

Министерство здравоохранения республики беларусь

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра патологической физиологии имени Д. А. Маслакова

Н. Е. МАКСИМОВИЧ
И. К. ДРЕМЗА
Э. И. ТРОЯН

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ
НАРУШЕНИЙ БИОЭНЕРГЕТИКИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА**

Монография

Гродно
ГрГМУ
2018

УДК 616.831-005.4:545.17]-092.6-092.9
ББК 56.12
М 172

Рекомендовано Редакционно-издательским советом ГрГМУ
(протокол № 15 от 30 ноября 2017 г.).

Авторы: зав. каф. патологической физиологии им. Д. А. Маслакова ГрГМУ,
д-р мед. наук, проф. Н. Е. Максимович;
канд. мед. наук, доц. И. К. Дремза;
канд. мед. наук, доц. Э. И. Троян.

Рецензенты: проф. каф. фармакологии и физиологии ГрГАУ,
д-р мед. наук, проф. М. Г. Величко;
зав. каф. фармакологии им. М. В. Кораблева,
д-р мед. наук, проф. В. И. Козловский.

Максимович, Н. Е.

М 172 Патогенетическая коррекция нарушений биоэнергетики
головного мозга : монография / Н. Е. Максимович, И. К. Дремза,
Э. И. Троян. – Гродно : ГрГМУ, 2018. – 256 с.
ISBN 978-985-595-065-4.

Целью монографии является ознакомление научной медицинской общественности с новыми сведениями о возможности патогенетического корригирования биоэнергетических нарушений головного мозга, причиной которых являются ишемические повреждения. Изложенная в книге информация может быть полезна для научных сотрудников, работающих в области нейропатологии, невропатологов, терапевтов, врачей кардиологических отделений больниц, а также студентам старших курсов высших учебных медицинских заведений.

Рассмотрено современное состояние проблемы защиты мозга от повреждающего действия развивающейся ишемии, которое базируется на выяснении основных патофизиологических механизмов ишемической гибели нервной ткани: эксайтотоксичность, периинфарктную деполяризацию, окислительный стресс, воспаление и апоптоз. На основании анализа современной литературы обсуждается развитие этих механизмов и их значение в повреждении мозга, в том числе в области периинфарктной зоны, или ишемической пенумбры, сохранение которой является основной целью нейропротекции при ишемии мозга. Определены основные направления нейропротекции при ишемическом инсульте.

УДК 616.831-005.4:545.17]-092.6-092.9
ББК 56.12

ISBN 978-985-595-065-4

© Максимович Н. Е., Дремза И. К.,
Троян Э. И., 2017
© ГрГМУ, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ. ИШЕМИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА – КАК ВАЖНАЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ И СОЦИАЛЬНАЯ ПРОБЛЕМА	7
ГЛАВА 1. ПОНЯТИЕ О БИОЭНЕРГЕТИКЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА	17
ГЛАВА 2. ПАТОГЕНЕЗ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ	47
ГЛАВА 3. ЭТИОПАТОГЕНЕЗ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА РЕПЕРФУЗИОННОГО ГЕНЕЗА	72
ГЛАВА 4. ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКИХ И РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА	108
ГЛАВА 5. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ БИОЭНЕРГЕТИКИ И АКТИВНОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ	134
ГЛАВА 6. РЕСПИРАТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ И ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА	149
6.1 Респираторная активность митохондрий при ишемии-реперфузии головного мозга	148
6.2 Показатели окислительного стресса в гомогенатах головного мозга крыс с ишемией-реперфузией	156
ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА БИОЭНЕРГЕТИКУ И ПОКАЗАТЕЛИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ	159

ГЛАВА 8. ВЛИЯНИЕ ТИАМИНА НА БИОЭНЕРГЕТИКУ И ПРООКСИДАНТНО–АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ	179
ГЛАВА 9. ВЛИЯНИЕ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ НА БИОЭНЕРГЕТИКУ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ	191
ГЛАВА 10. ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА БИОЭНЕРГЕТИКУ И ПРОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ	206
ГЛАВА 11. ЭФФЕКТЫ КОМПЛЕКСА (ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН, ТИАМИН, СУКЦИНАТ, АЦЕТИЛЦИСТЕИН) НА БИОЭНЕРГЕТИКУ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ	221
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	229

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИК	–	искусственное кровообращение
АОС	–	антиоксидантная система
АТФ	–	аденозинтрифосфат
АФА	–	антифосфолипидный синдром
АФК	–	активные формы кислорода
АЦЦ	–	ацетилцистеин
ВИЧ	–	вирус иммунодефицита человека
ГМ	–	головной мозг
ГПО	–	глутатионпероксидаза
ГР	–	глутатионредуктаза
ГТ	–	глутатионтрансфераза
ДКв	–	дигидрокверцетин
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
И	–	ишемия
ИИ	–	ишемический инсульт
ИР	–	ишемия–реперфузия
ИРГМ	–	ишемия–реперфузия головного мозга
ЛДГ	–	лактатдегидрогеназа
МДА	–	малоновый диальдегид
H^+	–	ионы водорода
H_2O_2	–	пероксид водорода
$O_2^{\cdot-}$	–	супероксидный анион-радикал.
HO^{\cdot}	–	гидроксильный радикал
$HO_2^{\cdot-}$	–	гидропероксидный радикал;
ОНМК	–	острое нарушение мозгового кровообращения
ПДК	–	пируватдегидрогеназный комплекс
ПОЛ	–	перекисное окисление липидов
Р	–	реперфузия
P_aO_2	–	напряжение кислорода в артериальной крови
pH	–	водородный показатель
С	–	сукцинат натрия
CO_2	–	углекислый газ
СОД	–	супероксиддисмутаза
СПИД	–	синдром приобретенного иммунодефицита
Т	–	тиамин

t-БГП	–	трет-бутилгидропероксид
ТБК	–	тиобарбитуровая кислота
ТБКРС	–	продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой
ТДФ	–	тиаминдифосфат
ТХУ	–	трихлоруксусная кислота
ФАД	–	флавинадениндинуклеотид
ЦВЗ	–	цереброваскулярные заболевания
ЭТЦ	–	электрон-транспортная цепь
Glu	–	окисленный глутатион
GSH	–	восстановленный глутатион
H ₂ O	–	вода
HbO ₂	–	оксигемоглобин
HNO ₂	–	азотистая кислота
IMM	–	внутренняя мембрана митохондрий
KoQ	–	коэнзим Q
N ₂ O ₃	–	азотистый ангидрид
NADH	–	никотинамидадениндинуклеотид
NO ₂ ⁻	–	нитроксил анион
NO ₂ Cl	–	нитрилхлорит
NOS	–	синтаза оксида азота
O ₂	–	кислород
OMM	–	наружная мембрана митохондрий
pO ₂	–	напряжение кислорода
PvO ₂	–	парциальное давление кислорода в смешанной венозной крови
RO [·]	–	алкоксильный радикал
SB	–	стандартный бикарбонат крови
TSH	–	общие SH-группы белков и глутатиона
HOCl	–	гипохлорит

ВВЕДЕНИЕ.

ИШЕМИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА – КАК ВАЖНАЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ И СОЦИАЛЬНАЯ ПРОБЛЕМА

Монография посвящена рассмотрению патогенетически обоснованной коррекции биоэнергетических нарушений, возникающих при цереброваскулярной патологии ишемического и реперфузионного генеза, которая, несмотря на многочисленные исследования в этой области, продолжает на сегодняшний день оставаться одной из наиболее актуальных проблем в здравоохранении.

В монографии представлены новые сведения о патогенезе биоэнергетических нарушений головного мозга ишемического и реперфузионного характера, обоснована возможность использования комплекса препаратов, обеспечивающих эффективную нейропротекцию при его ишемии-реперфузии.

На основе определения показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния (показатели системы глутатиона: восстановленный глутатион, общие SH-группы глутатиона и белка, активность глутатионпероксидазы, а также содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой), изучения дыхательной функции митохондрий и некоторых показателей углеводного обмена в ткани головного мозга показано участие окислительного стресса в развитии нарушений энергетического обмена при ишемии-реперфузии головного мозга, изучены механизмы церебропротекции ряда препаратов: дигидрокверцетин, тиамин, ацетилцистеин, сукцинат натрия, показан эффект их комплексного воздействия.

Цереброваскулярная патология является одной из актуальных медико-биологических и социальных проблем в связи ее опасностью для жизни и возможной потерей трудоспособности пациента. Цереброваскулярная патология включает группу остро и хронически возникающих заболеваний головного мозга, которые сопровождаются ишемией и гипоксией мозга независимо от первично обуславливающих факторов. Лидирующей патологией в группе цереброваскулярных

заболеваний (ЦВЗ) является ишемический инсульт (ИИ), представляющий собой острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), вызванное чаще окклюзией мозговых сосудов, либо их эмболизацией. Возможны и другие причины его возникновения.

Цереброваскулярную патологию характеризуют показатели заболеваемости, смертности и инвалидности. Инсульт занимает в мире второе место среди главных причин смертности и является ведущей причиной инвалидизации населения в странах, что определяет его значимость [6]. По данным Всемирной организации здравоохранения инсультом во всем мире страдают 15 млн человек, из них – около 5 млн человек умирают, 5 млн человек становятся инвалидами, у 85% человек возникновение инсульта связано с высоким кровяным давлением.

В Соединенных Штатах каждый год инсульт переносят более 795 тыс. человек, в том числе у 77% пациентов он возникает впервые, а у 87% пациентов возникают ишемические инсульты [6].

Органы официальной статистики РФ рассматривают цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) как одну нозологическую форму, не выделяя отдельно инсульт. В структуру ЦВЗ входят как острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) преходящего и стойкого характера, так и хронические формы ЦВЗ (начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга, различные варианты течения дисциркуляторной энцефалопатии, сосудистая деменция). По данным статистического анализа ежегодно в России регистрируется более 450 тыс., то есть каждые 1,5 минуты у кого-то из россиян развивается это заболевание. По числу случаев инсультов Россия значительно опережает такие страны, как Китай, Венгрия, Португалия, Канада и США [2]. В России показатель заболеваемости ишемическим инсультом в последние годы колеблется от 510 до 596 случаев на 100 тыс. населения. Ежегодное увеличение частоты инсульта в России составляет 6,5–9,2%.

В Беларуси заболеваемость в среднем составляет 296 случаев на 100 тыс. населения [16]. В 2016 году диагноз

«инсульт» был поставлен у 32,5 тыс. человек, около 30% из которых – люди трудоспособного возраста.

Медико-социальной особенностью ОНМК является высокая распространенность этой патологии у лиц трудоспособного возраста. В последнее время инсульт все чаще встречается у молодых людей. Растет частота инсульта и в возрасте 15–45 лет. За последнее десятилетие показатель заболевших возрос приблизительно на 30%. Несмотря на «помолодение» инсульта, он имеет тенденцию к «взрослению». Согласно регистру инсульта НАБИ частота инсультов в каждом регионе нашей страны увеличивается каждое десятилетие практически в три раза. При этом основная часть таких пациентов страдала от артериальной гипертензии, избыточной массы тела или сахарного диабета.

Ежегодный риск инсульта в возрастной группе 45–54 года составляет 0,1%, 65–74 года – 1%, старше 80 лет – 5%. Если в среднем возрасте инсульт встречается у одного из 1000 человек, то после 80 лет – у каждого четвертого человека. По данным Фрамингемского исследования вероятность инсульта удваивается каждое десятилетие жизни после 55 лет. С увеличением средней продолжительности жизни возрастает абсолютное число больных с ОНМК.

Относительно быстрые изменения демографической ситуации (в сопоставлении с тысячелетиями становления и развития цивилизации) оказались характерными для XX столетия. Они заключались не только в быстром приросте населения, но и в изменении соотношений разных возрастных групп. За последние 40 лет число жителей планеты увеличилось вдвое и достигло 6 млрд. человек. В странах с развитой экономикой уменьшилась рождаемость, но увеличилась продолжительность жизни. В развивающихся странах с меньшими темпами развития продолжительность жизни также увеличивалась и сохранилась высокая рождаемость. Средняя продолжительность жизни в ряде Европейских стран достигла 78–84 лет. По данным национального центра медицинской статистики США в 2005 г средняя продолжительность жизни американцев достигла 77,5 лет. В 2000 г в этой стране было

4,3 млн. человек старше 85 лет, предполагается, что в 2050 году их будет – 19,4 млн.

В России и РБ отчетливо прослеживается мировая демографическая тенденция последних десятилетий – быстрое увеличение доли пожилых людей в общей структуре населения. Уже сегодня пятую часть населения страны составляют люди пенсионного возраста, из которых около 11% – старше 80 лет. По сравнению с 1979 годом численность лиц старше 85 лет удвоилась.

Изменяется «половая принадлежность» инсульта – в старших возрастных группах инсульт чаще встречается у женщин, что связано с большей продолжительностью жизни женщин и отсутствием протективного влияния женских половых гормонов в старших возрастных группах.

Инсульт – ведущая причина смерти. По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно в мире от инсульта умирают 4,7 млн человек. В большинстве стран, в том числе в России, инсульт занимает 2–3-е место в структуре общей смертности населения, уступая лишь кардиоваскулярной патологии.

Согласно «Ассоциации болезней сердца и истории инсульта 2018 года, Американской кардиологической ассоциации, Центров по контролю и профилактике заболеваний, Национальным институтам здравоохранения (Health statistics is the Association's 2018 Heart Disease and Stroke Statistics Update, which is compiled annually by the American Heart Association, the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes) инсульт обуславливает смертность в 16,8% случаев после ишемической болезни сердца, с которой в США связано 43,8% смертей. Смертность при инсульте в Европе составляет от 100 до 250 на 100 тыс. населения, в среднем в Европе ежегодно от инсульта умирает около 650 000 человек. В экономически развитых странах смертность населения от инсульта оценивается в 11–12%, смертность от ЦВЗ в РФ – в 4 раза выше [15].

В разных странах показатель смертности может отличаться в несколько раз, а иногда и на порядок. Если в Кыргызстане смертность от инсульта достигает 314 на 100 тыс. населения, в

Швейцарии и Канаде она не превышает 25 на 100 тыс. населения. Ежегодная смертность от ИИ в Беларуси среди лиц трудоспособного возраста составляет 251 на 100 тысяч населения [1]. Риск развития инсульта варьируется в зависимости от расы и этнической принадлежности.

В Соединенных Штатах инсульт возникает каждые 40 секунд, а каждый случай смерти от инсульта возникает через каждые 4 минуты, инсульт убивает около 140 тыс. американцев каждый год.

Риск появления первого удара у белых почти вдвое выше, чем у чернокожих, а у чернокожих – инсульт является главной причиной смертности. Несмотря на то, что смертность от инсульта в течение десятилетий снижалась среди всех рас, у латиноамериканцев наблюдается рост смертности.



Рисунок 1. – Смертность от инсульта в России

По <https://insultinform.ru/posledstviya-insulta/smertnost-ot-insulta>

В Западной Европе, в противовес Восточной Европе, где смертность от инсульта возросла, в настоящее время тенденция направлена на снижение смертности от инсульта, в связи с чем снижение смертности от инсульта признано одним из 10 величайших достижений медицины XX столетия.

Два важнейших статистических показателя, характеризующих цереброваскулярную патологию, заболеваемость и смертность на современном этапе имеют противоположенную направленность – заболеваемость растет, смертность уменьшается (рис. 2).

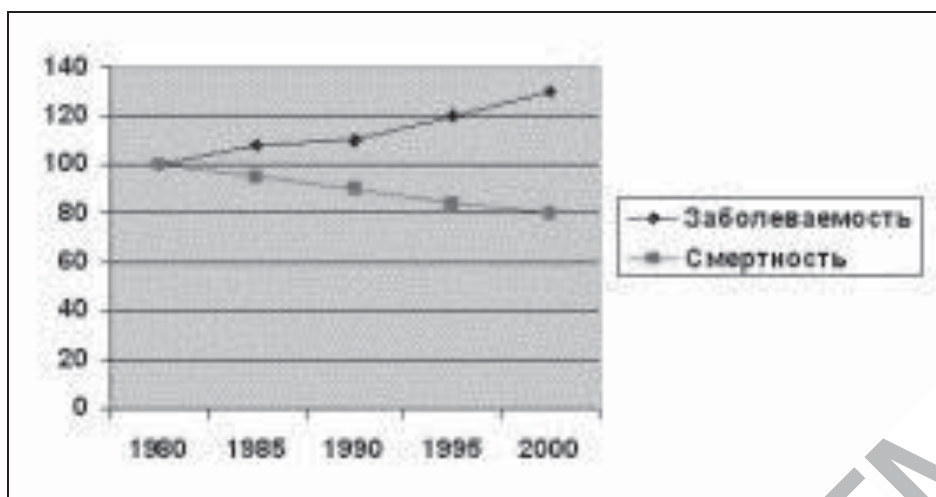


Рисунок 2. – Динамика заболеваемости и смертности от инсульта в период с 1980 по 2000 год

Несмотря на тенденцию к снижению смертности от инсульта это не является основанием для быстрого решения проблемы одного из наиболее тяжелых заболеваний. Причиной является увеличение численности населения и продолжительности жизни, в связи с ростом абсолютного количества людей, преимущественно за счет пожилых, будет расти заболеваемость и количество умерших от инсульта. Прогноз US Census Bureau (США) предполагает, что количество больных, умерших от инсульта в 2050 будет в 3 раза больше, чем в 2000 (рис. 3).

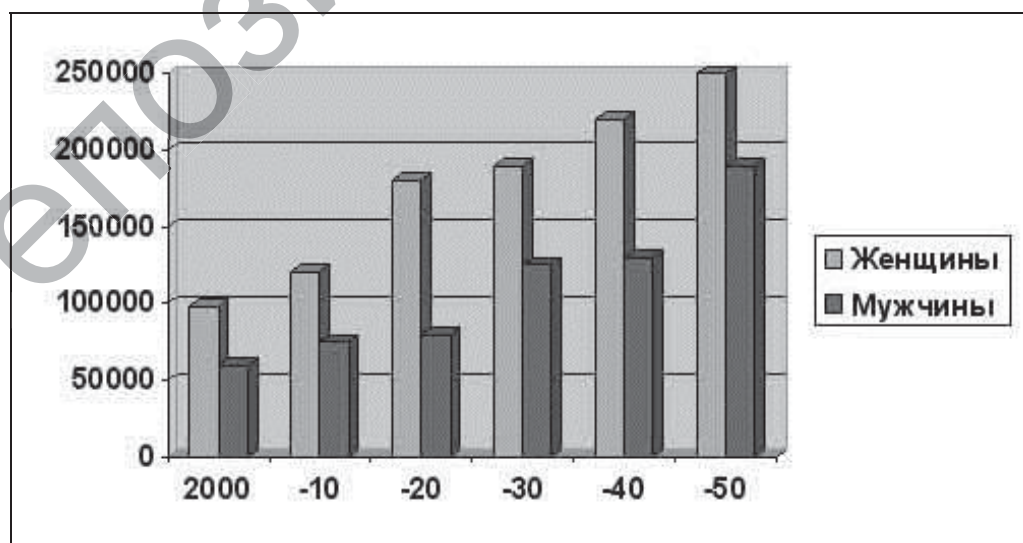


Рисунок 3. – Прогноз числа умерших от инсульта до 2050 г. (США)

Снижение смертности влечет за собой увеличение вероятности повторных нарушений мозгового кровообращения, увеличение количества больных с хроническими формами недостаточности мозгового кровообращения.

В Республике Беларусь количество умерших в 2016 г. от инфаркта мозга пациентов с артериальной гипертензией составила 520 человек, из них – 38 человек в трудоспособном возрасте [13]. В перерасчете на 100 тыс. населения смертность от инфаркта мозга пациентов с артериальной гипертензией составила 48,8 человек, из них 6,2 человек – в трудоспособном возрасте. Смертность от инфаркта мозга пациентов без АГ составила 125 человек, из них 8 человек – в трудоспособном возрасте. В перерасчете на 100 тыс. населения смертность от инфаркта мозга у пациентов без АГ составила 11,7 человек, из них 1,3 человек – в трудоспособном возрасте.

По данным итогового отчета неврологической службы Гродненской области, первичная заболеваемость ОНМК за 2016 год составила 280 случая на 100 тыс. населения (в 2015 г. – 270 на 100 тыс. населения). При этом, заболеваемость инсультом на фоне артериальной гипертензии – 220 случаев на 100 тыс. человек, что более 75% всех случаев первичной заболеваемости ОНМК [11].

В структуре смертности населения Гродненской области за 2016 год смертность от цереброваскулярных болезней (ЦВБ) составила 9,9% (в 2015 г. – 10,8%). В 2015 г. умерли 1564, в 2016 г. – 1440 человек; при этом основной вклад в смертность внес инфаркт головного мозга: от данной патологии в 2016 г. умерли 769 чел., в 2015 г. – 810 чел. (53,4% и 51,7% смертей от ЦВБ соответственно) [11].

Наряду с высокой смертностью социально значимыми являются и последствия инсультов: развитие стойкой инвалидности с потерей трудоспособности, высокий риск повторных нарушений мозгового кровообращения, сосудистой деменции. Острые нарушения мозгового кровообращения являются одной из причин стойкой утраты трудоспособности населения во всем мире инвалидизации и смертности населения Беларуси. Так, инвалидизация от инсульта занимает первое место среди причин первичной инвалидизации, достигая 40% [6].

Инвалидами становятся 70–80% выживших после инсульта, причём примерно 20–30% из них нуждаются в постороннем уходе, лишь 20% пациентов возвращаются к трудовой деятельности, а около 55% перенесших инсульт пациентов, выживших к концу 3-го года заболевания, не удовлетворены качеством своей жизни.

Инсульт ложится тяжелым бременем на государство. По данным ВОЗ в США ежегодные расходы на последствия инсульта составляют около 34 миллиардов долларов, затраты на лечение одного пациента с инсультом – 55–73 тыс. долларов. В России затраты на лечение пациентов с инсультом составляют от 24,7 до 32,8 миллиардов долларов в год. В эту сумму входят расходы на медицинские услуги, лекарства для лечения инсульта и пропущенные дни работы.

Как указывал главный внештатный невролог Минздрава, д.м.н., проф. С.А. Лихачев в докладе по отчету о работе неврологической службы республики за 2016 год, «ведущим направлением в дальнейшей работе по снижению смертности и инвалидности от ОНМК остается первичная и вторичная профилактика инсульта, которая требует консолидации усилий терапевтов, кардиологов и неврологов». Следует подчеркнуть государственный уровень значимости данных мер. Так, в Государственной программе «Здоровье народа и демографическая безопасность Республики Беларусь» на 2016–2020 годы, утвержденной постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 14.03.2016 г. № 200, уделяется значительное внимание профилактике и контролю неинфекционных заболеваний. Подчеркивается необходимость мер по снижению преждевременной смертности и стабилизации инвалидности населения, связанных с неинфекционными заболеваниями (задача 3 подпрограммы 2).

В монографии изложены результаты исследований, полученных при поддержке фонда фундаментальных исследований (шифр темы и название задания: УДК: 616.831-005.4-08-092.9 «Биоэнергетика и редокс-состояние головного мозга крыс в условиях реперфузии и коррекции с помощью биорегуляторного комплекса» (договор № Б11ОБ-122 от 15.04.2011) № госрегистрации: 2011/3397 от 16.09.11).

Литература

1. Бова, А.А. Ишемический инсульт: стратегия ведения пациентов (соответствие рекомендаций и их реального клинического применения) / А.А. Бова, М.В. Силиванович // Военная медицина – 2015. – № 4 (37). – С. 30–35.

2. Бокерия, Р.Г. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения / Л.А. Бокерия, Р.Г. Гудковой // М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2011. – 207 с.

3. Верещагин, Н. В. Регистры инсульта в России: результаты и методологические основы проблемы / Н.В. Верещагин, Ю.Я. Варакин // Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова (приложение «Инсульт»). 2001. – № 1. – С. 34–40.

4. Гусев, Е.И. Проблема инсульта в России / Е.И. Гусев // Журн. неврол. и психиатрии. Инсульт (Приложение к журналу). – 2003. – Вып. 9. – С. 3–7.

5. Денисов, И.И. Клинические рекомендации: Диагностика и тактика при инсульте в условиях общей врачебной практики, включая первичную и вторичную профилактику (утверждены на IV Всероссийском съезде врачей общей практики (семейных врачей) Российской Федерации 15 ноября 2013 г., г. Казань) / И.И. Денисов, Д.В. Кандыба, О.Ю. Кузнецова / Казань, 2013. – 33 с.

6. Доклад ВОЗ. Информационный бюллетень N 310, июль 2013; [www.who.int/https://www.cdc.gov/stroke/facts.htm](https://www.cdc.gov/stroke/facts.htm)

7. Кулеш, С.Д. Долгосрочные исходы мозгового инсульта в крупной городской популяции Беларуси / С.Д. Кулеш [и др.] // Вестник ВГМУ. – 2011. – Том 10, №3. – С. 93–101.

8. Кулеш, С.Д. Эпидемиология мозгового инсульта: результаты популяционного регистра Гродно. Сообщение 1 / С.Д. Кулеш [и др.] // Здоровоохранение. – 2009. – № 1. – С. 31–35.

9. Кулеш, С.Д. Мозговой инсульт: комплексный анализ региональных эпидемиологических данных и современные подходы к снижению заболеваемости, инвалидности и смертности: монография / С.Д. Кулеш // Гродно: ГрГМУ, 2012. – 204 с.

10. Лихачев, С.А. Диагностика и лечение инсульта: рекомендации / С.А. Лихачев и др. // Респ. науч.-практ. центр неврологии и нейрохирургии. – Минск, 2008. – 70 с.

11. Петельский, Ю.В. Новые организационные подходы к профилактике острых нарушений мозгового кровообращения в Гродненской области / Ю.В. Петельский, М.Ю. Сурмач // Вопросы организации и информатизации здравоохранения. – 2017, № 2. – С. 37–47.

12. Попович, В.В. Частота ишемических инсультов у женщин в соответствии с возрастом и степенью повышения артериального давления / В.В. Попович, А.П. Сутько, Н.Е. Максимович // Мат. Московского межд.

форума кардиологов 14–15 июня 2012. – Москва, 2012. – С. 38.

13. Смертность в Республике Беларусь: офиц. стат. сб. за 2015–2016 гг. – Минск: ГУ РНМБ, 2017. – 234 с.

14. Стародубцева, О.С. Анализ заболеваемости инсультом с использованием информационных технологий / О.С. Стародубцева, С.В. Бегичева // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 8 (2). – С. 424–427.

15. Суслина, З.А. Эпидемиологические аспекты изучения инсульта. Время подводить итоги / З.А. Суслина, Ю.Я. Варакин // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2007. – № 1 (2). – С. 22–28.

16. Усова, Н.Н. Заболевания нервной системы в гериатрии / Н.Н. Усова и др. // *Методическое пособие для врачей*. – Гомель, 2015. – 99 с.

17. Харченко, В.И. Смертность от болезней системы кровообращения в России и в экономически развитых странах. Необходимость усиления кардиологической службы и модернизации медицинской статистики в Российской Федерации / В.И. Харченко [и др.] // *Российский кардиологический журнал*. – 2005. – № 2. – С. 5–18.

18. Benjamin, E.J. On behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics–2017 update: a report from the American Heart Association / Benjamin E.J., Blaha M.J., Chiuve S.E. et al. // *Circulation*. – 2017. – V. 135. – e229–e445.

19. Bravata, D.M. Long-term mortality in cerebrovascular disease / D.M. Bravata, S.Y. Ho, L.M. Brass. et al. // *Stroke*. 2003; 34: 699–704.

20. Guidelines for Management of Ischaemic Stroke of the European Stroke Organisation, 2008 <http://www.eso-stroke.org/recommendations>.

21. Gusev, E.I. Ishemicheskiy insul't. Sovremennoe sostoyanie problemy / E.I. Gusev, M.Yu. Martynov, P.R. Kamchatnov // *Doktor.ru*. Moscow; 2013, 5 (83): 2–7 (in Russian).

22. Maksimovich, Ye. N. Epidemiology of ischemic strokes in the Grodno region (Belarus) / Ye. N. Maksimovich, T.P. Pronko, N.Ye. Maksimovich // *Abstr. of the European stroke conference*. – Viena. – 2015. – P. 178.

23. Sacco, S. E. Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population / S. E. Sacco, J. P. Whisnant, J. P. Broderick // *Stroke*. – 1991. – V. 22. – P. 1236–1241.

24. Suslina, Z.A. Insul't: otsenka problemy (15 let spustya) [Stroke: the review of the problem (15 years later)] / Suslina Z.A., Piradov M.A., Domashenko M.A. // *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. – 2014. – V. 11. – P. 5–13 (in Russian).

25. Vital Signs: Recent trends in stroke death rates – United States, 2000–2015. – *MMWR* – 2017. – P. 66.

ГЛАВА 1. ПОНЯТИЕ О БИОЭНЕРГЕТИКЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Биоэнергетическая функция клеток головного мозга поддерживается за счет непрерывного потребления глюкозы и аэробного синтеза АТФ в митохондриях. В покое головной мозг (ГМ) потребляет до 20% получаемого организмом человека кислорода. В нормальных условиях эффективное биологическое окисление является основным источником богатых энергией фосфатных соединений, необходимых для обновления структур, соответствующей функциональной активности органов и тканей.

В мозге последствия гипоксии наиболее выражены. Основной потребитель энергии в мозге – фермент АТФ-аза, поддерживающий электрическую активность нейронов. У взрослых потребление кислорода мозгом составляет в среднем 3–3,5 мл/100 г/мин, у детей – 3,5–6 мл/100 г ткани.

Доставка кислорода определяется уровнем мозгового кровотока, который в среднем составляет 50 мл/100 г/мин, в сером веществе мозга – 80 мл/100 г/мин, в белом – 20 мл/100 г/мин.

Общий мозговой кровоток составляет примерно 750 мл/мин и зависит от уровня системного артериального давления. При этом колебания артериального давления в пределах 60–160 мм рт.ст. не влияют на мозговой кровоток вследствие его ауторегуляции.

Потребность мозга в кислороде, по сравнению с таковой у других органов, чрезвычайно велика. Основной путь получения энергии в мозге – аэробный распад глюкозы. Энергетические потребности ГМ, необходимые для нормальной функциональной активности нейронов, составляют примерно 1046 Дж или 250 кал в минуту, обеспечиваются на 95% за счет аэробного гликолиза. Потребление глюкозы мозгом в среднем составляет 5 мг/100г/мин. Потребление кислорода и потребление глюкозы изменяются параллельно. Глюкоза – единственный энергетический субстрат, поступающий в нервную ткань, который в норме может быть использован ее клетками для образования АТФ. Проникновение глюкозы в мозг не зависит от

действия инсулина, который не проникает через гематоэнцефалический барьер. Влияние инсулина проявляется лишь в периферических нервах. Поэтому необходимым условием энергетического обеспечения нервных клеток является постоянный и непрерывный приток глюкозы и кислорода из кровеносного русла.

Жесткая зависимость от поступления глюкозы обусловлена тем, что содержание гликогена в нервной ткани крайне мало (0,1% от массы мозга) и не может обеспечить мозг энергией даже на короткое время. Так как, нервные клетки получают энергию преимущественно за счет аэробного окисления глюкозы, гипогликемия для мозга не менее опасна, чем гипоксия. Даже при кратковременной гипоксии и/или гипогликемии (при уровне глюкозы в крови менее 2,2 ммоль/л) в нервной ткани ингибируется образование АТФ, вследствие чего быстро развивается коматозное состояние и происходят необратимые изменения в мозге.

Высокая скорость потребления глюкозы нервными клетками обеспечивается работой высокоактивной гексокиназы мозга, которая обладает в 20 раз большей активностью, чем соответствующий изофермент печени и мышц. При повышенном энергопотреблении возможность ускорения реакций цикла трикарбоновых кислот отсутствует, в связи с чем высокая скорость аэробного гликолиза в нормальных условиях и особенности углеводного обмена ограничивает компенсаторные возможности нервных клеток при гипоксии.

Биоэлектрическая активность коры определяется потреблением кислорода, которое является максимальным в сером веществе коры больших полушарий. Наиболее чувствительны к гипоксии нейроны гиппокампа и мозжечка.

Достаточный уровень аэробного гликолиза определяется газовым составом крови, ее кислотно-основным состоянием, содержанием гемоглобина, глюкозы, уровнем мозгового кровотока.

Человеческий мозг использует глюкозу в качестве единственного источника энергии (около 75–100 мг/мин). При аэробном расщеплении из одной молекулы глюкозы образуется

36 молекул АТФ, а при анаэробном только две вместе с молочной кислотой.

Клеткам мозга требуется постоянное поступление АТФ для поддержания их стабильности и сохранения ионов калия K^+ внутри клетки ионов натрия и кальция снаружи. Так как мозг не в состоянии аккумулировать энергию, то ему требуется постоянное поступление оксигенированной крови.

В норме уровень мозгового кровотока в среднем равняется приблизительно 50–60 мл/100г/мин, что при весе мозга 1300–1400 г составляет приблизительно 750–900 мл/мин. При этом потребление кислорода не превышает 3,3–3,5 мл/100г/мин. Однако распределение крови по различным отделам головного мозга неравномерно. Так, наибольший мозговой кровоток в покое (до 180 мл/100г) определяется в области задних бугорков и в сером веществе конечных отделов зрительного, слухового и соматосенсорного анализаторов. Наименьший его уровень зарегистрирован в белом веществе спинного мозга (14 мл/100г).

Следует отметить, что из крови экстрагируется лишь определенная часть кислорода в соответствии с потребностями мозга.

При снижении ПД до критического уровня (9–15 мл/100г/мин) возникают морфологические изменения в мозговой ткани с формированием зоны инфаркта, а при сохранении его на уровне 18–20 мл/100г/мин возникают грубые функциональные изменения – так называемый «функциональный паралич», без формирования зоны инфаркта. Состояние мозговой ткани при перфузии ниже порога «функционального паралича», но выше порога морфологических нарушений, получило в литературе название «зоны ишемической полутени» или «пенумбры» – зоны обратимых изменений ткани мозга.

Окисление одной молекулы глюкозы способствует образованию 38 молекул АТФ, что составляет 40% высвобождающейся в клетках энергии окисляемых субстратов (остальная энергия рассеивается в виде тепла).

Таблица 1.1. – Основные физиологические показатели, характеризующие усвоение кислорода мозгом

Гемоглобин	120–160 г/л
Парциальное давление кислорода в крови	артериальной (P_aO_2) – 80–100 мм рт.ст. (10,7–15,5 кПа)
	венозной (P_vO_2) – 37–42 мм рт.ст. (4,9–5,6 кПа)
Насыщение гемоглобина крови кислородом (HbO_2)	артериальной – 92–98%
	венозной – 70–76%
Содержание кислорода в крови	артериальной – 19–21 об. % (8,7–9,7 ммоль/л)
	венозной – 13–15 об. % (6,0–6,9 ммоль/л)
Объем мозгового кровотока	55 мл/100г/мин
Потребление кислорода тканями мозга	3,7 мл/100г/мин
Содержание глюкозы в крови	60–120 мг/100 мл (3,3–6 ммоль/л)
Потребление глюкозы тканями мозга	5,3 мг/100г/ мин
Выделение углекислого газа (CO_2) тканями мозга	3,7 мл/100г/мин
Выделение молочной кислоты тканями мозга	0,42 мл/100г/мин
Содержание молочной кислоты в крови	5–15 мг/100 мл (0,6–1,7 ммоль)
Концентрация водородных ионов в крови (рН)	артериальной – 7,36–7,44
	венозной – 7,32–7,42
Парциальное давление углекислого газа в крови	артериальной (P_aCO_2): 34–46 мм рт. ст. (4,5–6,1 кПа)
	венозной (P_vCO_2): 42–55 мм рт.ст. (5,6–7,3 кПа)
Стандартный бикарбонат крови (SB)	артериальной – 22–26 ммоль/л
	венозной – 24–28 ммоль/л

Образующийся АТФ используется мозгом для синтеза белков, липидов и нейромедиаторов (ацетилхолин, серотонин, норадреналин) – комплекса биологически активных веществ, обеспечивающих нормальное функционирование нейрональных структур, барьерной роли клеточных мембран и транспорта ионов.

Механизмы трансдукции энергии в митохондриях

Митохондрии играют ключевую роль в обеспечении энергией клеточных функций, а с другой стороны – мишенью, декодером и коммутатором внутриклеточных сигналов, генератором вторичных мессенджеров и проапоптотических факторов.

Современные представления о механизмах трансдукции энергии в митохондриальной мембране были сформированы после создания Питером Митчеллом хемиосмотической теории синтеза АТФ. Энергетические ресурсы, используемые внутренней митохондриальной мембраной, первоначально направлены на транспорт сопрягающего протона через мембрану в область с большей его концентрацией (энергизация мембраны), затем протонный градиент используется митохондрией в качестве движущей силы, способной приводить к синтезу АТФ. Изолирование митохондриальных белков Грином Д.Е. с сотрудниками привело к формированию представления о «комплексах» дыхательной цепи. В 1955 г. Чанс Б. и соавторы определили окислительно-восстановительные уровни компонентов дыхательной цепи и при добавлении АДФ к изолированным митохондриям идентифицировали участки электронтранспортной цепи (ЭТЦ) способные к трансдукции энергии.

Структурно-функциональная организация митохондрии

Митохондрия имеет две мембраны: внутреннюю (ИММ) и наружную (ОММ), и, соответственно, два отсека, отделенных друг от друга внутренней мембраной. Наружная митохондриальная мембрана проницаема для малых молекул и ионов, которые перемещаются через трансмембранные каналы, сформированные семейством интегральных мембранных белков – поринов. Имеются потенциал-чувствительные анионные каналы (порины) ОММ, которые позволяют обмениваться метаболитами между митохондрией и цитоплазмой. Внутренняя мембрана непроницаема для H^+ , и это чрезвычайно важное свойство мембраны является ключевым для митохондриальной трансдукции энергии. Химические вещества, такие как ионы и малые молекулы, которые пересекают внутреннюю мембрану, имеют специфические транспортеры. ИММ содержит интегральные белки – ключевые катализаторы окислительного фосфорилирования (дыхательные комплексы электронтранспортной цепи переноса электронов) и АТФ-синтазный комплекс.

Компоненты митохондриальной дыхательной цепи и дыхательные комплексы

Митохондриальная дыхательная цепь состоит из ряда переносчиков электронов, представляя собой простетические группы интегральных белков, которые функционируют как окислительно-восстановительные пары. Выделяют четыре транспортера электронов, или дыхательных комплексов, которые катализируют процесс переноса электронов по ЭТЦ. Помимо дыхательных комплексов в переносе электронов участвуют и низкомолекулярные переносчики (челноки), такие как убихинон и цитохром *c*. Комплекс I (NADH-убихиноноксидоредуктаза; NADH-дегидрогеназа) состоит из 42–43 различных полипептидов, включая FMN (флавинаденинмононуклеотид), содержащий флавопротеид и 6 железо-серных центров. Комплекс I по своей структуре имеет L-форму с двумя «руками»: длинной «рукой», состоящей из гидрофобного мембранного белка, находящегося в липидном слое внутренней митохондриальной мембраны, и короткой «рукой», имеющей гидрофильную часть, выступающую в матрикс и содержащую FMN и активный центр связывания NADH. Препараты комплекса I, выделенные в соответствии с процедурой Hatefi, на 1 моль FMN содержат 4 моля убихинона. Убихинон – растворимый в липидной фазе бензохинон с длинной боковой изопреноидной цепью, который способен перемещаться путем диффузии в каждом из двух слоев фосфолипидов внутренней мембраны и обеспечивать челночный перенос электронов между мембранными белками.

Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа; сукцинат-убихинон оксидоредуктаза) – мембраносвязанный компонент цикла лимонной кислоты (цикла Кребса), который функционирует как фрагмент митохондриальной дыхательной цепи. В составе комплекса II – интегрального белка имеются ковалентно связанный FAD (флавинадениндинуклеотид) и железо-серные центры, локализованные в мембранном внешнем домене, которые катализируют перенос электронов от сукцината к убихинону и гему цитохрома *b*, находящемуся в гидрофобном мембранном домене.

Комплекс III (комплекс цитохромов bc_1 ; убихинон-цитохром *c* оксидоредуктаза) состоит из 9–10 полипептидов, 3 из которых

участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. В частности, это гемы цитохромов b_{562} , b_{566} , c_1 и a ($2\text{Fe}-2\text{S}$). Кроме того, с двумя отдельными доменами комплекса III связаны две молекулы убисемихинона. Цитохром c является периферическим белком, расположенным на внутренней мембране со стороны межмембранного пространства. Цитохром c переносит электроны от комплекса I к центру Cu_A комплекса IV.

Комплекс IV (цитохром c оксидаза; цитохромоксидаза; цитохром c - O_2 оксидоредуктаза) – финальный катализатор дыхательной цепи митохондрий. Функция комплекса IV заключается в восстановлении O_2 до H_2O путем передачи четырех электронов от восстановленного цитохрома c при использовании 2-х протонов из матрикса.

Электронные переносчики и комплексы образуют функциональные ансамбли ("сборки") с характерными белок-белковыми взаимодействиями, которые обеспечивают эффективный перенос электронов. Комплексы I, III и IV взаимодействуют между собой с образованием суперкомплексов, характеризующихся определенным стехиометрическим составом.

Электрохимические потенциалы компонентов митохондриальной дыхательной цепи

Электроны, последовательно окисляя компоненты электронтранспортной цепи, поступают от доноров электронов – НАДН или сукцината к акцептору – O_2 . Комплексы I, III и IV функционируют как протонные насосы, которые «питаются» свободной энергией сопряженных окислительно-восстановительных реакций, протекающих в митохондрии, при этом катализируемое окисление и выброс H^+ являются векторными (строго направленными) и сопряженными реакциями. Движение H^+ осуществляется в направлении от матрикса к межмембранному пространству, благодаря чему матрикс заряжается «отрицательно», а межмембранное пространство – «положительно». Химическая свободная энергия падения окислительно-восстановительного потенциала электронов, проходящих через дыхательные комплексы, используется для создания протонного электрохимического

градиента (потенциала $\Delta\mu_{\text{H}}$), выражаемого в единицах электрического потенциала и называемого протон-движущей силой – Δp :

$$\Delta p \text{ (мВ)} = \Delta\psi_{\text{m}} - (2.3 RT/F) \Delta p_{\text{H}}, \text{ где}$$

$\Delta\psi_{\text{m}}$ – трансмембранный электрический потенциал внутренней митохондриальной мембраны,

Δp_{H} – градиент рН на внутренней мембране;

R, T, и F – газовая постоянная, абсолютная температура и константа Фарадея, соответственно.

При температуре 37°C $\Delta p = \Delta\psi_{\text{m}} - 60\Delta p_{\text{H}}$.

Основной вклад в создание Δp в большинстве случаев вносит $\Delta\psi_{\text{m}}$, который количественно составляет примерно 150–180 мВ, Δp равен 200–220 мВ.

Δp – движущая сила процесса фосфорилирования ADP и торможения потока электронов в контролируемом метаболическом состоянии (в отсутствие ADP).

Протонный потенциал $\Delta\mu_{\text{H}}$ состоит из двух компонентов: электрического ($\Delta\psi_{\text{m}}$) и химического или осмотического (Δp_{H}).

Биофизическая основа дыхательного контроля заключается в том, что Δp в состоянии остановить экзергоническое окисление субстратов вследствие установления равновесия между свободной энергией электронного потока между окислительно-восстановительными парами ЭТЦ и потоком H^+ между камерами митохондрии. Кроме того, мембранный потенциал обеспечивает движущую силу для переноса катионов в митохондрию, таких как K^+ и Ca^{2+} .

Роль электрохимического потенциала и $\text{F}_1\text{-ATP}$ -азного молекулярного ротора в фосфорилировании АДФ

В целом процесс окислительного фосфорилирования критически зависит от целостности и непроницаемости внутренней митохондриальной мембраны. Первая часть процесса заключается в преобразовании химического потенциала NADH и энергии окисления янтарной кислоты (сукцината) в H^+ электрохимический градиент, вторая часть – в катализируемом

АТР-синтазой эндергоническом синтезе АТР за счет использования энергии протонного градиента. Этот процесс термодинамически возможен, поскольку освобождаемая энергия при переносе электронов по ЭТЦ и движущая протонная сила сохраняют достаточно свободной энергии, приблизительно 34 кДж на моль электронной пары, чтобы привести к ресинтезу одного моля АТР, требующему ~32 кДж.

Митохондриальная АТР-синтаза (комплекс V) является АТР-азой F-типа, имеющей два компонента: F_1 – периферический мембранный белок, и F_0 – интегральный белок, являющийся неотъемлемой частью IMM. Каталитический домен F_1 – шаровидное сообщество 5 белков – α , β , γ , δ , и ϵ со стехиометрией 3:3:1:1:1, где γ -, δ -, и ϵ -субъединицы формируют основу белкового ансамбля.

Для осуществления функции комплекса V необходимо наличие АДФ. Градиенты АДФ и АТР на внутренней мембране уравниваются активностью транслоказы адениннуклеотидов, которая обеспечивает поступление АДФ в матрикс и АТР в цитозоль. Экспериментально установлено, что для синтеза одной молекулы АТР требуется перемещение в матрикс ~3–4 H^+ . Эффективность фосфорилирования в изолированной митохондрии определяется как отношение ADP/O с экспериментальными значениями 2,6–2,7 для NAD-зависимых субстратов и 1,6–1,7 – для окисления сукцината. Эти значения близки к теоретическим (2.5 и 1.5, соответственно), которые рассчитаны исходя из того, что количество перекачиваемых H^+ при переносе пары электронов равняется 10-ти в случае окисления NADH и 6-ти – в случае окисления сукцината.

