активацію цього ферменту у полях CA₂ і CA₃. Уведення L-аргініну та 20-хвилинна ішемія викликає зростання активності ГПО більш ніж у 2 рази. За реперфузійних періодів показники активності її нижчі, але вони підвищенні відносно таких же даних отриманих без уведення L-аргініну. Це свідчить, що L-ар-

гінін сприяє посиленню активності цього ферменту [3].

Рівень каталази отриманий у наших дослідженнях не змінювався впродовж ішемічного та реперфузійних періодів, дещо зростав під час уведення L-аргініну та все ж залишався низьким. Очевидно, в гіпокампі вона не має суттєвого впливу в системі антиоксидантного захисту. Хоча є дані про нейропротекцію шляхом використання надекспресії каталази у щурів, шляхом мікроінфузії її в стріатум перед і після оклюзії середніх мозкових артерій. Автори зазначають важливість терміну уведення каталази відносно ішемії, і, що вона має потенційну терапевтичну цінність [11].

Щодо ролі СОД за ішемії-реперфузії мозку, то тут накопичений певний досвід її використання. За реоксигенації ішемічної тканини зростає утворення супероксиду зі швидкістю, що пригнічує ємність ендогенних СОД, усуваючи їх ефекти. Зараз використовують властивості селективних міметиків СОД каталітична активність яких еквівалентна тій, що в нативного ферменту, однак, вони проходять клітини, селективні до супероксиду - не взаємодіють з NO, пероксидом водню чи пероксинітридом, стабільні *in vivo*, не дезактивуються пероксинітридом, показана їх фармакологічна ефективність на ряді тваринних моделей хвороб. Захисні ефекти міметиків СОД за ішемічного ушкодження проявляються у захисті судинного ендотелію: сприяють позитивним ефектам NO, пригнічують утворення цитотоксичного і прозапального пероксинітриду, посилення адгезивних молекул так як і генерацію хемотаксичних чинників, пригнічують інфільтрацію нейтрофілів у місцях ушкодження та ушкодження ДНК, гальмують активацію полі-АДФ-рибозо полімерази [25].

Короткий період напівжиття Cu/ZnСОД (6 хв) у циркулюючій крові і її утруднене проходження через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), ускладнює використання ферменту у терапії церебральної ішемії. Однак, модифікований фермент зі збільшеним періодом напівжиття, такий як поліетиленгліколь зв'язана СОД, успішно використаний для зменшення об'єму інфаркту у щурів, що підлягали фокальній церебральній ішемії. СОД, заключена в ліпосомах має більший період напівжиття (4,2 год), проникає

ГЕБ і клітину і також показала ефективне лікування на зменшення травматичного і фокального ішемічного ушкодження мозку [15].

Важливим механізмом через який мімітики СОД впливають на ішемічне та реперфузійне ушкодження є зменшення утворення пероксинітриду, через усунення супероксиду перед тим як він може взаємодіяти з NO. До того ж, супероксид аніон через взаємодію з NO, порушує біологічну активність цього медіатора, зменшує важливі протизапальні і захисні властивості NO [24]. Є дані, що без СОД ефекти NO не реалізуються [20].

Вивчено розчин, що переносить кисень та володіє антиоксидантною активністю, утворений через взаємодію гемоглобіну, СОД і катализи: PolyHb-SOD-CAT. У дослідженні встановили його ефект на ГЕБ і набряк мозку з використанням транзиторної глобальної ішемії-реперфузії у щурів. Автори порівняли цей розчин з умовнооперованими тваринами, окисненованим соляним розчином, строма-вільним гемоглобіном, полімеризованим гемоглобіном і сумішшю строма-вільний гемоглобін, СОД, КТ у вільному розчині. Результати показали, що PolyHb-SOD-CAT розчин на відміну від інших може постачати кисень до ішемізованих тканин без спричинення реперфузійного ушкодження за транзиторної глобальної ішемії-реперфузії мозку [12].