Митохондриальная секвестрация Ca^{2+}

Добавление ионов Ca^{2+} к изолированным митохондриям даже в присутствии АДФ приводит к их энергозависимому захвату (секвестрации) митохондриями при прекращении синтеза АТР. Митохондрия поглощает Ca^{2+} в обмен на H^+ в процессе, приводимом в действие АТР или мембранным потенциалом, которые управляют Ca^{2+}/H^+ – насосом со стехиометрией 1:1. Митохондрии способны к накоплению большого количества Ca^{2+}

с одновременным поглощением P_i . Ca^{2+} при этом может осаждаться в матриксе в виде гидроксиапатита, что не приводит к значительному изменению концентрации его растворенной фракции. Другой путь поступления Ca^{2+} в митохондрию функционально связан с открытием Ca^{2+} – опосредованных пор высокой проницаемости. Внутримитохондриальный Ca^{2+} является аллостерическим активатором некоторых матриксных дегидрогеназ, таких как $NADH^+$ – изоцитратдегидрогеназа, пируватдегидрогеназа, α -кетоглутаратдегидрогеназа и кофактором митохондриальной NO-синтазы (mtNOS).

Непосредственным источником энергии, которую клетка использует для производства работы, служит энергия, заключенная в структуре аденозинтрифосфата (АТФ). Это очень ценное эволюционное приобретение: энергия, добытая из внешнего источника, запасается в виде «высоко энергетических связей» между фосфатными группами. АТФ легко отдает свои фосфатные группы другим молекулам, являясь незаменимым посредником для переноса химической энергии.



Рисунок 1.1 – Молекула аденозинтрифосфата

В силу особенностей своей структуры это соединение богато энергией и разрыв связей между его фосфатными группами может происходить таким образом, что высвобождающаяся энергия используется для производства работы. Запасание энергии в виде АТФ происходит в результате окислительного фосфорилирования, представляющего собой метаболический путь окисления питательных веществ.

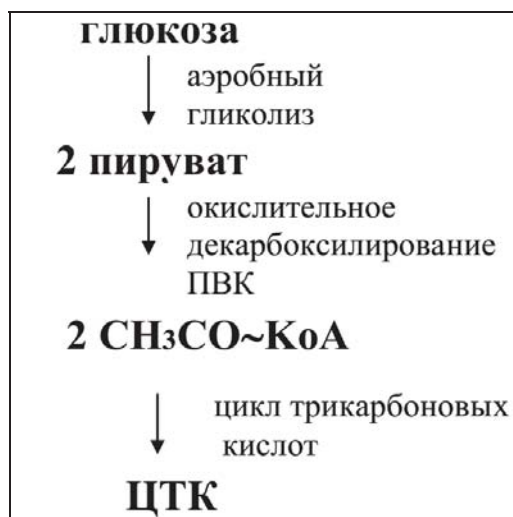


Рисунок 1.2 – Схема аэробного дихотомического распада

Дихотомический путь аэробного распада глюкозы обеспечивает клетку 38 молекулами АТФ в результате трех стадий. Первая, гликолиз, проходит в цитозоле, остальные в митохондриях.

Образование АТФ связано с дегидрированием субстрата и окислением водорода (образование H_2O) при участии НАД- и ФАД-зависимых дегидрогеназ, убихинон-дегидрогеназы, цитохромов и цитохромоксидазы (рис. 1.3).

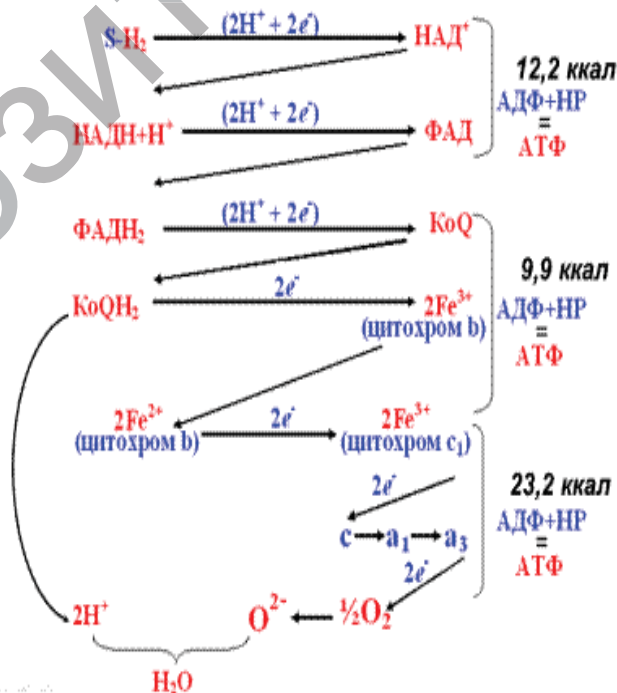


Рисунок 1.3 – Дыхательная цепь

Энергия для синтеза АТФ поступает от субстратов, содержащих высокоэнергетические электроны в ходе их дегидрирования в цикле Кребса, реализуемом в цитозоле. При окислительном фосфорилировании происходит перенос электронов от соединений-доноров к соединениям-акцепторам в ходе окислительно-восстановительных реакций.

Электроны высоких энергий извлекаются из субстратов в ходе гликолиза в цитозоле, при преобразовании пирувата в ацетил-КоА и в цикле трикарбоновых кислот (в митохондриальном матриксе).

Молекулы НАДН и ФАДН₂ переносят электроны в дыхательную цепь, локализованную во внутренней митохондриальной мембране (рис. 1.4.).

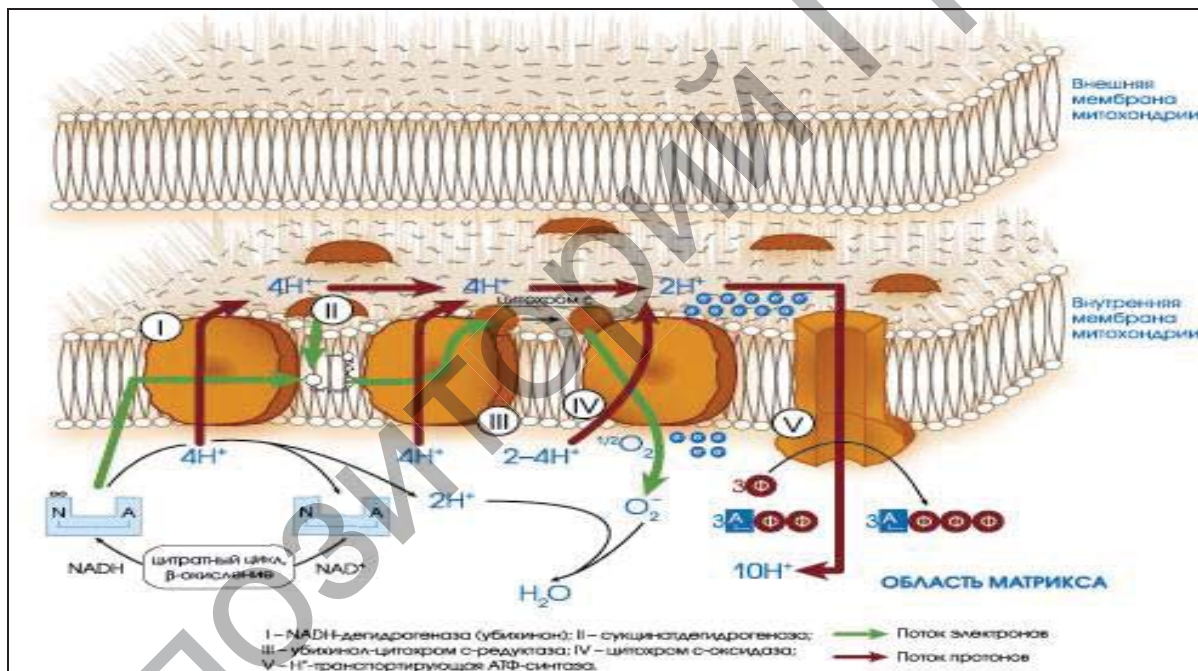


Рисунок 1.4 – Организация дыхательной цепи:

- I – НАДН-дегидрогеназа (убихинон); II – сукцинатдегидрогеназа;
- III – убихинол-цитохром с-редуктаза; IV – цитохром с-оксидаза;
- V – H-транспортирующая АТФ-синтаза (изображение: www.sciam.ru)

Комплекс ферментов дыхательной цепи находится между наружной и внутренней мембранами.



Рисунок 1.5 – Строение митохондрий

НАД-зависимые дегидрогеназы в качестве кофермента содержат НАД и НАДФ. Пиридиновое кольцо никотинамида способно присоединять электроны и протоны водорода от различных субстратов, служа главным коллектором энергии окисляемых веществ и главным источником электронов, обладающих высоким энергетическим потенциалом для цепи тканевого дыхания.

Флавиновые дегидрогеназы содержат в качестве коферментов FAD или FMN. Эти коферменты образуются в организме человека из витамина B₂. Флавиновые коферменты прочно связаны с апоферментами. Рабочей частью FAD и FMN служит изоаллоксазиновая сопряжённая циклическая система. Большинство FAD-зависимых дегидрогеназ – растворимые белки, локализованные в матриксе митохондрий, служат акцептором электронов от многих субстратов.

Цитохромная система содержит цитохромы и цитохромоксидазу, которые содержат железопорфириновую простетическую группу. Среди оксидаз важную роль играют железосодержащие ферменты и переносчики, относящиеся к цитохромной системе. Включаясь в определенной последовательности в процесс переноса электронов, передавая их от флавопротеинов на молекулярный кислород, при переносе электронов цитохромами происходит обратимое окисление и восстановление железа, в результате чего при отдаче или приобретении электрона происходит изменение их валентности. В дыхательной цепи направление транспорта электронов

определяется величиной окислительно-восстановительного потенциала цитохромов. Передавать электроны непосредственно на кислород, способна только цитохромоксидаза, обладающая наибольшим сродством к кислороду. Ингибиторами цитохромоксидазы являются СО, цианид, азид.

Окислительное фосфорилирование АДФ

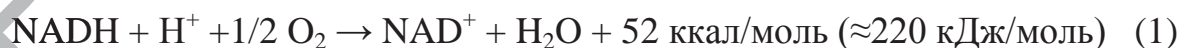
Для окислительного фосфорилирования необходима энергия движения электронов в дыхательной цепи. Так как электроны стремятся переходить от электроотрицательных систем к электроположительным, их транспорт по электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) к кислороду сопровождается снижением свободной энергии.

При сравнении величин электрохимических потенциалов переносчиков электронов видно, что снижение свободной энергии происходит на каждом этапе ЭТЦ, и энергия электронов выделяется порциями.

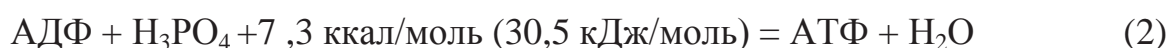
В дыхательной цепи можно выделить 3 участка, в которых перенос электронов сопровождается относительно большим снижением свободной энергии. Эти этапы способны обеспечить энергией синтез АТФ, так как количество выделяющейся свободной энергии приблизительно равно энергии, необходимой для синтеза АТФ из АДФ и фосфата. Экспериментально подтверждено, что процесс переноса электронов по ЭТЦ и синтез АТФ энергетически сопряжены.

Первый процесс – перенос электронов от восстановленных коферментов NADH и FADH₂ через ЭТЦ на кислород-экзергонический.

Например:



Второй процесс – фосфорилирование АДФ, или синтез АТФ, – эндергонический:



Синтез АТФ из АДФ и H_3PO_4 за счёт энергии переноса электронов по ЭТЦ называют окислительным фосфорилированием.

Механизм сопряжения окисления и фосфорилирования в наибольшей степени обоснован хемиосмотической теорией Митчелла, предложенной в 1961 г. Основные положения подтверждены и разработаны детально совместными усилиями многих исследователей в последующие годы.

Протонный градиент и электрохимический потенциал

Перенос электронов по дыхательной цепи от NADH к кислороду сопровождается выкачиванием протонов из матрикса митохондрий через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство. На эту работу затрачивается часть энергии электронов, переносимых по ЭТЦ.

Протоны, перенесённые из матрикса в межмембранное пространство, не могут вернуться обратно в матрикс в силу непроницаемости внутренней мембраны для протонов. Таким образом, создается протонный градиент, при котором концентрация протонов в межмембранном пространстве больше, а рН меньше, чем в матриксе. В связи с тем, что каждый протон несет положительный заряд, вследствие чего появляется разность потенциалов по обе стороны мембраны: отрицательный заряд на внутренней стороне и положительный – на внешней. В совокупности электрический и концентрационный градиенты составляют электрохимический потенциал $\Delta\mu\text{H}^+$ – источник энергии для синтеза АТФ. Так как наиболее активный транспорт протонов в межмембранное пространство, необходимый для образования $\Delta\mu\text{H}^+$, происходит на участках ЭТЦ, соответствующих расположению комплексов I, III и IV, эти участки называют пунктами сопряжения дыхания и фосфорилирования (рис. 1.6).

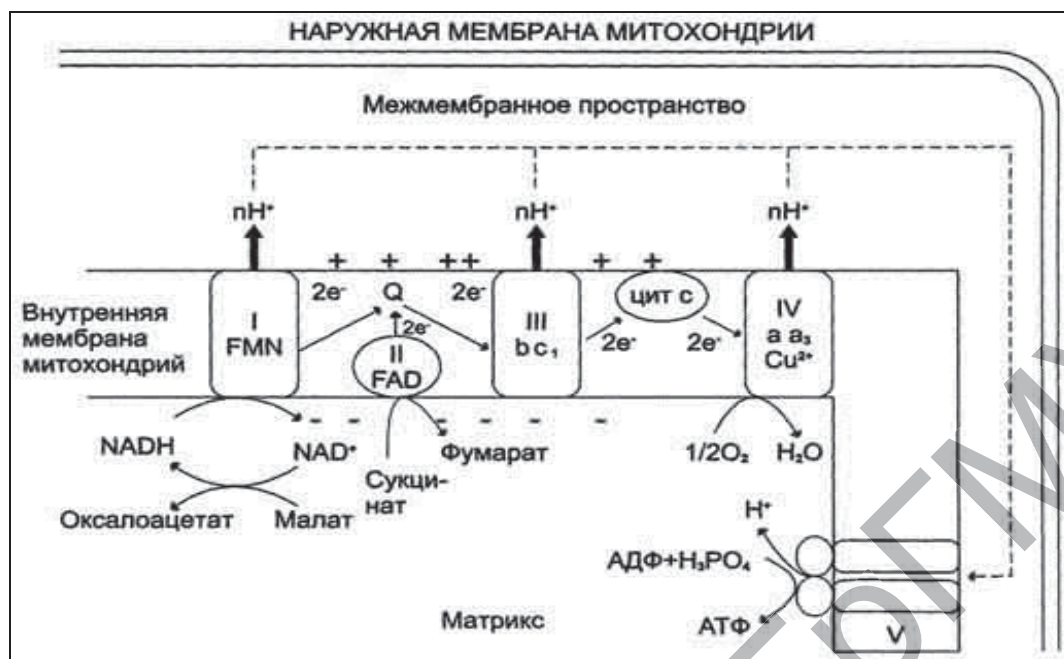


Рисунок 1.6 – Сопряжение дыхания и синтеза АТФ в митохондриях:

I – NADH-дегидрогеназа; II – сукцинат дегидрогеназа;
 III – QH_2 -дегидрогеназа; IV – цитохромоксидаза; V – АТФ-синтаза

Механизм транспорта протонов через митохондриальную мембрану в пунктах сопряжения недостаточно ясен. Известно, что важную роль в этом процессе играет КоQ. Наиболее детально механизм переноса протонов при участии КоQ изучен на уровне комплекса III (рис. 1.7).

КоQ переносит электроны от комплекса I к комплексу III и протоны из матрикса в межмембранное пространство, совершая своеобразные циклические превращения, называемые Q-циклами. Донором электронов для комплекса III служит восстановленный убихинон (QH_2), а акцептором – цитохром с. Цитохром с находится с внешней стороны внутренней мембраны митохондрий; там же располагается активный центр цитохрома с, с которого электроны переносятся на цитохром С.

Энергия протонного потенциала (электрохимического потенциала $\Delta\mu H^+$) используется для синтеза АТФ, если протоны возвращаются в матрикс через ионные каналы АТФ-синтазы.

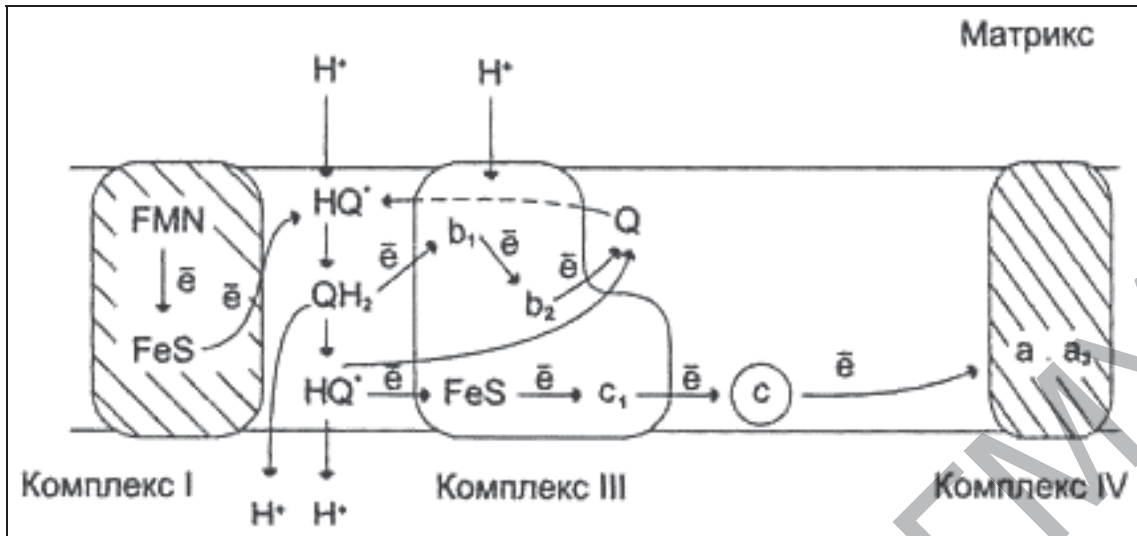


Рисунок 1.7 – Сопряжение переноса электронов через дыхательный комплекс III с транспортом H^+ через мембрану

Восстановленный убинон (QH_2) взаимодействует с Fe^{3+} гема b_1 и, восстанавливая его, освобождает протон в водную фазу, превращаясь в семихинон (HQ^{\cdot}). Электрон от гема b_1 переносится на Fe^{3+} гема b_2 . HQ^{\cdot} отдаёт второй электрон на FeS-центр, расположенный ближе к наружной поверхности мембраны; при этом второй протон оказывается в межмембранном пространстве; электрон передаётся на цитохром b_1 , а далее на цитохром c . Окисленный Q диффундирует к внутренней стороне мембраны, где получает электрон от гема b_2 и протон из матрикса, превращаясь в HQ^{\cdot} . HQ^{\cdot} получает электрон от комплекса I и протон из матрикса; в мембране образуется QH_2 , и весь процесс повторяется сначала.

В мембране существует стационарный общий фонд Q/ QH_2 , из которого каждая молекула QH_2 в одном цикле обеспечивает перенос протонов из матрикса в межмембранное пространство и электронов, которые в конечном итоге поступают на кислород. На работу, совершаемую при выкачивании протонов, расходуется часть свободной энергии, которая освобождается при переносе электронов по градиенту редокс-потенциала. Энергия электрохимического потенциала ($\Delta\mu H^+$) используется для синтеза АТФ, если протоны возвращаются в матрикс через ионные каналы АТФ-синтазы.

Строение АТФ-синтазы и синтез АТФ

АТФ-синтаза (H^+ -АТФ-аза) – интегральный белок внутренней мембраны митохондрий. Он расположен в непосредственной близости к дыхательной цепи. АТФ-синтаза состоит из 2 белковых комплексов, обозначаемых как F_0 и F_1 (рис. 1.8).

Гидрофобный комплекс F_0 погружён в мембрану. Он служит основанием, которое фиксирует АТФ-синтазу в мембране. Комплекс F_0 состоит из нескольких субъединиц, образующих канал, по которому протоны переносятся в матрикс.

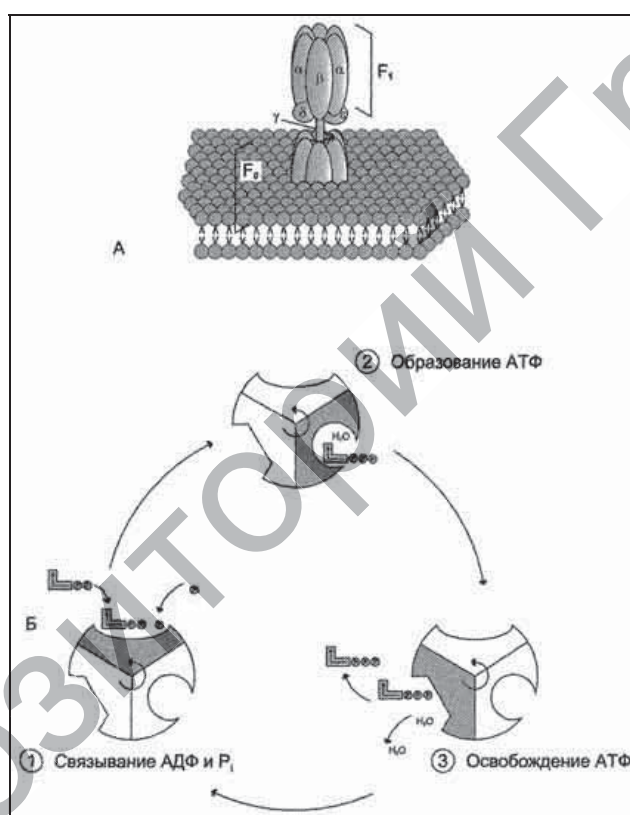


Рисунок 1.8 – Строение и механизм действия АТФ-синтазы:

А – F_0 и F_1 – комплексы АТФ-синтазы

В состав F_0 входят полипептидные цепи, которые образуют канал, пронизывающий мембрану насквозь. По этому каналу протоны возвращаются в матрикс из межмембранного пространства; белок F_1 выступает в матрикс с внутренней стороны мембраны и содержит 9 субъединиц, 6 из которых образуют 3 пары α и β ("головка"), прикрывающие стержневую часть, которая состоит из 3 субъединиц γ , δ и ϵ . γ и ϵ подвижны и

образуют стержень, вращающийся внутри неподвижной головки и связанный с комплексом F_0 .

В активных центрах, образованных парами субъединиц α и β , происходит связывание АДФ, неорганического фосфата (P_i) и АТФ.

Каталитический цикл синтеза АТФ включает 3 фазы, каждая из которых проходит поочередно в 3 активных центрах:

- 1 – связывание АДФ и H_3PO_4 ;
- 2 – образование фосфоангидридной связи АТФ;
- 3 – освобождение конечного продукта.

При каждом переносе протонов через канал F_0 в матрикс все 3 активных центра катализируют очередную фазу цикла. Энергия электрохимического потенциала расходуется на поворот стержня, в результате которого циклически изменяется конформация α - и β -субъединиц и происходит синтез АТФ.

Комплекс F_1 выступает в митохондриальный матрикс. Он состоит из 9 субъединиц (3α , 3β , γ , ϵ , δ). Субъединицы α и β уложены попарно, образуя "головку"; между α - и β -субъединицами располагаются 3 активных центра, в которых происходит синтез АТФ; γ -, ϵ -, δ - субъединицы связывают комплекс F_1 с F_0 .

Повышение концентрации протонов в межмембранном пространстве активирует АТФ-синтазу. Электрохимический потенциал $\Delta\mu H^+$ заставляет протоны двигаться по каналу АТФ-синтазы в матрикс. Параллельно под действием $\Delta\mu H^+$ происходят конформационные изменения в парах α , β -субъединиц белка F_1 , в результате чего из АДФ и неорганического фосфата образуется АТФ. Электрохимический потенциал, генерируемый в каждом из 3 пунктов сопряжения в ЭТЦ, используют для синтеза одной молекулы АТФ.

Коэффициент окислительного фосфорилирования

Окисление молекулы $NADH$ в ЭТЦ сопровождается образованием 3 молекул АТФ; электроны от FAD -зависимых дегидрогеназ поступают в ЭТЦ на CoQ , минуя первый пункт сопряжения, поэтому при этом образуются только 2 молекулы АТФ. Отношение количества фосфорной кислоты (P), использованной на фосфорилирование АДФ, к атому кислорода (O), поглощённого в процессе дыхания, называют

коэффициентом окислительного фосфорилирования и обозначают P/O. Следовательно, для NADH P/O = 3, для сукцината P/O – 2. Эти величины отражают теоретический максимум синтеза АТФ, фактически эта величина меньше.

Коэффициент P/O показывает число молекул неорганического фосфата (Фн), которое перешло в органическое состояние (АТФ) в расчете на каждый поглощенный атом кислорода. Фактически он равняется числу молекул АТФ, которые образуются при транспортировке 2-х электронов по дыхательной цепи на один атом кислорода.

Дыхательный контроль – это прямое влияние электрохимического градиента на скорость движения электронов по дыхательной цепи (т.е. на величину дыхания). В свою очередь, величина градиента напрямую зависит от соотношения АТФ/АДФ, количественная сумма которых в клетке практически постоянна ($[АТФ] + [АДФ] = const$).

Окисление субстратов и фосфорилирование АДФ в митохондриях тесно сопряжены. Скорость использования АТФ регулирует скорость потока электронов в ЭТЦ. Если АТФ не используется и его концентрация в клетках возрастает, то прекращается и поток электронов к кислороду. С другой стороны, расход АТФ и превращение его в АДФ увеличивает окисление субстратов и поглощение кислорода. Зависимость интенсивности дыхания митохондрий от концентрации АДФ называют дыхательным контролем. Механизм дыхательного контроля характеризуется высокой точностью и имеет важное значение, так как в результате его действия скорость синтеза АТФ соответствует потребностям клетки в энергии. Запасов АТФ в клетке не существует. Относительные концентрации АТФ/АДФ в тканях изменяются в узких пределах, в то время как потребление энергии клеткой, т.е. частота оборотов цикла АТФ и АДФ, может меняться в десятки раз.

Общее содержание АТФ в организме 30–50 г, но каждая молекула АТФ в клетке "живёт" меньше минуты. В сутки у человека синтезируется 40–60 кг АТФ и столько же распадается. Увеличение концентрации АДФ немедленно приводит к ускорению дыхания и фосфорилирования.

Транспорт АТФ и АДФ через мембраны митохондрий

В большинстве эукариотических клеток синтез основного количества АТФ происходит внутри митохондрии, а основные потребители АТФ расположены вне ее. С другой стороны, в матриксе митохондрий должна поддерживаться достаточная концентрация АДФ. Эти заряженные молекулы не могут самостоятельно пройти через липидный слой мембран. Внутренняя мембрана непроницаема для заряженных и гидрофильных веществ, но в ней содержится определённое количество транспортёров, избирательно переносящих подобные молекулы из цитозоля в матрикс и из матрикса в цитозоль.

В мембране есть белок АТФ/АДФ-антипортер, осуществляющий перенос этих метаболитов через мембрану (рис. 1.9). Молекула АДФ поступает в митохондриальный матрикс только при условии выхода молекулы АТФ из матрикса.

Движущая сила такого обмена – мембранный потенциал переноса электронов по ЭТЦ. Расчеты показывают, что на транспорт АТФ и АДФ расходуется около четверти свободной энергии протонного потенциала. Другие транспортеры тоже могут использовать энергию электрохимического градиента. Так переносится внутрь митохондрии неорганический фосфат, необходимый для синтеза АТФ. Непосредственным источником свободной энергии для транспорта Ca^{2+} в матрикс также служит протонный потенциал, а не энергия АТФ.

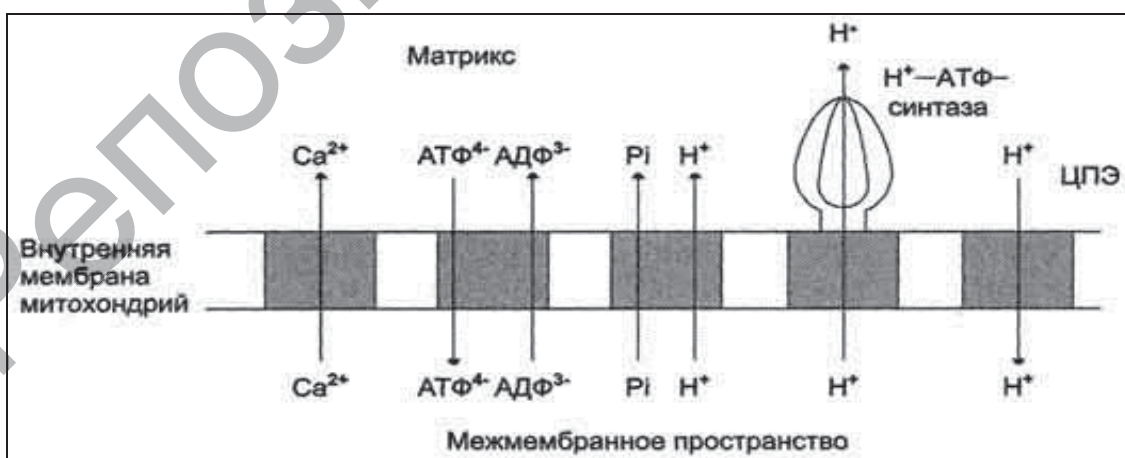


Рисунок 1.9 – Схема трансмембранного переноса веществ за счёт энергии $\Delta\mu\text{H}$

Потоки различных веществ (АТФ, АДФ, H_3PO_4 , Ca^{2+}) проходят через специфические транспортёры, при этом затрачивается энергия электрохимического потенциала мембраны.

Сопряжение дыхания и фосфорилирования

Согласно хемиосмотической теории Митчелла в сопрягающих мембранах отсутствует прямая связь ферментов дыхательной цепи с ферментами фосфорилирования. Сопряжение дыхания и фосфорилирования осуществляется через мембрану. При переносе протонов через мембрану она переходит в энергетизованное состояние с возникновением градиентов концентрации протонов и разностью электрических потенциалов поперек мембраны. При этом возникают силы, стремящиеся вернуть протоны в матрикс. Под влиянием этих сил протоны проходят по каналу фермента F_0 из внешней области к ферменту F_1 , расположенному на внутренней стороне мембраны. Энергия перемещения протонов используется этим ферментом для синтеза молекулы АТФ в матриксе. Электроны идут по дыхательной цепи, часть энергии от этих перемещений расходуется для закачивания протонов в межмембранное пространство, в результате чего ферменты F_0 и F_1 превращают кинетическую энергию движущегося протона в макроэргическую с фосфорилированием АДФ.

Разобщение дыхания и фосфорилирования

Некоторые химические вещества (протонофоры) могут переносить протоны или другие ионы (ионофоры) из межмембранного пространства через мембрану в матрикс, минуя протонные каналы АТФ-синтазы. В результате этого исчезает электрохимический потенциал и прекращается синтез АТФ. Это явление называют разобщением дыхания и фосфорилирования. В результате разобщения количество АТФ снижается, а АДФ увеличивается. В этом случае скорость окисления NADH и FADH_2 возрастает, возрастает и количество поглощенного кислорода, но энергия выделяется в виде теплоты, и коэффициент P/O резко снижается. Как правило, разобщители – липофильные

вещества, легко проходящие через липидный слой мембраны. Одно из таких веществ – 2,4-динитрофенол (рис. 1.10), легко переходящий из ионизированной формы в неионизированную, присоединяя протон в межмембранном пространстве и перенося его в матрикс.

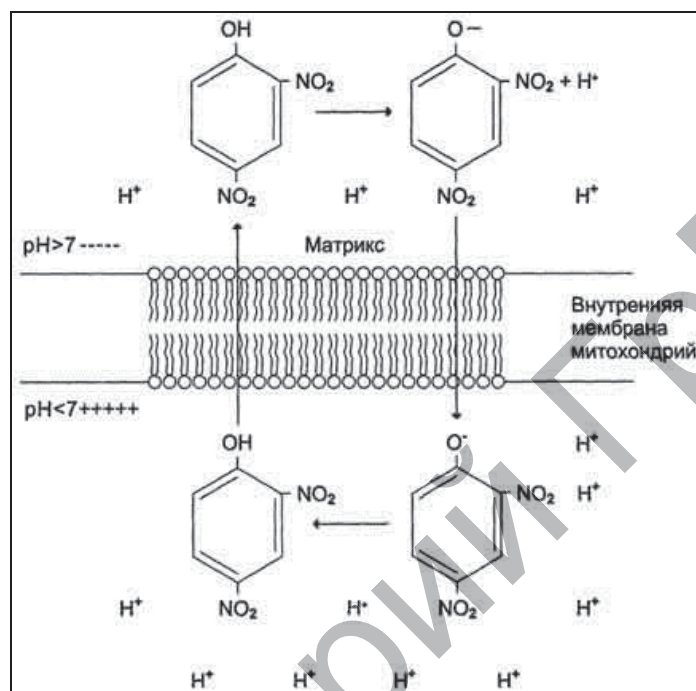


Рисунок 1.10 – Механизм разобщения дыхания и фосфорилирования

Протонированная форма 2,4-динитрофенола переносит протоны через внутреннюю мембрану митохондрий и препятствует образованию протонного градиента.

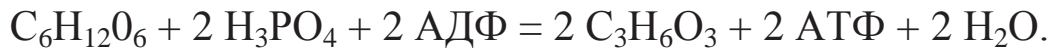
Примерами разобщителей могут быть также некоторые лекарства, например антикоагулянт дикумарол или метаболиты, которые образуются в организме, билирубин – продукт катаболизма гема, тироксин – гормон щитовидной железы. Все эти вещества проявляют разобщающее действие только при их высокой концентрации.

Анаэробный распад глюкозы (анаэробный гликолиз)

Процесс расщепления глюкозы, который протекает без кислорода и заканчивается образованием лактата из пировиноградной кислоты называют анаэробным распадом, или анаэробным гликолизом.

Этот процесс не зависит от работы митохондриальной дыхательной цепи. АТФ образуется за счет реакций субстратного фосфорилирования.

Суммарное уравнение процесса анаэробного гликолиза:



Гликолиз (от греч. *glycys* – сладкий и *lysis* – растворение, распад) – это последовательность ферментативных реакций, приводящих к превращению глюкозы в пируват с одновременным образованием АТФ.

Последовательность реакций до образования пирувата (анаэробный гликолиз).

При недостатке кислорода пируват восстанавливается в лактат:



При анаэробном гликолизе в цитозоле протекают все 10 реакций, идентичных аэробному гликолизу. Лишь 11-я реакция, где происходит восстановление пирувата цитозольным NADH, является специфической для анаэробного гликолиза.

Восстановление пирувата в лактат, обеспечивая регенерацию NAD^+ , катализируется лактатдегидрогеназой. С помощью этой реакции обеспечивается регенерация NAD^+ из NADH без участия митохондриальной дыхательной цепи в ситуациях, связанных с недостаточным снабжением клеток кислородом. Роль акцептора водорода от NADH (подобно кислороду в дыхательной цепи) выполняет пируват. Лактат выводится в кровь и утилизируется, превращаясь в печени в глюкозу, или при доступности кислорода превращается в пируват, который вступает в общий путь катаболизма, окисляясь до CO_2 и H_2O .

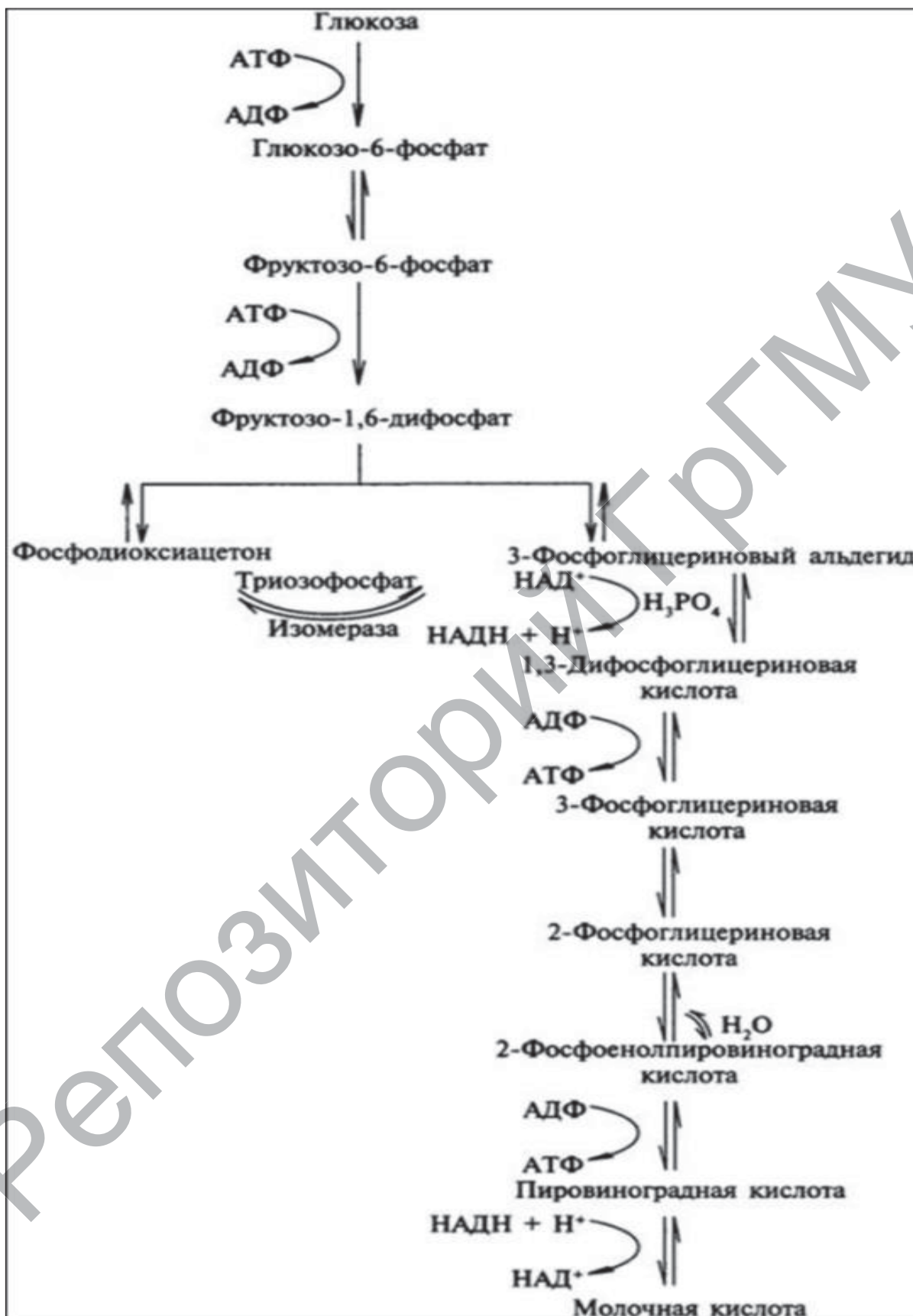


Рисунок 1.11 – Механизм разобщения дыхания и фосфорилирования

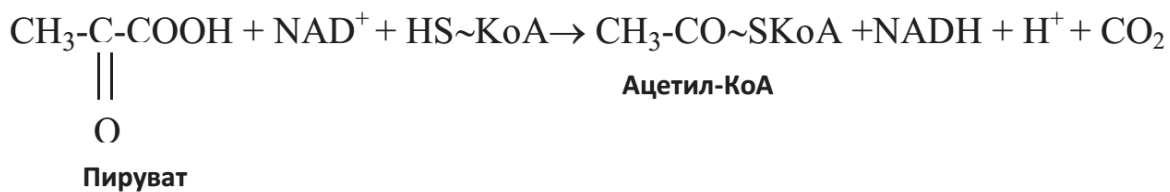


Рисунок 1.12 – Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты происходит при участии пируватдегидрогеназного комплекса

Пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК) состоит из трех типов каталитических протомеров, образующих три фермента:

- E_1 – пируватдекарбоксилазу,
- E_2 – дигидролипоилтрансацилазу,
- E_3 – дигидролипоилдегидрогеназу.

Каждый фермент содержит разное количество протомеров. Протомеры каждого из трех ферментов содержат в своем составе прочно связанные с белками коферменты. Коферменты NAD^+ , HS-CoA включаются в состав комплекса только в момент реакций и освобождаются при завершении процесса в составе конечных продуктов – Ацетил-КоА, NADH и H^+ .

Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты включает пять стадий:

1. Пируват соединяется с тиаминдифосфатом (ТДФ) в составе E_1 и подвергается гидроксильрованию.
2. Дигидролипоилтрансацилаза катализирует перенос атома водорода и ацетильной группы от ТДФ на окисленную форму липоиллизиновых групп с образованием ацетилтиоэфира липоевой кислоты.
3. На этой стадии КоА взаимодействует с ацетильным производным E_2 , в результате чего образуется ацетил-КоА и полностью восстановленный липоильный остаток, простетическая группа E_2 .
4. Дигидролипоилдегидрогеназа (E_3) катализирует перенос атомов водорода от восстановленных липоильных групп на ФАД, простетическую группу фермента E_3 .
5. Восстановленный ФАДН₂ передает водород на NAD^+ с образованием НАДН. ПДК поставляет в дыхательную цепь

электроны вместе с НАДН, а также обеспечивает синтез 3 моль АТФ на 1 моль пирувата путем окислительного фосфорилирования. Повышение концентрации НАД⁺ стимулирует окислительное декарбоксилирование пирувата, повышение концентрации АТФ и НАДН снижает скорость этого процесса.

Атомы водорода, освобождающиеся в окислительно-восстановительных реакциях, доставляются в ЭТЦ при участии NAD- и FAD-зависимых дегидрогеназ, в результате чего происходят синтез воды и окислительное фосфорилирование АДФ. Связь между атомами углерода в ацетил-КоА устойчива к окислению.

Цикл лимонной кислоты включает следующую последовательность реакций:

1. Образование цитрата из оксалоацетата. Фермент: цитрат синтетаза.
2. Превращение цитрата в изоцитрат. Фермент: аконитаза.

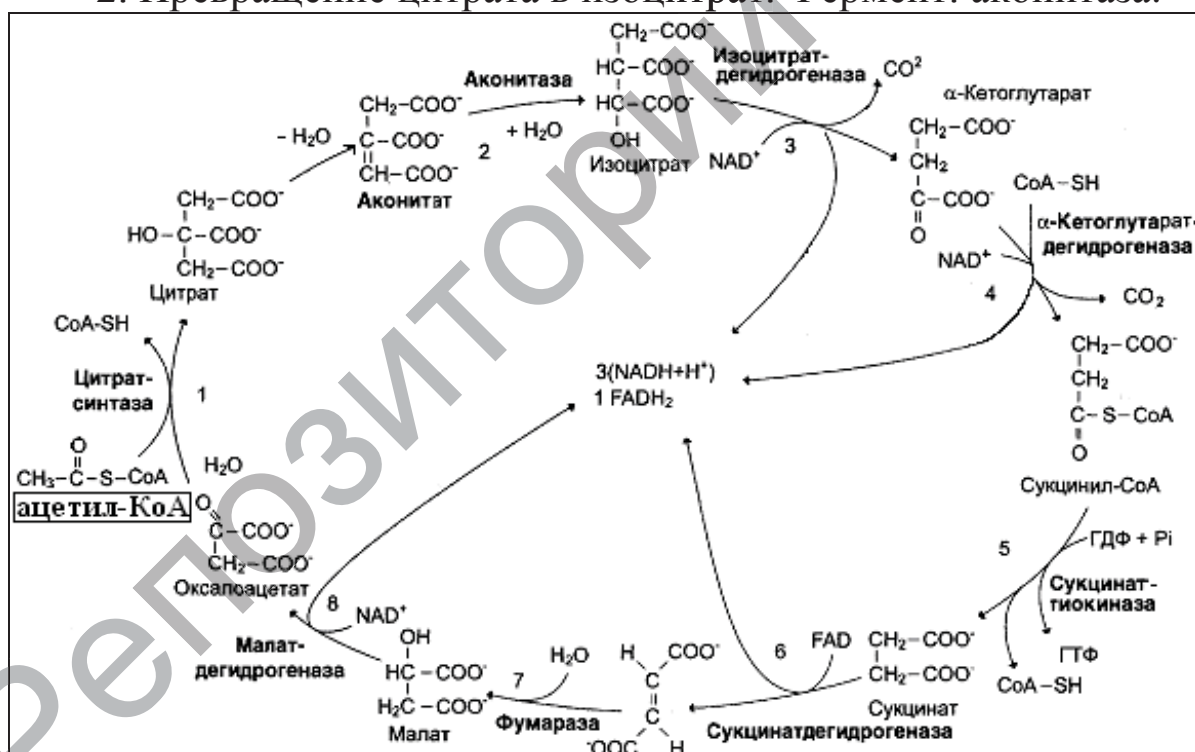


Рисунок 1.13 – Цикл лимонной кислоты: последовательность реакций и характеристика ферментов

3. Окислительное декарбоксилирование изоцитрата. Образуется α-кетоглутарат. Фермент: изоцитратдегидрогеназа, (две формы: один с коферментом НАД⁺, второй – НАДФ⁺).

4. Окислительное декарбоксилирование α -кетоглутарата. Образуется сукцинил-КоА. Фермент: α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс.

5. Превращение сукцинил-КоА в сукцинат. Фермент: сукцинаттиокиназа.

6. Дегидрирование сукцината. Образуется фумарат. Фермент: сукцинатдегидрогеназа.

7. Образование малата из фумарата. Фермент: фумараза.

8. Дегидрирование малата. Образуется оксалоацетат. Фермент: НАД-зависимая малатдегидрогеназа.

На каждый ацетильный остаток, включённых в цитратный цикл образуется 12 молекул АТФ (благодаря окислительному фосфорилированию 3 АТФ от трех НАД, 2 АТФ – один ФАД и последний благодаря субстратному фосфорилированию). Восстановленные коферменты (3 молекулы НАДН и одна молекула ФАДН₂) отдают электроны на кислород.

Глюкоза используется как основной вид топлива в головном мозге. Источником углеводов организма служат углеводы пищи – главным образом крахмал и гликоген, а также сахароза и лактоза. Кроме того, глюкоза может образовываться в организме из аминокислот, а также из глицерина, входящего в состав жира.

Основные источники глюкозы в организме: пища, распад резервного полисахарида гликогена, синтез глюкозы из неуглеводных предшественников (главным образом из гликогенных аминокислот) – глюконеогенез.

Анаэробный распад глюкозы энергетически малоэффективен. Аэробный распад – основной путь катаболизма глюкозы у человека и других аэробных организмов.

Субстратное фосфорилирование связано с передачей макроэргического фосфата или энергии макроэргической связи какого-либо вещества (субстрата) на АДФ. К таким веществам относятся метаболиты гликолиза (1,3-дифосфоглицериновая кислота, фосфоенолпируват), цикла трикарбоновых кислот (сукцинил-SКоА) и креатинфосфат. Энергия гидролиза их макроэргической связи выше, чем 7,3 ккал/моль у АТФ, и роль указанных веществ сводится к использованию этой энергии для фосфорилирования молекулы АДФ до АТФ.

Литература

1. Boumans, H. The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit / H. Boumans, L.A. Grivell, J.A. Berden // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 4872–4877.
2. Boveris, A. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone / Boveris A., Cadenas E. // *IUBMB Life.* – 2000. – Vol. 50. – P. 245 – 250.
3. Boyer, P.D. ATP synthase – past and future / P.D. Boyer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1365. – P. 3–9.
4. Brookes, P.S. Mitochondrial nitric oxide synthase / P.S. Brookes // *Mitochondrion.* – 2004. – Vol. 3. – P. 187–204.
5. Brown, G.C. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols / G.C. Brown, V. Borutaite // *Biochim Biophys Acta.* – 2004. – Vol. 1658. – P. 44–49.
6. Carafoli, E. Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship / E. Carafoli // *Trends Biochem. Sci.* – 2003. – Vol. 28. – P. 175 – 181.
7. Cecchini, G. Function and structure of complex II of the respiratory chain / G. Cecchini // *Annu. Rev. Biochem.* – 2003. – Vol. 72. – P. 77–109.
8. Chance, B. Electron transfer: pathways mechanisms and controls / B. Chance // *Annu. Rev. Biochem.* – 1977. – Vol. 46. – P. 967 – 980.
9. Chance, B. The respiratory chain and oxidative phosphorylation / B. Chance, G.R. Williams // *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* – 1956. – Vol. 17. – P. 65 – 134.
10. Chavez J.C., Hurko O., Barone F.C. et al. Pharmacologic interventions for stroke: looking beyond the thrombolysis time window into the penumbra with biomarkers, not a stopwatch. *Stroke*, 2009; 40 (10): e558 – 563.
11. Crofts, A.R. The cytochrome bc₁ complex: function in the context of structure / A.R. Crofts // *Annu. Rev. Physiol.* – 2004. – Vol. 66. – P. 689 – 733.
12. Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts / F. Diaz [et al.] // *Mol Cell Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 4872 – 4881.
13. Friedrich, T. The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System / T. Friedrich, B. Bottcher // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1608. – P. 1 – 9.
14. Gellerich, F.N. The control of brain mitochondrial energization by cytosolic calcium: The mitochondrial gas pedal // F.N. Gellerich, Z. Gizatullina, T. Gainutdinov et al. // *Iubmb. Life.* – 2013. – V. 8. – P. 1002 – 1031.
15. Hatefi, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system / Y. Hatefi // *Annu. Rev. Biochem.* – 1985. – Vol. 54. – P. 1015 – 1069.
16. Hinchliffe, P. Organization of iron–sulfur clusters in respiratory complex I / P. Hinchliffe, L.A. Sazanov // *Science.* – 2005. Vol. 309. – P. 771 – 774.

17. McCormack, J.G. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism / J.G. McCormack, A.P. Halestrap, R.M. Denton // *Physiol. Rev.* – 1990. – Vol. 70. – P. 391 – 425.

18. Mitchell, P. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria / P. Mitchell, J. Moyle // *Eur. J. Biochem.* – 1969. – Vol. 7. – P. 471 – 484.

19. Robertson, J.D. Outer mitochondrial membrane permeabilization: an open-and-shut case? / J.D. Robertson [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2003. – Vol. 10. – P. 485 – 487.

20. Schagger, H. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria / H. Schagger, K. Pfeiffer // *EMBO J.* – 2000. – Vol. 19. – P. 1777 – 1783.

21. Selivanov, V.A. Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain / [V.A. Selivanov [et al.]] // *Plos. comput. biol.* 2011. – Vol. 7. – P.1001 – 1115.

22. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation–reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents / V. Petronilli [et al.] // *J Biol Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 16638 – 16642.

ГЛАВА 2. ПАТОГЕНЕЗ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ

При ишемии ГМ гипоксия играет роль центрального звена патогенеза и вследствие тяжелых последствий представляет угрозу жизни пациента. Основным последствием гипоксии является энергодефицит, который в дальнейшем определяет развитие патобиохимического каскада повреждения нейронов.

Ограничение доставки кислорода кровью или его поступления из крови в клетки тканей из-за нарушения работы дыхательной цепи митохондрий, истощения клеточных запасов макроэргов приводит к замедлению обменных процессов вследствие биоэнергетических нарушений.

Основными факторами риска ишемического инсульта являются: артериальная гипертензия, сахарный диабет, сниженная физическая активность, курение, злоупотребление алкоголем, патология сердечно-сосудистой системы (сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, фибрилляция предсердий), гиперхолестеринемия, а также гомоцистеинемия – вероятный фактора риска, привлекающий большое внимание.

Метаболические изменения в ответ на развитие острой фокальной ишемии головного мозга развиваются в закономерной последовательности. При снижении мозгового кровотока менее 55 мл/100 г ткани в 1 минуту начинается торможение синтеза белка в нейронах, ниже 35 мл/100 г активируется анаэробный гликолиз, а дальнейшее снижение кровотока до 20 мл/100 г ткани ведет к выраженному нарушению энергетического обмена, аноксической деполяризации клеточных мембран с большой вероятностью гибели клетки. В области мозга с выраженным снижением кровотока (менее 10 мл/100 г в 1 мин) в течение 6–8 мин с момента развития острой ишемии развивается необратимое повреждение с образованием ядра инфаркта (центральная зона) ("сердцевина", или "ядерная" зона, ишемии), а в течение нескольких часов вокруг центральной зоны формируется зона ишемии, еще жизнеспособная ткань (с уровнем кровотока выше 20 мл/100 г в 1 мин) – так называемая зона

"ишемической полутени", или пенумбры (penumbra).

Понятие "церебральная ишемия" подразумевает динамический процесс и потенциальную обратимость вызываемых изменений. В течение нескольких часов центральный "точечный" инфаркт окружен зоной "ишемической полутени", или пенумбры, в которой в целом сохранен энергетический метаболизм и присутствуют лишь функциональные, но не структурные изменения. Именно пенумбра является главной мишенью терапии инсульта в первые часы и дни заболевания.

Церебральная ишемия, или циркуляторная гипоксия мозга, является процессом, представляющим собой метаболический этап патогенеза ишемического инсульта, в основе которого лежат универсальные реакции ткани мозга на повреждающие воздействия или изменения окружающей среды, в том числе нарушения функционирования обеспечивающих жизнедеятельность мозга сосудистых систем.

До 60-х годов XX века в ангионеврологии доминировало представление о том, что при остром нарушении мозгового кровообращения ишемическое повреждение возникает сразу и необратимо. Только в конце 70-х–начале 80-х годов XX века были сделаны первые попытки раскрыть механизмы последовательного изменения функционального состояния и морфологии ткани мозга на фоне ишемизации. Это позволило сформулировать положение о том, что понятие "церебральная ишемия" подразумевает динамический процесс и предполагает потенциальную обратимость вызываемых изменений, не являясь тождественным понятию "инфаркт мозга", отражающему формирование необратимого морфологического дефекта.

Установлено, что степень повреждающего действия ишемии определяется, прежде всего, глубиной и длительностью снижения мозгового кровотока. Область мозга с наиболее выраженным снижением кровотока (менее 10–15 мл) становится необратимо поврежденной очень быстро, в течение 6–8 мин с момента развития ишемии. В течение нескольких часов центральный "точечный" инфаркт окружен ишемизированной, но жизнеспособной тканью – зоной "ишемической полутени", или

пенумбры, в которой еще сохранен энергетический метаболизм и развиваются лишь функциональные, но не структурные изменения. Это область "критической", или "нищенской", перфузии, где нейрональная функция снижена потому, что не обеспечиваются метаболические запросы ткани, но клетки остаются жизнеспособными, с сохраненным ионным гомеостазом. Вследствие того, что резерв локальной перфузии исчерпан, нейроны в области пенумбры становятся чувствительными к любому дальнейшему падению перфузионного давления, вызванному, например, вторичной гиповолемией (после дегидратации), неадекватной гипотензивной терапией, ортостазом. За счет зоны пенумбры происходит постепенное увеличение размеров инфаркта.

Область "ишемической полутени" может быть спасена путем восстановления адекватной перфузии ткани мозга и применения нейропротекторных средств. Именно пенумбра является главной мишенью терапии инсульта в первые часы и дни заболевания.

Пенумбра – область ишемического поражения мозга, характеризующаяся обратимыми метаболическими и структурно-функциональными изменениями. Нейроны в области пенумбры становятся чувствительны к дальнейшему падению перфузионного давления, вызванному вторичной гиповолемией, неадекватной гипотензивной терапией, быстрым вставанием больного. За счет зоны пенумбры происходит постепенное увеличение размеров инфаркта. Эта зона может быть спасена восстановлением адекватной перфузии ткани мозга и применением нейропротективных средств. Именно пенумбра является главной мишенью терапии в первые часы и дни после развития инсульта.

Длительность существования пенумбры индивидуальна у каждого пациента. Она определяет обратимость патологических изменений в этой зоне или границы временного периода – «терапевтического окна», на протяжении которого лечебные мероприятия наиболее эффективны и способны ограничить объем инфаркта. Известно, что основная часть инфаркта формируется в течение 3–6 часов после появления первых очаговых симптомов,

а окончательное его формирование завершается, как правило, через 48–50 часов. Согласно источникам литературы средняя оптимальная продолжительность терапевтического окна составляет примерно 3 часа от начала острой ишемии головного мозга.

Благодаря исследованиям последних лет показана стадийность гемодинамических и метаболических изменений, происходящих в ткани мозга на различных этапах недостаточности его кровоснабжения. Современные патогенетические представления позволили предложить схему последовательных этапов "ишемического каскада" на основе их причинно-следственных связей и значимости для терапии: 1) снижение мозгового кровотока; 2) глутаматная "эксайтотоксичность"; 3) внутриклеточное накопление кальция; 4) активация внутриклеточных ферментов; 5) повышение синтеза NO и развитие оксидантного стресса; 6) экспрессия генов раннего реагирования; 7) отдаленные последствия ишемии (реакция местного воспаления, микроваскулярные нарушения, повреждения гемато-энцефалического барьера); 8) апоптоз. Каждый этап каскада является своеобразной мишенью для терапевтических воздействий. Чем на более раннем этапе прерывается каскад, тем больший эффект можно ожидать от терапии.

Развитие энергодефицита

Гипоксия приводит к уменьшению аэробного гликолиза. В анаэробных условиях из одной молекулы глюкозы продуцируется 2 молекулы АТФ, что в 19 раз меньше чем при нормальной оксигенации мозга. Гипоксия блокирует включение пировиноградной кислоты в цикл Кребса; накапливаясь, она превращается в молочную кислоту, что вызывает ацидоз в клеточных структурах мозга, межклеточном пространстве и крови капилляров. Повреждающее действие гипоксии и ацидоза на нейрональные структуры характеризуется нарушением внутриклеточного синтеза белков, аминокислот, нейромедиаторов, электрической активности нейронов. В митохондриях нервных клеток образуются радикалы кислорода,

вызывающие окисление фосфолипидов клеточных мембран (в том числе митохондриальных), приводя к их повреждению. Из-за нарушения ионного насоса внутриклеточный калий заменяется натрием, способствуя поступлению воды в нервные клетки и развитию внутриклеточного отека.

В условиях гипоксии и ацидоза изменяется метаболизм в межклеточном пространстве, происходят выраженные нарушения микроциркуляции вследствие тромбообразования.

При отсутствии поступления кислорода происходит усиление анаэробного гликолиза, повышение парциального давления углекислого газа в крови, пировиноградной и молочной кислот и др., развивается внутриклеточный ацидоз в нервных клетках, происходит нарушение мембран, функции АТФ-аз и ионных насосов, избыточное поступление натрия и воды в клетку. Гипоксическое повреждение нервных клеток создает условия для отека мозга.

Критические величины содержания кислорода в артериальной крови составляет 33–27 мм рт. ст., в венозной – 9 мм рт.ст., в митохондриях различных клеток – 1,5–2,0 мм рт.ст. При уменьшении содержания кислорода ниже критического уровня возникает состояние энергетического дефицита, приводящее к разнообразным морфологическим и функциональным нарушениям, вплоть до гибели клетки.

Функциональная активность мозга резко угнетается, что клинически проявляется прогрессирующим угнетением сознания и усилением явлений дыхательной недостаточности. Снижение напряжения кислорода ниже 30 мм рт.ст. происходит, если кровь не поступает в мозг в течение 10 с, человек при этом теряет сознание. Полное истощение запасов АТФ с необратимым повреждением нейронов возникает, если мозговой кровоток не восстанавливается в течение 3–8 минут.

Нарушения энергетического обеспечения процессов, протекающих в нервной клетке, могут быть обусловлены снижением интенсивности и эффективности синтеза АТФ в митохондриях, нарушением транспорта АТФ к местам утилизации, нарушением использования АТФ.

К гипоксии головного мозга может привести нарушение его

кровообращения (ишемия) в результате атеросклероза, тромбоза, другой причиной может быть снижение оксигенации крови при кардиореспираторном поражении, анемии, потере кислороднесущей способности гемоглобина (например, при отравлении СО).

Снижение интенсивности и эффективности синтеза АТФ, кроме дефицита кислорода, может быть вызвано нарушением транспорта субстратов (карнитина, неорганического фосфата и адениновых нуклеотидов (АДФ и АТФ), ингибированием ферментов дыхательной цепи (отравление цианидами, барбитуратами, СО), ингибированием окислительного фосфорилирования (атрактилозид), либо разобщением окисления и фосфорилирования, повышением проницаемости внутренней мембраны митохондрий.

Энергетический дефицит на начальных этапах ишемии мозга вызывает ряд метаболических и функциональных расстройств: возникает ионный дисбаланс и ацидоз, окислительное повреждение рецепторного аппарата клеток, ионных каналов, ионных насосов, вследствие чего нарушается генерация биопотенциалов, инактивируются многие ферменты, в том числе и антиоксидантной природы, нарушается синтез белка и других биомолекул. На более поздних стадиях ишемии развиваются структурные изменения в виде дезорганизации билипидного слоя клеточных мембран, в том числе и митохондриальных, что еще в большей степени усугубляет дефицит энергии АТФ. Высвобождающиеся из разрушенных органелл и клеток лизосомальные ферменты, ионы K^+ , H^+ , Ca^{2+} , продукты распада клеточных структур вызывают нарушение функции интактных клеток, способствуя гибели нейронов и распространению повреждения. Энергодефицит, как правило, сохраняется и в ранние сроки в зонах постишемической реперфузии. Так, известно, что уже через 8 часов после 15-минутной билатеральной окклюзии сонных артерий в стриатуме мозга гибнет значительная часть нейронов малого и среднего калибра, что обусловлено «реперфузионной» дезагрегацией полирибосом, окислительным повреждением полиненасыщенных жирных кислот плазматической мембраны и аппарата Гольджи.

Нарушения метаболических процессов при гипоксии

Под влиянием гипоксии и ацидоза изменяется метаболизм в межклеточном пространстве, а в капиллярах резко нарушается кровоток. Из-за ангиопареза и замедления кровотока, вызванного ацидозом, происходят интенсивная агрегация, набухание, а затем распад эритроцитов и тромбоцитов.

При снижении парциального давления кислорода ниже критических величин ранее всего изменения наступают в обмене веществ (прежде всего углеводном) и энергии, поскольку большая часть кислорода, потребляемого организмом, расходуется на окислительное фосфорилирование. Гипоксия приводит к уменьшению аэробного гликолиза. Возникает дефицит макроэргов. Уменьшение содержания АТФ приводит к одновременному увеличению АДФ и неорганических фосфатов. В головном мозге ранним признаком гипоксии является уменьшение содержания креатинфосфата.

Гипоксия блокирует включение пировиноградной кислоты в цикл Кребса; накапливаясь, она превращается в молочную кислоту, что вызывает ацидоз в клеточных структурах мозга, межклеточном пространстве и капиллярах.

Энергодефицит приводит к накоплению свободного кальция в клетке. Избыток кальция угнетает функцию митохондрий, ингибирует ферменты гликолиза, активирует мембранные фосфолипазы, способствуя разрушению мембран и накоплению свободных радикалов.

Последствием увеличения содержания Ca^{2+} в цитозоле является активация Ca^{2+} -зависимых фосфолипаз (деградация ФЛ и разрушение клеточных мембран), протеиназ (разрушение белков клеточных мембран), АТФ-аз (дефицит энергии), эндонуклеаз (активация апоптоза).

Энергодефицит связан с отставанием образования АТФ от его расходования и зависит от функциональной активности тканей. В клетках дефицит АТФ и увеличение АДФ активирует гликолиз. Это приводит к уменьшению содержания гликогена и увеличивает содержание пирувата и лактата. Происходит накопление недоокисленных продуктов: восстановленных

пиридиннуклеотидов, органических кислот цикла Кребса. Повышение концентрации молочной кислоты замедляет процесс ресинтеза гликогена, для которого необходим АТФ.

Снижение электрической стабильности мембран, увеличение их ионной проницаемости приводит к разобщению окислительного фосфорилирования в митохондриях и дальнейшему нарушению энергетического обеспечения клетки.

Результатом развивающихся нарушений является возникновение метаболического ацидоза, что вызывает нарушение баланса ионов по обе стороны мембраны клетки: внутрь клетки поступает Na^+ и вода, а из клетки выходит K^+ , что приводит к снижению потенциала покоя клетки. Повреждающее действие недостатка кислорода на мембраны также связано с прекращением синтеза их структурных элементов и образованием активных форм кислорода. Радикалы кислорода оказывают воздействие на мембранные фосфолипиды и усугубляют повреждение клеточных мембран.

Повреждающее действие гипоксии и ацидоза на нейрональные структуры характеризуется нарушением внутриклеточного синтеза белков, аминокислот, нейромедиаторов, снижается содержание основных аминокислот и глутамина, возникает отрицательный азотистый баланс, нарушается электрическая активность нейронов.

Недостаточная активность окислительных процессов приводит к ряду обменных нарушений: замедляется интенсивность обмена фосфопротеинов и фосфолипидов. В результате расстройств липидного обмена развивается кетонемия, с мочой выделяется ацетон, ацетоуксусная и бета-оксимасляная кислоты.

В клетках нарушаются окислительные реакции, лежащие в основе образования стероидных гормонов, нейромедиаторов и биогенных аминов.

Происходит деструкция митохондрий, внутриклеточного сетчатого аппарата, жировая декомпозиция протоплазмы. Завершаются эти нарушения разрушением мембраны лизосом, выходом гидролитических ферментов и автолизом клетки.

Функциональная активность мозга резко угнетается,

снижается электрическая активность нейронов, что клинически проявляется прогрессирующим угнетением сознания и усилением явлений дыхательной недостаточности.

Острое гипоксическое поражение нервных клеток создает условия для отека мозга. Его развитию способствует замедление мозгового кровотока и уменьшение венозного оттока из полости черепа, ведущее к увеличению внутрисосудистого гидростатического давления и повышению выхода жидкой части крови в межклеточное пространство. Этому также способствует усиление анаэробного гликолиза, повышение парциального давления углекислого газа в крови, пировиноградной и молочной кислот, развитие ацидоза в нервных клетках, повреждение мембран, нарушение функции АТФ-аз и ионных насосов, ведущее к поступлению натрия и воды в клетку.

В основе гипоксического повреждения нейронов лежит: клеточный ацидоз, истощение креатинфосфата, истощение адениновых нуклеотидов, увеличение внутриклеточного кальция, образование свободных радикалов, деградация мембранных фосфолипидов, нарушение внутриклеточного синтеза белков, аминокислот, нейромедиаторный дисбаланс, отек мозга, нарушение электрической активности нейронов.

Стадии развития гипоксии головного мозга

При гипоксии мозга можно выделить несколько стадий ее развития:

1 – компенсированная стадия гипоксии характеризуется сохранением запасов АТФ на нормальном или околонормальном уровне.

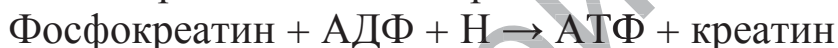
2 стадия – компенсации характеризуется ингибированием комплекса I дыхательной цепи и переключением с комплекса I на комплекс II. В это время частично сохраняется функция дыхательной цепи на уровне комплекса III, в результате чего поддерживается возможность образования АТФ с помощью цитохромоксидазы. Субстратом для этого комплекса является восстановленная форма цитохрома *c*. По мере истощения комплекса III цитохром *c* начинает покидать митохондрии.

3 стадия – истощения. Характеризуется подавлением

функции дыхательной цепи в области комплекса III – начало некомпенсируемых изменений. Далее в клетке происходит открытие ионных каналов для поддержания синтеза АТФ и нарушение их функционирования, в результате чего происходит избыточное поступление в клетку натрия, воды, формируется отек.

Превышение гидролиза АТФ при гипоксии над ее продукцией приводит к накоплению АДФ, неорганического фосфата и водорода. При снижении парциального давления кислорода в 10 раз мобилизуется система анаэробного окисления. Это усиливает гликолиз, креатин-киназные и аденилат-киназные реакции.

В мозге, который наряду с сердцем и скелетной мускулатурой относится к органам с высоким кислородным запросом, синтез АТФ поддерживается с участием фосфокреатина, который находится на внешней мембране митохондрий, откуда он поступает в места ионных насосов, где происходит креатин-киназная реакция.



Креатин возвращается в митохондрии и снова превращается в креатинфосфат

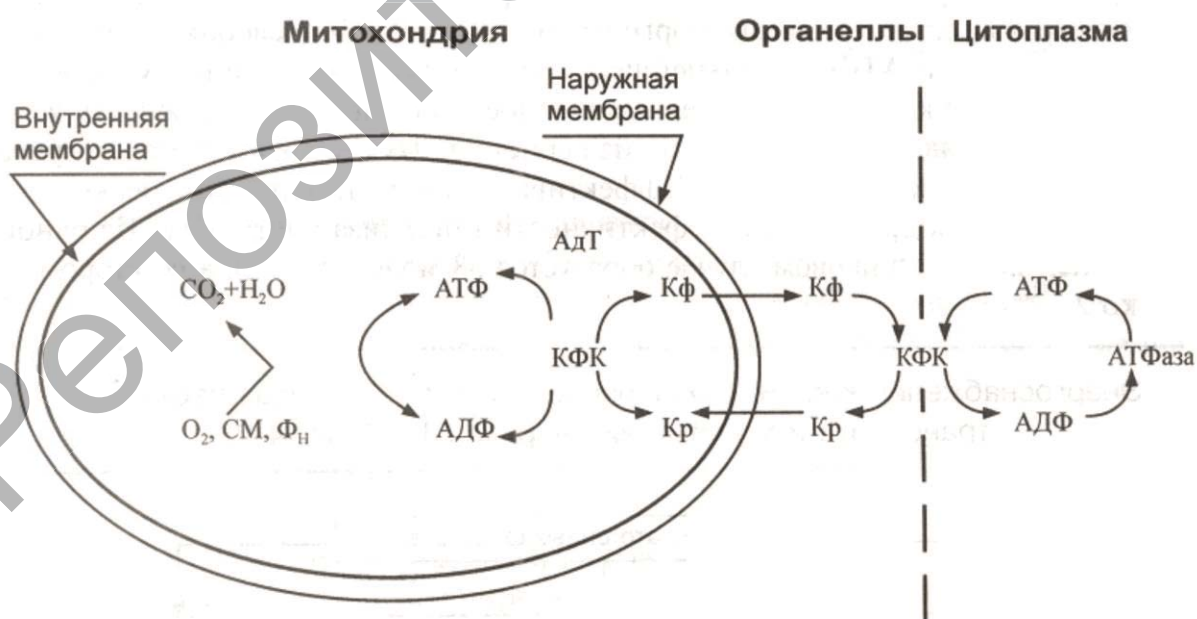
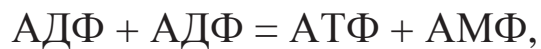


Рисунок 2.1 – Креатин-киназная реакция

Также отмечается повышение активности аденилаткиназных реакций:



при которых в результате накопления АМФ происходит образование аденозина—мощного вазодилататора и источника свободных радикалов вследствие активации ксантиноксидазы: аденозин → инозин → гипоксантин → ксантин → мочевая кислота → генерация свободных радикалов.

Последствия дефицита энергии:

- повышение анаэробного гликолиза → ацидоз → нарушение обмена веществ;
- нарушение функции Na^+/K^+ -АТФазы → гипергидратация клетки;
- нарушение функции Ca^{2+} АТФаз → ↑ Ca^{2+} в цитозоле.

Гипоксия приводит к уменьшению аэробного гликолиза. В результате функциональная активность мозга резко угнетается, что клинически проявляется прогрессирующим угнетением сознания и усилением явлений дыхательной недостаточности.

Активируется образование свободных радикалов, происходит деградация мембранных фосфолипидов, что приводит к повреждениям клеточных (в том числе митохондриальных) мембран, деструкции и гибели клеток.

Роль оксидативного стресса

Оксидативные реакции и образующиеся в результате их протекания продукты имеют важное значение в жизнедеятельности мозга и клеток всего организма. Установлено, что кислородные радикалы выполняют функции мессенджера, отвечая за нейрональную активность, регулируют мозговой кровоток, апоптоз и другие важные процессы, необходимые для

функционирования головного мозга. Кроме этого показано, что проведение нервного импульса также сопряжено с возникновением свободно-радикальных форм фосфолипидов.

На сегодняшний день сформировалось общее представление о про- и антиоксидантной системе организма. Дисбаланс между отдельными звеньями этой системы приводит к гиперпродукции кислородных радикалов и к повреждению тканей. Повреждение тканей избыточно образующимися продуктами оксидативных реакций получило название оксидативного стресса.

Общие механизмы, лежащие в основе повреждения тканей организма с участием оксидативных реакций хорошо изучены и носят универсальный характер. Однако в мозге, как и в и других органах и системах они имеют достаточно выраженные специфические особенности, что важно учитывать. Кроме этого недостаточно изучен вопрос участия оксида азота в оксидативном стрессе в мозговой ткани. Затрудняет изучение данного вопроса то, что оксид азота является веществом, которое по своей природе может быть отнесено как про- так и антиоксидантным агентам.

Источниками активных форм кислорода при ишемии и реперфузии мозга являются нейроны, а также экстранейрональные источники (эндотелиальные клетки сосудов мозга, глия, а также лейкоциты) [Wu S., 1997].

Непосредственными источниками активных форм кислорода в этих клетках при ишемии-реперфузии головного мозга являются:

- ксантин-ксантин-оксидазная система, активность которой значительно возрастает при ишемии [Saugstaad J.D., 1993, Fellman V., 1997],
- митохондриальная цепь (вследствие повышения восстановленности компонентов дыхательной цепи),
- путь образования простагландинов из арахидоновой кислоты (из-за повышения активности фосфолипаз и индуцибельной циклооксигеназы),
- синтез и распад катехоламинов,
- «респираторный взрыв» в лейкоцитах, секвестрированных в сосудах мозга и глиии мозга.

Одной из мишеней действия активных форм кислорода при ишемии мозга являются эндотелиальные клетки микроциркуляторного русла, хотя, по данным отдельных авторов, они обладают более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с эндотелиальными клетками сосудов другой локализации.

Кроме этого, активные формы кислорода проявляют токсичность, индуцируют апоптоз и некроз нейроцитов.

Высокореакционноспособные радикалы кислорода вызывают окисление биомолекул (фосфолипидов, углеводов, аминокислот и нуклеиновых кислот), а также инициируют цепные процессы перекисного окисления в мембранных липидах нервных клеток.

В результате действия активных форм кислорода образуются сшивки биополимеров, выявляются набухание митохондрий и разобщение окислительного фосфорилирования, инактивация тиоловых ферментов, участвующих в дыхании и гликолизе, разрушение липидной основы мембран.

Образующиеся при окислении свободных жирных кислот спирты, кетоны и альдегиды также повреждают действуют на цитоскелет, мембраны нейронов, повышая их проницаемость, в том числе и для кальция.

Наличие большого количества липидов, высокие энергетические потребности, высокая степень кислородного насыщения, большая концентрация железа и относительно низкий уровень антиоксидантов делают мозг весьма чувствительным к действию кислородных радикалов.

ЭТЦ как источник активных форм кислорода

Утечка электронов из ЭТЦ и непосредственное их взаимодействие с кислородом – основной путь образования активных форм кислорода в большинстве клеток.

Кофермент Q в ЭТЦ принимает от доноров последовательно по одному электрону, превращаясь в форму семихинона – CoQH^{\cdot} .

Этот радикал может непосредственно взаимодействовать с кислородом, образуя супероксидный анион O_2^- , который, в свою

очередь, может превращаться в другие активные формы кислорода:

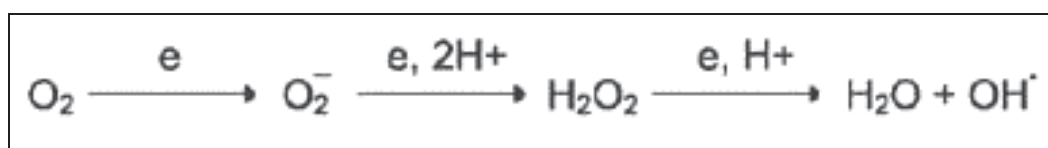


Рисунок 2.2 – Образование активных форм кислорода:

O_2^- – гидропероксидный радикал; H_2O_2 – пероксид водорода;

HO^\bullet – гидроксидный радикал

АФК – группа стабильных промежуточных продуктов восстановления кислорода, обладающая высокой химической активностью. Эти продукты образуются в клетке как ферментативным (в основном), так и неферментативным путем при неполном (одно-, двух- и трехэлектронном) восстановлении кислорода. Доля активных форм кислорода в организме невелика, не более 2–5% потребляемого в сутки кислорода переходит в активные формы.

К активным формам кислорода относят: $^1\text{O}_2$ – синглетный кислород, у него, в отличие от молекулярного (представляющего собой бирадикал с двумя неспаренными электронами с параллельными спинами, которые располагаются на разных орбиталях), все электроны спарены. Молекула активна, но неустойчива. O_2^- – супероксидный анион-радикал (супероксидный кислород), продукт одноэлектронного восстановления кислорода;

Окислительная способность АФК: $\text{O}_2 < ^1\text{O}_2 < \text{O}_2 < \text{O}_2^- < \text{H}_2\text{O}_2 < \text{HO}^\bullet$.

АФК возникают в организме при взаимодействии кислорода с металлопротеинами, содержащими катионы металлов в низших степенях окисления (гемоглобин, цитохромы), получая от них электроны; при радиоллизе воды, при переносе электронов по дыхательной цепи (на стадии убихинона).

Это меняет проницаемость биологических мембран, способствует их обновлению. При усилении процессов ПОЛ нарушается структура и функция белков, нуклеиновых кислот, клетка гибнет. Являясь активными окислителями, АФК представляют серьезную опасность для клетки. Отщепляя

электроны от многих соединений, они превращают их в свободные радикалы и инициируют цепные окислительные реакции. С токсическим действием АФК, прямым или опосредованным через ПОЛ, связано возникновение многих заболеваний и патологических синдромов (атеросклероз, некроз тканей, хронические воспаления, дегенеративные процессы в сетчатке и хрусталике глаза, в нервной системе). В противовес активным формам кислорода (они образуют оксидантную систему) в организме работает антиоксидантная система (АОС). Механизмы защиты от токсического действия кислорода: неферментативные (витамины Е, С, глутатион и др.). К ферментам, защищающим клетки от действия активных форм кислорода, относят супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу. Наиболее активны эти ферменты в печени, надпочечниках и почках, где содержание митохондрий, цитохрома P₄₅₀ и пероксисом особенно велико.

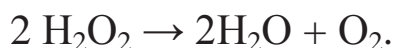
Супероксиддисмутаза (СОД) превращает супероксидные анионы в пероксид водорода:



Изоферменты СОД находятся и в цитозоле и в митохондриях и являются как бы первой линией защиты, потому что супероксидный анион образуется обычно первым из активных форм кислорода при утечке электронов из дыхательной цепи.

СОД – индуцируемый фермент, т.е. синтез его увеличивается, если в клетках активируется перекисное окисление.

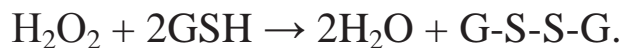
Пероксид водорода, который может инициировать образование самой активной формы ОН, разрушается ферментом каталазой:



Каталаза находится в основном в пероксисомах, где образуется наибольшее количество пероксида водорода, а также в лейкоцитах, где она защищает клетки от последствий «респираторного взрыва».

Глутатионпероксидаза – важнейший фермент, обеспечивающий инактивацию активных форм кислорода, так как он разрушает и пероксид водорода и гидропероксиды липидов.

Он катализирует восстановление пероксидов с помощью трипептида глутатиона (γ -глутамил-цистеинилглицин). Сульфгидрильная группа глутатиона (GSH) служит донором электронов и, окисляясь, образует дисульфидную форму глутатиона, в которой 2 молекулы глутатиона связаны через дисульфидную группу.



Окисленный глутатион восстанавливается глутатионредуктазой:



Глутатионпероксидаза, которая восстанавливает гидропероксиды липидов в составе мембран, в качестве кофермента использует селен (необходимый микроэлемент пищи). При его недостатке активность антиоксидантной защиты снижается.

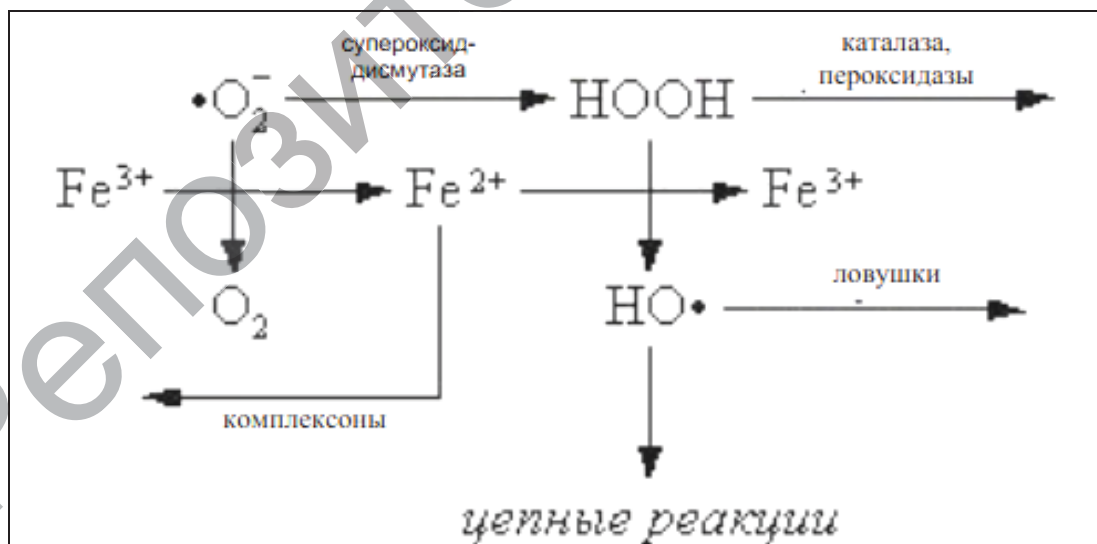


Рисунок 2.3 – Участие ионов железа и компонентов антиоксидантной защиты в окислительном стрессе

Этапы перекисного окисления липидов (ПОЛ)

- 1) кислородная инициация (кислородный этап),
- 2) образование радикалов органических и неорганических веществ (свободнорадикальный этап),
- 3) продукция перекисей липидов (перекисный этап),
- 4) образование конечных продуктов ПОЛ.

Механизмы повреждающего действия АФК и АФА

- окислительное повреждение пиримидиновых и пуриновых оснований ДНК
- образование ковалентных связей между ДНК и белками, пиримидиновыми и пуриновыми основаниями
- разрывы ДНК
- активация нуклеаз под влиянием освобождения Ca^{2+} .

Последствия окислительного стресса

- сшивки биополимеров
- образование токсических веществ (спирты, кетоны и альдегиды)
- набухание митохондрий
- разобщение окислительного фосфорилирования
- инактивация тиоловых ферментов дыхания и гликолиза
- разрушение липидной основы мембран и повышение их проницаемости
- цитостатический эффект
- нарушение: репликации, трансляции и транскрипции
- мутагенез, канцерогенез.

Роль оксида азота

NO в мозге, как и кислородные радикалы, синтезируется в тех же структурных элементах, т.е. в нейрональных (нейроциты) и экстранейрональных источниках (эндотелии, тромбоцитах, микро- и макрофагах). нейрональные и экстранейрональные источники оксида азота объединяются в нитроксидергическую систему мозга. Образование оксида азота в нитроксидергической системе мозга происходит при участии двух форм по-синтаз: конституциональной NOS (CNOS) – в эндотелии и нейроцитах и индуцибельной NOS (iNOS) – в макрофагах. Первая для своей

активности требует кальция и кальмодулина, вторая NOS индуцируется липополисахаридами, цитокинами и др. в обычных условиях NOS опосредуют базальный синтез NO, а при стимуляции количество синтезируемого NO возрастает, особенно при участии iNOS. Появились сведения о возможности индуцирования NOS в эндотелии сосудов. Кроме этого установлено, что eNOS присутствует не только в эндотелии, а и в адвентиции сосудов.

Оксид азота выполняет в мозге целый ряд важных функций. NO эндотелиального и нейронального происхождения участвует в регуляции мозгового кровотока (оказывает влияние на сосудистый тонус, обладает антитромбогенными эффектами). Кроме того оксид азота нейронального происхождения реализует медиаторные функции, отвечая за многие процессы нервной деятельности. Оксид азота макрофагального происхождения участвует в поддержании антигенного гомеостаза мозговой ткани [Mc Rae, 1995].

NO и оксидативный стресс

Участие оксида азота как одного из эффекторов оксидативных реакций дает основание подвергнуть анализу его значимость в реализации оксидативного стресса в мозговой ткани.

Широкий диапазон физиологических эффектов NO реализуется через различные механизмы, и, в частности, через участие в процессах свободно-радикального окисления. NO обладает высокой реакционной способностью, обусловленной особенностью его химической структуры (неспаренный электрон на внешней орбитали).

Время полужизни молекулы NO невелико (несколько секунд), а его взаимодействие с активными формами кислорода может иметь различный характер. Установлено, что NO может быть как источником радикалов, так и их гасителем.

В ряде клинических ситуаций имеют место нарушения гомеостаза NO, как в сторону его дефицита, так и в сторону избытка. Предполагается, что это может приводить к изменениям активности оксидативных процессов и формировать

патогенетические особенности заболеваний головного мозга [10].

Механизмы повреждения нейронов при гиперпродукции NO универсальны. Установлено, что высокие или субкритические (микромольные) концентрации NO, образуемые астроцитами при участии индуцибельной формы NO-синтазы, вызывают необратимые изменения ферментов дыхательной цепи и подавление пируватдегидрогеназы. По данным ряда авторов критические уровни оксида азота необратимо ингибируют не только ферменты дыхательной цепи, цикла Кребса, а также ингибируют синтез ДНК. Важно отметить, что и низкие (наномольные) концентрации оксида азота обратимо ингибируют цитохромоксидазу и митохондриальное дыхание.

Прооксидантное действие NO связано со способностью, реагируя с супероксид анионом, образовывать пероксинитрит.

Пероксинитрит, как и NO, может вносить существенный вклад в протекание физиологических процессов в мозге.

Пероксинитрит обладает гораздо большей реакционной способностью, чем NO супероксидный радикал, однако, по некоторым данным, меньшей, чем супероксидный радикал. Он участвует во многих биохимических реакциях в биологических системах, в том числе в нитрировании остатков тирозина в белках, инициации перекисного окисления липидов, инактивации аконитаз, подавлении транспорта электронов в митохондриях и в окислении биологических тиолов. Митохондрии могут быть ключевым звеном эффектов ONOO' при различных патологических состояниях.

Пероксинитрит – мощный оксидант, способный диффундировать на несколько микрометров, разлагающийся впоследствии с образованием таких цитотоксических окислителей как гидроксильный радикал и нитрит. Образующиеся радикалы способствуют повреждению клеточных мембран, липидов, белка, ДНК и в целом клеток, ведя к нейродегенеративным изменениям.

Пероксинитрит также самостоятельно окисляет клеточные липиды и белки, причем в последних азот этого радикала присоединяется преимущественно к остаткам тирозина. Высказано предположение, что нитрирование тирозина в клетках

ухудшает фосфорилирование и аденилирование белков, в результате чего нарушают процессы внутриклеточной сигнализации.

Следует также обратить внимание, что ONOO' является модулятором активности циклооксигеназы в клетках мозга и при воспалении. Установлено, что ONOO' неферментативным путем может окислять липопротеиды артериальной стенки и, таким образом, вносить вклад в патогенез атеросклероза [9].

Пероксинитрит также является сильным ДНК-расщепляющим агентом [10]. Повреждение ДНК считается ключевым моментом в развитии нейротоксичности. Происходящее дезаминирование нуклеиновых оснований ДНК приводит к ее фрагментации. А это, в свою очередь, приводит к АДФ-рибозилированию ядерных белков-гистонов. Такие ферментативные реакции протекают весьма интенсивно, что приводит к быстрой потере нейронами АТФ и НАДФ, т.е. энергетические запасы клетки исчерпываются и она погибает.

Однако другим биологическим аспектом NO является то, что он обладает и антиоксидантными свойствами. В механизме антиоксидантного действия NO имеет значение его способность выступать в роли ловушки радикалов, что создает химический барьер для цитотоксических радикалов кислорода. В частности, антиоксидантное действие NO может быть обусловлено и его взаимодействием с супероксид анионом, что способствует устранению радикалов и уменьшению вызванной ими цитотоксичности. В то же время с помощью метода хемилюминесценции установлено, что образование супероксид аниона несколько возрастает в присутствии L-NAME. На основании этого можно предположить, что вырабатываемый эндотелиальными клетками супероксид анион частично утилизируется в реакции с NO, защищая их от оксидативного повреждения.

В дополнение к этим химическим и биохимическим свойствам NO может лимитировать оксидативные повреждения путем модулирования клеточных и физиологических процессов. По некоторым данным, использование NO уменьшает оксидативные повреждения опосредуемые лейкоцитами, в том

числе вызванных лейкоцитарной адгезией.

Установлено, что антиадгезивные свойства NO связаны с его способностью инактивировать O_2^- .

В стенках сосудов NO оказывает также антиоксидантное действие посредством ингибирования зависимого от липооксигеназы окисления липидов и липопротеидов, реализуемых через обрыв реакций цепи липидных радикалов.

Цитопротективный эффект NO может быть обусловлен подавлением NMDA-рецепторной активности, которая в условиях дефицита L-Аргинина также может явиться причиной повышенного образования кислородных радикалов. Таким образом, NO действует как модулятор каскада арахидоновой кислоты и образования активных форм кислорода.

Однако, необходимо отметить, что не только оксид азота изменяет активность оксидативных реакций, а и наоборот, радикалы кислородного происхождения оказывают модулирующее действие на уровень оксида азота. Вследствие этого повышенное образование кислородных радикалов снижает активность физиологических эффектов оксида азота, в то время как сниженное образование напротив, вызывает увеличение этих эффектов вплоть до цитотоксичности.

Так, в частности, вазодилаторные эффекты NO могут регулироваться путем генерирования супероксид-радикала, в результате чего активность NO как вазодилатора уменьшается. Введение супероксиддисмутазы напротив, увеличивает нейротоксичность NO в культуре клеток микроглии.

Оксидативный стресс, NO, ишемия головного мозга

Как известно, в острый период ишемии головного мозга наиболее значимые изменения наблюдаются в энергообеспечении мозговых клеток.

Одной из причин снижения энергообразования в нейронах наряду с выраженным кислородным голоданием ишемического характера при ишемии-реперфузии головного мозга является зависимость от NO активация поли-АДФ-рибозо-синтетазы. Установлено, что использование ингибиторов этого фермента оказывает нейропротекторный эффект. Снижение выработки

энергии происходит также в результате модификации оксидом азота SH-групп глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы – важнейшего гликолитического энзима.