СОД каталізує відновлення супероксиду до H_2O_2 . Другою стадією є включення відновлення H_2O_2 до H_2O через глутатіонпероксидазу. Припускають, що глутатіонпероксидаза є складовою нейропротекції у СОД-1 трансгенних мишей (СОД-/-). Для перевірки цієї гіпотези схрестили мишей, трансгенних за глутатіонпероксидазою (ГПО-/-) з СОД-/- трансгенними і піддали цю схрещену модель 2 год фокальній церебральній ішемії і наступній 24 год реперфузії. СОД-/- і ГПО-/- не показали нейропротекції, об'єм інфаркту збільшився у цих мишей порівняно з контролем. Висунуто гіпотезу, що антиоксидантний фермент ГПО є важливим компонентом ферментативного захисту проти зростання вільних радикалів, що генеруються за ішемії-реперфузії. Захисний ефект надекспресії СОД-1 гена залежить від функціонування ГПО, що перехоплює H_2O_2 . Тобто, необхідно звертати увагу не

тільки на зростання супероксиду, але й H_2O_2 та інших вільних радикалів. Дослідження зазначає, що ГПО є одним з ключових ферментів, залучених у клітинний захист за ішемії-реперфузії і має бути важливим у потенційному лікуванні інсульту [18].

У дослідженні [16] продемонстровано, що S-нітрозоглутатіон (GSNO) і NO захищають мозкові допамінові нейрони від гідроксильного радикалу (OH \cdot), зумовленого окисним стресом *in vivo* через те, що вони є потенційними антиоксидантами. GSNO і NO обривають окисний стрес у мозку шляхом: пригнічення залізоцимульованого утворення OH \cdot у реакції Фентона; обривання ПОЛ; посилення антиоксидантних можливостей GSH глутатіону; зумовлюють нейропротективну дію нейротрофіну мозкового походження (BDNF); пригнічують цистеїнілові протеази. GSNO-S-нітрозильований глутатіон приблизно у 100 разів сильніший, ніж класичний глутатіон. До того ж, S-нітрозилування цистеїнових залишків через GSNO інактивує каспазу-3 і HIV-1 протеазу, запобігаючи апоптозу і нейротоксичності. GSNO зумовлює дезагрегацію тромбоцитів також шляхом S-нітрозилування XIII фактора згортання. GSNO найбільше генерується в ендотеліоцитах і астроцитах впродовж окисного стресу, тому що ці клітини містять мілімолярні концентрації GSH і NOS.

Виконуючи функцію стабілізатора і переносника NO, S-нітрозоглутатіон може мати протективний ефект через реакції трансітрозилування [13, 24, 22, 23].

Зважаючи на дані дослідження подальше вивчення нейропротективних взаємовпливів оксиду азоту та ферментів антиоксидантного захисту становить потенційну терапевтичну цінність у лікуванні ішемічного інсульту та інших патологій.

Література

1. Боголепов Н.Н. Ультраструктура мозга при гипоксии / Н.Н. Боголепов. - Москва: Медицина, 1976. - 164 с.
2. Кургалюк Н.Н. Оксид азота как фактор адаптационной защиты при гипоксии / Н.Н. Кургалюк // Успехи физиологических наук. - 2002. - Т.33, № 4. - С.63-79.
3. Куровська В.О. Перекисне окиснення ліпідів у гіпокампі щурів за умов ішемії-реперфузії головного мозку та уведення L-аргініну / В.О. Куровська, І.Р. Тимофійчук // Буковинський медичний вісник. - 2010. - Т. 14,