В данный период происходит и активация гиперпродукции оксида азота. Считают, что высокие концентрации оксида азота не только обуславливают выраженный эффект вазодилатации, а и одновременно оказывают на сосуды повреждающее действие. Однако сосудистые эффекты NO и пероксинитрита при ишемии могут носить как вазоконстрикторный, так и вазодилататорный характер.

Установлено, что вазоактивные эффекты пероксинитрита, образующегося при реперфузии, дозозависимы. Низкие дозы пероксинитрита (10 мкМ) вызывают сужение сосудов на 15%, дозы (25 мкМ) вызывают переменный ответ, а очень высокие концентрации (100 мкМ) – дилатацию. Считают, что вазоконстрикторное действие пероксинитрита может быть связано с его способностью ограничивать стимуляцию гуанилатциклазы гладких мышц сосудов под влиянием NO. Предполагается, что причиной повышения вазоконстрикции при атеросклерозе является также увеличение образования пероксинитрита вследствие снижения активности СОД, хотя образование NO в атеросклеротических сосудах и не изменяется. Существуют доказательства, что пероксинитрит релаксирует сосуды посредством нитрозилирования тканевого GSH или других тиолов.

Другие исследователи считают, что эффекты ONOO' в биологических системах существенно зависят от биохимических свойств среды, в которой находится прооксидант. Показано, что направленность вазоактивных эффектов ONOO⁻ зависит от внутриклеточной концентрации восстановленного глутатиона и способности митохондрий повышать гликолиз. Имеются единичные сведения о совместном вовлечении NO и свободных радикалов в патогенез преходящих ишемических повреждений.

Имеются отдельные работы, в которых показано, что при реоксигенации после ишемической гипоксии L-NNA защищает нейроны, а при добавлении в инфузионную среду L-аргинина или гемоглобина его защитное действие устраняется. С другой

стороны, по данным Mason R.V. (2000) оксид азота оказывает защитный эффект при реперфузионном повреждении.

Как видим, в последнее время опубликованы отдельные работы по исследованиям роли оксида азота в реализации оксидативных реакций при ишемических и реперфузионных повреждениях головного мозга, однако эти сведения зачастую носят противоречивый характер.

Однако многие исследователи предполагают, что повышение активности оксидативных процессов – один из патогенетических механизмов повреждения мозговой ткани при ишемических и реперфузионных процессах головного мозга. Другие считают, что при ИГМ возможно как снижение, так и увеличение активности свободно-радикальных процессов. В то же время согласно современным представлениям патогенез реперфузионных повреждений мозга чаще всего связывают с гиперпродукцией кислородных радикалов.

Многие авторы стадию ишемии рассматривают как подготовительную, когда создаются условия для активации оксидативных процессов ПОЛ, но из-за отсутствия кислорода степень их выраженности невелика. Другие считают, что ишемия (гипоксия) и реперфузия (реоксигенация) – это две стадии одного и того же процесса, приводящего к активации ПОЛ.

Таким образом, по данным литературы, участие NO в реализации оксидативного стресса, в том числе и при ишемических и реперфузионных повреждениях мозга многогранно и неоднозначно. NO способен проявлять как прооксидантные, так и антиоксидантные свойства. Такая двойственность, по-видимому, определяется как сиюминутной целесообразностью, так и способностью его выступать в качестве донора или акцептора электронов и может определяться его микроокружением. Очевидно, что как недостаток, так и избыток оксида азота в системе может явиться причиной повышения активности оксидативных процессов. При дефиците NO это реализуется путем синтеза супероксид аниона, перекисью водорода, а при избытке – пероксинитрита и образующегося из него гидроксильного радикала.

Очевидно, что NO может выполнять как защитную, так и

нейродеструктивную роль. Таким образом, из изложенного выше следует, что при включении патогенетических механизмов гиперпродукции NO и кислородных радикалов в организме и мозговой ткани в частности, наблюдаются весьма близкие по природе биологические эффекты, направленные на деструкцию клеток и их структур.

Литература

1. Ленинджер, А. Основы биохимии (в 3 томах) / А. Ленинджер // Мир. – 1985. – 321 с.
2. Buisson, A. Nitric oxide: an endogenous anticonvulsant substance / A. Buisson, N. Lakhmeche // Neuroreport. – 1993. – V. 4. – P. 444 – 446.
3. Chan, P.H. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia / P.H. Chan et al. // Brain. Pathol. – 1994. – Vol. 4, № 1. – P. 59 – 65.
4. Chance, B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / B. Chance, H. Sies, A. Boveris // Physiol. Rev. – 1979. – VOL. 59. – P. 527 – 605.
5. Chen, H. The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia / H. Chen, D. Sun // Neurol. Res. 2005. – Vol. 27, N 3. – P. 280 – 286.
6. Chernyak, B.V. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites / B.V. Chernyak, P. Bernardi // Eur J Biochem. – 1996. – Vol. 238. – P. 623 – 630.
7. Choi, Y. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation / Y. Choi // Nat. Neurosci. 2000. – V.3. – P.15 – 21.
8. Clemens, J. A. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants / J.A. Clemens // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28. – P. 1526 – 1531.
9. Darley-Usmar, V. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system / V. Darley-Usmar, // Pharm. Res. – 1996. – V. 13 (5). – P. 649 – 662.
10. Dawson, T.M. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide / T.M. Dawson, V.L. Dawson // Ann. Neurol. – 1992. – Vol. 32(3). – P. 297 – 311.
11. Desapher, S. Mitochondria as the central control point of apoptosis / S. Desapher, J.C. Martinou // Trends Cell Biol. – 2000. – Vol. 10. – P. 369 – 377.
12. Garthwaite, J., Boulton C. Nitric oxide signalling in the central nervous system// Annu. Rev. Physiol. – 1995. – V. 57. – P. 683 – 706.
13. Hossmann, K.A. Reperfusion of the brain after global ischemia: hemodynamic disturbances // Shock. – 1997. – V. 8(2). – P.95 – 101.
14. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide,

S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation / V. Tortora [et al.] // *Free radic biol med.* – 2007. – Vol. 42. – P. 1075 – 1088.

15. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes i and ii induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species / Y. Chen [et al.] // *J Cell Sci.* – 2007. – Vol. 120. – P. 4155 – 4166.

16. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis / K. Nomura [et al.] // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 351. – P.183 – 193.

17. Moran, L.K. Thiols in cellular redox signaling and control / L.K. Moran, J.M. Gutteridge, G.J. Quinlan // *Curr. Med. Chem.* 2001. – Vol. 8, N 7. – P.763 – 772.

18. Nohl, H. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria / H. Nohl, L. Gille, K. Staniek // *Biochem. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 69. – P. 719 – 723.

19. Poderoso, J. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles / J.J. Poderoso [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1996. – Vol. 328. – P. 85 – 92.

20. Robak, J. Nitric oxide donors as scavengers of superoxide anions / J. Robak, R.J. Gryglewski // *Pol. J. Pharmacol.* – 1993. – Vol. 45. – P. 51 – 58.

21. Robey, R.B. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and akt / R.B. Robey, N. Hay // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 25. – P. 4683 – 4696.

22. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol / Poderoso J.J. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 37709 – 37716.

23. Valdez, L.B. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity / L.B. Valdez, T. Zaobornyj, A. Boveris // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757. – P. 166 – 172.

ГЛАВА 3.

ЭТИОПАТОГЕНЕЗ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА РЕПЕРФУЗИОННОГО ГЕНЕЗА

Во многих случаях при восстановлении нарушенного кровотока в мозге в зоне ишемии происходит развитие постишемического реперфузионного синдрома [2]. Интенсивность развития реперфузионных повреждений определяется продолжительностью реперфузионного периода и степенью выраженности предшествующей развитию реперфузионного синдрома ишемии.

Это диктует необходимость быстрого восстановления церебрального кровотока в сроки так называемого «терапевтического окна» до развития необратимых изменений, обусловленных переходом зоны пенумбра или зоны ишемической полутени в зону некроза.

Реперфузионный синдром – комплекс метаболических и структурно-функциональных нарушений в ишемизированной ткани (пенумбре) и прилежащей по периферии области дистрофических изменений является следствием формирования дополнительной альтерации тканей факторами реперфузии и реоксигенации. Известно, что постокклюзионная реперфузия наряду с основным – репаративным, восстановительным эффектом, также оказывает и повреждающее воздействие на ткани организма, т.е. имеет место пролонгирование и потенцирование повреждения реперфузированного органа после имевшей место ишемии. Общие механизмы окислительных повреждений тканей организма при ишемии-реперфузии хорошо изучены и носят универсальный характер. Однако в мозге они имеют свои, достаточно выраженные специфические особенности, что важно учитывать. Реперфузионные повреждения мозга связаны, прежде всего, с резким усилением образования активных форм кислорода в очаге повреждения, а также со снижением активности механизмов антиоксидантной защиты.

Окислительный стресс – дисбаланс между содержанием оксидантов (активных форм кислорода – АФК) и антиоксидантов с преобладанием оксидантов.



Рисунок 3.1 – Развитие окислительного стресса

Проявлением окислительного стресса является избыточная наработка активных форм кислорода радикальной (супероксид анион O_2^- , гидроксильный радикал OH^\cdot , оксид азота NO , тиольный радикал, липидный пероксильный радикал, алкоксильный радикал RO^\cdot и др.) и нерадикальной (гипохлорит ($HOCl$), перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород (1O_2), озон, липоперекись) природы и активных форм азота радикальной природы (оксид азота, пероксинитрит, пероксоазотная кислота, $ONOOH$, нитроксил анион (NO^{2-}), нитрилхлорит (NO_2Cl) и нерадикальной (нитрозил катион NO^+ , перекись азота NO_2^{2-} , азотистый ангидрид (N_2O_3), азотистая кислота, HNO_2).

Активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА) в условиях недостаточной нейтрализации способны повреждать важнейшие биологические молекулы (липиды, белки, углеводы, ДНК).



Рисунок 3.1 – Источники свободных радикалов при ишемии-реперфузии головного мозга

Кислород, необходимый организму для функционирования ЭТЦ и многих других реакций, является одновременно и токсическим веществом, если из него образуются АФК. Активные формы кислорода повреждают структуру ДНК, белков и различные мембранные структуры клеток. В результате появления в гидрофобном слое мембран гидрофильных зон за счёт образования гидропероксидов жирных кислот в клетки могут проникать вода, ионы натрия, кальция, что приводит к набуханию клеток, органелл и их разрушению. Активация перекисного окисления характерна для многих заболеваний: дистрофии мышц (болезнь Дюшена), болезни Паркинсона, при которых ПОЛ разрушает нервные клетки в стволовой части мозга, при атеросклерозе, развитии опухолей.

Нужно отметить, что оксидативно модифицированные молекулы, образующиеся в нормальных условиях, играют важную роль в жизнедеятельности мозга и клеток всего организма. Они выполняют функции мессенджеров и влияют на нейрональную активность, вызывают адаптивную регуляцию мозгового кровотока, активности апоптоза и других внутримозговых процессов, необходимых для нормального функционирования головного мозга. В некоторых исследованиях показано, что проведение нервного импульса сопряжено с возникновением свободно-радикальных форм фосфолипидов.

На сегодняшний день сложилось общее представление о прооксидантно-антиоксидантном балансе тканей организма. Нарушение баланса между образованием и инактивацией свободных кислородных радикалов в сторону преобладания их образования приводит к повреждению тканей. Так, возобновление потока кислорода в ишемизированную ткань при восстановлении кровотока, особенно на фоне повреждения компонентов дыхательной цепи, сопровождается генерацией активных форм кислорода в митохондриях вследствие утечки электронов на молекулярный кислород с восстановленных во время ишемии комплексов электрон-транспортной цепи. Кроме того, одним из основных источников супероксиданиона при ишемии является ксантиноксидазная реакция, активность которой при этом существенно возрастает. Также определенный

вклад в развитие окислительного стресса при ишемии-реперфузии вносят и другие механизмы: путь образования простагландинов из арахидоновой кислоты (из-за повышения активности фосфолипаз и индуцибельной циклооксигеназы), аутоокисление катехоламинов, «респираторный взрыв» лейкоцитов, секвестрированных в сосудах мозга и нейроглии АФК и другие свободные радикалы проявляют свойственную им цитотоксичность, индуцируют апоптоз и некроз нейроцитов. Они вызывают окисление биомолекул (фосфолипидов, углеводов, аминокислот и нуклеиновых кислот), инициируют цепные реакции перекисного окисления мембранных липидов нейронов и других клеток. В результате их действия образуются сшивки полимерных биомолекул, повышается проницаемость митохондриальных мембран, что сопровождается набуханием митохондрий и разобщением окисления и фосфорилирования, инактивируются тиолсодержащие ферменты, участвующие в процессах гликолиза и тканевого дыхания, разрушается липидная основа клеточных мембран. Подобным же действием обладают и конечные продукты перекисной модификации клеточных мембран: спирты, кетоны, эпоксиды, альдегидокислоты, альдегиды и др., оказывающие разрушающее действие на цитоскелет, мембраны нейронов, повышая их проницаемость и приводя к гибели клетки.

Основными продуцентами АФК при ПРС являются эндотелиальные клетки, нейроны, активированные нейтрофилы, микроглиальные и паренхиматозные клетки. Одной из мишеней ишемически-реперфузионного повреждения мозга являются эндотелиальные клетки микроциркуляторного русла мозговых сосудов, хотя, по мнению отдельных авторов, они обладают и более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с эндотелиальными клетками сосудов другой локализации.

Немаловажную роль в патогенезе ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга играют реакции иммунной системы, поскольку модифицированные свободными радикалами и продуктами их действия биомолекулы приобретают антигенные свойства. В результате происходит образование антител против нейронных компонентов, таких как

основной белок миелина, нейрон-специфичная енолаза, белок 8100p, ММЭЛ-рецепторы, нейрофиламенты. Образование иммунных комплексов антиген-антитело в ЦНС инициирует главный путь активации каскада комплемента, который усугубляет последствия ИР-повреждения. Было показано образование иммуноглобулинов, специфически распознающих нитротирозин нитрованных под влияние пероксинитрита белков.

Ранее была показана активация различных изоформ NO-синтазы, что приводит к избыточной продукции NO и образованию сильного окислителя пероксинитрита, который участвует в нитровании остатков тирозина в белковых молекулах. На начальной стадии ишемии/реперфузии нейрональная NO-синтаза (nNOS) играет доминирующую роль в образовании нитротирозина в мозге, а на ее поздних стадиях образование пероксинитрита обеспечивается экспрессией индуцибельной nNOS. Накопление нитрованных белков вследствие избыточной продукции NO и пероксинитрита принято считать основными признаками нитрозативного стресса. По определению Фоминых нитрозативный стресс – это повышенная продукция оксида азота (NO) при ишемии мозга, сопровождающаяся образованием реактивных форм NO, которые участвуют в повреждении липидов и белков. Нитрозативный стресс, как правило, сопровождается окислительным стрессом, инициированным АФК. При этом в реакции NO с супероксид анион-радикалом образуется сильный окислитель пероксинитрит, который участвует в нитрозировании остатков тирозина в белковых молекулах с нарушением их функциональных свойств. Нужно отметить, что нейрональная NO-синтаза играет доминирующую роль в образовании нитротирозина в мозге на ранних стадиях ишемии и реперфузии, а на поздних стадиях ишемии образование пероксинитрита преимущественно связано с экспрессией индуцибельной NO-синтазы.

Присутствие нитрованных белков и пептидов, как отмечалось ранее, может не только нарушать функциональные свойства белков, но и активировать иммунную систему и продукцию иммуноглобулинов, специфически распознающих нитротирозин. Исследование ликвора позволяет выявить не

только продукты нитрозативного и окислительного стресса, но и иммунную реакцию в ЦНС. Так, в ликворе больных обнаружено увеличение содержания аутоантител к основному белку миелина через сутки после ишемического инсульта.

Не вызывает сомнения крайне важная роль в патогенезе практически всей церебральной патологии систем NO и протеолиза. Обе системы принимают участие в формировании адекватной функциональной активности головного мозга, обеспечивают динамическое равновесие сигнальных и модифицирующих белки стимулов, а также в патогенезе нейродегенеративных и других болезней. NO-система при физиологических условиях функционирует в мозге благодаря действию двух Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых изоформ NO-синтазы, которые присутствуют в эндотелиальных клетках и нейронах. NO, который генерируется eNOS, играет важную роль в контроле мозгового кровотока, тогда как NO, синтезируемый nNOS выступает в качестве нейротрансмиттера, модулируя нейроэндокринные функции, память и поведение. При различных патологических условиях, включая нейродегенеративные заболевания, в том числе и ишемию мозга, большие количества NO синтезируются индуцибельной NO-синтазой (iNOS), экспрессия которой повышается при локальном усилении биосинтеза провоспалительных цитокинов. Экспрессия iNOS повышена при воспалении, как ответе на ишемическое повреждение, в инфильтрующей ишемизированную зону мозга фагоцитах, эндотелии сосудов и глиальных клетках-астроцитах, олигодендроцитах и микроглии [Bachschmid et al., 2005].

Среди основных групп протеаз, участвующих в регуляции функций головного мозга, важную роль играют цистеиновые протеазы, к которым относятся три семейства – каспазы, калпаина и катепсин. Они присутствуют во всех клетках ЦНС, участвуют в ограниченном протеолизе различных молекул при физиологических стимулах, в процессах повреждения или гибели клеток. Важнейшими цистеиновыми протеазами являются каспаза-3, калпаин и катепсин В.

Калпаин-катепсиновая гипотеза гибели клетки основывается на том, что активированный эксайтотоксическими стимулами

калпаин повреждает лизосомальные мембраны и обеспечивает выход в цитозоль клетки лизосомальных протеаз, включая катепсин В, которые расщепляют клеточные белки и вызывают гибель клетки по некротическому механизму.

Взаимодействие нитрергической и протеолитических систем во многом определяется плеiotропными эффектами NO и реактивными формами азота, которые индуцируют некротическую и/или апоптотическую гибель клеток в зависимости от интенсивности повреждающего воздействия. Оксид азота и пероксинитрит могут индуцировать каспаз-зависимую и/или калпаин-опосредованную клеточную гибель с участием различных механизмов. NO может индуцировать каспаз-опосредованную гибель клеток, индуцируя выход из межмембранного пространства митохондрий цитохрома С и образование апоптосомы, активируя, таким образом, каспазу – 9, повышать экспрессию антиапоптотического белка р53, активировать митоген-зависимые протеинкиназы, изменять экспрессию белков-регуляторов апоптоза [62]. Также NO может индуцировать каспаз-независимую гибель нейронов, активируя калпаин, путем активации высвобождения возбуждающих аминокислот и образования АФК, повышать внутриклеточную концентрацию ионов кальция и нарушать нормальное функционирование митохондрий. Действие ингибиторов различных изоформ NOS подтверждает активирующий эффект NO и его производных на калпаин и эффекторную каспазу-3. Тиолы, присутствующие в активном центре протеаз чувствительны к окислительно-восстановительным модификациям и могут подвергаться S-нитрозилированию. Так, в эксперименте изучена способность NO нитровать тиолы в активном центре каспаз и ингибировать их протеолитическую активность. Также NO может ингибировать активность катепсина В, папаина и калпаина через S-нитрозилирование остатков цистеина в их активном центре. По мнению некоторых авторов, присутствие в клетке Fe-S комплексов является критическим фактором для опосредованного NO-зависимого S-нитрозилирования *in vivo*. Таким образом, NO может выступать в качестве общей регуляторной молекулы для

цистеиновых протеаз. С другой стороны, избыточная активация калпаина может приводить к расщеплению всех трех изоформ NOC-eNOS, nNOS и iNOS.

Таким образом, окислительный стресс, включая нитрозитивный, является общим механизмом повреждения для большинства видов церебральной патологии, в том числе ишемии мозга и нейродегенеративных заболеваний. Стимулы, которые ведут к усиленной продукции NO, могут быть и причиной повреждений нейронов. Одним из ярких примером такого механизма повреждения нейронов является глутаматная эксайтотоксичность [65]. По NO-зависимому пути синергично с глутаматом действует Р-амилоидный пептид, вызывающий повреждение нейронов и индуцирующий окислительный стресс. Однако изменения активности различных изоформ NOS при болезни Альцгеймера неоднозначны, а имеющиеся на этот счет данные очень противоречивы.

Эксайтотоксичность глутамата играет важную роль не только при ишемическом повреждении, но и в патогенезе эпилепсии, являясь, таким образом, одним из универсальных механизмов повреждения головного мозга. Раньше было показано, что продукция NO повышается в результате глутамат-зависимой активации nNOS после введения пентилентетразола или инъекции ингибиторов биосинтеза NO, которые снижают чувствительность к индуцированным PTZ судорогам. NO проявляет и антиконвульсантный эффект при судорогах, индуцированных каином, α -гуанидиноглутаровой кислоты и NMDA. На различных моделях судорожной активности было выявлено повышение экспрессии и активности каспазы-3, а ингибитор каспазы-3 z-DEVD-fmk снижал индуцированную судорогами гибель нейронов. Можно найти много общих звеньев в механизмах развития ишемического повреждения мозга и стрессорной реакции. Активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при стрессе является одним из первых ответов на ишемию мозга, что сопровождается повышением в крови концентрации глюкокортикоидов, внеклеточного уровня возбуждающих аминокислот, модуляцией активности и экспрессией различных изоформ NOS.

Наличие большого количества липидов, высокие энергетические потребности, высокая степень кислородного насыщения, большая концентрация железа и относительно низкий уровень антиоксидантов, нарушение гематоэнцефалического барьера делают головной мозг весьма чувствительным к окислительному повреждению. Многие исследователи предполагают, что повышение активности свободнорадикальных процессов – один из главных патогенетических механизмов повреждения мозговой ткани при ишемии и реперфузии. Однако некоторые считают, что при ИГМ возможно как снижение, так и увеличение активности свободно-радикальных процессов. В то же время большинство исследователей сходится на том, что патогенез реперфузионных повреждений головного мозга, прежде всего, связывают с гиперпродукцией АФК и АФА.

Многие авторы стадию ишемии головного мозга рассматривают как подготовительную, т.е. в это время создаются условия для активации окислительных процессов ПОЛ, но из-за отсутствия кислорода степень их выраженности невелика. Другие считают, что ишемия (гипоксия) и реперфузия (реоксигенация) – это две стадии единого процесса, приводящего к активации ПОЛ.

Одной из первых реакций ткани мозга на уменьшение мозгового кровотока является развитие лактат-ацидоза. К активации анаэробного гликолиза в ишемизированной зоне мозга приводит снижение содержания АТФ, что сопровождается усилением образования лактата и H^+ .

Однако в большинстве случаев отсутствует комплексный терапевтический подход для коррекции метаболических нарушений при ишемии, направленный на активизацию возможных механизмов восстановления, прежде всего, биоэнергетической функции нейронов.

Специфические терапевтические воздействия на митохондрии, улучшающие их функциональное состояние, должны оказывать ряд позитивных эффектов в органах, тканях и организме в целом.

В головном мозге существует более тесная, чем в других органах, связь системы энергопродукции и функциональной

активности органа. Это обусловлено исключительно высокой интенсивностью процессов образования и утилизации энергии, отсутствием в мозге запасов субстратов окисления и кислорода, наличием гематоэнцефалического барьера.

Глюкоза является основным энергетическим субстратом клеток мозга, а кинетические характеристики гликолиза допускают его 40-кратную активацию при возрастании энергозапросов. Существуют многочисленные данные, показывающие высокую стабильность содержания АТФ в ткани мозга при патологических состояниях, сопровождающихся экстремальными энергозатратами. К таковым, в частности, относятся стресс-реакция, генерализованные судорожные припадки, церебральная ишемия. По существующим представлениям, основными механизмами, поддерживающими стабильность аденилатного энергетического заряда клеток мозга наряду с окислительным фосфорилированием являются нуклеозид-дифосфат-киназная реакция, связывающая пул ГТФ и АТФ, и креатинкиназная реакция, поддерживающая взаимосвязь пула КФ и АТФ. Пул КФ в отношении АТФ выполняет буферную функцию и затрагивается только при уменьшении аденилатного энергетического заряда, либо при снижении внутриклеточного рН.

Содержание ГТФ является одним из наиболее лабильных показателей состояния системы энергопродукции головного.

Синтез ГТФ в реакции субстратного фосфорилирования при образовании из 2-оксоглутарата янтарной кислоты имеет особое значение этого звена ЦТК в регуляции энергетического метаболизма мозга.

Существующее представление о функционировании ЦТК предполагает приток субстратов в цикл через пируватдегидрогеназный комплекс. Вместе с тем, медленные ферменты (изоцитратдегидрогеназа и цитратсинтаза) в рамках теории функционирования замкнутого цикла Кребса, ограничивают возможность интенсификации продукции макроэргов органеллами, что не согласуется с данными об уровне энергозатрат мозга при экстремальных энергозапросах.

Патогенез поражения церебральных структур при ишемии

всегда однотипен, несмотря на многообразие причин. Главным патобиохимическим компонентом синдрома клеточной, тканевой и органной ишемии является энергодефицит.

Сохранение энергетического гомеостаза мозга, в том числе при ишемических церебральных расстройствах, происходит при участии ряда саморегулирующих систем, поддерживающих баланс между энергозатратными и энергопродуцирующими процессами. В условиях нарушения энергообразующих процессов, лежащих в основе ишемического церебрального инсульта, именно дисбаланс энергетического метаболизма может негативно сказаться на клетке и привести к гибели.

Синтез энергии АТФ в гликолитических циклах является главной задачей энергетического конвейера клетки, который работает как в цитоплазме, где идет анаэробное разложение глюкозы, так и в митохондриях, где функционирует цикл Кребса.

Имеются как экспериментальные, так и клинические данные, указывающие на то, что смерть нейронов не наступает сразу после ишемического повреждения. При этом у человека эксайтотоксическое повреждение нервной ткани может развиваться более медленно, чем у экспериментальных животных. В работе с использованием микродиализа отмечено значительное повышение уровня глутамата (в 300 раз по сравнению с нормой), которое сохранялось в течение нескольких дней, в коре головного мозга больного с большим инфарктом в результате окклюзии внутренней сонной артерии. Высокий уровень глутамата в цереброспинальной жидкости у пациентов с ишемическим инсультом наблюдался по крайней мере в течение 1 сут после развития заболевания. Эти данные свидетельствуют о возможности расширения терапевтического окна с целью предотвращения дальнейшего распространения необратимого ишемического повреждения мозга. Сохранение нервной ткани в области пенумбры является, таким образом, основной целью нейропротекции при ишемическом инсульте.

Получены новые данные, касающиеся их молекулярной структуры, электрофизиологических и фармакологических свойств, а также механизмов функционирования. На основании полученных данных были выделены две основные группы

глутаматных рецепторов: ионотропные рецепторы, которые связаны с мембранными ионными каналами, и метаботропные рецепторы, связанные с G-белками и модулирующие активность внутриклеточных вторичных мессенджеров. В группу ионотропных рецепторов входят 3 основных типа рецепторов, обозначенных по названию их основных селективных агонистов: М-метил-D-аспартата (NMDA-рецепторы), альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4 зоксазолпропионата (AMPA-рецепторы) и каината (каинатные рецепторы).

В связи с тем что избыточный приток в нервные клетки Ca^{2+} , который является основным триггером метаболических нарушений, приводящих к их гибели, опосредуется преимущественно NMDA-рецепторами, связанными с высокопроницаемыми для Ca^{2+} ионными каналами, эти рецепторы, в том числе их роль в эксайтотоксичности при ишемии мозга, изучались наиболее интенсивно. Показано, что NMDA-рецепторы представляют собой сложные макромолекулярные комплексы, которые включают потенциалзависимый мембранный канал, высокопроницаемый для Ca^{2+} , а также Na^+ и Cl^- , и имеют наряду с местом связывания агониста (глутамата) несколько других регуляторных мест, связывающих различные соединения, такие, как глицин, цинк, полиамины, фенциклидин, магний, которые располагаются как на мембране, так и внутри ионного канала и модулируют его открытие. NMDA-рецепторный комплекс включает также так называемое Кейох-место, состоящее из одной или более тиоловых групп, которые могут связывать окисленные производные ТЧО, что, влияя на активность ионного канала, может оказывать в зависимости от характера лиганда либо нейропротективное, либо токсическое влияние.

AMPA-рецепторы и каинатные рецепторы контролируют ионные каналы, проницаемые главным образом для моновалентных ионов Na^+ и K^+ , но также, хотя и в меньшей степени, для Ca^{2+} .

Активация метаботропных рецепторов при ишемии мозга также участвует в повышении внутриклеточного уровня Ca^{2+} , опосредуемого вторичными мессенджерами, в частности

инозитолтрифосфатом.

В настоящее время накоплено большое число данных, свидетельствующих о том, что блокада глутаматных рецепторов, главным образом NMDA-рецепторов, оказывает выраженное нейропротективное действие при ишемии мозга в исследованиях как человека, так и у различных видов экспериментальных животных. Так, в большом числе работ, авторы которых использовали различные модели фокальной ишемии мозга, показано, что антагонисты NMDA-рецепторов, а также других глутаматных рецепторов, применяемые до или во время окклюзии средней мозговой артерии, уменьшали размер ишемического инфаркта более чем на 50% по сравнению с контролем. Отмечалось также значительное увеличение выживаемости животных и уменьшение неврологического дефицита. При этом нейропротективное действие оказывали не только конкурентные антагонисты NMDA-рецепторов, блокирующие место связывания глутамата, но и селективные антагонисты других мест связывания, входящих в состав NMDA-рецепторного комплекса, в том числе антагонисты полиаминового и глицинового мест, а также нитраты, приводящие в результате связывания Кейох–места к снижению активности рецепторов и ограничению продукции пероксинитрита в ишемизированной ткани.

Роль митохондрий в патогенезе ишемического и реперфузионного повреждения

Выяснение механизмов развития дисфункции митохондрий нейронов, лежащих в основе реперфузионного повреждения, необходимо для разработки методов профилактики и направленной коррекции (лечения). При ишемии/реперфузии мозга образующиеся в митохондриальном матриксе и комплексах электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий радикалы кислорода вызывают окислительные повреждения митохондрий и их последующую дисфункцию, приводя к дефициту энергии АТФ и, в конечном итоге, к гибели нейронов по некротическому (зона некроза) либо апоптотическому механизму (зона пенумбры). Активация митохондриального пути апоптоза

инициируется чрезмерной продукцией АФК, открытием митохондриальных пор высокой проницаемостью, потерей митохондриями цитохрома С, формированием апоптосомы, экспрессией генов и синтезом проапоптотических белков семейства Bax, Bad, Bcl-x_s.

Генерация значительных количеств АФК в митохондриях может приводить к повреждению ферментов цикла Кребса и дефициту восстановленных пиридинуклеотидов, повреждению комплексов ЭТЦ и фосфолипидов митохондриальных мембран (в частности кардиолипина), электролитному дисбалансу и набуханию митохондрий, разобщению процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях, играя, таким образом, определяющую роль в патогенезе реперфузионной гибели нейронов. Повреждение реактивными формами кислорода митохондриальной ДНК незащищенной гистонами сопровождается ингибированием синтеза белков-переносчиков электронов.

Митохондрии – это структуры, ограниченные двумя мембранами – наружной и внутренней, имеющие форму цилиндра диаметром 0,5–1 нм и длиной 2–5 нм. Число, форма и величина митохондрий широко варьируют в различных клетках. Митохондрии – индикаторы функционального состояния клеток, наиболее чувствительные к агрессии. Известно, что одним из первых признаков аутолиза (гибели) клетки является вакуолизация митохондрий. Хотя митохондрии и относятся к стабильным структурам, в клетках происходит их постоянное обновление. Деструкция (разрушение) избыточного числа митохондрий осуществляется при помощи процессов аутофагии вакуолями, которые играют роль вторичных лизосом.

Митохондрии – "энергетические станции", которые непосредственно участвуют в обмене через цикл Кребса и системы транспорта электронов дыхательной цепи. Производимая ими энергия конвертируется и накапливается внутри молекул АТФ в виде богатых энергией фосфатных соединений (макроэргических связей). АТФ производится фосфорилированием АДФ; эта реакция связана с окислением восстановленных веществ в дыхательной цепи ферментов. Для

этого требуется кислород.

Митохондрии – это органеллы, имеющие свой собственный геном и осуществляющие клеточное дыхание (окислительное фосфорилирование), в процессе которого клетки запасают энергию в аденозин-трифосфорной кислоте (АТФ). Несмотря на маленький размер митохондриального генома – всего около 16 500 пар нуклеотидов, 37 генов, 13 из которых кодируют субъединицы белковых комплексов дыхательной цепи, – мутации в нем ассоциированы с такими важными процессами, как старение, комплексные болезни человека (нейродегенеративные и мышечные), а также адаптация к холодным климатическим условиям.

Однако клеточные культуры, несущие различные мутации в митохондриальной ДНК (мтДНК), не проявляют отклонений и характеризуются примерно одинаковым со здоровыми культурами уровнем клеточного дыхания и роста, что ставит под сомнение связь этих мутаций с болезнями на уровне целого организма.

Чтобы разрешить этот парадокс, испанские биохимики из Сарагосы и Мадрида, авторы статьи в журнале *Nature genetics*, изучили активность дыхания клеточных линий, обладающих одним и тем же ядерным геномом, но различающихся митохондриальными геномами. Эти клеточные линии были получены путем образования клеточных гибридов – слиянием безъядерной клетки (но с митохондриями) с безмитохондриальной (но с ядром). АФК играют ключевую роль в одном из ранее неизвестных внутриклеточных компенсаторных механизмов. Когда выработка АТФ в клетке становится недостаточной (в силу мутации или из-за перехода от глюкозного питания к галактозному), увеличивается выработка активных форм кислорода, которые в свою очередь стимулируют увеличение числа копий мтДНК и, как следствие, число ферментов дыхательной цепи.

Так что наряду с вредными функциями АФК (повреждение белков, липидов и ДНК) новые исследования все больше обнаруживают и их полезные функции – такие, как активация разобщающих белков (*uncoupling proteins*), регулирующая

продукцию АТФ, и передача сигналов роста через тирозинкиназы. обнаружена еще одна роль АФК-компенсаторная регуляция активности клеточной дыхательной цепи через активацию репликации митохондриальной ДНК.

Митохондрии как мишень окислительного повреждения

Учитывая главный механизм ишемического повреждения головного мозга, заключающийся в нарушении процессов кислородзависимого (аэробного) образования энергии в митохондриях вследствие дефицита кислорода и последующего повреждения митохондриальных мембран и ферментов образующимися свободными радикалами в реперфузионный период, важен анализ представлений о механизмах ресинтеза АТФ в митохондриях, их повреждения и защиты от патогенных воздействий факторов ишемии/реперфузии.

Митохондриальные поры высокой проницаемости

Под действием активных форм кислорода (АФК) в АТР/АДФ антипортере – белке внутренней мембраны митохондрий, происходит окисление SH – группы Cys-56, что приводит к превращению этого переносчика адениннуклеотидов в неспецифический канал, проницаемый для любых низкомолекулярных веществ. По-английски этот канал называется «permeability transition pore» (mPTP) – пора, вызывающая переход мембраны митохондрий в состояние высокой проницаемости. Согласно общепринятой модели, в формировании mPTP участвуют такие белки, как адениннуклеотид-транслокатор внутренней митохондриальной мембраны, потенциал-зависимый анионный канал (the voltage-dependent anion channel, VDAC) внешней митохондриальной мембраны, циклофилин Д (cyclophilin) матрикса митохондрий, обеспечивающий чувствительность поры к циклоспорину А, закрывающему пору. Чувствительность митохондрий к переходу в состояние высокой проницаемости (permeability transition) может возрастать под действием различных факторов: окислительного стресса, повышения уровня неорганического фосфата P_i , истощения аденин нуклеотидов. Через открытую

mPTP во внутренней митохондриальной мембране диффундирует вода и вещества размером до 1500 Да, что приводит к набуханию митохондрий и выбросу поглощенного Ca^{2+} . Формирование mPTP играет решающую роль в многообразных физиологических и патологических процессах в клетке.

Генерация свободных радикалов и антиоксидантная защита митохондрий

Главным источником активных форм кислорода (АФК) в клетке является митохондриальное дыхание. Предполагают, что в сердце и печени крысы на митохондриальную продукцию H_2O_2 расходуется $\approx 0,5\%$ от общего количества физиологического органического потребления O_2 при использовании в качестве субстратов сукцината или малата-глутамата и $\approx 0,15\%$ – при использовании в качестве субстрата пальмитоил-карнитина. Впервые Боверис А. и Чанс Б. в 1972–1973 показали, что изолированные митохондрии печени и сердца животных являются активными источниками пероксида водорода (H_2O_2), который способен диффундировать в цитозоль. Несколько позже было установлено, что стехиометрическим предшественником митохондриального H_2O_2 является супероксиданион ($\text{O}_2^{\cdot-}$), а главным источником образования $\text{O}_2^{\cdot-}$ в митохондриях было признано аутоокисление убисемихинона (UQH). В настоящее время известно, что $\text{O}_2^{\cdot-}$ образуется за счет утечки электронов из комплексов I, II, III электронтранспортной цепи переноса электронов (ЭТЦ) к молекулярному кислороду.

Существенным прорывом в исследовании митохондриальных свободно-радикальных процессов была недавняя демонстрация кинетики образования $\text{O}_2^{\cdot-}$ в митохондриях живых клеток и органов. Так, в культуре клеток, нагруженных желтым флуоресцирующим белком–новым биосенсором $\text{O}_2^{\cdot-}$, который не реагировал с другими АФК в клетке, такими как H_2O_2 , пероксинитрит, гидроксил-радикал или NO, исследователи обнаружили вспышки флуоресценции в отдельных митохондриях или группах функционально сопряженных митохондрий, отражающие продукцию $\text{O}_2^{\cdot-}$. В результате выброса $\text{O}_2^{\cdot-}$ наблюдалось открытие mPTP без

взаимосвязи с освобождением ионов Ca^{2+} . Инициированные O_2^- mPTP требовали функционирования ЭТЦ и были АТР-зависимыми. Генерирование O_2^- коррелировало с преходящим снижением мембранного потенциала, матриксным ацидозом и набуханием митохондрий. Аноксия или умеренная гипоксия уменьшали частоту вспышек O_2^- в кардиомиоцитах, что подчеркивает роль избирательной продукции АФК в нормальных процессах клетки, использующей скэвенджерные и детоксицирующие АФК-системы в сигнальных каскадах, так же как киназы, фосфатазы, мембранные каналы и транспортеры. Однако, Ноль Г. и соавторы оспаривают положение о том, что митохондрии являются основным продуцентом O_2^- и H_2O_2 в тканях млекопитающих, утверждая, что генерация свободных радикалов митохондриями может быть результатом нарушения целостности митохондриальной мембраны при изолировании митохондрий. Эти же авторы показали, что нарушение редокс-сопряжения в пункте убихинон/цитохромы *bcl*, зависимое от физического состояния внутренней митохондриальной мембраны, сопровождается утечкой электронов и генерацией АФК.

К генерации АФК способны и многие митохондриальные ферменты (второй источник АФК), в частности, два фермента цикла Кребса-аконитаза и α -кетоглутаратдегидрогеназа, пируватдегидрогеназа и глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, дигидрооротат-дегидрогеназа, моноаминоксидазы А и В и цитохром *b5* редуктаза.

Третий важный источник продукции митохондриальных АФК представлен митохондриальной NO-синтазой (mtNOS). В гепатоцитах и кардиомиоцитах NOS локализована внутри митохондрий, тогда как в митохондриях эндотелиальных клетках она состыкована с эндоплазматической стороной внешней митохондриальной мембраны. Основное количество образующегося в митохондриальной ЭТЦ O_2^- (70–80%) поступает в матрикс, а 20–30%—в межмембранное пространство. Ранее детально были описаны два главных пути продукции O_2^- в ЭТЦ митохондрий: 1) как результат аутоокисления промежуточных семихинонов: UQH[•] для окислительно-восстановительной пары

убихинол/убихинон ($UQH^{\cdot} + O_2 \Rightarrow UQ + H^+ + O_2^{\cdot-}$) и 2) как результат окисления кофермента $FMNH_2/FMN$ NADH-дегидрогеназы ($FMNH^{\cdot} + O_2 \Rightarrow FMN + H^+ + O_2^{\cdot-}$). Известно, что семихиноны неэнзиматически окисляются молекулярным O_2 с образованием $O_2^{\cdot-}$. Убисемихинон является главным количественным источником одновалентного восстановления O_2 в ЭТЦ митохондрий.

Образование H_2O_2 модулируется метаболическим состоянием митохондрий и внутримитохондриальной концентрацией NO. Так, продукция H_2O_2 в метаболическом состоянии IV примерно в 4–5 раз выше, чем в метаболическом состоянии III и составляет $0.3\text{--}0.8$ нмоль $H_2O_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мгбелка}^{-1}$ для состояния IV и только $0.05\text{--}0.15$ нмоль $H_2O_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мгбелка}^{-1}$ для состояния III, соответственно. Потoki ионов через внутреннюю митохондриальную мембрану оказывают сильное воздействие на скорость образования H_2O_2 , указывая на регулируемую роль мембранного потенциала в процессе аутоокисления UQH^{\cdot} .

Митохондриальное образование NO:

Синтез оксида азота осуществляется в ферментативной реакции, катализируемой NOS, которая требует присутствия аргинина, $NADPH_2$ и O_2 как субстратов. В результате реакции образуются цитруллин, H_2O и NO ($NADPH_2 + \text{аргинин} + O_2 \Rightarrow NADP + H_2O + \text{цитруллин} + NO$). Известны три различных геномных NOS: нейрональная NOS (nNOS или номер 1); индуцибельная NOS макрофагов (iNOS или номер 2) и эндотелиальная NOS (eNOS или номер 3). Двумя независимыми группами исследователей митохондрии были признаны одним из источников оксида азота. Митохондриальный NO продуцируется изоформой митохондриальной NO-синтазы. Физиологическая продукция NO ферментом взаимосвязана с регулированием *cyt-c*-оксидазной активности: повышение уровня NO снижает *cyt-c*-оксидазную активность за счет S-нитрозилирования остатков цистеина в комплексах IV и I. В состоянии разобщения эндотелиальная NOS (eNOS) генерирует супероксид анион-радикал. Разобщение не требует диссоциации и мономеризации

фермента, скорее всего это происходит в результате субстратного и тетрагидробиоптеринового дефицита, приводящего к облегченной генерации супероксида через NO-зависимый механизм, и сопровождается образованием пероксинитрита при снижении уровня NO. Множество патологических состояний приводит к разобщению eNOS, например, это было четко показано при эндотелиальной дисфункции.

Митохондриальная NO-синтаза была идентифицирована как вариант посттрансляционной модификации nNOS, заключающейся в её миристилировании и фосфорилировании. Известно, что для протекания ферментативной реакции синтеза NO концентрации NADPH₂, аргинина, O₂, и Ca²⁺ в митохондриях находятся в избытке или в необходимом диапазоне. Митохондриальные и субмитохондриальные препараты синтезируют NO со скоростью 0.25–0.90 нмоль·мин⁻¹·мг белка¹. Однако все еще существуют некоторые противоречия относительно наличия mtNOS. Было рассчитано, что внутримитохондриальные стационарные концентрации NO составляют 50–200 нМ, а выброс NO, измеренный электрохимически в отдельной митохондрии после добавления Ca²⁺ составил 29 нМ. В физиологических условиях насыщение ткани O₂ составляет ~ 25 μМ, а митохондриальное отношение [O₂]/[NO] – ~ 150–300, что поддерживает ингибирование цитохромоксидазы на 25–50%. Показано, что NO, продуцируемый NO-донорами или mtNOS, ингибирует комплекс III ЭТЦ (50%-ное ингибирование переноса электронов между цитохромами *b* и *c* происходит при концентрации NO, равной 0.2–0.4 μМ) и увеличивает образование O₂⁻ и H₂O₂ в митохондриях и субмитохондриальных частицах. Этот механизм часто включается в молекулярные процессы неврологических болезней.

Внутримитохондриальный метаболизм свободных радикалов:

Внутримитохондриальные метаболиты O₂⁻, H₂O₂, NO и ONOO⁻ являются прооксидантами, потенциально приводящими к окислительному стрессу, и в настоящее время рассматриваются как факторы, определяющие молекулярный механизм

дисфункции ткани при воспалении, неврологических болезнях, старении. Два из них, O_2^- и NO, являются свободными радикалами; однако в силу своей слабой реакционности они не участвуют в реакциях «разветвления», а только лишь в реакциях «обрыва цепи», приводящих к образованию H_2O_2 и $ONOO^-$. Последние два соединения потенциально опасны, так как после гомолитического расщепления они участвуют в генерации высоко реактивного гидроксильного радикала ($OH\cdot$) и свободного радикала $NO_2\cdot$, который включается в нитрование белка.

Образование NO и H_2O_2 в митохондриях печени крысы имеет экспоненциальную зависимость от величины мембранного потенциала. В матриксе митохондрии метаболизм NO и O_2^- не связан с диффузионным ограничением реакции, приводящей к образованию пероксинитрита ($NO + O_2^- \Rightarrow ONOO^-$). Этот окислительный путь использования NO (80%) является главным в метаболизме, и использует только незначительную часть O_2^- (15%), тогда как восстановление NO убихинолом и цитохромоксидазой обеспечивает использование примерно 20% NO в митохондриях.

Пероксинитрит – сильный окислитель, который, как заряженная форма NO, быстро диффундирует из внутримитохондриального пространства. Пероксинитрит необратимо ингибирует комплексы I и III; а поддержание высокого уровня $ONOO^-$ в митохондриях приводит к их дисфункции и апоптозу клетки. Уровень $ONOO^-$ в матриксе митохондрии в физиологических условиях находится в диапазоне 2–5 нМ, а уровни выше 20–30 нМ считают цитотоксическими. Митохондриальную дисфункцию связывают с избытком NO и $ONOO^-$ при ишемии/реперфузии, воспалении и старении. В матриксе митохондрий пероксинитрит быстро реагирует с CO_2 с образованием аддукта $ONOOCO_2^-$ ($k = 6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), который также участвует в реакциях нитрования и окисления белков и липидов. Формирование аддукта уменьшает стационарный уровень $ONOO^-$ от 30 нМ до 2 нМ [48] и считается одним из путей детоксификации митохондриального $ONOO^-$ при высокой митохондриальной концентрации CO_2 (1 мМ).

Митохондриальная антиоксидантная защита

Митохондрия имеет многоуровневую систему ферментативной и неферментативной антиоксидантной защиты, обеспечивающей детоксикацию образуемых АФК. Ферментативные компоненты включают марганец-содержащую супероксиддисмутазу (MnSOD), каталазу, глутатионпероксидазу и фосфолипидгидропероксид глутатионпероксидазу (восстанавливает гидроперекиси фосфолипидов, липопротеинов и сложных эфиров холестерина), а также ферменты, включаемые в восстановление окисленных форм малых антиоксидантных молекул, такие как глутатионредуктаза, ответственная за восстановление тиолов белков, тиоредоксинредуктаза, глутаредоксинредуктаза и пероксиредоксин. Для регенерации глутатиона глутатионредуктазой и восстановления тиоредоксина 2 тиоредоксинредуктазой необходимо присутствие NADPH. Мутации, в соответствующих этим ферментам генах, взаимосвязаны с некоторыми видами патологии, такими как идиопатическая кардиомиопатия, неврологические болезни, нарушение метаболизма глюкозы и раковые заболевания.

Неферментативные компоненты антиоксидантной защиты включают ряд гидрофильных и липофильных акцепторов свободных радикалов, таких как цитохром с, α -токоферол, аскорбиновая кислота, восстановленная форма кофермента Q₁₀ и восстановленный глутатион (GSH).

Основная часть митохондриального O₂⁻ диффундирует в матрикс, где взаимодействует с внутримитохондриальной MnSOD, которая катализирует реакцию $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \Rightarrow O_2 + H_2O_2$. Стационарные концентрации O₂⁻ для матрикса митохондрии составляют 0,2–0,3 нМ при содержании 10–40 μ М MnSOD-реакционных центров. O₂⁻, диффундирующий в межмембранное пространство, реагирует с цитохромом с, расположенным на внешней стороне внутренней мембраны, и с Cu,Zn-SOD межмембранного пространства [54].

Глутатионпероксидаза катализирует превращение H₂O₂ и восстановление гидроперекисей ROOH с участием восстановленного глутатиона [H_2O_2 (ROOH) + 2 GSH \Rightarrow GSSG + 2H₂O (ROH + H₂O)], и является уникальным ферментом, который

использует в качестве субстрата H_2O_2 в митохондриях большинства органов млекопитающих, исключением является сердце, где была описана митохондриальная каталаза. За счет митохондриальной активности глутатионпероксидазы метаболизируется $\approx 60\%$ H_2O_2 , образующегося в митохондрии, что указывает на ее важную роль в детоксикации H_2O_2 и в восстановлении митохондриальных гидроперекисей. Дефицит GSH связан с широко распространенной митохондриальной дисфункцией, приводящей к повреждению клетки. Функционирование глутатионпероксидазы требует непрерывной поставки GSH в митохондрии из цитозоля, где осуществляется его синтез. Фермент NADPH₂-зависимая глутатионредуктаза матрикса митохондрии поддерживает отношение GSH/GSSG в высоко восстановленном состоянии.

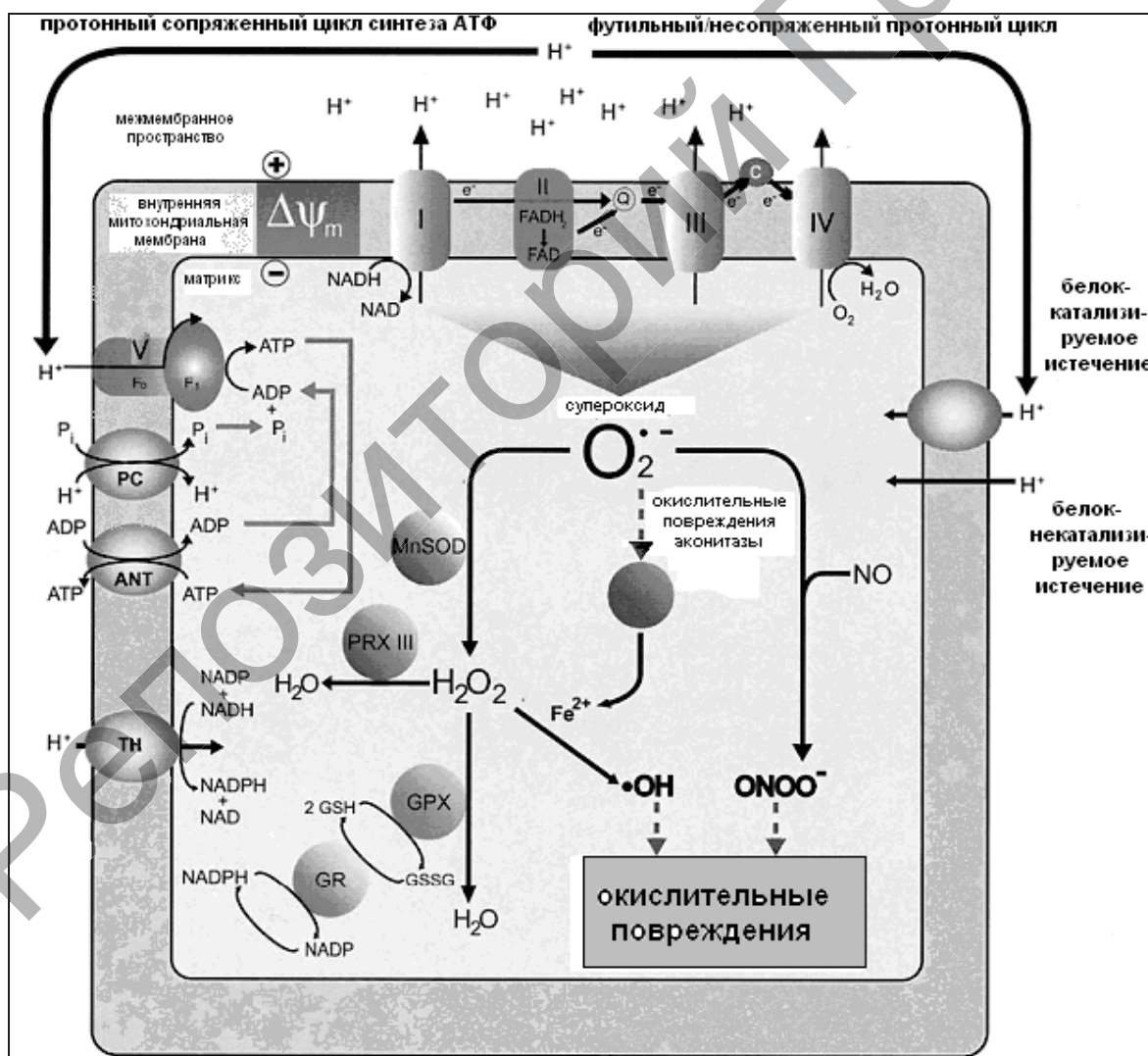


Рисунок 3.2 – Электронтранспортная цепь и митохондриальные окислительные повреждения

Генерация АФК в структурно и функционально интактной митохондрии уравнивается системой антиоксидантной защиты, ограничивающей распространение и биодоступность АФК. Снижение уровня антиоксидантной защиты в митохондриях является предпосылкой для увеличения продукции АФК, развития окислительного стресса и последующей дисфункции митохондрий.

Митохондриальная дыхательная цепь передает электроны от электронных «челноков» (NADH и FAD-H₂) к кислороду, что приводит к перекачке протонов из матрикса в IMS через IMM и формированию протонного электрохимического градиента ($\Delta\mu_{H^+}$). $\Delta\mu_{H^+}$ используется для обеспечения синтеза АТФ F₀F₁ АТФ-синтазой. Обмен АТФ и АДФ катализируется транспортером адениннуклеотидов (АНТ, антипортер), а перемещение неорганического фосфата (P_i) – соответствующим переносчиком (РС). Существуют пути истечения протонов $\Delta\mu_{H^+}$ без образования АТФ. Дыхательная цепь (комплексы I–III) генерирует O₂⁻, который может повреждать железо-серные кластеры белков, таких как аконитаза, таким образом, освобождая ионы железа. O₂⁻, реагируя с оксидом азота (NO), вызывает образование высокотоксичного пероксинитрита (ONOO⁻), а в присутствии ионов железа – очень реактивного гидроксильного радикала (OH[·]), ONOO⁻ и OH[·] могут вызвать повреждение митохондриальных липидов, белков и ДНК (основание схемы). Защиту против окислительного повреждения в митохондриальном матриксе обеспечивает Mn-содержащая супероксиддисмутаза (Mn-SOD), глутатионпероксидаза (GPX) и пероксиредоксин (PRX). Глутатионредуктаза (GR) в присутствии NADPH обеспечивает регенерацию окисленной формы глутатиона (GSSG) в восстановленную (GSH). Часть необходимого NADPH поставляет трансгидрогеназа (TH) [Green K. et al., 2004].

Митохондриальные мишени свободных радикалов

В обычных условиях низкая стабильность и неспособность АФК проникать через бислой мембранных липидов создают эффективный экран, препятствующий распространению

окислительного повреждения. Однако, взаимодействуя с полиненасыщенными жирными кислотами митохондриальных липидов, они образуют гидроперекиси, α -, β -ненасыщенные альдегиды, например, 4-гидрокси-2-ноненаль, которые, обладая высокой электрофильностью, достаточно стабильны, способны распространяться между клеточными компартментами и взаимодействовать с белками и нуклеиновыми кислотами. Иницилируемые АФК цепные реакции ПОЛ играют важную роль в патогенезе атеросклероза, повреждений, вызываемых ишемией/реперфузией, в развитии стресс-индуцированного преждевременного старения.

Кислородные радикалы и иные АФК, вызывая окислительную модификацию белков, приводят к изменению их функций, химической фрагментации и повышенной уязвимости к протеолитической атаке, осуществляемой главным образом протеосомами. Митохондриальный фермент аконитаза 2 одна из важнейших мишеней митохондриального окислительного стресса. Аконитаза 2 (ACO-2)–Fe-S-содержащий белок, катализирующий изомеризацию цитрата в изоцитрат в цикле Кребса. Селективная уязвимость фермента частично объясняется структурной склонностью Fe-S-белка в ACO-2 к формированию АФК и пероксинитрита. Известно, что ACO-2 является специфической мишенью окислительного повреждения в процессе старения. Показано, что длительное экспонирование митохондрий оксидантам приводит к разрушению кластера $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, карбонилиции и дегградации фермента. Взаимосвязь между окислительным стрессом и инактивацией фермента продемонстрирована в процессе повреждения сердечной мышцы при ишемии/реперфузии. Истощение ACO-2 приводит к ингибированию цикла Кребса. При этом избыток пирувата преобразуется в лактат с участием лактатдегидрогеназы, как это имеет место у мышей с введением L-NMMA. Кроме того, в ингибирование цикла Кребса вносит вклад истощение фермента ECHS-1, который катализирует второй шаг β -окисления жирных кислот в процессе метаболизма, при котором жирные кислоты превращаются в митохондриях и/или пероксисомах в форму ацил-СоА, чтобы затем метаболизировать в ацетил-СоА,

включаемый в цикл Кребса. Так, острое воздействие NO сопровождается "метаболической гипоксией" за счет ингибирования митохондриального электронного транспорта. С другой стороны, хроническое разобщение mtNOS вызывает тот же результат через избирательное истощение АСО-2 и ЕСНС-1. Подобное ингибирование цикла Кребса представляет механизм, объясняющий развитие эндотелиальной дисфункции.

Анионные фосфолипиды IMM, обогащенные в контактных участках с внешней митохондриальной мембраной кардиолипином, представляют другую важную мишень окислительного стресса. В нормальных условиях кардиолипид "фиксирует" *cyt-c* в IMM. Окисление высоконенасыщенных ацильных цепей кардиолипидов снижает его сродство к *cyt-c* и освобождает *cyt-c* в свободное состояние. Это, в сочетании с повышением проницаемости внешней митохондриальной мембраны к проапоптотическим членам семейства белков Bcl-2 приводит к выходу *cyt-c* в цитозоль, формированию апоптосомы и активации каскада каспаз, достигающей высшей точки при апоптозе. Примечательно, что в контактные участки внешней митохондриальной мембраны и IMM также входят гексокиназы II и III, связанные с эндоплазматической стороной потенциал-зависимого анионного канала. Гексокиназы, связанные в этом канале, предотвращают выход *cyt-c* из митохондрии, таким образом, создавая антиапоптотический эффект. Это, в свою очередь, поддерживает взаимосвязь внутримитохондриального и экстрамитохондриального метаболизма через эффективный обмен адениннуклеотидов; диссоциация гексокиназ от митохондрии вызывает разобщение митохондриального метаболизма в зависимости от потребности клетки и облегчает апоптоз.

Последствия митохондриального окислительного стресса

Роль митохондрии в каспаз-зависимой программируемой клеточной гибели хорошо установлена, тогда как возможность проникновения в суть каспаз-независимых механизмов смерти клетки появилась недавно. Аутофагия – один из защитных механизмов, защищающих клетки от воздействия окислительного

стресса отрегулируанный лизосомальный путь, обеспечивающий лизис и восстановление окисленных белков и поврежденных органелл при старении клетки.

Накапливаются доказательства, что процессы аутофагии чрезмерно поврежденных органелл, например, пероксисом, эндоплазматической сети и митохондрий могут включаться в ответ на увеличение продукции АФК. Увеличение образования АФК в покоящейся митохондрии представляет угрозу для этой органеллы и, соответственно, для жизнеспособности клетки, поскольку инициирует открытие каналов митохондриальной мембраны, включая mPTP и анионные каналы внутренней мембраны, что приводит к коллапсу митохондриального мембранного потенциала и дальнейшему транзиторному увеличению генерации АФК ЭТЦ. Эти события могут закончиться аутофагией, апоптозом, или некрозом.

В обзоре Chen Y. и соавторы [60] продемонстрировано, что ротенон-ингибитор комплекса I и теноил трифлуороацетон-ингибитор комплекса II, вызывают в трансформированных линиях опухолевой клетки АФК-опосредованную аутофагию. Эти наблюдения демонстрируют, что ингибирование митохондриальной ЭТЦ может привести к аутофагической смерти опухолевых (раковых), но не других типов клеток, обеспечивая новую потенциальную стратегию для борьбы с опухолевым процессом.

В настоящее время появляются данные о том, что «несмертельный» окислительный стресс может стимулировать митохондриальную биогенетику, в том числе через активацию связывания альфа-аминоизокапроновой кислоты с факторами транскрипции, которые регулируют экспрессию генов для ферментов системы детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантной защиты, например, глутатион S-трансферазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы. Этими процессами управляют, по крайней мере, частично митохондриальные АФК. В частности, активация ядерного дыхательного фактора 1 является предпосылкой для активации транскрипции митохондриального фактора А, индукции митохондриальной ДНК (mtDNA) и активации митохондриальной биогенетики.

Повреждения митохондрий проявляются набуханием митохондрий.

Набухание митохондрий связано с проникновением в митохондрию воды. Набухание необходимо дифференцировать от истинного увеличения объема митохондрий, известного под названием мегамитохондрии (см. ниже). Набухание митохондрий наблюдается при самых различных состояниях: голодании, гипоксии, интоксикациях, лихорадке, мышечных заболеваниях, назначении тироксина и т.д. Мутное набухание, описанное в оптическом микроскопе как зернистая дистрофия клетки, также сопровождается набуханием митохондрий.

In vitro констатировано два типа набуханий. Первый тип – с малой амплитудой набухания, при котором изменение энергетической активности влечет за собой обратимую альтерацию протеиновых структур. Этот тип набухания сопровождается пассажем воды через расширенное наружное пространство, сформированное наружной мембраной, во внутреннее, образованное кристами и выполненное матриксом. При этом митохондриальный матрикс сжимается и становится очень плотным. После фазы контракции митохондрии могут возвращаться в нормальное состояние.

Второй тип – с большой амплитудой набухания, возникает в результате увеличения проницаемости внутренней мембраны. Следствием этого является разглаживание и фрагментация крист. Набухание с большой амплитудой вначале может корригироваться увеличением концентрации АТФ и магнезии, но после повреждения наружной мембраны быстро становится необратимым (т.е. смертельным). Оно сопровождается *in vivo* гибелью гранул митохондриального матрикса, которые вначале просветляются, затем уплотняются и образуют хлопья во внутренней камере. Заключительный этап гибели характеризуется тем, что обе мембраны, внутренняя и наружная, разрываются

При некоторых состояниях на внутренней мембране могут образовываться преципитаты фосфата кальция, что ведет к кальцификации (омелотворению) митохондрий. Эти изменения также являются необратимыми.

Изменения структуры крист митохондрий могут касаться их размеров, формы и числа. Деформация крист и уменьшение их числа встречается при пониженной активности митохондрий. Увеличение числа крист митохондрий – свидетельство возрастающих функциональных потребностей клетки.

Наряду с изменением крист в условиях патологии, наблюдается изменение структуры плотных гранул митохондриального матрикса. Эти гранулы диаметром от 20 до 50 нм аккумулируют дивалентные катионы. Кроме кальция, магния, фосфора и других неорганических субстанций, матрикс плотных гранул образован протеинами и липидами. Их увеличение в объеме наблюдается в клетках, перенасыщенных ионами кальция, что может вести к смертельному повреждению клетки. Гипертрофия (увеличение в объеме) этих гранул выявлена при ишемии миокарда, в гепатоцитах при интоксикации четыреххлористым углеродом, в мышечных клетках при тетанусе. Уменьшение или исчезновение плотных гранул происходит в онкоцитах, гепатоцитах и клетках кишечного эпителия при ишемии.

Избыточное увеличение числа митохондрий можно наблюдать в оптическом микроскопе. Это проявляется появлением в цитоплазме клеток оксифильных гранул. Такие клетки известны как онкоциты или, например, в щитовидной железе, как клетки Гюртля. Они имеют обильную цитоплазму, ядро в них часто отодвинуто к периферии. Онкоциты выявляются часто в щитовидной, парашитовидных, слюнных, бронхиальных и молочных железах. В секреторирующих клетках онкоцитарная трансформация свидетельствует об изменении белкового синтеза. Клетки, цитоплазма которых богата митохондриями, встречаются и при других патологических состояниях (гипертрофия, воспаление, опухоли).

Митохондрии способны к ауторепликации как пластиды (аналог митохондрий) растительных клеток. Они могут расти и делиться, достигать гигантских размеров, иногда больше чем ядро – это и есть мегамитохондрии. В световом микроскопе их можно увидеть в виде светлых круглых, очень оксифильных шариков. Мегамитохондрии встречаются, например, в

гепатоцитах при алкоголизме и при циррозах печени, в эпителиальных клетках канальцев почек при нефротическом синдроме, при дефиците рибофлавина, при интоксикации бромидами, при некоторых мышечных заболеваниях. Однако, известно и то, что после устранения интоксикации уже через несколько часов происходит возврат к норме гигантских митохондрий.

Актуальным направлением воздействия на основные звенья патогенеза ишемического повреждения головного мозга, предполагающего ведущую роль биоэнергетических нарушений, является разработка способов направленной коррекции нарушений митохондриальных процессов. Развитие этого направления привело к формированию митохондриальной физиологии, митохондриальной медицины, митохондриальных болезней.

Литература

1. Бархатова, В.П. К патологии метаболизма катехоламинов при цереброваскулярных заболеваниях / В.П. Бархатова, Ю.Я. Воронин, З.А. Суслина. и др. // Журн. неврол. и психиатр. – 1994. – Т. 94, № 2. – С. 33–37.
2. Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения) / М.В. Биленко // М.: Медицина, 1989. 368 с.
3. Болдырев, А. А. Парадоксы окислительного метаболизма мозга / А.А. Болдырев// Биохимия. – 1995. – Т. 60, № 9. – С. 1536 – 1542.
4. Бонь, Е.И. Гистологические изменения в париетальной коре и гиппокампе крыс после субтотальной церебральной ишемии / Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович, С.М. Зиматкин // Журнал ГрГМУ. – 2018. – № 4. – С. 419 – 423.
5. Бонь, Е.И. Морфофункциональные нарушения в гиппокампе крыс при субтотальной ишемии / Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович, С.М. Зиматкин // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2018. – Т.17, № 1. – С. 24 – 29.
6. Верещагин, Н.В. Патология головного мозга при атеросклерозе и артериальной гипертензии / Н.В. Верещагин, В.А. Моргунов, Т.С. Гулевская // М.: Медицина, 1997. – 287 с.
7. Гончар, И.А. Биохимические предикторы и маркеры инфаркта головного мозга / И.А. Гончар, Ю.И. Степанова, И.С. Прудывус // под редакцией проф., д.м.н. В.С. Камышникова. – Минск: БелМАПО, 2013. – 512 с.
8. Гусев, Е. И. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной церебральной ишемии / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова,

А.В. Коваленко, М.А. Соколов // Журн. неврол. и психиатр. – 1999. – Т. 99, № 2. – С. 65 – 70.

9. Гусев, Е.И. Ишемия головного мозга / Гусев Е.И., Скворцова В.И. – М.: Медицина, 2001. – 327 с.

10. Дремза, И.К. Респираторная функция митохондрий головного мозга крыс в условиях реперфузии / И.К. Дремза, Н.Е. Максимович, Троян Э.И., А.Н. Бородинский, Е.Н. Максимович // Актуальные проблемы медицины: мат-лы ежегодной итоговой научной конф. (15–16 декабря 2011 / отв. ред. М.Н. Курбат). – Гродно : ГрГМУ, 2011. – С. 338 – 341.

11. Егорова, М.В. Дыхание митохондрий постинфарктного сердца крыс при окислении различных субстратов/ М.В.Егорова// Сибирский медицинский журнал. – 2010. – Том 25, № 4. – С. 116.

12. Завалишин, И.А. Оксидантный стресс-общий механизм повреждения при заболеваниях нервной системы / И.А. Завалишин, М.Н. Захарова // Журн. неврол. и психиатр. – 1996. – № 2. – С.111 – 114.

13. Зенсков, Н.К. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз / Н.К. Зенсков, Е.Б. Меньщикова, Н.Н. Вольский и др. // Усп. совр. биол. – 1999. – № 5. – С.440 – 444.

14. Калуев, А.В. К проблеме окислительных процессов в ишемическом мозге/ А.В. Калуев // Биохимия. – 1996. – Т. 61. Вып. 5. – С. 939 – 941.

15. Куклей, М. Л. Перекисное окисление липидов в мозге крыс при ишемии/М.Л. Куклей, Стволинский С. Л., Шаврацкий В. Х., Шатров Ю. В. // Нейрохимия. – 1995. – Т. 12. – № 2. – С. 28.

16. Кулинский, В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. 1999. – № 1. – С. 2 – 7.

17. Кулинский, В.И. Биологическая роль глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. 1990. – Том 51. Вып. 1(4) – С.20 – 33.

18. Кулинский, В.И. Обмен глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. 1993. – Т. 113, вып. 1. – С.107 – 122.

19. Лаврентьев, А.В. Патопфизиология ишемии головного мозга применительно к оперативной ревазуляризации головного мозга / А.В. Лаврентьев, К.М. Морозов, М.И. Стойко // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2002. – С. 32 – 38.

20. Лиходий, С.С. Динамика уровней макроэргических фосфатов мозга во время ишемии по данным [31p] ЯМР спектроскопии [Текст] / С.С. Лиходий, Л.А. Сибельдина, Н.А. Семенова // Нейрохимия. – 1988. – Т. 7, вып. 3. – С. 415 – 424.

21. Максимович, Н. Е. Степень окислительного стресса головного мозга крыс при ишемии/реперфузии в условиях коррекции L-Аргинин-NO

системы / Н.Е. Максимович [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2005. – Т.91. – № 4. – С. 385 – 393.

22. Максимович, Н. Е. Агрегация тромбоцитов при модуляции пути L-Аргинин-NO у крыс с ишемией головного мозга / Н.Е. Максимович // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2005. – № 4. – С. 14 – 15.

23. Максимович, Н. Е. Эффект различных ингибиторов NO-синтазы и L-аргинина в изменении уровня стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови крыс при ишемии и реперфузии головного мозга // Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине: Материалы конференции с межд. участием. – Мн.: ПЧУП «Бизнесофсет» / Н.Е. Максимович // 2004. – С. 233 – 234.

24. Максимович, Н.Е. Показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния при ишемии головного мозга и введении модуляторов синтеза оксида азота / Н.Е. Максимович [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2005. – № 2. – С. 54 – 57.

25. Максимович, Н.Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга / Н.Е. Максимович // Гродно, ГрГМУ. – 2004. – 180 с.

26. Максимович, Н.Е. Роль оксида азота нейронального и экстранейронального происхождения в повреждении эндотелия и формировании его дисфункции при ишемии-реперфузии головного мозга у крыс / Н.Е. Максимович // Региональное кровообращение и микроциркуляция. – 2004. – Т. 3. – № 2 (10). – С. 63 – 68.

27. Максимович, Н.Е. Роль различных изоформ NO-синтазы в повреждении эндотелия и формировании его дисфункции при ишемии головного мозга у крыс / Н.Е. Максимович // Белорусский медицинский журнал. – 2004. – № 3. – С. 65 – 68.

28. Максимович, Н.Е. Системный анализ эффектов различных модуляторов L-аргинин-NO системы на состояние окислительного стресса у крыс с ишемией головного мозга / Н.Е. Максимович, В.В. Зинчук, Д.А. Маслаков // Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине: Материалы конференции с межд. участием. – Мн.: ПЧУП «Бизнесофсет» / Н.Е. Максимович, В.В. Зинчук, Д.А. Маслаков // 2004. – С. 231 – 232.

29. Максимович, Н.Е. Экспериментальное обоснование лечения отека мозга при его ишемии путем коррекции образования оксида азота / Н.Е. Максимович // Журнал ГрГМУ. – 2004. – № 4. – С. 17 – 21.

30. Максимович, Н. Е. Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в плазме крови крыс с ишемией-реперфузией головного мозга при введении L-Аргинина и различных ингибиторов NO-синтаз / Н.Е. Максимович [и др.] // Белорусский медицинский журнал. – 2004. – № 4. – С. 67 – 69.

31. Максимович, Н.Е. Понятие о нитроксидергической системе

мозга. Роль экстранейрональных источников // Журнал ГрГМУ / Н.Е. Максимович // 2004. – № 1. – С. 3 – 5.

32. Максимович, Н.Е. Антигипоксическая резистентность крыс с ишемией-реперфузией головного мозга в условиях модуляции пути «L-Аргинин-NO» / Н.Е. Максимович // Журнал ГрГМУ. – 2004. – № 2. – С. 43 – 46.

33. Максимович, Н.Е. Дыхание митохондрий и некоторые показатели гликолиза головного мозга в условиях его частичной ишемии / Н.Е. Максимович, Т.С. Милош, В.В. Ермак, Э.И. Троян, И.К. Дремза // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017. – Т. 15, № 4. – С. 405 – 409.

34. Максимович, Н.Е. Оксид азота в патогенезе ишемических повреждений головного мозга / Н.Е. Максимович // Матер. научно-практ. конф., посв. 50-летию кафедры норм. физиол. ГрГМУ «Фундаментальные и прикладные аспекты физиологии» Сборник науч. стат. – 2009. – С. 97 – 100.

35. Максимович, Н.Е. Переносимость гипоксической гипоксии при ишемии головного мозга у крыс на фоне использования модуляторов NO-синтазы / Н.Е. Максимович // Нурохиа Medical. – 2004. – V. (1-2). – 19 – 22.

36. Максимович, Н.Е. Понятие о нитроксидагической системе мозга. Роль нейрональных источников // Ж-л ГрГМУ/ Н.Е. Максимович // 2003. – № 4. – С. 7 – 11.

37. Максимович, Н.Е. Роль компонентов нитригической системы в патогенезе ишемических повреждений головного мозга / Н.Е. Максимович // Дисфункция эндотелия: труды V-й международной научно-практической конференции 22–23 мая 2008 г. – Витебск, 2008. – С. 13 – 16.

38. Максимович, Н.Е. Роль оксида азота в генезе повреждений мозга при оксидативном стрессе // Журн. Весці НАН Беларусі. Сер. Мед. Навук / Н.Е. Максимович // 2004, № 2 – С. 112 – 117.

39. Максимович, Н.Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга / Н.Е. Максимович. – Гродно: ГрГМУ, 2004. – 178 с.

40. Максимович, Н.Е. Экспериментальное обоснование лечения ишемических повреждений мозга путем селективной коррекции NO-зависимых механизмов / Н.Е. Максимович // Достижения медицинской науки Беларуси. – РНМБ, выпуск XII, 2007. – С.105 – 106.

41. Нечипуренко, Н.И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга / Н.И. Нечипуренко, И.Д. Пашковская, Ю.И. Мусиенко // Медицинские новости. – 2008. – №1. – С. 7 – 13.

42. Онуфриев, М. В. Показатели нитрозативного стресса и иммунного ответа в ликворе больных на ранней стадии инсульта / М. В. Онуфриев [и др.] // Нейрохимия. – 2011. – Т. 28, № 1. – С. 83 – 86.

43. Раевский, К.С. Роль оксида азота в глутаматэргической

патологии / К.С. Раевский, В.Г. Башкатова, А.Ф. Ванин // Вестник Росс. акад. мед. наук 2000. – (4). – С. 11 – 15.

44. Руқан, Т.А. Активность некоторых ферментов в нейронах фронтальной коры головного мозга крыс в ранний постишемический период/ Руқан Т.А., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М. // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 50 – 54.

45. Руқан, Т.А. Влияние субтотальной ишемии головного мозга крыс на морфофункциональное состояние нейронов фронтальной коры / Т.А. Руқан, Н.Е. Максимович, С.М. Зиматкин // Материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции Актуальные проблемы медицины. В 2-х частях. – Гродно, ГрГМУ, 2013. – Ч.2. – С. 158 – 161.

46. Руқан, Т.А. Морфофункциональные изменения нейронов фронтальной коры головного мозга крыс в условиях его ишемии-реперфузии/ Руқан Т.А., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М. // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2012. – № 4. – С. 35 – 38.

47. Скворцова, В.И. Содержание нейротрансмиттерных аминокислот в спинномозговой жидкости больных острым ишемическим инсультом / В.И. Скворцова, К.С. Раевский, А.В. Коваленко и др. // Журн. неврол. и психиатр. – 1999. – Т. 99, № 2. – С. 34 – 38.

48. Суслина, З.А. Динамика перекисного окисления липидов у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения ишемического характера / З.А. Суслина, Т.Н. Федорова, Б.А. Кистенев и др. // Журн. неврологии и психиатрии. – 1999; 7: 33–35.

49. Суслина, З.А. Сосудистые заболевания головного мозга: Эпидемиология. Патогенетические механизмы. Профилактика / З.А.Суслина, Ю.Я. Варакин, Н.В. Верещагин // М.: МЕДпресс-информ, 2009. – С. 352.

50. Федорова, Т.Н. Перекисное окисление липидов при экспериментальной ишемии мозга / Т.Н. Федорова, А.А. Болдырев, И.В. Ганнушкина // Биохимия. – 1999. – Т. 64., вып. 1. – С. 94 – 98.

51. Adam, A. Mitochondrial function after asphyxiain newborn lambs / A. Adam [et al.] // Stroke. – 1989. – V. 20, № 5. – P. 674 – 679.

52. Anderson, M.F. The effects of focal ischemia and reperfusion on the glutathione content of mitochondria from rat brain subregions / M.F.Anderson, N.R.Sims.// J. Neurochem. 2002. – Vol.81, N 3. – P.541 – 549.

53. Arvin, B. The role of inflammation and cytokines in brain injury / B. Arvin B., L.F. Neville, F.C. Barone, G. Z. Feuerstein // Neurosci biobehav. rev. – 1996. – V. 20. – P. 445 – 452.

54. Budd, S.L. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation / S.L. Budd // Pharmacol. ther. – 1998. – V. 80, № 2. – P. 203 – 229.

55. Buisson, A. Nitric oxide: an endogenous anticonvulsant substance / A. Buisson, N. Lakhmeche // *Neuroreport*. – 1993. – V. 4. – P. 444 – 446.
56. Canas, P.E. The role of xanthine oxidase and the effects of antioxidants in ischemia reperfusion cell injury // *Acta physiologica, pharmacologica et therapeutica latinoamericana*. – 1999. – V. 49(1). – P.13 – 20.
57. Chan, P.H. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia / P.H. Chan et al. // *Brain. Pathol.* – 1994. – Vol. 4, № 1. – P.59 – 65.
58. Chance, B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / B. Chance, H. Sies, A. Boveris // *Physiol. Rev.* – 1979. – Vol. 59. – P. 527 – 605.
59. Chen, H. The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia / H. Chen, D. Sun // *Neurol. Res.* 2005. – Vol. 27, N 3. – P. 280 – 286.
60. Chen, T.H. Inhibition of inducible nitric oxide synthesis ameliorates liver ischemia and reperfusion injury induced transient increase in arterial stiffness / T.H. Chen [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2014. – Vol. 46, № 4. – P. 1112 – 1116.
61. Chernyak B.V. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites / B.V. Chernyak, P. Bernardi // *Eur J Biochem.* – 1996. – Vol. 238. – P. 623 – 630.
62. Choi Y., Tenneti L., Le D., Ortiz J., Bai G., Chen H., Lipton S. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation // *Nat. Neurosci.* – 2000. – V. 3. – P. 15 – 21.
63. Acute Brain Infarction Study Group. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI – 186), on acute brain infarction. *Cerebrovascular Diseases* 2003; 15: 222 – 229.
64. Juurlink, B.H. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies / B.H. Juurlink, P.G. Paterson // *J. Spinal Cord Med.* 1998. – Vol. 21, N 4. – P. 309 – 334.
65. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol.79, N 4. – P.1431 – 1568.
66. Martinez, G. Effects of glutathione depletors on postischemic reperfusion in rat brain / G. Martinez, M.L. Carnazza, A. Campisi, V. Sorrenti, C. Di Giacomo, J.R. Perez-Polo, A. Vanella // *Neurochem. Res.* 1998. – Vol. 23, N 7. – P. 961 – 968.
67. Mizui, T. Depletion of brain glutathione by buthionine sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats / T. Mizui, H. Kinouchi, P.H. Chan // *Am. J. Physiol.* 1992. – Vol. 262, – N 2. – P. 313 – 317.
68. Vanella, A. Free radical scavenger depletion in post-ischemic reperfusion brain damage / A. Vanella, C. Di Giacomo, V. Sorrenti, A. Russo, C. Castorina, A. Campisi, M. Renis, J.R. Perez-Polo // *Neurochem. Res.* 1993. – Vol. 18. – № 12. – P. 1337 – 1340.

69. Zinchuk, V.V. The role of NO-dependent mechanisms in the pathogenesis of brain and liver ischemia-reperfusion syndrome / V.V. Zinchuk, N.Ye. Maksimovich // Neurochemical mechanisms of adaptive and pathological states of the brain: Abstr. of reports–St. Petersburg, 2014. – P. 64.

Репозиторий ГРГМУ

ГЛАВА 4. ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКИХ И РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В мировой практике накоплен значительный опыт лечения ишемических и реперфузионных повреждений мозга. Однако лечение данной патологии все еще остается трудноразрешимой проблемой.

До 60-х годов XX века в ангионеврологии доминировало представление о том, что при остром нарушении мозгового кровообращения ишемическое повреждение возникает сразу и необратимо. Только в конце 70-х-начале 80-х годов были сделаны первые попытки раскрыть механизмы последовательного изменения функционального состояния и морфологии ткани мозга на фоне ишемизации. Это позволило сформулировать положение о том, что понятие "церебральная ишемия" подразумевает динамический процесс и предполагает потенциальную обратимость вызываемых изменений, не являясь тождественным понятию "инфаркт мозга", отражающему формирование необратимого морфологического дефекта.

Установлено, что степень повреждающего действия ишемии определяется, прежде всего, глубиной и длительностью снижения мозгового кровотока. Область мозга с наиболее выраженным снижением кровотока (менее 10–15 мл/100г/мин.) становится необратимо поврежденной в течение 6–8 мин. В течение нескольких часов центральный "точечный" инфаркт окружен ишемизированной, но жизнеспособной тканью–зоной "ишемической полутени", или пенумбры. Это область "критической", или "нищенской", перфузии, где нейрональная функция снижена из-за отсутствия обеспечения метаболических запросов ткани мозга, но клетки остаются жизнеспособными. Вследствие исчерпания локального резерва перфузии нейроны в области пенумбры становятся чувствительными к любому дальнейшему падению перфузионного давления, неадекватной гипотензивной терапии. За счет зоны пенумбры происходит постепенное увеличение размеров инфаркта. Область

"ишемической полутени" может быть спасена путем восстановления адекватной перфузии ткани мозга и применения нейропротекторных средств. Именно пенумбра является главной мишенью терапии инсульта в первые часы и дни заболевания.

Длительность существования пенумбры индивидуальна у каждого больного и определяет границы периода, в течение которого с наибольшей эффективностью можно проводить лечебные мероприятия (так называемое "терапевтическое окно"). Формирование большей части инфаркта заканчивается через 3–6 ч с момента появления первых симптомов инсульта. "Доформирование" очага продолжается в среднем 2–3 дня, но в некоторых случаях продлевается до 7 дней, что определяется не только компенсаторными возможностями сосудистого русла, но и доинсультным состоянием метаболизма мозга.

Доказательства отсроченности необратимых повреждений мозга после развития острого нарушения мозгового кровообращения и появления первых симптомов заболевания свидетельствуют о том, что терапия ишемического инсульта должна быть начата как можно раньше, желательно в первые 3 ч заболевания, и должна быть наиболее интенсивной и патогенетически направленной в течение первых 3–5 дней (острейший период инсульта).

Чем тяжелее течение инсульта, тем более необходима в комплексе лечебных мероприятий так называемая базисная терапия, направленная на поддержание всех жизненно важных функций организма. Основными направлениями базисной терапии в остром периоде инсульта являются коррекция нарушений дыхания и сердечно-сосудистой деятельности, нормализация кислотно-основного и осмолярного гомеостаза, водно-электролитного баланса, профилактика и лечение повышения внутричерепного давления и отека мозга, вегетативно-трофических расстройств и осложнений острого мозгового инсульта.

Углубление представлений о формировании ишемического повреждения мозга видоизменило взгляды на стратегию патогенетического лечения ишемического инсульта.

Исследования последних лет позволили сформировать

принципиально новые представления о патогенезе ишемических повреждений мозга, выделить схему последовательных этапов «ишемического каскада» (табл. 4.1) и на основе их определить значимые для терапии причинно-следственные связи.

Считается, что каждый этап каскада является своеобразной мишенью для терапевтических воздействий. Предполагается, что чем на более раннем этапе прерывается каскад, тем больший эффект можно ожидать от терапии.

Анализ «ишемического каскада» свидетельствует о двух возможных направлениях терапии ишемического инсульта:

1. Улучшение перфузии тканей (воздействие на 1-й этап каскада).

2. Нейропротекторная, или цитопротекторная терапия (воздействие на 2-8 этапы каскада).

Таблица 4.1 – Патогенетические этапы «ишемического каскада» и возможные пути терапевтического воздействия на них

<i>Этапы</i>	<i>Патогенетическая характеристика этапа</i>	<i>Пути коррекции</i>
1-й этап	Снижение мозгового кровотока	Повышение перфузии мозга (NO) Гипокоагуляция. Усиление текучести крови
2-й этап	Глутаматная эксайтотоксичность	Блокада NMDA-рецепторов
3-й этап	Внутриклеточное накопление кальция	Блокада Ca ⁺⁺
4-й этап	Активация внутриклеточных ферментов	Блокада внутриклеточных ферментов
5-й этап	Повышение синтеза NO и развитие оксидативного стресса	Снижение синтеза NO. Блокада ПОЛ
6-й этап	Экспрессия генов	Препараты, подавляющие активность генов
7-й этап	«Отдаленные последствия» ишемии (реакции местного воспаления, микроваскулярные нарушения, повреждения ГЭБ)	Подавление воспалительных процессов усиление перфузии мозга Репарация повреждения ГЭБ
8-й этап	Апоптоз	Нормализация апоптоза

Согласно современным представлениям основными направлениями воздействия на патогенетические механизмы ишемической болезни головного мозга (ИБГМ) являются:

1. Коррекция нарушений центральной и церебральной гемодинамики.

2. Коррекция изменений физико-химических свойств циркулирующей крови: реологических свойств системы гемостаза (преимущественно на уровне сосудисто-тромбоцитарного звена).

3. Коррекция метаболических нарушений: дефицита макроэргических связей, шокового открытия агонистзависимых Ca^{2+} каналов и накопления свободного цитозольного кальция, ацидоза, продуктов эндогенной интоксикации.

Эти терапевтические воздействия обеспечивают определенный прогресс в лечении ишемической болезни головного мозга, но кардинально не решают проблему реабилитации данной категории больных, в силу чего во всем мире смертность при этой патологии остается достаточно высокой.

Многие клинично-экспериментальные группы исследователей интенсивно работают над вопросами детализации патогенеза ишемической болезни головного мозга и повышения селективности и эффективности терапевтических воздействий [50, 62].

Проблема терапевтической реперфузии чрезвычайно сложна и требует отдельного подробного анализа. Реперфузия при острой фокальной ишемии мозга наиболее эффективна в первые минуты после развития инсульта. Даже спустя 5 мин. после дебюта ишемии массивное возвращение крови в ишемизированную зону через включившиеся коллатерали или реваскуляризированный участок артерии не приводит к полной нормализации мозгового кровотока. Возникают поэтапные нарушения перфузии церебральной ткани: в первые минуты – гиперемия (или "роскошная перфузия"), затем – постишемическая гипоперфузия, что является результатом тяжелых нарушений микроциркуляции, вызванных высвобождением из ишемизированной ткани вазоактивных и провоспалительных метаболитов (феномен "невосстановленного кровотока", англ. "no-reflow"). Феномен "невосстановленного кровотока" особенно выражен при длительно существующей

ишемии. Чем длительнее дореперфузионный период, тем меньше шанс быстро нормализовать микроциркуляцию в ишемизированной зоне и тем выше риск дополнительного реперфузионного повреждения церебральной ткани: оксидантного стресса, обусловленного включением кислорода в процессы свободнорадикального окисления, и осмотических нарушений, вызванных нарастанием цитотоксического отека вследствие избытка воды и осмотически активных веществ. По экспериментальным данным, целесообразность терапевтической реперфузии сохраняется в течение 3–6 ч. Затем при ее применении значительно возрастает риск не только реперфузионного повреждения, но и геморрагических осложнений.

Характер реперфузионной терапии определяется патогенетическим вариантом развития инсульта. При тромботическом или эмболическом поражении артерий среднего и крупного калибра направлением выбора является тромболизис. Исследование, проведенное Национальным институтом неврологических нарушений и инсульта (США) (1995), впервые доказало эффективность рекомбинантного тканевого активатора плазминогена при его введении в первые 3 ч инсульта, особенно в первые 90 мин., в дозе 0,9 мг/кг массы позволило в 11–13% случаев улучшить неврологический статус и функциональное состояние.

Другой фибринолитический препарат-анкрод, созданный на основе яда малайской гадюки, также улучшал клинический исход инсульта при его введении в течение первых 3 ч после развития заболевания, но в меньшей степени, чем тканевой активатор плазминогена, введенный в пределах 3 ч, и проурокиназа, введенная в пределах 6 ч.

Необходимость проведения активной реперфузионной терапии в стационаре оттеняет преимущества другого направления терапии-нейропротекции (цитопротекция), которая может использоваться на догоспитальном этапе при появлении первых симптомов инсульта, даже при его возможном геморрагическом характере. По сравнению с реперфузией нейропротективная терапия более разнообразна, отражая

многообразии механизмов ишемического повреждения ткани мозга (см. 2–8 этапы ишемического каскада). Практически для каждого этапа ишемического каскада был разработан и прошел испытания хотя бы один препарат-нейропротектор. Раннее применение нейропротекторов позволяет увеличить долю транзиторных ишемических атак и "малых" инсультов среди острых нарушений мозгового кровообращения по ишемическому типу; значительно уменьшить размеры инфаркта мозга; удлинить период "терапевтического окна, расширяя возможности для тромболитической терапии; осуществить защиту от реперфузионного повреждения.

Выделяют первичную и вторичную нейропротекцию. Первичная нейропротекция направлена на прерывание быстрых реакций глутамат-кальциевого каскада, свободнорадикальных механизмов с целью коррекции дисбаланса возбуждающих и тормозных нейротрансмиттерных систем и активации естественных тормозных процессов. Этот вид нейропротекции должен применяться с первых минут ишемии и продолжаться на протяжении первых 3 дней инсульта, особенно активно в первые 12 ч.

Вторичная нейропротекция направлена на уменьшение выраженности отдаленных последствий ишемии: на блокаду провоспалительных цитокинов, молекул клеточной адгезии, торможение прооксидантных ферментов, усиление трофического обеспечения, прерывание апоптоза. Она может быть начата спустя 3–6 ч после развития инсульта и должна продолжаться по меньшей мере 7 дней.