- № 1. - С. 124-127.
4. Мищенко И.В. Постишемическая реперфузия головного мозга и её влияние на реакции перекисного окисления липидов / И.В. Мищенко // *Архів клінічної та експериментальної патології*. - 2003. - № 2. - С. 162-171.
 5. Сазонтова Т.Г. Роль свободнорадикальных процессов и редокс-сигнализация в адаптации организма к изменению уровня кислорода / Т.Г. Сазонтова, Ю.В. Архипенко // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. - 2005. - Т.91, № 6. - С. 636-656.
 6. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная терапия при ишемии головного мозга / Э.Ю. Соловьева, О.П. Миронова, О.А. Баранова [и др.] // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. - 2008. - № 6. - С. 37-42.
 7. Соловьев А.И. Фармакология и токсикология оксида азота: два "лица" одной и той же молекулы / А.И. Соловьев, А.В. Стефанов // *Укр. біохім. жур.* - 2003. - Т.75, № 1. - С. 12-17.
 8. Ходосовский М.Н. Участие L-аргинин-NO системы в развитии реперфузионных повреждений печени / М.Н. Ходосовский, В.В. Зинчук // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. - 2003. - № 3. - С. 43-47.
 9. Ходосовский М.Н. К механизму протекторного влияния L-аргинина на печень при ишемии-реперфузии / М.Н. Ходосовский // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. - 2006. - Т. 69, № 3. - С. 40-42.
 10. Филимоненко В.П. Антиоксидантные эффекты L-аргинина в сердце крыс при экспериментальном рабдомиолизе / В.П. Филимоненко, И.В. Никитченко, П.А. Калиман // *Український біохімічний журнал*. - 2009. - № 1. - С. 114-121.
 11. Catalase over-expression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia / W.Gu, H. Zhao, M.A. Yenari [et al.] // *Clinical neuroscience and neuropathology*. - 2004. - Vol.15, Is.3. - P. 413-416.
 12. Douglas Powanda D. Cross-linked polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase supplies oxygen without causing blood brain barrier disruption or brain edems in a rat model of transient global brain ischemia-reperfusion / D. Douglas Powanda, Th.M.S. Chang // *Artificial cells, blood substitutes and biotechnology*. - 2002. - Vol.30, №1. - P. 23-27.
 13. Dringen R. Metabolism and function of glutathione in brain / R. Dringen // *Progress in neurobiology*. - 2000. - Vol.62. - P. 649-671.
 14. Chan P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain / P.H. Chan // *J. Cerebral blood flow&Metabolism*. - 2001. - Vol.21. - P. 2-14.
 15. Chan P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage / P.H. Chan // *Stroke*. - 1996. - Vol. 77. - P. 1124-1129.
 16. Chiueh C.C. The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron / C.C. Chiueh, P.Rauhala // *Free Radic. Res*. - 1999. - Vol.31. - P. 641-650.
 17. Fujimura M. Neuroprotective effect of an antioxidant in ischemic brain injury: involvement of neuronal apoptosis / M. Fujimura, T. Tominaga, P.H. Chan // *Neurocritical Care*. - 2005. - Vol.2, №1. - P. 59-66.
 18. Glutathione peroxidase-1 contributes to the neuroprotection seen in the superoxide dismutase-1 transgenic mouse in response to ischemia/reperfusion injury / P.J. Crack, J.M. Taylor, J.B. de Haan [et al.] // *Journal of cerebral blood flow&Metabolism*. - 2003. - Vol.23. - P. 19-22.
 19. Love S. Oxidative stress in brain ischemia / S.Love // *Brain pathol*. - 1999. - Vol. 9. - P. 119-131.
 20. NADH: sensor of blood flow need in brain, muscle and other tissues / Y. Ido, K. Chang, T.A. Woolsey // *The FASEB Journal*. - 2001. - Vol.15. - P. 1419-1421.
 21. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage / M.J.L. Eliasson, Zh. Huang, R.J. Ferrante [et al.] // *The journal of neuroscience*. - 1999. - Vol.19(14). - P. 5910-5918.
 22. Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage / M. Weisbrot-Lefkowitz, K. Reuhl, B. Perry [et al.] // *Molecular brain research*. - 1998. - Vol.53, Is.1-2. - P. 333-338.
 23. P. Rauhala Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione / P. Rauhala, T. Andoh, C.C. Chiueh // *Toxicology and applied pharmacology*. - 2005. - Vol.207. - P. 91-95.
 24. Role of nitric oxide - mediated glutathionylation in neuronal function. Potential regulation of energy utilization / Li-Peng Yap, J.V. Garcia, D.S. Han [et al.] // *Biochem J*. - 2010. - Vol.23. - P. 123-131.
 25. Salvemini D. Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury / D. Salvemini, S. Cuzzocrea // *Current opinion in investigational drugs*. - 2002. - Vol.3, № 6. - P. 886-895.
 26. Ying W. NAD⁺ and NADH in ischemic brain injury / W. Ying // *Front biosci*. - 2008. - Vol.13. - P. 1141-1151.
 27. Ying W. Oxidative stress and NAD⁺ in ischemic brain injury: current advances and future perspectives / W. Ying, Z.-G. Xiong // *Current medicinal chemistry*. - 2010. - Vol.17, №20. - P. 2152-2158.