Значительный прогресс в этой области в изучении патогенеза ИБГМ связывают с биологическими эффектами NO, развитием оксидативного стресса, с расшифровкой механизмов апоптоза.

В остром периоде заболевания больным проводят (с учетом индивидуальных показаний) фибринолитическую терапию, а также лечение, направленное на коррекцию витальных функций и кислотно-основного состояния, что включает корригирование нарушений кровообращения, реологических и свертывающих свойств крови, антикоагулянтов и дезагрегантов, гемодилюцию,

антигипертензивную терапию.

Обоснованы ранняя госпитализация больных с инсультом и необходимость ранней (в пределах "терапевтического окна") комбинированной патогенетической терапии ишемического инсульта, включающей реперфузию, комбинированную нейтропротекцию, стимуляцию репаративных процессов и предотвращение реэмболии, вторичного сосудистого и тканевого повреждения.

Доказательства отсроченности необратимых повреждений мозга после развития острого нарушения мозгового кровообращения и появления первых симптомов заболевания свидетельствуют о том, что терапия ишемического инсульта должна быть начата как можно раньше, желательно в первые 3 ч заболевания, и должна быть наиболее интенсивной и патогенетически направленной в течение первых 3–5 дней (острейший период инсульта).

Чем тяжелее течение инсульта, тем более необходима в комплексе лечебных мероприятий так называемая базисная терапия, направленная на поддержание всех жизненно важных функций организма. Основными направлениями базисной терапии в остром периоде инсульта являются коррекция нарушений дыхания и сердечно-сосудистой деятельности, нормализация кислотно-основного и осмолярного гомеостаза, водно-электролитного баланса, профилактика и лечение повышения внутричерепного давления и отека мозга, вегетативно-трофических расстройств и осложнений острого мозгового инсульта.

К 90-му дню у больных, леченных r-PA, в 11–13% случаев отмечалось улучшение неврологического статуса и функционального состояния, значительно превосходившее результаты, полученные в группе плацебо. Однако в 6,4% случаев в течение 36 ч от момента введения препарата возникали интрацеребральные кровоизлияния, почти в половине случаев – смертельные, тогда как в группе плацебо они наблюдались в 0,6% случаев. Несмотря на риск развития ранних геморрагических осложнений, 90-дневная летальность в группе r1-PA была достоверно ниже, чем в группе плацебо: 17 и 21%

соответственно.

Позже (1997) показано, что при обширной ишемизированной области (раннее появление на КТ обширного отека), а также при наличии у больных сахарного диабета тромболизис не улучшает прогноз заболевания, что связано с повышением риска геморрагических осложнений. Повышение дозы тканевого активатора плазминогена до 1,1 мг/кг и введение его в более поздние сроки также повышает риск вторичных геморрагических осложнений.

В то же время показано, что при ангиографически подтвержденной окклюзии средней мозговой артерии интраартериальное введение рекомбинантной проурокиназы, используемой вместе с низкими дозами внутривенно вводимого гепарина, улучшало исход заболевания (в течение 3 месяцев наблюдения) и при отсроченном на 6 ч от начала острого ишемического инсульта применении. Это свидетельствует о том, что тромболитическая терапия может быть эффективна за пределами 3-х-часового диапазона в случае тщательного отбора пациентов. Установлено, что тромболизис не показан при гемодинамических инсультах. В настоящее время только 1–2% больных с острым ишемическим инсультом получают тромболитическую терапию, хотя, даже при условии соблюдения 3-х-часового диапазона введения, это число могло быть выше (до 5–10%).

Другие методы реперфузии не нашли подтверждения своей эффективности в мультицентровых испытаниях. Однако субгрупповой анализ показал целесообразность применения антикоагулянтной терапии в первые дни прогрессивного атеротромботического инсульта, а также при подтвержденной кардиогенной эмболии и проведении хирургических вмешательств на сосудах мозга. Ограничениями к ее назначению являются стойкое высокое (>180 мм рт. ст.) артериальное давление (АД) или, наоборот, значительное снижение АД, а также коматозное состояние, эпилептические припадки, тяжелые заболевания печени, почек, язвенная болезнь желудка и различные геморрагические проявления. Следует, однако, отметить, что даже при наличии противопоказаний приходится

использовать антикоагулянтную терапию в случае развития ДВС-синдрома. Предпочтительно назначение прямого антикоагулянта гепарина в течение первых 2–5 дней заболевания в суточной дозе до 10–15 тыс. ед. через инфузомат внутривенно или под кожу живота (в 4–6 введений). Обязателен лабораторный контроль за действием гепарина: время кровотечения должно удлиниться не более чем в 1,5–2 раза, АЧТВ не должно увеличиваться более, чем в 2 раза. За 1–2 дня до окончания курса гепарина целесообразно постепенное снижение его дозы под "прикрытием" антикоагулянтов непрямого действия, прием которых продолжается в последующие 3–4 нед. В связи с частым недостатком антитромбина III у наиболее тяжелых больных с прогрессирующим атеротромботическим инсультом рекомендуется одновременно с гепарином использовать нативную или свежемороженную плазму (по 100 мл 1–2 раза в день).

Антиагрегантная терапия и гемодилюция, не оказывая радикального реперфузионного действия, улучшают микроциркуляцию в ткани мозга, что служит основанием для традиционного их применения в первые дни ишемического инсульта под контролем гемореологических и сердечно-сосудистых показателей.

Истинные антиагреганты могут быть применены, начиная лишь со 2-й недели заболевания, после регресса перифокального отека мозга и нормализации проницаемости сосудистой стенки. В первые дни заболевания предпочтительнее применение вазоактивных препаратов с антиагрегантным действием. Сравнительное сопоставление влияния различных препаратов этой группы показало высокую эффективность трентала (пентоксифиллина), что связано с улучшением эластичности мембран эритроцитов и их деформируемости, комплексным антиагрегантным и реологическим действием. При наличии у больных, чаще молодого возраста, выраженной тахикардии, стойкого повышения систолического АД предпочтителен выбор β -адреноблокаторов с антиагрегантными свойствами (обзидан, анаприлин). В случаях острых нарушений мозгового кровообращения в вертебрально-базилярной системе эффективно

назначение циннаризина, тогда как при полушарной локализации ишемического инсульта целесообразно использование кавинтона (винпоцетина). Некоторые авторы рекомендуют раннее применение аспирина в дозе 1 мг/кг/сут.

У больных с повышенным гематокритом с целью улучшения мозговой перфузии проводят гемодилюцию низкомолекулярными декстранами (рео-полиглюкин, реомакродекс по 250–500 мл внутривенно капельно в течение 1 ч) под контролем лабораторных показателей и функций сердечно-сосудистой системы. Основным критерием эффективности гемодилюции является снижение уровня гематокрита до 30–35%.

Назначение антикоагулянтной, антиагрегантной терапии и особенно тромболизиса возможно лишь в стационаре, после нейровизуализационного исследования (КТ/МРТ головного мозга), позволяющего исключить геморрагический компонент поражения, оценить размеры ишемизированной области и патогенетический вариант инсульта. Это подчеркивает преимущества другого направления терапии-нейропротекции (цитопротекции, метаболической защиты мозга), которую можно использовать на догоспитальном этапе при появлении первых симптомов инсульта, даже при возможном геморрагическом его характере. По сравнению с реперфузией нейропротекторная терапия более сложна и разнообразна, что отражает разнообразие механизмов ишемического повреждения ткани мозга. Практически для каждого этапа ишемического каскада разработан и прошел испытания хотя бы один препарат-нейропротектор. По данным экспериментальных и клинических исследований раннее применение нейропротекторов позволяет улучшить прогноз, значительно уменьшить размеры инфаркта мозга, удлинить период "терапевтического окна", расширяя возможности для тромболитической терапии, осуществить защиту от реперфузионного повреждения.

Выделяют первичную и вторичную нейропротекцию. По результатам экспериментальных работ, проведенных на моделях острой фокальной ишемии, основным направлением первичной нейропротекции является прерывание быстрых механизмов глутаматкальциевого каскада с целью коррекции дисбаланса

возбуждающих и тормозных нейротрансмиттерных систем и активации естественных тормозных процессов. Этот вид нейропротекции следует применять с первых минут ишемии и продолжать на протяжении первых 3 дней инсульта, особенно активно в первые 12 ч. Клинические испытания большинства наиболее сильных в эксперименте нейропротекторов-антагонистов глутаматных рецепторов были прекращены из-за широкого спектра серьезных побочных явлений. Использование менее токсичных низкоаффинных и селективных антагонистов NMDA-рецепторов оказалось малоэффективным. Единственными безопасными и, по результатам 2-й фазы испытаний, эффективными неконкурентными антагонистами NMDA-рецепторов на сегодняшний день являются препараты магния, регулирующие кальциевый ток через вольтажчувствительные и агонистзависимые каналы. Мультицентровое испытание магнезии при остром инсульте показало ее безопасность, отсутствие значимых побочных эффектов, снижение 30-дневной летальности на 10% (30% против 40% в контроле) и ранней летальности на 5,7%. Возможно применение перорального препарата магния-магне В₆, содержащего наряду с лактатом магния пиридоксина хлоргидрата, улучшающего всасывание магния из желудочно-кишечного тракта и фиксацию его внутри клетки.

Естественным активатором тормозных нейротрансмиттерных систем является препарат "Глицин", содержащий в качестве активного вещества аминокислоту глицин. Наряду с нейротрансмиттерным глицин обладает также метаболическим действием, он связывает низкомолекулярные токсичные продукты (альдегиды, кетоны), в больших количествах образующиеся в процессе ишемии. Сублингвальное применение глицина в первые дни инсульта в дозе 20 мг/кг массы тела (в среднем 1,0–2,0 г/сут) полностью безопасно и позволяет обеспечить противоишемическую защиту мозга у больных с различной локализацией сосудистого поражения и разной тяжестью состояния. Двойное слепое плацебоконтролируемое исследование выявило положительное влияние препарата на клинический исход заболевания: снижение показателя

30-дневной летальности; ускорение регресса расстройств сознания и других общемозговых симптомов, признаков отека мозга, очагового дефекта; улучшение восстановления нарушенных неврологических функций. Иммунобиохимические исследования подтвердили комплексное нейропротективное влияние препарата, направленное на устранение дисбаланса между возбуждающими и тормозными медиаторными системами (снижение глутаматной эксайтотоксичности, стимуляция естественных защитных тормозных систем мозга), уменьшение выраженности процессов оксидантного стресса (снижение концентраций вторичных продуктов перекисного окисления липидов).

Вторичная нейропротекция направлена на уменьшение выраженности отдаленных последствий ишемии: оксидантного стресса; избыточного синтеза оксида азота; активации микроглии и связанных с ней дисбаланса цитокинов, иммунных сдвигов, локального воспаления, нарушений микроциркуляции и гематоэнцефалического барьера; трофической дисфункции и апоптоза. Эти процессы не только участвуют в "деформировании" инфаркта мозга, приводя к отсроченной гибели нейронов, но и вызывают долговременную перестройку единой нейроиммуноэндокринной системы, способствуют прогрессированию процессов атерогенеза и диффузному повреждению церебральной ткани (развитию энцефалопатии) на протяжении многих месяцев после перенесенного инсульта. Вторичную нейропротекцию можно начать спустя 3–6 ч после развития инсульта и следует продолжать по меньшей мере 7 дней. Для вторичной нейропротекции используют антиоксиданты, антагонисты провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии; факторы роста, фосфопротеины и нейропептиды, обладающие трофическими свойствами.

Одним из направлений вторичной нейропротекции является применение антиоксидантов-препаратов, уменьшающих выраженность оксидантного стресса. Уже в 60-е годы XX века было известно большое количество "биоантиокислителей", различающихся по химической формуле и механизмам действия; была доказана необходимость дифференцированного их

применения. В 80-е годы было установлено, что в самом раннем периоде острой фокальной ишемии мозга целесообразно использование "ловушек", "чистильщиков" свободных радикалов и препаратов, разрушающих перекиси (с сульфидными и тиоловыми группами): унитиола, тиосульфата-натрия и др. Вслед за этим показано значение токоферолов и каротиноидов, связывающих катализаторы, инактивирующих синглетный кислород. За последние десятилетия стало традиционным включением унитиола и токоферола (витамина Е), в том числе в комбинированных формах (аевит), в комплекс интенсивной терапии ишемического инсульта. Однако специальное изучение "вклада" этих препаратов в общий результат лечения не выявило у них значимого нейропротекторного эффекта. Была продемонстрирована лишь тенденция к более благоприятному течению заболевания на фоне их применения. В настоящее время к потенциальным нейропротекторам при ишемии мозга относят ферменты супероксиддисмутазу (СОД) и каталазу, глутатион, витамин Е, лазароиды, хелаты железа, фенил-1-бутил-нитрон. Экспериментальные исследования доказали нейропротекторные свойства препаратов, связывающих свободные радикалы, достоверное уменьшение размеров инфаркта мозга на фоне их применения, что обосновало необходимость клинических испытаний этих антиоксидантов.

В проведенных экспериментальных и клинических исследованиях высокую эффективность показали отечественные препараты: эмоксипин, мексидол. Эмоксипин—структурный аналог витамина В₆, не прямой антиоксидант, повышающий содержание в тканях эндогенного антиоксиданта глутатиона, обладающий стабилизирующим действием на клеточные мембраны и некоторым антиагрегантным действием. Препарат вводят внутривенно капельно по 15 мл 1% раствора в течение 10 дней, а затем внутримышечно по 5 мл 1% раствора в течение 14 дней. Показано благоприятное действие препарата на регресс неврологических нарушений и нормализацию паттерна электроэнцефалограммы. Мексидол также оказывает выраженный антиоксидантный эффект: тормозит свободнорадикальные процессы, активирует эндогенную

антиоксидантную систему (супероксиддисмутаза). Установлено также позитивное влияние мексидола на состояние мембранных структур клеток: уменьшение вязкости липидного бислоя мембраны и увеличение ее текучести; модуляция активности мембраносвязанных ферментов, ионных каналов, рецепторных комплексов, в том числе бензодиазепинового, ГАМК, ацетилхолинового; улучшение синаптической передачи и пластичности мозга. Препарат стимулирует энергосинтезирующие функции митохондрий и улучшает энергетический обмен в клетке, таким образом, повышая устойчивость мозговой ткани к ишемии. Наряду с метаболическими эффектами мексидол вызывает обратное развитие атеросклеротических изменений в артериях, обладает гиполипидемическим действием, уменьшает уровень общего холестерина и липопротеинов низкой плотности, улучшает реологические свойства крови, подавляет агрегацию тромбоцитов. При этом препарат не оказывает достоверного влияния на показатели гемодинамики, а также лишен выраженных побочных действий. Пилотные клинические исследования мексидола в остром периоде ишемического инсульта подтвердили его хорошую переносимость, отсутствие значимых побочных эффектов, выявили некоторое положительное влияние препарата на течение заболевания при внутривенном капельном введении в дозе с 100 до 1000 мг/сут. Огромное значение в развитии процессов ишемического повреждения ткани мозга имеет недостаточность трофического обеспечения. Уровень трофического обеспечения определяет альтернативный выбор между генетическими программами апоптоза и антиапоптозной защиты, влияет на механизмы некротических и репаративных процессов. Естественной защитной реакцией мозга в первые минуты ишемии является синтез трофических факторов и рецепторов к ним. При быстрой и активной экспрессии генов, кодирующих нейротрофины (факторы роста), ишемия мозга может длительно не приводить к инфарктным изменениям. В случае же формирования ишемического повреждения высокий уровень трофических факторов обеспечивает регресс неврологического дефицита даже

при сохранении морфологического дефекта, его вызвавшего. Таким образом, важной стратегией вторичной нейропротекции являются разработка и внедрение препаратов с выраженными нейротрофическими и ростовыми свойствами.

Поскольку полипептидные естественные факторы роста не проникают через гематоэнцефалический барьер, их клиническое использование ограничено. В связи с этим большое внимание уделяется изучению свойств низкомолекулярных нейропептидов. Эти соединения свободно проникают через гематоэнцефалический барьер, оказывают многостороннее действие на центральную нервную систему и характеризуются высокой эффективностью и выраженной направленностью действия при условиях их очень малой концентрации в организме.

Одним из наиболее известных препаратов нейротрофического ряда является церебролизин, представляющий белковый гидролизат вытяжки из головного мозга свиньи, активное действие которого обусловлено фракцией низкомолекулярных пептидов. Основными механизмами действия активной пептидной фракции церебролизина являются регуляция энергетического метаболизма мозга, собственное нейротрофическое влияние и модуляция активности эндогенных факторов роста, взаимодействие с системами нейропептидов и нейромедиаторов. Проведенные клиничко-нейрофизиологические исследования подтвердили безопасность церебролизина, продемонстрировали благоприятное влияние препарата в суточной дозе 10–30 мл на течение острого периода каротидного ишемического инсульта при разной тяжести заболевания. Более значимо церебролизин улучшал восстановительные процессы, ускорял регресс очаговых неврологических симптомов у больных с исходным состоянием средней тяжести. Анализ показателя летальности в целом по группам, без деления больных по тяжести состояния, выявил тенденцию к его снижению на фоне лечения церебролизинем (4%, 2 из 50) по сравнению с контрольной группой (15%, 9 из 60; $p < 0,1$). В группе тяжелобольных снижение показателя летальности было достоверным ($p < 0,05$). Сравнительное изучение эффективности разных доз препарата

показало, что при отсутствии в клинике возможностей нейрофизиологического контроля оптимальная суточная доза у больных с состоянием средней тяжести составляет 10 мл, у тяжелобольных – 20 мл внутривенно капельно на протяжении 7–10 дней заболевания (возможно дальнейшее продолжение курса в виде внутримышечных инъекций по 5 мл до 21 сут заболевания). Наиболее точно индивидуальную адекватную дозу церебролизина можно определить с помощью исследования спонтанной биоэлектрической активности мозга при поступлении больного в клинику.

В НИИ молекулярной генетики РАН создан синтетический аналог фрагмента АКТГ (4–10) – препарат "Семакс", представляющий собой гептапептид, лишенный гормональной активности. Семакс является эндогенным регулятором функций ЦНС и обладает нейромодуляторной и нейротрофической активностью, а также ярко выраженным ноотропным эффектом. Проведенные клинико-иммунобиохимические исследования подтвердили сильное нейропротекторное действие семакса, основными компонентами которого являются иммуномодуляция, торможение глиальных реакций воспаления, улучшение трофического обеспечения мозга, торможение синтеза оксида азота и других реакций оксидантного стресса. Индуцированные нейропептидом цепочки метаболических превращений взаимно усиливают и поддерживают друг друга, приводя к торможению большинства важных механизмов отсроченной смерти клеток. Препарат безопасен, хорошо переносится больными, не обладает токсичностью и значимыми побочными эффектами. Интраназальное введение семакса наиболее эффективно в остром периоде полушарного ишемического инсульта, хотя положительные эффекты препарата проявляются и при стволовой локализации сосудистого поражения. При применении в суточной дозе 12–18 мг препарат снижает 30-дневную летальность и улучшает клинический исход инсульта и степень функционального восстановления, особенно в случаях раннего начала терапии, в первые 6 ч заболевания. Положительное клиническое действие семакса коррелирует с его нормализующим влиянием на функциональную активность мозга

по данным полимодального нейрофизиологического мониторинга.

Начиная с первых дней заболевания, после формирования морфологических инфарктных изменений в веществе мозга, все большее значение приобретает репаративная терапия, направленная на улучшение пластичности здоровой ткани, окружающей инфаркт, активацию образования полисинаптических связей, увеличение плотности рецепторов. Вторичные нейропротекторы, обладающие трофическими и модуляторными свойствами, – нейропептиды оказывают и регенераторно-репаративное действие, способствуя восстановлению нарушенных функций. Наряду с ними к средствам репаративной терапии относятся производные ГАМК (ноотропы), особенно в случаях превалирования в клинике очагового неврологического дефекта. Одним из них является препарат "Пирацетам", обладающий многокомпонентным действием: вазоактивным и антиагрегантным; быстрым метаболическим, связанным с активацией энергетического метаболизма и окислительно-восстановительных процессов; отсроченным метаболическим, повышающим пластичность церебральной ткани за счет увеличения плотности рецепторов к нейротрансмиттерам. Особенно эффективны ноотропные препараты при ограниченных корковых очагах ишемии, клинически проявляющихся расстройствами высших мозговых функций, прежде всего речевых, а также двигательным дефицитом. Изучение дозозависимой эффективности пирацетама показало, что его оптимальные дозы в первые 10–15 дней ишемического инсульта составляют 6–12 г/сут при внутривенном введении. Для достижения максимального клинического эффекта рекомендуется длительное применение препарата с переходом на пероральный прием в суточной дозе 4,8 г с 15-го дня заболевания на протяжении 1–1,5 мес, учитывая отсроченное нейротрансмиттерное действие пирацетама.

Важно отметить, что терапия острого ишемического инсульта включает и компоненты его вторичной профилактики. Особенно актуальной вторичная профилактика становится со 2-й недели заболевания, когда значительно возрастает риск повторных сосудистых эпизодов. К числу наиболее значимых

профилактических мероприятий относятся контроль АД, глюкозы и липидов крови, а также применение истинных антиагрегантов: аспирин, дипиридамола, тиклопидина, клопидогреля. "Золотым стандартом" вторичной профилактики является аспирин, который, по данным мультицентровых исследований, при приеме в дозе 50 мг/сут позволяет снизить риск развития повторного инсульта на 18%. Показана также эффективность дипиридамола. Безопасным и эффективным является комплексное применение курантила (150 мг/сут) и аспирин (50 мг/сут). Важное значение имеют антиагреганты нового поколения: тиклопидин (тиклид) и клопидогрель (плавикс). Установлена их высокая эффективность для вторичной профилактики инсульта, инфаркта миокарда и других сосудистых осложнений при применении у пациентов с исходно повышенными показателями агрегационной способности тромбоцитов под контролем системы гемостаза (агрегации и количества тромбоцитов, времени кровотечения).

Таким образом, развитие представлений о причинах и механизмах повреждения ткани мозга на фоне острого нарушения мозгового кровообращения и фокальной ишемии мозга определяет основные стратегические направления терапии ишемического инсульта. Результаты клинко-экспериментальных исследований последних лет позволили сделать вывод о необходимости проведения ранней (в пределах "терапевтического окна") комбинированной патогенетической терапии ишемического инсульта, включающей реперфузию, комбинированную нейропротекцию, стимуляцию репаративных процессов и предотвращение реэмболии, вторичного сосудистого и тканевого повреждения.

Наибольшую эффективность в реабилитационный период после инсульта показали препараты с комплексным метаболическим и вазоактивным действием. Для многих из них, таких как винпоцетин, пирацетам, гингкобилоба, цитофлавин – комплексный препарат, содержащий янтарную кислоту, рибоксин, никотинамид, рибофлавин характерно:

– метаболическое и нейротрофическое действие – улучшение энергетики клетки, уменьшение активности

свободнорадикального окисления, активация нейротрансмиттеров;

– вазодилататорное и антиагрегантное действие – уменьшение агрегации, улучшение деформируемости и адгезивности эритроцитов, уменьшение вязкости крови и констрикции сосудов.

В качестве базовой терапии в неврологии применяются традиционные комплексы препаратов, обладающие нейротрофическим и вазоактивным действием. В качестве примера можно привести комплекс инстенона (этофиллина, этамивана, гексобендина) и актовегина. Этамиван за счет активации ретикулярной формации нормализует функциональное состояние нейронных комплексов коры и подкорково-стволовых структур. Гексобендин повышает утилизацию глюкозы и кислорода за счет активации анаэробного гликолиза и пентозных циклов (реализуются только в условиях ишемии и гипоксии, когда нарушается цикл аэробного окислительного фосфорилирования). Стимуляция анаэробного окисления дает энергетический субстрат для синтеза и обмена медиаторов и восстановления синаптической передачи, депрессия которой, наряду с деструкцией мембран нейронов, является ведущим патогенетическим механизмом расстройств сознания и неврологических нарушений при гипоксии и ишемии мозга. Он также стабилизирует физиологические механизмы ауторегуляции церебрального и коронарного кровотока, что связано с воздействием лактата и пирувата (продуктов анаэробного гликолиза) на рецепторный аппарат интракраниальных артериол и капилляров.

Этофиллин активизирует метаболизм миокарда, увеличивает минутный объем сердца, что способствует увеличению перфузионного давления в сосудах краевой зоны ишемии без повышения уровня артериального давления.

Актовегин стимулирует аэробный гликолиз, обладает инсулиноподобным действием, при его применении усиливаются энергетический и пластический обмены в нейронах, усиливаются репаративные процессы нервной ткани, улучшается память, повышается трудоспособность.

Литература

1. Афанасьев, В.В. Патопфизиология и нейропротективная терапия ишемического повреждения головного мозга / В.В. Афанасьев, С.А. Румянцева, Е.В. Силина // Медицинский Совет. – 2008. – № 9. – 10. – С. 35–39.
2. Бархатова, В.П. Основные направления нейропротекции при ишемии мозга / В.П. Бархатова, З.А. Суслина // Неврологический журнал, № 4. – 2002. – С. 42–49.
3. Белоярцев, Д.Ф. Хирургическая профилактика ишемических повреждений головного мозга / Д.Ф. Белоярцев // Журнал «Лечение нервных болезней». – 2005. – Т. 6. – № 2 (16). – С. 9–12.
4. Бова, А.А. Ишемический инсульт: стратегия ведения пациентов (соответствие рекомендаций и их реального клинического применения) / А. А. Бова, М. В. Силиванович // Военная медицина – 2015. – № 4 (37). – С. 30–35.
5. Бова, А.А. Ишемический инсульт: стратегия ведения пациентов (соответствие рекомендаций и их реального клинического применения) / А. А. Бова, М.В. Силиванович // Военная медицина. – 2015. – № 4 (37). – С. 30–35.
6. Бокерия, Р.Г. Нейропротекция при цереброваскулярных заболеваниях: поиск жизни на Марсе или перспективное направление лечения. Часть 1. Острые нарушения мозгового кровообращения / М.А. Пирадов, М.М. Танащян, М.А. Верещагин, Н. В. Принципы диагностики и лечения больных в остром периоде инсульта / Н.В. Верещагин, М.А. Пирадов, З.А. Суслина // Consilium Medicum. – Consi 2001. – Т. 3, № 5. – С. 221–225.
7. Бокерия, Р.Г. Нейропротекция при цереброваскулярных заболеваниях: поиск жизни на Марсе или перспективное направление лечения. Часть 1. Острые нарушения мозгового кровообращения / М.А. Пирадов, М.М. Танащян, М.А. Домашенко, Д.В. Сергеев, М.Ю. Максимова // Анн. клинич. и эксперим. неврол. – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 10–21.
8. Виленский, Б.С. Современная тактика борьбы с инсультом / Б.С. Виленский. – СПб: ООО "Издательство ФОЛИАНТ". – 2005. – 288 с.
9. Вознюк, И.А. Липоевая кислота в острейшем периоде ишемического инсульта / И.А. Вознюк, С.В. Макаренко, К.В. Ким, Е.В. Мельникова // Материалы IX Всероссийского съезда неврологов. – Ярославль. – 2006. – С. 384.
10. Волченкова, О.В. Применение электромагнитного поля, генерируемого аппаратом «Каскад», у больных с острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу / О.В. Волченкова, Г.Е. Иванова, Б.А. Поляев // Материалы научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицинской реабилитации в

современных условиях». – М. – 1999. – С. 197–199.

11. Голиков, А.П. Свободнорадикальное окисление и сердечно-сосудистая патология: коррекция антиоксидантами / А.П. Голиков, С.А. Бойцов., В.П. Михин, В.Ю. Полумисков // Ж. Лечащий врач. – 2003. – № 4. – С. 32–38.

12. Гудкова, В.В. Ранняя реабилитация после перенесенного инсульта / В.В. Гудкова и др. // Журнал «Consilium Medicum». – 2005. – Т. 7. – № 8. – С. 692–696.

13. Дамулин, И.В. Использование Инстенона и энцефабола в неврологической практике / И.В. Дамулин // Москва, 2004. – 31 с.

14. Домашенко, Д.В. Сергеев, М.Ю. Максимова // Анн. клинич. и эксперим. неврол. – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 10–21.

15. Домашенко, М.А., Цитиколин в лечении ишемических нарушений мозгового кровообращения / М.А. Домашенко, М.Ю. Максимова, Д.В. Сергеев, М.А. Пирадов // Русск. медиц. журн. 2013. – № 30. – С. 1540–1542.

16. Исмагилов, М.Ф. Оценка эффективности церетона в остром периоде ишемического инсульта/ М.Ф. Исмагилов, О.В. Василевская, Р.Т. Гайфутдинов и др. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2009. – № 3. – С. 35–36.

17. Камаева, О.В. Мультидисциплинарный подход в ведении и ранней реабилитации неврологических больных: Методическое пособие / О.В. Камаева, П. Монро // Под ред. кад. РАМН, проф. А.А. Скоромца. – СПб, 2003. – 20 с.

18. Луцкий, И.С. Анализ эффективности мексидола в комплексном лечении больных с ишемическим инсультом/ Журн. неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. – 2010. – № 4. – С. 57–59.

19. Максимович, Н.Е. Использование биорегуляторного комплекса для коррекции повреждений головного мозга в условиях ишемии-реперфузии Н.Е.Максимович, И.К. Дремза, Э.И. Троян, А.Н. Бородинский //Достижения медицинской науки Беларуси. – 2012. – С. 164–166.

20. Максимович, Н.Е. Коррекция биоэнергетической функции митохондрий головного мозга крыс при реперфузионном синдроме с помощью дигидрохверцетина, тиамин, сукцинат и n-Ацетилцистеина / Максимович Н.Е., Дремза И.К., Троян Э.И., Бородинский А.Н., Максимович Е.Н. // Актуальные проблемы медицины. В 2-х частях. Часть 2: материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции (22 января 2013 г.) / Отв. редактор В.А. Снежицкий. – Гродно : ГрГМУ, 2013. – Ч. 2. – С. 34–38.

21. Максимович, Н.Е. Коррекция функции митохондрий при реперфузионном синдроме головного мозга с помощью комплекса препаратов (дигидрохверцетин, сукцинат, тиамин, ацетилцистеин) // Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Э.И. Троян // Мат. межд. научно-практ.

конф. «Белорусские лекарства», 22–23 ноября 2012 г. – Мн., 2012.– С. 150–152.

22. Максимович, Н.Е. Перспективы использования комплекса метаболитов и антиоксидантов в качестве нейропротекторов при ишемии-реперфузии головного мозга/ Н.Е.Максимович, И.К.Дремза, Э.И.Троян, А.Н. Бородинский // Сколково, 2012.–С. 68.

23. Одинак, М.М. Многоцентровое (пилотное) исследование эффективности глиатилина при остром ишемическом инсульте / М.М. Одинак, И.А.Вознюк, М.А. Пирадов и др. // Анн. клинич. и эксперим. неврол., 2010; 1: 20–28.

24. Одинак, М.М. Многоцентровое (пилотное) исследование эффективности глиатилина при остром ишемическом инсульте / М.М. Одинак, И.А. Вознюк., М.А.Пирадов и др. // Анн. клинич. и эксперим. неврол. – 2010. – 1. – С. 20–28.

25. Патент № (19)BY, (11) 10552, МПК (2006) С 07С 279/00 А 61Р 7/00/ N^G-миристоил-L-аргинин, обладающий антигипоксической активностью пролонгированного действия / Кравчя Н.А., Максимович Н.Е. – № заявки А20050947; Заявл. 10.03.2005; Опубл. 28. 01. 2008 // Афіцыйны бюлетэнь/ Нац. Центр інтелект. уласнасці РБ. – 2008. – № 4. – С. 112.

26. Патент №C1by, 5820, МПК А 61К 31/195 / Средство для коррекции ишемического инсульта / Максимович Н. Е., Маслаков Д. А. – № заявки А19991169; Заявл. 28.12.1999; Опубл. 29. 08. 2003 // Афіцыйны бюлетэнь/ Нац. Центр інтелект. уласнасці РБ. – 2003. – № 4. – С. 112.

27. Петельский, Ю.В. Новые организационные подходы к профилактике острых нарушений мозгового кровообращения в Гродненской области/ Ю.В.Петельский, М.Ю.Сурмач // Вопросы организации и информатизации здравоохранения. – 2017, № 2. – С. 37–47.

28. Пирадов, М.А. Применение цераксона в остром периоде полушарного ишемического инсульта: клиническая и КТ-перфузионная оценка/ М.А. Пирадов, Д.В.Сергеев М.В.Кротенкова // Анн. клинич. и эксперим. неврол. 2012; 3: 31–36.

29. Румянцева, С.А. Антиоксидантная терапия при остром ишемическом инсульте / С.А. Румянцева, В.Н. Евсеев, Е.В. Елисеев // Атмосфера. Нервные болезни. 2009; 3: 8–12.

30. Сергеев, Д.В. Цитиколин в лечении ишемического инсульта – новые доказательства эффективности / Д.В. Сергеев, М.А. Пирадов // Русск. медиц. журн. 2012; 31: 1552–1554.

31. Скворцова, В.И. Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности и безопасности мексидола в комплексной терапии ишемического инсульта в остром периоде / В.И. Скворцова, Л.В. Стаховская, Я.Р. Нарциссов и др. // Инсульт. Приложение к журн. неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. – 2006. –

№ 18. – С. 47–54.

32. Скоромец, А.А. Анализ эффективности различных лекарственных препаратов в лечении инсультов / А.А. Скоромец, В.В. Ковальчук // В сб. научно-практических статей: «Актовегин в неврологии». – Москва, 2002. – С. 152–164.

33. Суслина, З.А. Антиоксидантная терапия при ишемическом инсульте / З.А. Суслина, Т.Н. Федорова, М.Ю. Максимова, Т.В. Рясина // Журн. неврол и психиат Корсакова. – 2000. – № 100 (10). – С. 34–38.

34. Суслина, З.М. Проблемы лечения ишемического инсульта / З.А. Суслина, Е.А. Гераскина // Клин. фармакол. и тер. – 1996. – № 5 (4). – С. 80–83.

35. Суслинова, З.А. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика / З.А. Суслиной, М.А. Пирадова // М.: МЕДпресс-информ, – 2008.

36. Уминский, А.А. Биохимия флавоноидов и их значение в медицине / А.А. Уминский, Б.Х. Хавстеен, В.Ф. Баканева / Рос. акад. наук, Рос. акад. мед. наук, Пушин. науч. центр РАН, Ин-т биол. приборостроения РАН. – Пушино: Фотон-век, 2007. – С. 226–257.

37. Федин, А.И. Антиоксидантная терапия нарушений мозгового кровообращения / А.И. Федин, С.А. Румянцева // В сб. научно-практических статей: «Актовегин в неврологии». – Москва, – 2002. – С. 74–84.

38. Чугунов, А.В. Коррекция свободнорадикального окисления – патогенетический подход к лечению острого ишемического инсульта / А.В. Чугунов, П.Р. Камчатнов, Н.А. Михайлова // Журнал неврологии и психиатрии. – 2009. – № 10. – С. 65–67.

39. Adams, H.P. Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke. A Guideline From the American Heart Association / American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups / H.P. Adams, G. del Zoppo, M.J. Alberts [et al.] // Stroke. – 2007. – V. 338. – P. 1655–1711.

40. Alberts, M.J. Secondary prevention of stroke and the expanding role of the neurologist / M.J. Alberts // Cerebrovascular Diseases. – 2002; 13 (Suppl 1): 12–16.

41. Amaro, S. The URICO-ICTUS study, a phase 3 study of combined treatment with uric acid and rtPA administered intravenously in acute ischaemic stroke patients within the first 4.5 h of onset of symptoms / S. Amaro, D. Canovas, M. Castellanos. et al // Int J Stroke, 2010; 5(4): 325–328.

42. Ansari, M.A. Neuroprotective effect of allopurinol and nimesulide against cerebral ischemic reperfusion injury in diabetic rats / M.A. Ansari, S.K. Hussain, M.P. Mudagal, D.Goli // Eur. rev. med. pharmacol. Sci.–2013.–V. 17.– P. 170–178.

43. Bacigaluppi, M., Hermann D.M. New targets of neuroprotection in ischemic stroke / M. Bacigaluppi, D.M. Hermann // *Scientific World Journal*. – 2008. – V. 13. – P. 698–712.
44. Belayev, L. Human albumin therapy of acute ischemic stroke: marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window/ L.Belayev, Y. Liu, V. Zhao. et al. // *Stroke*, 2001 – 32– P. 553–560.
45. Berk, M. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry // M. Berk, G.S. Malhi, L.J. Gray, O.M. Dean // *Trends. Pharmacol. Sci.* – 2013. – V. 28. – P. 0165–6147.
46. Bitich, R. Bioavailability assesment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamine derivative/ Bitich R.,Wolf M., Meller J. et al. // *Ann. Nutr. Metab.* – 1991. – V. 35 (5). – P. 292–296.
47. Donnan, G.A. A New Road Map for Neuroprotection / G.A. Donnan // *The 2007 Feinberg Lecture. – Stroke.* – 2008. – V. 39. – P. 242.
48. Drummond, J.C. Neuroprotection failure in stroke / J.C. Drummond, P.M. Piyash, J.R. Kimbro // *Lancet.* – 2000. – V. 16. – V. 356 (9234).– P. 1032–1033.
49. Ginsberg, M.D. Current Status of Neuroprotection for Cerebral Ischemia / M.D. Ginsberg // *Synoptic Overview.* – *Stroke.* – 2009. – V. 40. – P. 111–114.
50. Ginsberg, M.D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future / M.D. Ginsberg // *Neuropharmacology.* – 2008. V. 55 (3). – P. 363–369.
51. Granger, D.N. Nitric oxide as antiinflammatory agent / D. N. Granger, P. Kubes // *Methods enzymol.* – 1996. – Vol. 269. – P. 434–442.
52. Green, A.R. Free radical trapping as a therapeutic approach to neuroprotection in stroke: experimental and clinical studies with NXY-059 and free radical scavengers. *Current Drug Targets / A.R. Green, T. Ashwood // CNS and Neurological Disorders.* – 2005. – V. 4 (2). – P. 109–118.
53. Hacke, W. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials / W. Hacke, G. Donnan, C. Fieschi, M. Kaste // *Lancet.* – 2004. – V. 363 (9411). – P. 768–74.
54. Heiss, W. Cerebrolysin in patients with acute ischemic stroke in Asia: results of a double-blind, placebo-controlled randomized trial / W. – D. Heiss, M. Brainin, N.M. Bornstein [et al.] // *Stroke.* – 2012. – V. 43. – P. 630–636.
55. Hong, Z. The clinical efficacy of Cerebrolysin in the treatment of acute ischemic stroke. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis.* – 2005. – V. 7. – P. 331–333.
56. Dave, K. Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus / K. Dave [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* – 2001. – Vol. 21 (12). – P. 1401–1410.
57. Koroshetz, W.J. Emerging treatment for stroke in humans

/ W.J. Koroshetz, M.A. Moskowitz // *TiPS*. 1996. – Vol. 17. – P. 227–234.

58. Maksimovich, N. Ye. The correction of the ischemia and ovariectomy by flax oil / N. Ye. Maksimovich, I.K. Dremza, Ye. N., Maksimovich, T.S. Milash, V.V. Yermak, E.I. Troyan // *Abstr. of the European stroke conference*. – Viena. – 2015. – P. 235.

59. Maksimovich, Ye. N. Epidemiology of ischemic strokes in the Grodno region (Belarus) / Ye. N. Maksimovich, T.P. Pronko, N. Ye. Maksimovich // *Abstr. of the European stroke conference*. – Viena. – 2015. – P. 178.

60. Olesen, J., Baker M.G., Freund T. et al. Consensus document on European brain research. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2006; 77; 110–149.

61. Qiu, Y. Effect of N-acetylcysteine on pharmacokinetics of acetaminophen in piglets // Y. Qiu, F. Cao, J. Xu et al. // *Pharmacol. Ther.* – 2013. – V. 31. – P. 12037.

62. Rundek, T. Atorvastatin Decreases the Coenzyme Q10 Level in the Blood of Patients at Risk for Cardiovascular Disease and Stroke / T. Rundek, A. Naini, R. Sacco et al. // *Arch. Neurol.* – 2004. – Vol. 61. – P. 889–892.

63. Scheinberg, P. The biologic basis for the treatment of acute stroke / P. Scheinberg // *Neurology*. – 1991. – V. 41 (12). – P. 1867–1873.

70. Cuzzocrea, S. Antioxidant Therapy: A New Pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury // S. Cuzzocrea, D.P. Riley, A.P. Caputi, D. Salvemini // *Pharmacol. Rev.* 2001. – Vol. 53, N 1. – P. 135–159.

71. Davalos A., Alvarez-Sabin J., Castillo J. et al. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). *Lancet*, 2012; 380: 349–357.

72. De Deyn P.P., Reuck J.D., Deberdt W. et al. Treatment of acute ischemic stroke with piracetam. Members of the Piracetam in Acute Stroke Study (PASS) Group. *Stroke*, 1997; 28: 2347–2352.

73. De Georgia M.A., Krieger D. W., Abou-Chebl A. et al. Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOL AID): a feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology*, 2004; 63: 312–317.

74. De Keyser J. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right things? / J. De Keyser, G. Sulter, P.G. Luiten // *Trends Neurosci.* 1999. – Vol. 22, N 12. – P. 535–540.

75. Donnan G.A., Davis S. M. Parsons M.W. et al. How to make better use of thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Nat. Rev. Neurol.* – 2011; 7(7): 400–409.

76. Effect of human recombinant prourokinase (rhpro-UK) on thromboembolic stroke in rats / C. Hao [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2017. – V. 56. – P. 89–101.

64. Edaravone Остроумова, М.Н. Возможность использования N-ацетилцистеина в профилактике рака / М.Н. Остроумова, И.Г. Коваленко, Л.М. Берштейн // *Эксперим. онкол.* – 1994. – Т. 16. – С. 96–101.

65. Wahlgren N.G., Ahmed N. Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies—the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis* 2004; 17 Suppl 1: 153–66
66. Xu, J.H. Protective effects of recombinant human bone morphogenetic protein-7 on focal cerebral ischemia-reperfusion injury / J.H. Xu, T.Z. Zhang, Y.Y. Zhao, et al. // *Int. J. Neurosci.* – 2013. – V. 7. – P. 213–216.
67. Yanaka, K. Camarata Reduction of brain injury using heparin to inhibit leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia / K. Yanaka, S.R. Spellman // *Dose–response effect and the therapeutic window*, 1996.
68. Young A.R., Ali C., Duretete A., Vivien D. Neuroprotection and stroke: time for a compromise. *J Neurochem* 2007; 103, 1302–1309.
69. Zhang, Z.G. Neuroprotective effects of ultra-low-molecular-weight heparin on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: involvement of apoptosis, inflammatory reaction and energy metabolism / Z.G. Zhang, X. Sun, Q.Z. Zhang, H. Yang // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 17. – P. 1932–1939.
70. Zhao, G. Effect of Melilotus officinalis extract on the apoptosis of brain tissues by altering cerebral thrombosis and inflammatory mediators in acute cerebral ischemia / G.C. Zhao, Y.L. Yuan, F.R. Chai, F.J. Ji // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – P. 1346–1352.

ГЛАВА 5. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ БИОЭНЕРГЕТИКИ И АКТИВНОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

Для исследования биоэнергетики клетки, в частности структурно-функционального состояния митохондрий, которое в значительной степени определяется интенсивностью образования свободных радикалов в митохондриальных компартментах и мембранных структурах, используется ряд методических подходов, к которым относятся:

1. Препаративные – с помощью которых из клеток различных органов выделяют митохондрии, митохондриальные фрагменты, дыхательные комплексы и отдельные ферменты.

2. Морфологические – включающие, прежде всего, электронную микроскопию изолированных и нативных митохондрий, с помощью которых исследуется структура митохондриальных мембран, размеры и форма митохондрий и митохондриальных компартментов.

3. Функциональные – с помощью которых исследуются механизмы потребления кислорода митохондриями и ресинтеза АТФ, определяется сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в интактных (изолированных) митохондриях, активность отдельных ферментов и комплексов электронтранспортной цепи митохондрий.

4. Детекция образования АФК в изолированных митохондриях и исследование активности свободнорадикального окисления мембранных липидов, митохондриальных белков и нуклеиновых кислот.

5. Прижизненные – включающие использование различных митохондриальных зондов для оценки функционального состояния митохондрий в культуре клеток или органов.

Все используемые подходы базируются на соответствующих биохимических и биофизических методах.

К рутинному, часто используемому в экспериментальной практике методу, который позволяет оценить функциональное

состояние интактных (изолированных) митохондрий, относится метод регистрации митохондриального дыхания, который может быть реализован практически в любой лаборатории.

Поскольку биоэнергетика головного мозга, в том числе, при ишемии/реперфузии зависит, прежде всего, от состояния углеводного обмена, а митохондрии чувствительны к продуктам свободнорадикального окисления и сами являются одним из основных источников их образования, является важным исследование активности ПОЛ и изменений показателей углеводного обмена в ткани головного мозга.

Изолирование митохондрий головного мозга крысы

Головной мозг после эвтаназии животных быстро препарировали, осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и помещали в среду выделения (объемом 50 мл), а после охлаждения немедленно гомогенизировали (при 0–4°C) в среде выделения (в соотношении 1:10), используя гомогенизатор Поттера-Эвельгейма с тефлоновым пестиком, согласно модифицированному классическому методу Lai и Clark (1964) [24]. Необходимый инструментарий и используемые растворы (среды) также были охлаждены до температуры 4°C.

Важную роль для исследования параметров митохондриального дыхания играет состав используемых сред для выделения и инкубации митохондрий и методика их выделения. Поэтому в наших исследованиях одним из начальных этапов работы была оптимизация состава среды для изолирования митохондрий головного мозга крыс. С этой целью мы использовали митохондрии, выделенные из головного мозга интактных крыс. Кроме того, нами было проанализировано влияние процедуры выделения митохондрий на их респираторную активность за счет изменения параметров дифференциального центрифугирования, продолжительности и скорости гомогенизации:

Вариант 1. Гомогенизация (60 с) в среде выделения, которая включала 0,32 М сахарозы, 20 мМ Трис-НСl, 2 мМ ЭДТА, рН 7,2. Скорость первого центрифугирования 4500 г (10 мин) для осаждения ядер, крупных клеточных фрагментов и

неразрушенных клеток. Повторное центрифугирование супернатанта при 11000g для осаждения митохондрий. Митохондрии ресуспендировали в 1,25 мл среды выделения и хранили в короткой пробирке на льду.

Вариант 2. Гомогенизация (60 с) в среде выделения, которая включала 0,32 М сахарозы, 20 mM Трис-НСl, 1,5 mM ЭДТА, рН 7,2. Скорость центрифугирования 1000 g (10 мин) для осаждения ядер, крупных клеточных фрагментов и неразрушенных клеток. Центрифугирование супернатанта при 11000 g для осаждения митохондрий. Митохондрии ресуспендировали и после второго центрифугирования (11000 g) ресуспендировали в 1,2 мл среды выделения и хранили на льду в короткой пробирке.

Вариант 3. Гомогенизация (60 с) в среде выделения: КСl 125 mM, Трис-НСl 20 mM, ЭДТА 1mM. Скорость центрифугирования 1000 g (10 мин) для осаждения ядер, крупных клеточных фрагментов и неразрушенных клеток. Супернатант, содержащий митохондрии использовали для регистрации респираторной активности.

Вариант 4. Гомогенизация (30 с) в среде выделения, которая включала 0,32 М сахарозы, 10 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТА, рН 7,4. Скорость первого центрифугирования для осаждения ядер, крупных клеточных фрагментов и неразрушенных клеток составляла 600 g (10 мин). Супернатант сохраняли, а осадок ресуспендировали в таком же объеме среды выделения и повторно гомогенизировали в течение 30 с. Далее гомогенат центрифугировали при 600 g (10 мин) для осаждения клеточных фрагментов. После этого осадок удаляли, а супернатанты объединяли и дважды центрифугировали при 12500 g (10 мин), ресуспендируя митохондриальную фракцию в среде выделения. Митохондрии после повторного центрифугирования ресуспендировали в 1,2 мл среды выделения подлежат хранению в пробирке на льду.

Лучшие параметры дыхания наблюдались в митохондриях, выделенных по четвертому варианту в среде, включающей: 0,32 М сахарозы, 10 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТА, рН 7,4.

Инкубационная среда для регистрации дыхания

митохондрий включала 0,17 М сахарозу, 40 mM KCl, 10 mM Трис-НСl, 5 mM KН₂РO₄, 8 mM КНСO₃, 0,1 mM ЭДТА, рН 7,4.

После изолирования митохондрии должны быть ресуспендированы в небольшом объеме среды выделения для получения конечной концентрации белка 40–50 мг/мл и подлежат хранению на льду. С целью опеределения концентрации белка использовался метод Лоури.

Исследование респираторной активности изолированных митохондрий головного мозга крыс с помощью полярографического метода

Для реализации данного метода используются кислородные электроды и полярографические ячейки различных типов, которые могут быть изготовлены в лабораторных условиях. На рисунке 3 приведена схема сконструированной термостатируемой герметической полярографической ячейки с кислородным электродом типа Кларка. Последний состоит из платинового катода и серебряного анода (рис. 5.1.), погруженных в один и тот же раствор концентрированного хлористого калия и отделенных от исследуемого раствора проницаемой для кислорода мембраной. Селективно проницаемая для кислорода мембрана (тефлон или другой материал) защищает электроды от загрязнения биологическим материалом или химическими агентами, таким образом, устраняя один из важных недостатков открытых электродов. С целью уменьшения инерционности устройства диффузионное расстояние для O₂ между мембраной и платиновым электродом должно было максимально уменьшено.

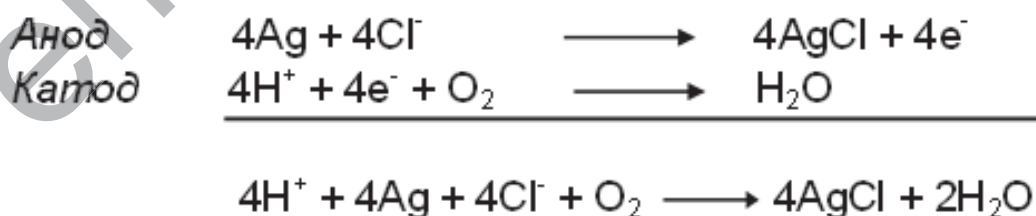


Рисунок 5.1 – Принцип кислородной полярографии

Принцип кислородной полярографии основан на электролитическом восстановлении O₂ на платиновом электроде

(катоде). Когда платиновый электрод используют в сочетании с хлорсеребряным (анодом), на аноде образуются четыре электрона, которые на катоде расходуются на восстановление одной молекулы кислорода.

В случае, когда напряжение на электродах составляет (0,5–0,8) В, то сила возникающего при этом тока прямо пропорциональна концентрации кислорода в суспензии митохондрий.

Регистрация изменений напряжения кислорода (pO_2) в суспензии митохондрий осуществляется с помощью электронных регистраторов (потенциометров), или же, в случае использования адаптеров с встроенным аналогово-цифровым преобразователем, непосредственно на персональном компьютере. Калибровка электрода Кларка проводится в течение эксперимента, путем последовательного продувания через ячейку воздуха (pO_2 воздуха) и азота ($pO_2=0$ мм рт. ст.), или же путем добавления в раствор, находящийся в ячейке, небольших количеств порошкообразного сульфита натрия, связывающего растворенный кислород. Процедура исследования респираторной активности митохондрий включает ряд этапов:

- внесение в ячейку 3,0 мл среды инкубации и 0,1 мл концентрированной суспензии митохондрий, с перемешиванием с помощью магнитной мешалки.

- закрытие ячейки модифицированной пробкой (рисунок 5.2), вытеснение воздуха и избыточного количества суспензии, уменьшение объема ячейки до 3,0 мл.

- введение через специальные каналы ячейки АДФ и других эффекторных в отношении дыхания субстратов в суспензию митохондрий (рис. 5.2.).

Реактивы. Все реактивы, используемые для приготовления среды инкубации митохондрий, должны иметь срок годности и квалификацию «ОСЧ» или «ЧДА». При необходимости они могут быть подвергнуты дополнительной очистке. Среда инкубации должна удовлетворять нескольким принципиальным условиям – быть изотоничной и изоосмолярной содержимому матрикса митохондрий, не должна содержать посторонних примесей (соли тяжелых металлов и др.). Гипоосмолярная среда приводит к

набуханию митохондрий, гиперосмолярная—к сморщиванию, что нарушает респираторную активность органелл.

Наиболее важными компонентами среды дыхания являются: KCl (генерация мембранного потенциала), H_3PO_4 (фосфорилирование АДФ), маннитол или сахароза (для создания оптимального осмотического давления). Состав сред инкубации для митохондрий, полученных из разных тканей, несколько отличаются. В зависимости от поставленной задачи (исследование дыхания, активности ферментов, набухания митохондрий и др.), подбирается и соответствующий состав среды для инкубации. Вода для приготовления среды дыхания должна быть максимально очищена (дважды дистиллирована и деионизирована).

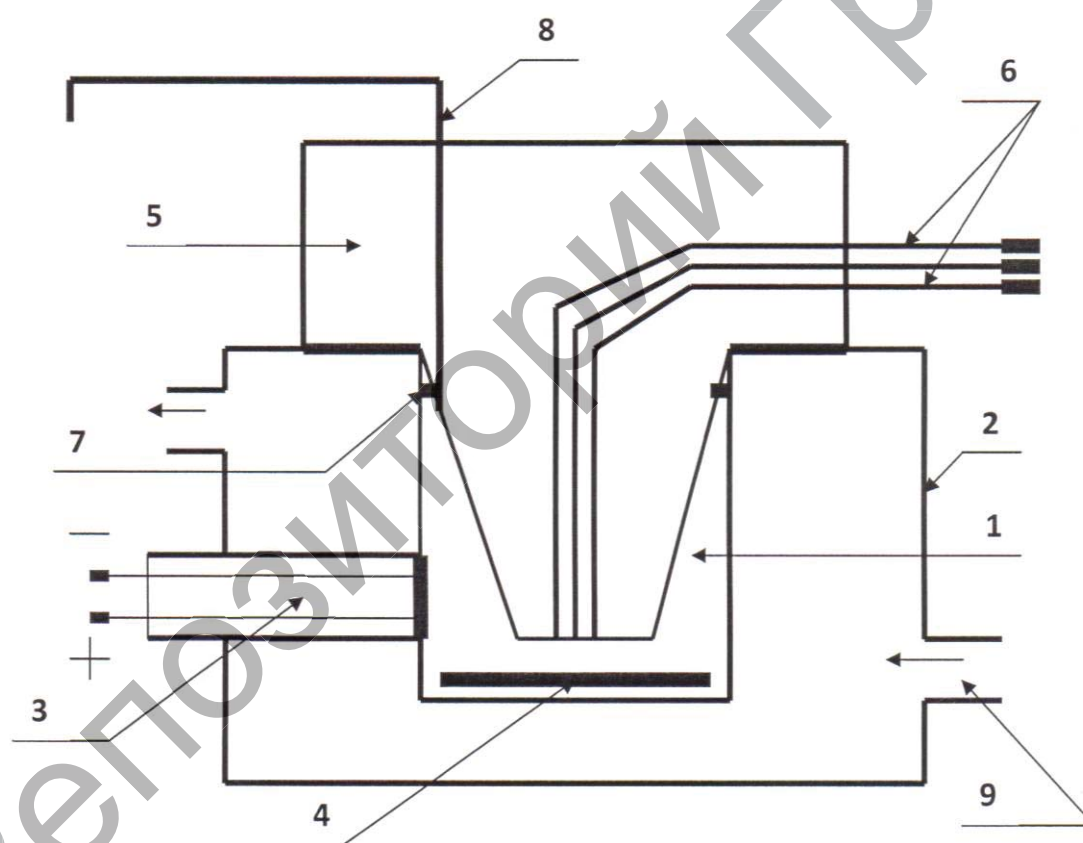


Рисунок 5.2 – Полярографическая ячейка для исследования респираторной активности митохондрий: 1 – ячейка;

- 2 – термостатируемая камера; 3 – электрод Кларка; 4 – магнитная мешалка; 5 – модифицированная пробка; 6 – каналы для дозированного анаэробного введения субстратов и АДФ; 7 – уплотнительное кольцо; 8 – канал для вывода воздуха и жидкости; 9 – штуцер для подключения к ультратермостату

Ниже приводится состав среды инкубации для исследования респираторной активности изолированных митохондрий печени крысы: 0,125М сахараза; 0,02 М Трис-НCl; 0,05 М KCl; 0,0025 М KH_2PO_4 ; 0,005 М MgSO_4 , 0,005 М EDTA, pH 7,5. Содержание компонентов в среде может варьировать в определенных пределах (в зависимости от степени очистки воды и решаемой задачи). Температура среды для исследования дыхания митохондрий не должна превышать 30°C. Регистрация изменений напряжения кислорода (pO_2) в суспензии митохондрий осуществлялась с помощью электронного регистратора.

Регистрация респираторной активности митохондрий и оценка результатов

Калибровка электрода. Электрод Кларка, расположенный в полярографической ячейке, перед каждым исследованием калибруется. Для этого через канал 8 полярографической ячейки, не содержащей жидкости, подается газообразный азот, который выходит из ячейки через канал 6. Продувка ячейки азотом приводит к удалению кислорода из ячейки и снижению его содержания (cO_2) практически до нулевого значения, которое регистрируется электродом Кларка. При этом на ленте регистратора записывается калибровочный сигнал, амплитуда которого измеряется в миллиметрах (рис. 5.3а). Для определения цены деления смещения пера регистратора (количество нг ат О на 1 мм) необходимо разделить ΔcO_2 (при 25°C – 450 нг атомов О) на амплитуду калибровочного сигнала в миллиметрах.

После калибровки электрода в ячейку вносится среда инкубации в определенном объеме (3 мл), а затем – 0,1 мл концентрированной суспензии митохондрий (содержание белка – 35–45 мг/мл). Конечная концентрация белка в суспензии митохондрий в ячейке доводится до ~ 1,0 мг/мл, после чего ячейка закрывается специальной пробкой, что приводит к удалению из нее воздуха, в ячейке остается строго заданное количество суспензии митохондрий без пузырьков воздуха и осуществляется регистрация количества поглощаемого митохондриями кислорода. На рисунке 5.3б представлена классическая кривая, отражающая метаболические состояния

митохондрий (1–4) и соответствующие им скорости потребления кислорода.

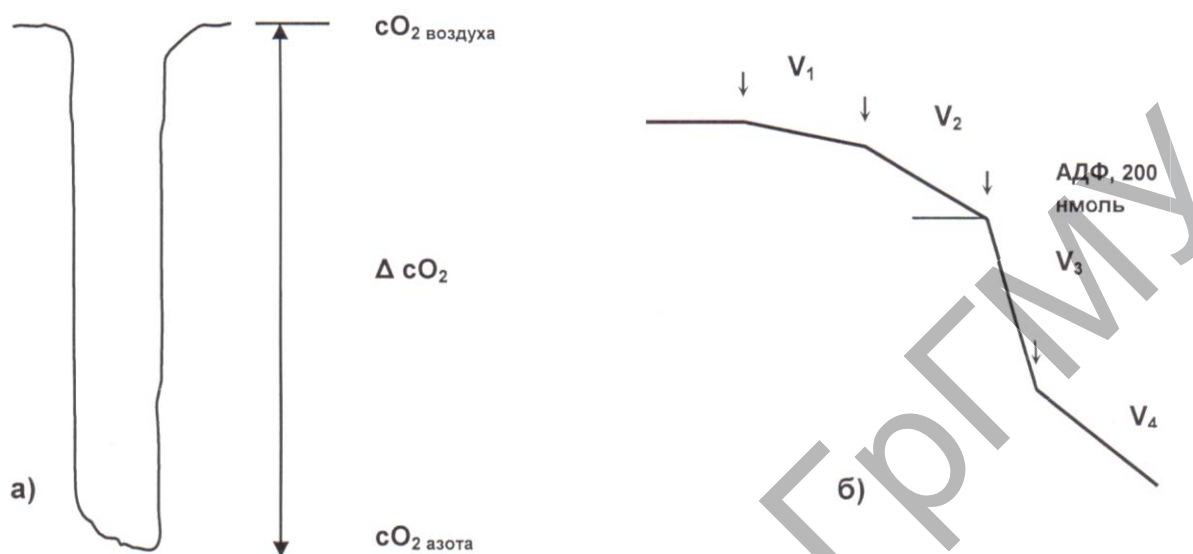


Рисунок 5.3 – Калибровочный график (а) и кривая поглощения кислорода (б) изолированными митохондриями головного мозга крысы: а – cO_2 воздуха – содержание кислорода в воздухе (или растворе при pO_2 воздуха), cO_2 азота – содержание кислорода в газообразном азоте, принимаемое равным нулю; б – стрелками слева направо обозначены моменты внесения в ячейку суспензии митохондрий, субстрата и АДФ и переход дыхания в четвертое метаболическое состояние, соответственно

По полярограмме можно рассчитать скорость дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях:

V_1 – скорость базального (эндогенного) дыхания, характеризующая поглощение кислорода после внесения в ячейку митохондрий.

V_2 – скорость субстрата-стимулируемого дыхания, определяемая по поглощению кислорода после внесения в суспензию митохондрий субстрата (сукцината, малата/глутамата или др.). Конечная концентрация субстрата в ячейке не должна лимитировать скорость митохондриального дыхания (примерно 5 mM).

V_3 – скорость АДФ-стимулируемого дыхания или скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием АДФ, определяемая после добавления в ячейку АДФ.

После фосфорилирования внесенного АДФ дыхание митохондрий замедляется, и регистрируется скорость V_4 , которая соответствует примерно скорости V_2 .

Зная скорости поглощения кислорода в метаболических состояниях 2, 3, 4, можно рассчитать параметры, характеризующие сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях: коэффициенты акцепторного контроля (V_3/V_2) и дыхательного контроля (V_3/V_4). Коэффициент фосфорилирования рассчитывается путем деления количества внесенного АДФ на количество поглощенного кислорода в 3-м метаболическом состоянии (рисунок 5.3б).

Окисление молекулы NADH в ЭТЦ сопровождается образованием 3 молекул АТФ; электроны от FAD-зависимых дегидрогеназ поступают в ЭТЦ на КоQ, минуя первый пункт сопряжения. Поэтому образуются только 2 молекулы АТФ. Отношение количества фосфорной кислоты (P), использованной на фосфорилирование АДФ, к атому кислорода (O), поглощенного в процессе дыхания, называют коэффициентом окислительного фосфорилирования и обозначают P/O. Следовательно, для NADH P/O = 3, для сукцината P/O = 2.

В расчете на каждый атом поглощенного кислорода (или на каждую пару переносимых электронов) митохондрии образуют максимум три молекулы АТФ (т.е. связывают три молекулы H_3PO_4 с АДФ). Отношение количества связанной H_3PO_4 к количеству поглощенного кислорода (O) называют коэффициентом фосфорилирования и обозначают P/O; следовательно, коэффициент P/O < 3.

ФАД-зависимые дегидрогеназы мембраны митохондрий не являются протонными насосами: в этом случае в цепи переноса электронов действуют только два пункта перекачки протонов – комплексы III и IV, и коэффициент P/O не может быть больше двух.

Дыхательный контроль. Окисление субстратов и фосфорилирование АДФ в митохондриях прочно сопряжены. Скорость использования АТФ регулирует скорость потока электронов в ЭТЦ. Если АТФ не используется и его концентрация в клетках возрастает, то прекращается поток электронов к кислороду.

Исследование параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса в гомогенатах головного мозга

Исследование параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса в гомогенатах головного мозга осуществляли на основе определения факторов антиоксидантной защиты: глутатиона, концентрации общих сульфгидрильных групп (TSH), ферментов, принимающих участие в его транспорте и регенерации (глутатионпероксидазы), конечных продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС).

Определение концентрации восстановленного глутатиона (GSH): концентрацию GSH в гомогенатах головного мозга определяли спектрофотометрически по методу Элмана. В чистую пробирку наливаем 1 мл 15% гомогената головного мозга, добавляем 0,2 мл 25% ТХУ, встряхиваем и центрифугируем при 5000 об/мин в течение 5-ти минут. К полученному супернатанту (0,2 мл) добавляем 1,2 мл 0,5 М фосфатного буфера (рН 7,8) и 50 мкл реактива Элмана. Концентрацию GSH рассчитываем, используя коэффициент молярной экстинкции $\varepsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ путем определения оптической плотности исследуемых образцов при $\lambda = 412 \text{ нм}$ на спектрофотометре «Cary» (USA).

Определение концентрации общих сульфгидрильных групп (TSH): для определения концентрации общих сульфгидрильных групп (белков и глутатиона) к 60 мкл гомогената головного мозга добавляем 30 мкл 3%-го раствора натриевой соли додецилсульфата. Затем к 25 мкл отобранной в чистую пробирку (эпиндорф) полученной смеси добавляем 1,2 мл 0,5 М фосфатного буфера (рН 7,8) и 50 мкл реактива Элмана. Концентрацию TSH рассчитываем после определения оптической плотности на спектрофотометре «Cary» при $\lambda = 412 \text{ нм}$ с учетом коэффициента молярной экстинкции после 10-минутной инкубации смеси при комнатной температуре.

Определение активности глутатионпероксидазы: для исследования активности глутатионпероксидазы в чистый эпиндорф вносили 0,8 мл Трис-НСl буфера (рН 7,25), содержащего 0,012 М азида натрия, 0,001М ЭДТА и 4,8 mM GSH.

После 3-минутного прогрева раствора при 37°C к нему добавляли 0,1 мл 20 мМ трет-бутилгидропероксида (т-БГП) и инкубируем 10 минут при температуре 37°C. Затем в чистую пробирку отбираем 0,1 мл полученного образца и добавляем к нему 0,02 мл 25% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Аналогичная процедура проводится для получения нулевой точки сразу же после добавления т-БГП. После добавления ТХУ пробы центрифугируем при 5000 об/мин в течение 5-ти минут. Для спектрофотометрирования берем 1мл фосфатного буфера (рН 7,8) к которому добавляем 30 мкл полученного супернатанта и 30 мкл реактива Элмана. Активность фермента выражаем в ммольях GSH/л⁻¹х мин⁻¹.

Определение содержания конечных продуктов перекисного окисления липидов: для определения конечных продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС) используется метод, основанный на реакции альдегидных продуктов перекисного окисления липидов, прежде всего, малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой, образующей при высокой температуре и низком рН триметилловый комплекс, состоящий из двух молекул тиобарбитуровой кислоты и одной молекулы МДА [62].

Согласно методике, к исследуемому образцу 10%-го гомогената головного мозга (0,3 мл) крысы последовательно добавляем 2,4 мл 0,07 N серной и 0,3 мл 10% фосфорновольфрамовой кислот. К дважды отмытому в бидистиллированной воде осадку, растворенному в 3,0 мл бидистиллированной воды, добавляем 1 мл 0,85%-го водного раствора тиобарбитуровой кислоты, растворенной в уксусной кислоте. Цветную реакцию проводим в герметически закрытых пробирках при температуре 96°C в течение 60 минут. После их охлаждения в течение 5 минут в водяной бане определяем оптическую плотность отцентрифугированного супернатанта на спектрофотометре «Cary» при длинах волн 532 нм и 580 нм.

Расчет концентрации МДА проводили по формуле:

$$\text{МДА} = \frac{(E_{532} - E_{580})}{0,156} \cdot K, \text{ где}$$

E – экстинкция при соответствующих длинах волн;
 V_1 – объем раствора тиобарбитуровой кислоты (1,0 мл);
 V_2 – объем исследуемого образца (0,3 мл);
 K – коэффициент разведения образца головного мозга равный 147,7.

Исследование углеводного обмена в гомогенате головного мозга и плазме крови

Известно, что при ишемии головного мозга, в первую очередь, нарушается аэробное окисление глюкозы, которое переключается с аэробного окислительного пути на анаэробный-гликолитический. Для определения конечных продуктов гликолиза (содержание лактата и пирувата) используется ферментативный (лактатдегидрогеназный) метод. С участием лактатдегидрогеназы молочная кислота превращается в пировиноградную кислоту. Если реакция протекает в гидразинглициновом буфере, то образующаяся в ходе реакции пировиноградная кислота связывается гидразином с образованием гидразон-пирувата, что создает условие для полного окисления лактата:

лактатдегидрогеназа



При этом концентрацию лактата или пирувата определяют спектрофотометрически («Specord UV-VIS») по образованию восстановленной или окисленной формы НАД при длине волны 340 нм, которое эквимолярно содержанию в образце лактата или пирувата.

Для определения концентрации лактата и пирувата используются 20%-е суспензии хлорнокислых гомогенатов

головного мозга и плазмы крови. Исследование показателей-маркеров редокс-состояния и окислительного стресса [60], а также параметров углеводного обмена (содержание пирувата, лактата) и дыхания митохондрий осуществляли в гомогенатах головного мозга.

Были исследованы митохондриотропные, антиоксидантные эффекты дигидрохверцетина (ДК), тиамин (Т), сукцинат натрия (С) и N-ацетилцистеина (АЦЦ), а также их корригирующее воздействие на показатели гликолиза в головном мозге крыс в условиях его ишемии/реперфузии. Продолжительность ишемического и реперфузионного периодов составила 1 час.

Дигидрохверцетин вводили внутривенно (ДКв/м, 60 мг/кг), тиамин (Т) в/м в дозе 25 мг/кг, сукцинат натрия в дозе 100 мг/кг, ацетилцистеин (АЦЦ), в дозе 100 мг/кг. В качестве контроля использовали ложноперированных животных (контроль-1), а также крыс с ИР без введения препаратов. В экспериментах на белых крысах исследованы состояние углеводного обмена головного мозга, биоэнергетической функции митохондрий головного мозга и редокс-состояния клеток мозга при реперфузионном синдроме и его коррекции с помощью биорегуляторного комплекса, включающего все вышеперечисленные компоненты – дигидрохверцетин, тиамин, сукцинат и N-ацетилцистеин.

Сравнение результатов осуществляли с показателями крыс контрольной группы (контроль) и крыс с ишемией/реперфузией, не получавших препараты, методами непараметрической статистики. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы «Statistica 10» после проверки на нормальность непараметрическими методами для количественных данных. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Литература

1. Барковский, Е.В. Современные проблемы биохимии. Методы исследований / Е.В. Барковский, С.Б. Бокуть, А.Н. Бородинский, В.У. Буко, Е.М. Дорошенко, И.К. Дремза, А.С. Дроздов, В.Ю. Смирнов // Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 491 с.

2. Бонь, Е.И. Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга / Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович

// Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 59 – 71.

3. Бородинский, А.Н. Состояние углеводного обмена в головном мозге крыс в условиях ишемии/реперфузии / Бородинский А.Н., Максимович Н.Е., Дремза И.К., Троян Э.И., Максимович Е.Н. // Актуальные проблемы медицины: мат-лы ежегодной итоговой научной конф. (15–16 декабря 2011 /отв. ред. М.Н. Курбат). – Гродно : ГрГМУ, – 2011. – С. 326 – 329.

4. Дремза, И. К. Респираторная функция митохондрий головного мозга крыс в условиях реперфузии/ И.К. Дремза., Н.Е. Максимович, Э.И. Троян, А.Н. Бородинский, Е.Н Максимович// Актуальные проблемы медицины: мат-лы ежегодной итоговой научной конф. (15–16 декабря 2011 /отв. Ред. М.Н. Курбат). – Гродно: ГрГМУ, 2011. – С. 338 – 341.

5. Дремза, И.К. Активность системы глутатиона в головном мозге крыс в условиях его ишемии-реперфузии и введения ацетилцистеина /Дремза И.К., Троян Э.И., Максимович Е.Н., Бородинский А.Н., Максимович Н.Е. // Мат. II-й межд. конференции «Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций XIII съезда белорусского общества физиологов» 19–20 апреля 2012 г. – Мн. – 2012. – С.44.

6. Дремза, И.К. Некоторые методические подходы к исследованию митохондрий / И.К. Дремза, Е.А. Лапшина, В.Т. Чещевик, И.Б. Заводник // Современные проблемы биохимии: учебное пособие; под ред. А.П. Солодкова и А.А. Чиркина. – Витебск, Изд-во «УО ВГУ им. П.М. Машерова». – 2010. – С. 123 – 135.

7. Камышников, В. С. Справочник по клинико–биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников // 3-е изд.– М.: МЕДпрессинформ, 2009. – 896 с.

8. Коваленко, Е.А. Полярографическое определение кислорода в организме / Е.А. Коваленко, В.А. Березовский, И.М. Эпштейн И.М. / М.: Медицина, 1975. – 232 с.

9. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – Москва: Медиасфера, 2002. – 312 с.

10. Северин, С.Е. Практикум по биохимии / С.Е. Северин [и др.] // – Москва: МГУ, 1989. – 508 с.

11. Anderson, M.E. Enzymatic and chemical methods for the determination of glutathione// Glutathione. 1989. – P. 339 – 365.

12. Casper, S. An isolation method for assessment of brain mitochondria function in neonatal mice with hypoxic-ischemic brain injury / S. Casper [et al.] // Dev. neurosci. – 2008. – V. 30, № 5. – P. 319 – 324.

13. Ellman, J. Tissue sulfhydryl groups / J. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – V. 82. – P. 70 – 77.

14. Khazanov, V.A. Respiration of rat brain mitochondria during hyperoxia and normoxia / V.A. Khazanov, A.N. Podorski // Bull. eksp. biol. i

med. – 1991. – Vol. 112, № 3. – P. 1258 – 1261.

15. Lai, J.C.K. Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondria from mammalian brain / J.C.K Lai, J.B. Clark // *Methods in Enzymology*. – 1979. – V. 55. – P. 28 – 32.

16. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // *J Biol Chem*. – 1951. – Vol. 193. – P. 265 – 275.

Репозиторий ГРГМУ

ГЛАВА 6. РЕСПИРАТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ И ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

6.1 Респираторная активность митохондрий при ишемии-реперфузии головного мозга

Степень ишемического повреждения головного мозга экспериментальных животных оценивали по показателям митохондриального дыхания, активности гликолиза (содержание пирувата и лактата), показателям прооксидантно-антиоксидантного баланса головного мозга крыс при моделировании его ишемии/реперфузии.

При анализе показателей дыхания митохондрий головного мозга было выявлено, что наибольшей респираторной активностью обладали митохондрии головного мозга контрольных животных. В частности, в этой группе крыс наблюдались наиболее высокие показатели: скорости АДФ-стимулированного дыхания, коэффициента дыхательного контроля (Ларди-Уилсона) и коэффициента степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования.

В группе животных, подвергнутых ишемии (1 час) и последующей реперфузии (1 час), отмечалось снижение некоторых параметров дыхания митохондрий: скорости АДФ-стимулируемого дыхания (V_3), коэффициента акцепторного контроля ($AK=V_3/V_2$), коэффициента дыхательного контроля ($DK=V_3/V_4$) и коэффициента фосфорилирования АДФ/О) относительно показателей в группе ложнооперированных крыс при использовании в качестве субстратов как сукцината, так и малата/глутамата.

В то же время не было выявлено достоверных различий относительно ряда показателей (V_1 – скорость эндогенного (базального) дыхания, V_2 – скорость субстрат-зависимого дыхания, V_4 – скорость дыхания после завершения фосфорилирования (расходования внесенного АДФ) ($p>0,05$) (рис. 6.1). При добавлении к взвеси митохондрий субстрата сукцината отмечено,

что в группе крыс, подвергнутых ИРГМ, по сравнению с группой ложнооперированных животных, наблюдалось снижение скорости субстрат-зависимого дыхания (V_2) на 48,1%, ($p>0,05$), скорости АДФ-стимулированного дыхания (V_3) – на 42,0% ($p<0,05$), скорости дыхания после завершения фосфорилирования АДФ (V_4) – на 36%, $p>0,05$, коэффициента акцепторного контроля (V_3/V_2) – до 1,15 (0,9; 1,35), $p<0,01$, в контроле – 1,5 (1,8; 2,1), коэффициента дыхательного контроля – до 1,17 (1,07; 1,62), в контроле – 1,70 (1,67; 2,02, $p<0,01$), коэффициента фосфорилирования – до 0,82 (0,6; 1,1; $p<0,01$) или в 2 раза ($p<0,05$), в контроле – 1,78 (1,6; 2,0, $p<0,01$) (рис. 5).

При использовании смеси малата/глутамата в качестве НАД-зависимых субстратов отмечались аналогичные закономерности в изменении параметров респираторной активности митохондрий: V_2 снизилась на 55%, V_3 – на 46% ($p<0,05$), скорость дыхания после завершения фосфорилирования АДФ (V_4) – на 36%, $p>0,05$ (рис. 6.1).

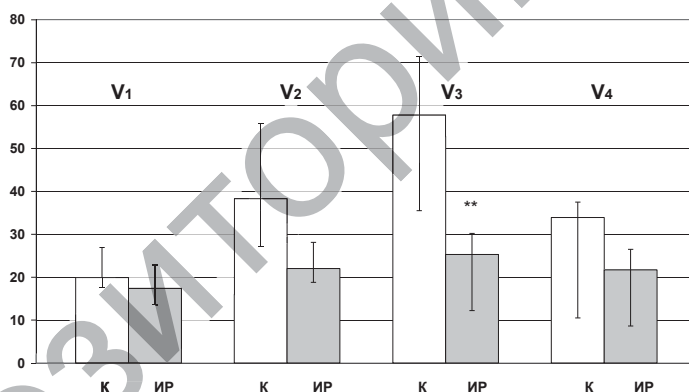


Рисунок 6.1 – Показатели митохондриального дыхания в митохондриях головного мозга крыс с ИРГМ. Субстратов сукцинат: V_1 – скорость базального (эндогенного) дыхания; V_2 – скорость субстрат-стимулируемого дыхания (субстраты: сукцинат, малат/глутамат); V_3 – скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием – АДФ-стимулированное дыхание; V_4 – дыхание митохондрий после расходования добавленного АДФ

Примечание: К – контроль,

ИР – ишемия/реперфузия.

* – $p<0,05$,

** – $p<0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p<0,05$,

– $p<0,001$, по сравнению со значением в группе ИР

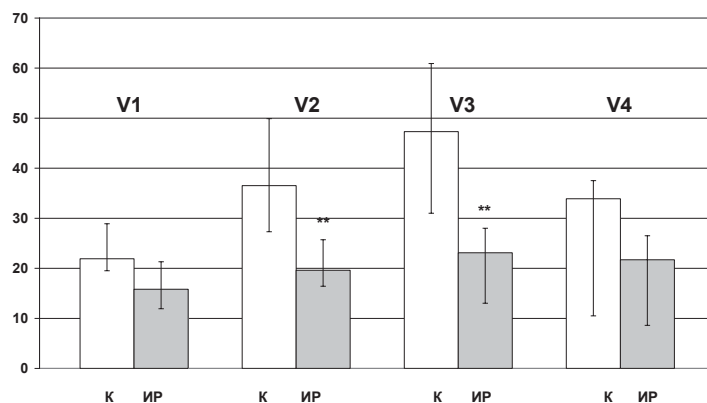


Рисунок 6.2 – Показатели митохондриального дыхания в митохондриях головного мозга крыс с ИРГМ.

Субстрат – малат/глутамат

Наряду со снижением показателей скорости митохондриального дыхания в присутствии субстратов (сукцината или малата/глутамата) и экзогенного АДФ, а также разобщением процессов окисления и фосфорилирования, отмечали существенное уменьшение роста активности митохондриального дыхания после внесения субстратов дыхания, по сравнению с базальным состоянием (V_2-V_1) (рис. 6.3.) и после внесения АДФ, по сравнению со скоростью митохондриального дыхания, после внесения субстратов (V_3-V_2) (рис. 6.4.).

Так, если показатель (V_2-V_1) у ложнооперированных крыс составил 92%, то у крыс с ИРГМ – только 26% после внесения в качестве субстрата сукцината и 20% – у крыс с ИРГМ после внесения малат/глутаматной смеси (в контроле – 1–67%) (рис. 6.3.).

В условиях использования сукцината в качестве субстрата дыхания отмечалось снижение коэффициента акцепторного контроля (V_3/V_2) – до 1,18 (0,73; 1,28), $p < 0,01$, в контроле – 1,29 (2,03; 2,44), коэффициента дыхательного контроля – до 1,06 (0,63; 1,28), в контроле – 1,40 (1,67; 2,02, $p < 0,01$), коэффициента фосфорилирования – до 1,15 (0,85; 1,4; $p < 0,01$) или в 2 раза ($p < 0,05$), в контроле – 1,9 (1,6; 2,0, $p < 0,01$) (рис. 6.5).

Следует отметить уменьшение коэффициента фосфорилирования в группе животных с ишемически-реперфузионным воздействием, по сравнению со значением в группе ложнооперированных крыс.

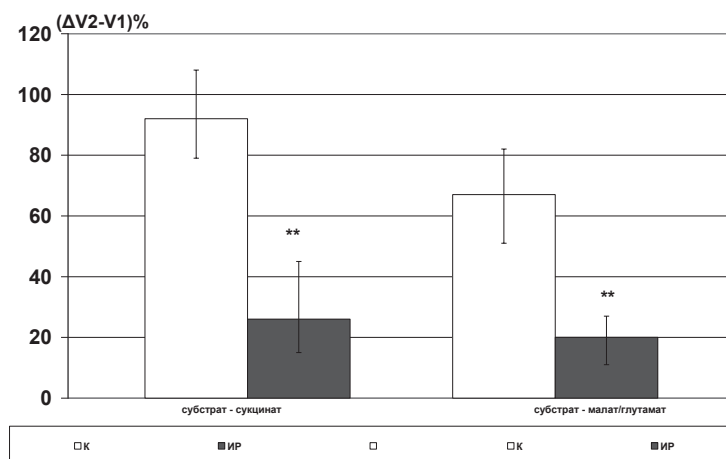


Рисунок 6.3 – Показатель роста скорости субстрат-зависимого дыхания:

$(V_2 - V_1)$ митохондрий крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга при использовании в качестве субстратов сукцината и малата/глутамата;

V_1 – базальное (эндогенное) поглощение кислорода интактными митохондриями; V_2 – скорость субстрат-стимулируемого дыхания (субстраты: сукцинат, малат/глутамат)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ.

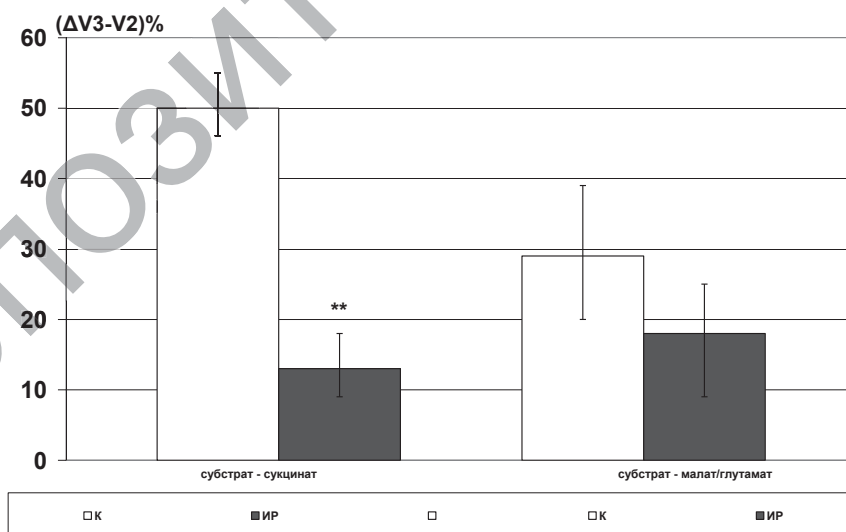


Рисунок 6.4 – Показатель роста скорости АДФ-зависимого дыхания

$(V_3 - V_2)$ митохондрий головного мозга крыс с ишемией-реперфузией (ИР) при использовании в качестве субстратов

сукцината и малата/глутамата

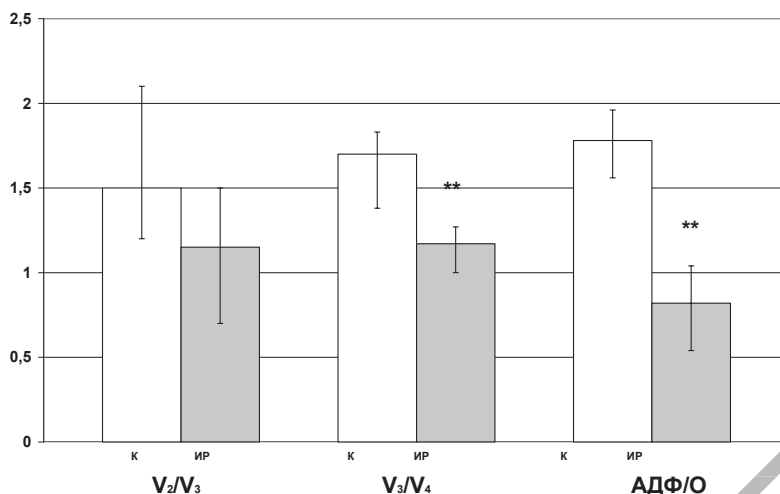


Рисунок 6.5 – Дыхание митохондрий головного мозга крыс при его ишемии-реперфузии:
коэффициенты акцепторного контроля (V_2/V_3), дыхательного контроля (V_3/V_4) и фосфорилирования (АДФ/О). Субстрат-малат/глутамат. Субстрат-сукцинат

Примечание: К – контроль,

ИР – ишемия/реперфузия.

V_3/V_2 – коэффициент акцепторного контроля;

V_3/V_4 – коэффициент дыхательного контроля;

АДФ/О – коэффициент фосфорилирования;

* – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ.

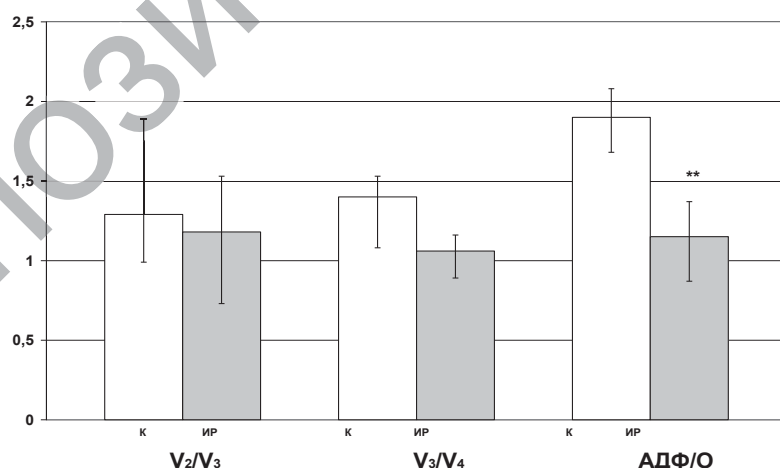


Рисунок 6.6 – Дыхание митохондрий головного мозга крыс при его ишемии-реперфузии:
коэффициенты акцепторного контроля (V_2/V_3), дыхательного контроля (V_3/V_4) и фосфорилирования (АДФ/О). Субстрат-малат/глутамат

Наряду с уменьшением прироста скорости субстрат-зависимого дыхания при использовании в качестве субстратов как сукцината, так и глутамата, а также АДФ-зависимого дыхания, отмечали снижение суммарного прироста митохондриального дыхания (V_3-V_1), определяемого путем вычисления процентного прироста скорости потребления кислорода митохондриями после внесения субстрата и после внесения АДФ (рис. 6.7.).

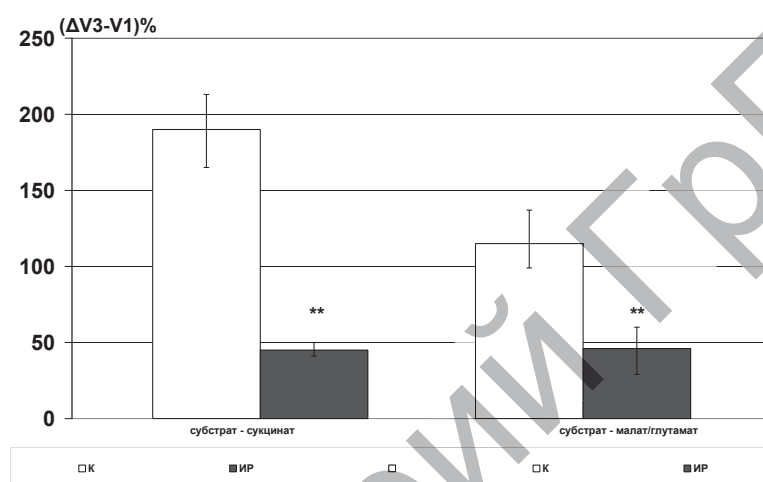


Рисунок 6.7 – Суммарный прирост скорости потребления кислорода митохондриями после внесения субстрата и АДФ:
 (V_3-V_1) у крыс с ишемией-еперфузией (ИР) головного мозга;
 V_1 – базальное (эндогенное) поглощение кислорода интактными митохондриями; V_3 – АДФ-стимулированное дыхание – скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ.

Полученные результаты свидетельствуют о значительном угнетении аэробной респираторной активности головного мозга крыс и разобщении процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях при ИРГМ в условиях использования в качестве стимуляторов дыхания обоих субстратов.

Нарушение функционирования комплекса I в условиях недостатка кислорода приводит к снижению окисления НАДН,

торможению цикла Кребса и накоплению в этих условиях глутамата, что, в свою очередь, может вызвать повышение активности глутамат-кальциевого каскада и развитие глутаматной эксайтотоксичности как одного из ведущих патогенетических механизмов ишемического повреждения головного мозга.

В течение ишемии головного мозга и последующего реперфузионного периода развиваются существенные нарушения тканевого дыхания, проявляющиеся в уменьшении активности кислородзависимых механизмов и компенсаторной активации анаэробных механизмов энергообразования.

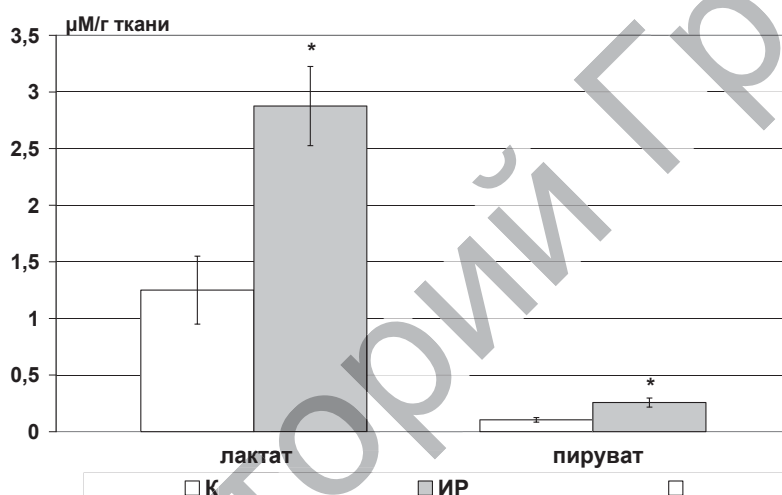


Рисунок 6.8 – Уровень лактата и пирувата в головном мозге крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ.

С помощью ферментативных методов установлены средние концентрации лактата в мозге ложнооперированных животных (1,25 (0,65; 1,75) μM на 1 г ткани). У крыс с ИРГМ в гомогенатах головного мозга отмечалось повышение содержания лактата до 2,88 (2,0; 3,45) μM на 1 г ткани (рис. 6.9). Возрастание содержания лактата в гомогенатах мозга ($p < 0,001$) спустя 1 час реперфузии свидетельствовало об активации анаэробных

гликолитических процессов в условиях ИРГМ. В условиях гипоксии повышается скорость поглощения пирувата и превращения его в молочную кислоту, что подтверждается полученными данными.

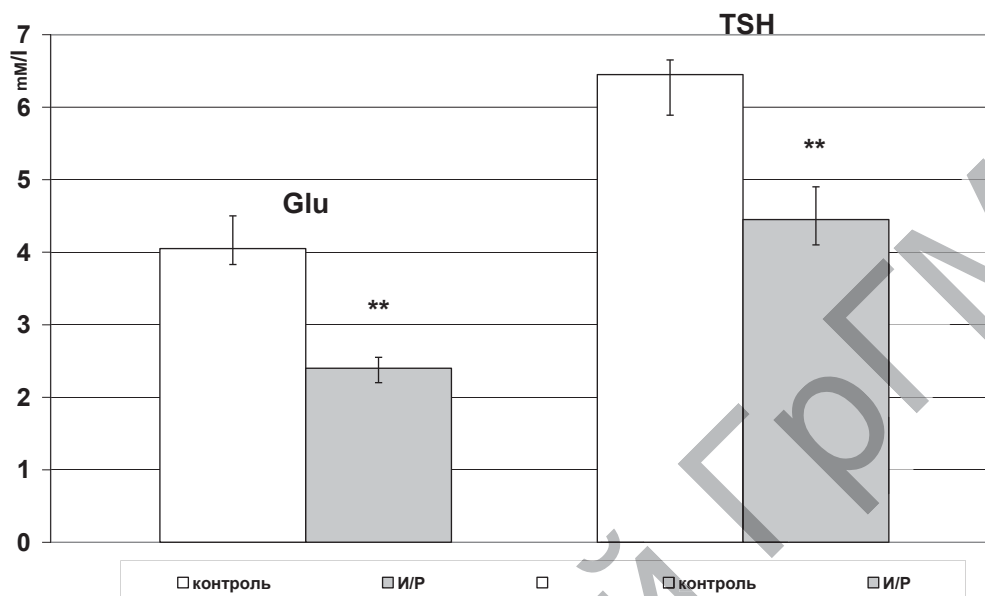


Рисунок 6.9 – Уровень восстановленного глутатиона (Glu) и общих SH-групп (TSH) в ткани головного мозга крыс с ишемией-реперфузией (И/Р) головного мозга

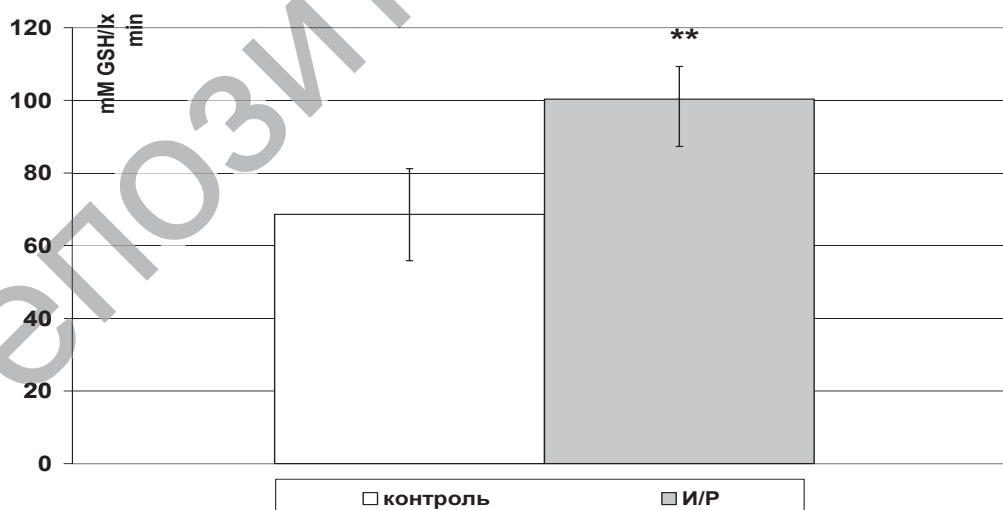


Рисунок 6.10 – Активность глутатионпероксидазы ($\text{mM GSH/l}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) в ткани головного мозга крыс с ишемией-реперфузией (И/Р) головного мозга

Очевидно, что в течение реперфузионного периода развивается повреждение как ферментов цикла Кребса, так и комплексов электронтранспортной цепи митохондрий, что в конечном итоге приводит к снижению включения пирувата в аэробный энергообмен митохондриями и активации его превращения в лактат. Уровень пирувата у крыс с ИРГМ повысился до 0,257 (0,02; 0,09) μM на 1 г ткани (в контроле – 1,25 (1,01; 0,59) μM на 1 г ткани ($p < 0,05$).

Как известно, лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует обратимую реакцию взаимопревращения лактата и пирувата и обладает высокой активностью. В условиях гипоксии повышается скорость поглощения пирувата и превращения его в молочную кислоту, что подтверждают полученные данные. Молочная кислота в тканях организма играет особую роль в связи с тем, что этот субстрат представляет собой своеобразный метаболический тупик, поскольку основным путем обмена лактата является легко обратимая лактатдегидрогеназная реакция.

В течение суточного реперфузионного периода содержание лактата в гомогенатах мозга уменьшилось ($p < 0,01$), по сравнению с ранним периодом ишемии/реперфузии, но превышало значение показателя у интактных животных. Значительное нарастание концентрации лактата вызывает снижение рН до 6,4–6,7, оказывая непосредственное цитотоксическое действие, вызывая «разрыхление» клеточных мембран, изменение их физико-химических свойств, способствуя повышению проницаемости нейронов и эндотелия сосудов, и, кроме того, усугубляя энергетические нарушения, глутаматную «эксайтотоксичность», изменяя регуляторные свойства вторичных мессенджеров и т.д. Комплексное повреждающее действие ацидоза является важным компонентом процессов острой церебральной ишемии и развития инфаркта мозга.

6.2 Показатели окислительного стресса в гомогенатах головного мозга крыс с ишемией-реперфузией

Определение уровня показателей-маркеров окислительного стресса выявило изменение концентрации показателей, его

характеризующих, зависящее как от продолжительности ишемического, так и от продолжительности реперфузионного периода, следующего за ишемическим.

В группе крыс с ишемией-реперфузией головного мозга отмечали существенное снижение показателей ферментативных механизмов защиты: концентрации восстановленного глутатиона и общих SH-групп (рис. 6.9). Выявлено достоверное снижение концентрации восстановленного глутатиона (SH-) на 41% ($p < 0,05$), общих SH-групп белков и глутатиона (TSH) – на 31% ($p < 0,05$) и повышение активности глутатионпероксидазы – на 46% ($p < 0,05$) (рис. 6.10). В этой же группе отмечали повышение уровня глутатионпероксидазы, отражающего высокую напряженность ферментативных механизмов антиоксидантной защиты в условиях реперфузионного повреждения головного мозга.

В реперфузионный период в ткани головного мозга также отмечался рост продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой – ТБКРС (на 27%, $p < 0,05$), что также свидетельствовало о повышении активности окислительного процесса.

Спустя сутки ишемии-реперфузии активность глутатионпероксидазы имела тенденцию к снижению, что можно трактовать как следствие истощения активности ферментативных механизмов защиты. Одновременно у крыс этой подгруппы отмечался рост ТБКРС (на 38%, $p < 0,05$), как следствие снижения активности ферментативных и ферментативных механизмов антиоксидантной защиты.

ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА БИОЭНЕРГЕТИКУ И ПОКАЗАТЕЛИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ

В последнее время в качестве цитопротекторов (в частности эндотелия сосудов), в том числе обладающие митохондриотропным действием, активно изучаются растительные полифенолы, которые могут выступать в качестве регуляторов микроциркуляции и, соответственно, биоэнергетики клетки.

Дигидрокверцетин (химическая формула $C_{15}H_{12}O_7$) является производным кверцетина. *Quercetinum. название химическое:* 2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-4Н-1-бензопиран-4-он дигидрат. Флавоноиды широко распространены в растительном мире. Особенно богаты ими листья гречихи, цветочные бутоны софоры японской, листья и плоды черной смородины, аронии черноплодной, рябины обыкновенной, трава зверобоя, плоды облепихи, семена конского каштана, листья крапивы, трава фиалки трехцветной и др. Содержится в растениях (преимущественно красного, багрового цвета): гречневой крупе, луке (особенно красном; содержание выше во внешних оболочках), яблоках, перце, чесноке, золотом усе, красном винограде, чае, цитрусовых, тёмной вишне, бруснике, томатах, брокколи, ботве, малине, чернике, клюкве, аронии, рябине, облепихе, водянике, плодах опунции, некоторых сортах мёда (эвкалиптовом, чайного дерева), орехах, цветной и краснокочанной капусте, красном вине, оливковом масле.

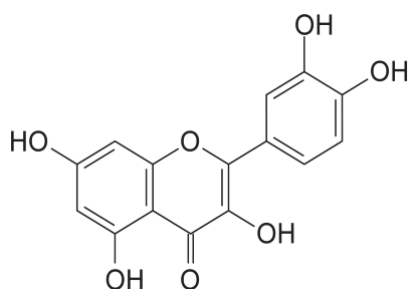


Рисунок 7.1 – Химическая формула кверцетина

Кверцетин выделяют из коры *Quercus tinctoria* кипячением с кислотами. Обнаружен также в хмеле, чае, кожуре лука, цветках мать-и-мачехи и др. В виде гликозидов содержится во многих цветках, листьях, плодах. 3-О – Рамнозид (кверцитрин) и 3-О-рамноглюкозид кверцетин (рутин) относятся к группе биофлавоноидов; Известный в Америке и Европе «Таксифолин» относится к антиоксидантам натурального происхождения, или биофлавоноидам. Содержится в большом количестве в комлевой части сибирской лиственницы или даурской лиственницы.

Однако имеются публикации, указывающие на то, что кверцетин может активировать митохондриальный биогенез, что приводит к увеличению количества митохондрий в ткани мозга, подвергнувшегося черепно-мозговым травмам.

Дигидрокверцетин, по сравнению с кверцетином, обладает меньшими токсическими свойствами и мутагенностью. Является потенциальным химиопрофилактическим средством: в экспериментах было показано его ингибирующее действие на рост клеток опухоли яичника. Также это вещество стимулирует синтез и стабилизирует структуру волокон коллагена, потенцирует (in vitro) эффект антибиотиков-левофлоксацина и цефтазидима, угнетает синтез меланина и способствует осветлению кожи с такой же эффективностью, как и используемый в косметологии арбутин.

Существует также сильная корреляция (с коэффициентом корреляции 0,93) между антипролиферативными эффектами дигидрокверцетина, полученными in vitro на коже мышей фибробластов и человека с раком молочной железы.

Способность дигидрокверцетина стимулировать образование фибрилл коллагена и способствовать стабилизации фибриллярных форм коллагена используется в медицине.

Полифенолы обладают умеренной липофильностью, акцепторно-донорными свойствами и наряду с выраженными антиоксидантными свойствами могут выполнять роль интермедиатов переноса электронов в ЭТЦ изолированных митохондрий.

Флавоноиды способны влиять как на сопряжение дыхания и фосфорилирования, так и на текучесть митохондриальных

мембран. Наиболее известными флавоноидами являются гинкго-билоба (Китай, Япония), пикногенол, содержащийся в коре ландской сосны (Франция) и флавонол дегидрохверцитин, выделенный из сибирской лиственницы (Россия).

Дигидрохверцитин обладает ангиопротекторными, гастропротекторными, регенерирующими, дезинтоксикационными, противоотечными и антиоксидантными свойствами, и относится к группе антиоксидантов и антигипоксантов.

Дигидрохверцитин оказывает стимулирующее влияние на биоэнергетику клетки, способен связывать свободные радикалы кислорода, повышать протонную проводимость клеточных мембран. В митохондриях он увеличивает синтез макроэргических соединений, повышает активность дыхательных ферментов. Также дигидрохверцитин регулирует пассивный транспорт ионов Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- , воздействуя на структуру дипольных молекул воды и синтез нуклеиновых кислот, влияя на состояние трансмембранных ионных каналов, рецепторы потенциалвозбудимых мембран, которые регулируются Na^- , K^- АТФазой, Na, Ca^- и Na^+/H^+ – обменниками, а также ферментами, которые входят в систему регуляции протеинкиназы А, включающей хеморецепторы, ц-АМФ, ц-ГМФ, фосфодиэстеразу, фосфолипазу А, кальмодулин, в систему регуляции протеинкиназы С (ПКС), связанной с ее влиянием на дифференцировку и деление клеток. Взаимодействие стимуляторов роста и гормонов с рецепторами клеточных мембран приводит к активации ПКС через увеличение концентрации таких вторичных мессенджеров, как диацилглицерол и ионы кальция. Препараты дигидрохверцитина оказывают положительное влияние на ЦНС, иммунную и кроветворную системы, на эпителий тонкого кишечника, что приводит к ускорению обменных процессов, увеличению общей неспецифической резистентности организма к различным видам патологии и неблагоприятным внешним воздействиям.

Дигидрохверцитин обладает способностью инактивировать активные свободные радикалы, например АФК, проявляя свою антиоксидантную активность при минимальных концентрациях (10^{-4} – 10^{-5}) в сравнении с другими известными антиоксидантами,

такими как витамины С, Е, каротин. К эффектам, характерным для дигидрохверцетина, относятся: улучшение микроциркуляции и текучести крови, ускорение восстановления соединительнотканых структур, снижение уровня холестерина и тромбообразования.

Дигидрохверцетин участвует в хелатировании ионов металлов с переменной валентностью, подавляя, таким образом, процессы свободнорадикального окисления, в том числе и путем инактивации липидных радикалов. В ряде исследований показано, что увеличение устойчивости тканей к повреждающему воздействию гипергликемии, оказываемое дигидрохверцетином, снижает риск осложнений сахарного диабета, а с другой стороны, облегчает течение сосудистых макро- и микроангиопатий.

Применение дигидрохверцетина оказывает в целом эндотелио- и капилляропротекторное действие, оптимизируя, таким образом, системный и периферический кровоток, уровень артериального давления, проницаемость сосудистой стенки, вязкость крови, капиллярную микроциркуляцию, что снижает риск преждевременного старения. Известно его положительное влияние на коронарный и мозговой кровоток, процессы возбудимости, проводимости и сократимости миокарда, трофики нервной системы.

Дигидрохверцетин оказывает ингибирующее действие на экспрессию молекул адгезии, опосредующих воспаление, предотвращая, таким образом, лейкоцитарную инфильтрацию ишемизированных областей головного мозга и миокарда. Показано также положительное действие дигидрохверцетина на липидный обмен и липидограмму крови, препятствующее развитию атеросклероза. В частности он подавляет синтез аполипопротеина В, одного из основных компонентов липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [Кожокару А.Ф.]. Дигидрохверцетин в условиях гипергликемии, понижает активность реакций перекисного окисления липидов, тормозит скорость деструктивных изменений в островках Лангерганса поджелудочной железы, достоверно снижая уровень глюкозы в крови. При этом подавляется провоспалительная активность нейтрофилов, снижается риск прогрессирования диабетических сосудистых осложнений.

Высокую эффективность показало применение дигидрохверцетина в реабилитационный период после инсульта и инфаркта миокарда, заключающееся в скорейшем восстановлении микроциркуляции, ограничении дистрофических и склеротических процессов. Так, у пациентов с нарушениями мозгового кровообращения при его применении улучшалась память в 70% случаев, на 60% повышалась концентрация внимания и интеллектуальный индекс. Кроме того, увеличивалась продолжительность сна, улучшалось настроение, и снижалась выраженность физического дискомфорта.

При использовании дигидрохверцетина улучшается кровоток в сетчатке глаза, тормозится развитие катаракты, ингибируется активность ферментов в хрусталике.

Дигидрохверцетин проявляет дезинтоксикационные свойства, заключающиеся в прямом взаимодействии с токсинами, связывании их в стабильную форму с последующим выведением из организма. За счет улучшения капиллярного кровотока ускоряется процесс выведения и обезвреживания токсинов и активированных канцерогенов.

Дигидрохверцетин замедляет воспалительные реакции в организме, обладает противогипоксическим действием, нормализует синтез коллагеновых волокон в коже, ускоряя заживление ран.

Биофлавоноиды, к которым относится дигидрохверцетин, оказывают положительное влияние на липидный обмен, в частности снижают образование или освобождение свободных радикалов макрофагами, тем самым защищают ЛПНП от окисления. Кроме того, они способны восстанавливать α -токоферил-радикал, а также повышать резистентность клеток к повреждающему действию окисленных ЛПНП. Дигидрохверцетин примерно на 50% снижает активность ключевого фермента синтеза холестерина – ГМГ-КоА-редуктазы (3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А-редуктазы), тем самым нормализует его синтез в организме, а также угнетает этерификацию холестерина. Кроме того дигидрохверцетин напрямую взаимодействует с гидроперекисями липидов, захватывает свободные радикалы и устраняет ингибирующее

влияние липопероксидов на ключевой фермент катаболизма холестерина в печени – микросомальную 7 α -гидроксилазу, а также на липопротеиновую липазу. Все выше сказанное проявляется нормализацией липидного профиля крови.

Дигидрокверцетин в сочетании с аскорбиновой кислотой в комплексной терапии атеросклероза способствует улучшению гемореологических показателей: снижению вязкости цельной крови за счет уменьшения степени агрегации и увеличения деформируемости эритроцитов, снижению содержания в эритроцитах и плазме крови продуктов перекисного окисления липидов. Включение дигидрокверцетина в состав комплексной терапии больных атеросклерозом при наличии цереброваскулярной патологии снижает частоту возникновения головной боли, шума в голове, головокружения, нарушения координации движений [2] и нормализации показателей холестерина обмена [3]. Прием дигидрокверцетина оказывает общее положительное влияние на функционирование организма, что выражается в снижении уровня глюкозы в крови и активности трансаминаз [3].

Показано, что при комплексной реабилитации больных после перенесенного инфаркта миокарда и аорто-коронарного шунтирования, дигидрокверцетин улучшает микроциркуляцию, вазомоторные реакции тканевого кровотока, снижает проницаемость капилляров. При этом нормализуется активность свертывающей и противосвертывающей системы крови, снижается содержание продуктов свободнорадикального окисления липидов в плазме крови и повышается активность антиоксидантных ферментов, что способствует улучшению оксигенации крови, функции внешнего дыхания и в конечном итоге приводит к улучшению центральной и легочной гемодинамики постинфарктного характера. Кроме того, уменьшаются психологические постинфарктные и постоперационные нарушения со снижением уровня реактивной тревожности. В сроки до 3–6 месяцев отмечается стабильность достигнутых после окончания курса лечения результатов, интегральным показателем которой является более высокий процент пациентов, восстановивших трудоспособность, после

инфаркта миокарда и аорто-коронарного шунтирования.

При артериальной гипертензии прием дигидрохверцетина в комплексе гипотензивной терапии улучшает параметры АД: более значительно снижается САД, ДАД, нормализуется вариабельность ночного САД, уменьшается показатель пульсового АД. Включение дигидрохверцетина в комплексные программы реабилитации больных гипертонической болезнью положительно влияет на субъективное состояние пациентов, способствует улучшению психофизиологических показателей (снижение частоты возникновения головных болей, шума в голове, головокружения, улучшение самочувствие, повышение работоспособности, активности и настроения).

Дигидрохверцетин в составе комплексной терапии способствует снижению в сыворотке крови концентрации NO_2 и NO_3 , тем самым нормализуя функцию эндотелия, снижает содержание в крови фибриногена и активности процессов ПОЛ. Он снижает потребность в нитроглицерине и повышает активность его антиангинального эффекта и толерантности пациентов к физической нагрузке при стенокардии. Кроме того, дигидрохверцетин улучшает микроциркуляцию, нормализует показатели кислотно-основного состояния и газов крови, снижает проявления дыхательной и сердечной недостаточности при ИБС [9].

Дигидрохверцетин опосредованно воздействует на центральную и периферическую гемодинамику, улучшает показатели центральной гемодинамики, способствует улучшению внешнего дыхания, устраняет спазм артерий, в том числе и коронарных, как в нормальных, так и пораженных атеросклеротическим процессом, способствует устранению микроангиопатий [9].

Курсовое применение дигидрохверцетина способствует активизации микроциркуляции, снятию застойных явлений в веноулярном звене, снижению внутрисосудистой агрегации эритроцитов и уменьшению проницаемости микрососудов [3].

Дигидрохверцетин снижает токсическое действие алкоголя на печень. От 75% до 98% поступившего в организм алкоголя, окисляется печенью. Ферменты печени способны окислить 0,1 г этанола на 1 кг массы тела в час. Дигидрохверцетин уменьшает

токсические эффекты спиртных напитков, существенно снижает повреждающее действие продуктов метаболизма алкоголя: уменьшает похмельный синдром, снижает потребность в очередной дозе алкоголя, обеспечивая тем самым снижение алкогольной зависимости.

Дигидрохверцетин обладает способностью подавлять активность процессов перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов и тромбоцитов у пациентов с сахарным диабетом второго типа, что проявляется в снижении содержания малонового диальдегида (МДА) в клеточной мембране, повышением активности ключевых антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы в эритроцитах, снижением агрегационной активности тромбоцитов. Применение дигидрохверцетина в комплексной терапии пациентов с СД 2 типа способствует снижению активности Na^+/H^+ -обменника в эритроцитарной мембране и повышению продукции NO, что свидетельствует о влиянии дигидрохверцетина на функциональную активность форменных элементов, реологию крови. Дигидрохверцетин способствует значительному снижению уровня HbA1c. Применение дигидрохверцетина в комплексной терапии пациентов с СД способствует снижению уровня МДА и величины клинического индекса оценки тяжести онихомикоза. Таким образом, дигидрохверцетин снижает уровень метаболических и структурных нарушений на фоне стойкой гипергликемии и поэтому может использоваться как средство для усиления базисной терапии сахароснижающими препаратами и раннего предупреждения микро- и макроангиопатий при сахарном диабете.

В целом, многочисленные научно-медицинские исследования, проведенные во многих странах, убедительно доказали, что дигидрохверцетин обладает различными ценными свойствами необходимыми в профилактике и эффективной борьбе с множеством различных заболеваний:

– имеет мощный антиоксидантный потенциал, препятствуя повреждающему действию свободных радикалов, тормозит процессы перекисного окисления липидов клеточных мембран и липопротеидов сыворотки крови, улучшает внутритканевое дыхание;

– защищает клетки головного мозга от воздействия свободных радикалов и оказывает выраженное антисклеротическое действие;

– устраняет повышенную хрупкость, ломкость, проницаемость артерий и капилляров, препятствует отложению холестериновых бляшек и снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний;

– ингибирует гиперагрегацию тромбоцитов, предотвращает образование тромбов и улучшает циркуляцию крови;

– нормализует сердечную деятельность при неврозах, вегетососудистой дистонии, обладает противоаритмической активностью, проявляет гипотензивное действие, нормализует артериальное давление;

– является мощным восстановительным агентом, ингибирует появление и рост злокачественных новообразований, обладает выраженным антиканцерогенным действием;

– предотвращает чувствительность к пищевым и пылевым аллергенам и является эффективным противоаллергическим средством;

– оказывает сильный антиоксидантный защитный эффект после хирургических операций, при проведении лучевой и химиотерапии, а также при тяжелых инфекционных заболеваниях (брюшной и сыпной тиф, туберкулез легких, гломерулонефрит и др.);

– как «чистильщик свободных радикалов» стимулирует синтез прочной соединительной ткани, повышает эластичность и упругость суставов, сухожилий, связок опорно-двигательного аппарата, оказывает регенерирующее, противовоспалительное действие, снимает боль;

– эффективен при лечении и профилактике дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов и позвоночника (остеоартрозы, ревматоидные артриты, остеохондрозы);

– повышает устойчивость тканей организма к повреждающему воздействию избыточного содержания сахара в крови, снижает уровень гликированного гемоглобина, снижая гликемию уменьшает риск развития осложнений сахарного диабета и уменьшает прогрессирование микро- и макроангиопатий;

– повышает остроту зрения, улучшает чувствительность и проводимость зрительного нерва, восстанавливает поврежденные

ткани, укрепляет мышцы и связки глаза;

- обладает в несколько раз более мощным антиоксидантным потенциалом, чем витамин С и витамин Е, усиливает их действие на организм (синергизм);

- способствует регенерации и функциональной активности поджелудочной железы, стимулирует образование и секрецию желчи и усиливает антитоксическую функцию печени;

- обладает гастропротекторной активностью, стимулирует процессы регенерации слизистой оболочки желудка, предотвращает развитие и способствует заживлению язвы желудка и двенадцатиперстной кишки;

- укрепляет иммунную систему, усиливает противовирусную, антимикробную и противоопухолевую активность;

- благоприятно влияет на кожные покровы, нормализует синтез коллагена и эластина в коже, способствуют сохранению упругости кожных покровов;

- оказывает выраженную профилактику основных заболеваний старения: рак, сердечно-сосудистые заболевания, болезни мозга.

Учитывая важную роль дигидрохверцетина, как потенциального антиоксиданта и переносчика электронов, было исследовано его влияние на параметры митохондриального дыхания, показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса головного мозга крыс при его ишемии/реперфузии. Также были определены интегральные показатели углеводного обмена – содержание лактата и пирувата.

Как показали полученные результаты, параметры митохондриального дыхания (скорость АДФ-стимулированного дыхания, коэффициента дыхательного контроля, коэффициента фосфорилирования) у крыс с ИРГМ, получавших ДКв, снижались менее выражено относительно группы крыс с ИРГМ без его введения при использования в качестве активаторов дыхания субстраты сукцинат и смесь малата/глутамата.

В группе животных, подвергнутых ИРГМ и получавших ДКв, при внесении в качестве субстрата дыхания сукцината отмечалось снижение скорости субстрат-стимулированного дыхания (V_2) на 38% (на 48% – без введения ДКв), скорости

АДФ-стимулированного дыхания (V_3) на 39% (на 57% – без ДКв, $p < 0,05$) (рис. 14), коэффициента акцепторного контроля – на 27% (на 43%, $p > 0,05$), коэффициента фосфорилирования – в 1,47 раза ($p < 0,05$). Не было отмечено изменений скорости дыхания в условиях потребления экзогенного АДФ (V_4) ($p > 0,05$).

Отмечалось повышение коэффициента акцепторного контроля (V_2/V_3) в условиях введения ДКв при использовании обоих субстратов (сукцината и малата/глутамата). Отмечалось также повышение значения коэффициента фосфорилирования (АДФ/О) в митохондриях клеток головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) в сочетании с введением ДКв в условиях введения обоих субстратов, по сравнению со значением показателя у крыс без введения флавоноида, что свидетельствовало о способности препарата повышать сопряженность процессов окисления и фосфорилирования.

В случае использования в качестве НАД-зависимых субстратов смеси малата/глутамата показатель V_3 снизился на 24% (на 41% без ДКв, $p < 0,05$), коэффициенты акцепторного контроля (V_3/V_2) – на 9% (на 69,7%, $p < 0,01$), дыхательного контроля (V_3/V_4) – на 25% (на 39,7%, $p < 0,01$), коэффициента фосфорилирования (АДФ/О) – на 29%, по сравнению со значениями у крыс с ИРГМ относительно группы ложноперированных животных (39,4%), $p < 0,01$.

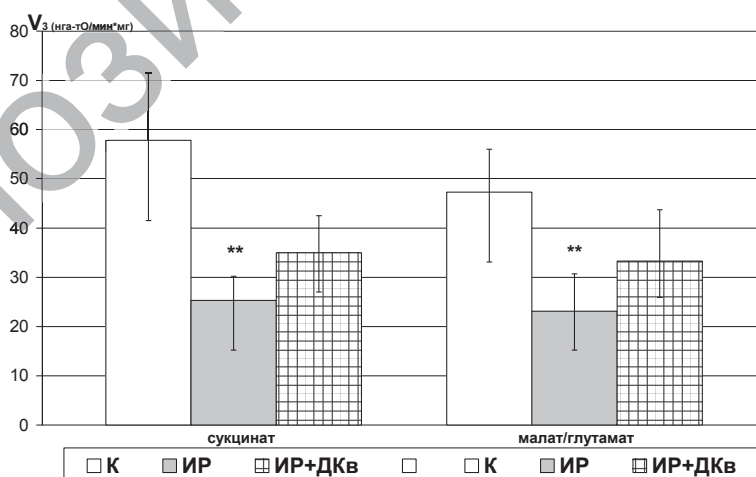


Рисунок 7.2 – Скорость АДФ-стимулированного дыхания (V_3) митохондрий клеток головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) и ИР в сочетании с введением ДКв (субстраты-сукцинат и малат/глутамат)

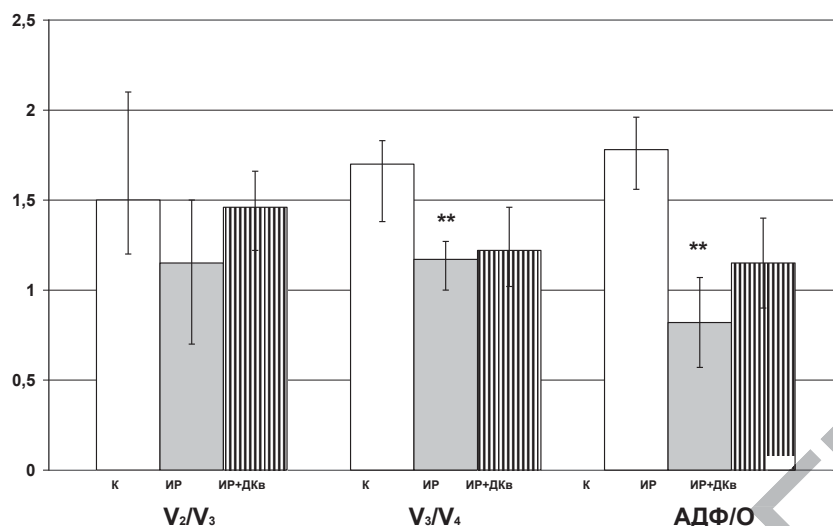


Рисунок 7.3 – Показатели акцепторного и дыхательного контроля, а также коэффициента фосфорилирования у крыс с ИР головного мозга в условиях использования дигидрокверцетина (ДКв).

Субстрат-сукцинат: V_3/V_2 – коэффициент акцепторного контроля; V_3/V_4 – коэффициент дыхательного контроля; АДФ/О – коэффициент фосфорилирования

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

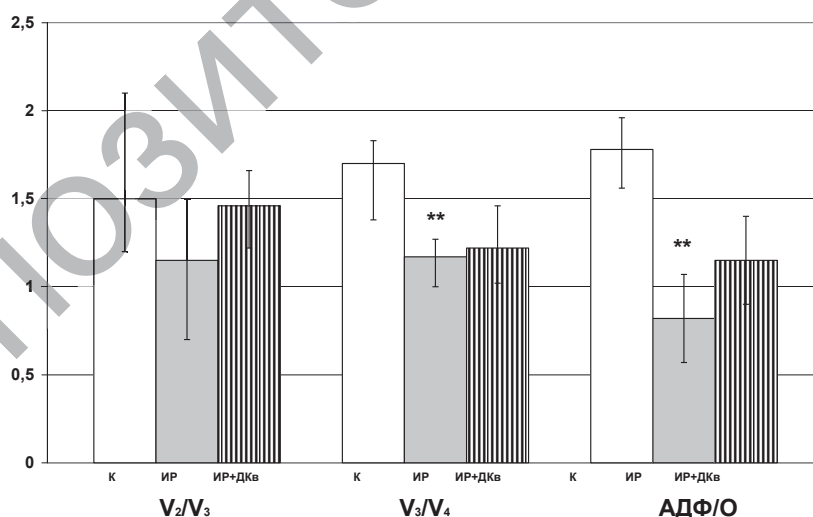


Рисунок 7.4 – Значения коэффициентов акцепторного контроля (АК), дыхательного контроля (ДК) и коэффициента фосфорилирования (АДФ/О) в митохондриях клеток головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) и ИР в сочетании с введением ДКв (субстрат малат/глутамат)

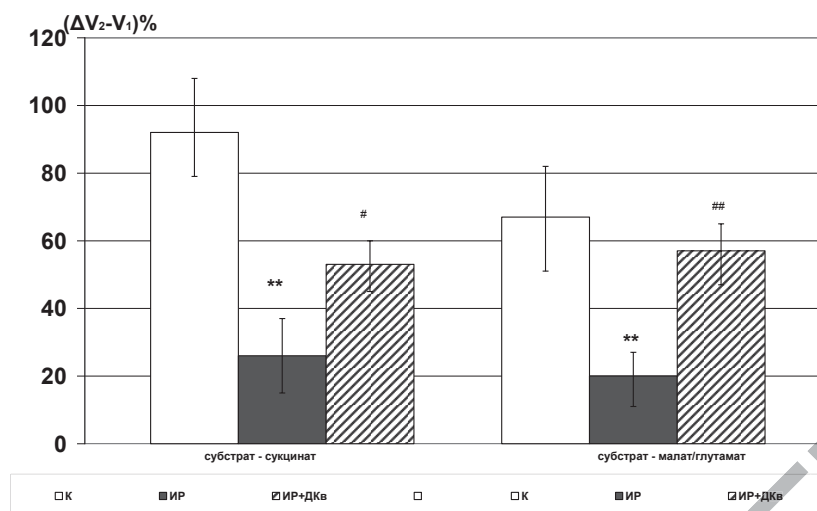


Рисунок 7.5 – Показатель роста субстрат-зависимого дыхания ($V_2 - V_1$) митохондрий крыс с ИРГМ с введением дигидрокверцетина (ДКв) после внесения в качестве субстрата сукцината и малат/глутамата

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

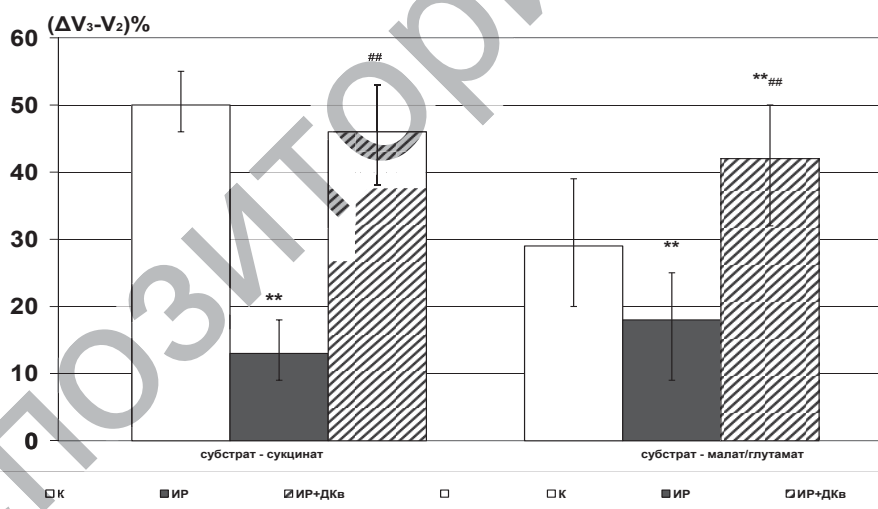


Рисунок 7.6 – Показатель роста АДФ-зависимого дыхания ($V_3 - V_2$) митохондрий крыс с ИРГМ с введением дигидрокверцетина (ДКв) после внесения в качестве субстрата сукцината и малат/глутамата.

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

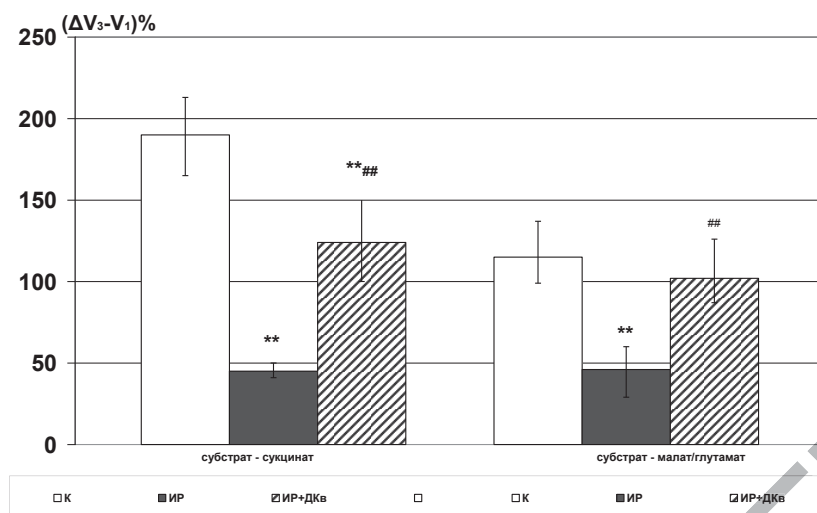


Рисунок 7.7 – Суммарный прирост скорости потребления кислорода митохондриями после внесения субстрата и после внесения АДФ (V_3-V_1) у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга и введения дигидрокверцетина (ДКв)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

У крыс с ИРГМ, получавшими ДКв, отмечали увеличение роста активности митохондриального дыхания после внесения субстратов дыхания, по сравнению с базальным состоянием (V_2-V_1) (рис. 7.5) и после внесения АДФ, по сравнению со скоростью митохондриального дыхания, после внесения субстратов (V_3-V_2), по сравнению с животными с ИРГМ без введения ДКв (рис. 7.6). Так, если у крыс с ИРГМ значение V_2-V_1 составило 26% (у ложнооперированных крыс – 92%) после внесения в качестве субстрата сукцината и 20% – у крыс с ИРГМ после внесения малат/глутаматной смеси (в контроле – 1–67%), то в условиях введения ДКв его значение составило 53% – при введении сукцината, $p < 0,05$ и 57% – при использовании малата/глутамата, $p < 0,05$.

Наряду с повышением прироста скорости субстрат-зависимого дыхания при использовании в качестве субстратов как сукцината, так и малата/глутамата, а также АДФ-зависимого дыхания у крыс с ИРГМ с введением ДКв, отмечали увеличение суммарного прироста митохондриального дыхания (V_3-V_1),

определяемого путем вычисления процентного прироста скорости потребления кислорода митохондриями после внесения субстрата и после внесения АДФ до 124%, по сравнению со значением показателя у крыс с ИРГМ без введения ДКв (45%), субстрат-сукцинат и до 102% (46% – при ИРГМ), субстрат-малат/глутамат, соответственно.

Концентрация лактата в головном мозге крыс, получавших ДКв, снизилась на 13% (до 2,5 (2,1; 2,9) по сравнению с животными с ИРГМ, его не получавшими, но оставаясь повышенной, по сравнению с уровнем у ложнооперированных животных контрольной группы. Уровень пирувата в мозге крыс, получавших ДКв, уменьшился на 33%, $p < 0,05$, по сравнению с животными с ИРГМ, его не получавшими, оставаясь повышенным, по сравнению с уровнем у ложнооперированных животных контрольной группы без моделирования реперфузионных повреждений на 47%. Эти результаты свидетельствуют о некотором положительном корригирующем эффекте используемого флавоноида на показатели углеводного обмена, что важно для поддержания энергетической функции митохондрий головного мозга в условиях его И/Р.

Определение показателей, характеризующих антиоксидантную защиту, после введения ДКв крысам с ИРГМ, выявило менее выраженное снижение концентрации глутатиона (на 33%, у крыс с ИРГМ – на 41%), по сравнению с крысами контрольной группы ($p < 0,05$), что на 12,5% больше, чем в группе крыс с ИРГМ без введения ДКв ($p < 0,05$); менее выраженное, чем у крыс с ИРГМ, уменьшение [TSH] (на 24%, $p > 0,05$), в группе крыс с ИРГМ без введения ДКв – на 31% ($p < 0,05$); что на 10% больше, чем у крыс с ИРГМ, не получавших ДКв ($p < 0,05$).

У крыс этой группы отмечалось повышение активности ГП, по сравнению со значением у ложнооперированных крыс, на 7% ($p > 0,05$), на 46% ($p < 0,05$) – у крыс с ИРГМ головного мозга, что свидетельствует о меньшей напряженности антиоксидантных механизмов ферментативной природы в условиях использования дигидрохверцетина. Концентрация ТБКРС при введении ДКв крысам с ИРГМ возросла на 20%, что ниже, по сравнению с ростом показателя (на 27%, $p > 0,05$) у крыс с ИРГМ без введения

ДКв. Это указывает на меньшую активность процессов перекисного окисления липидов у крыс с ИРГМ в условиях введения биофлавоноида.

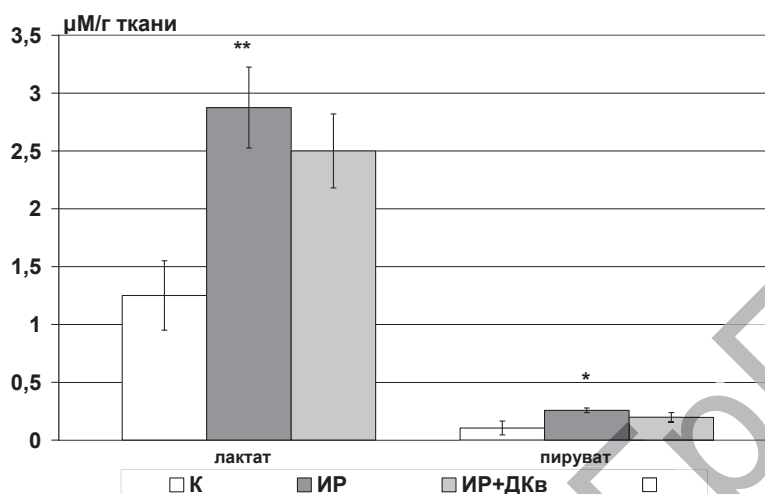


Рисунок 7.8 – Уровень лактата и пирувата в ткани мозга крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга, в условиях введения дигидрокверцетина (ДКв)

Примечание: * – $p < 0,05$,
 ** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;
 # – $p < 0,05$,
 ## – $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

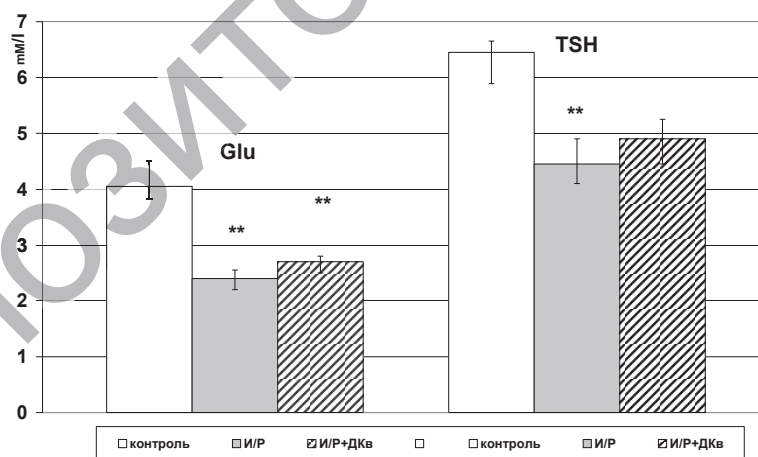


Рисунок 7.9 – Уровень восстановленного глутатиона (GSH) и общих SH-групп (TSH) в ткани головного мозга крыс при его ишемии-реперфузии (ИР) в условиях введения дигидрокверцетина (ДКв)

Примечание: * – $p < 0,05$,
 ** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;
 # – $p < 0,05$,
 ## – $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

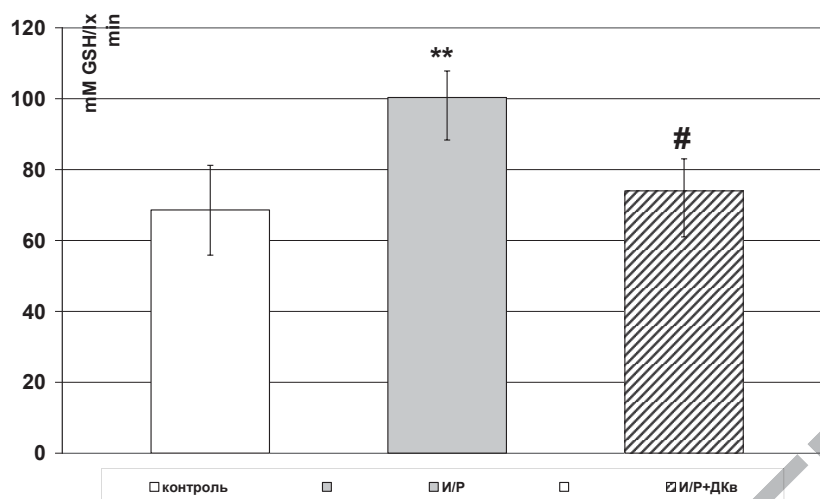


Рисунок 7.10 – Активность глутатионпероксидазы у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга в условиях введения дигидрокверцетина (ДКв)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

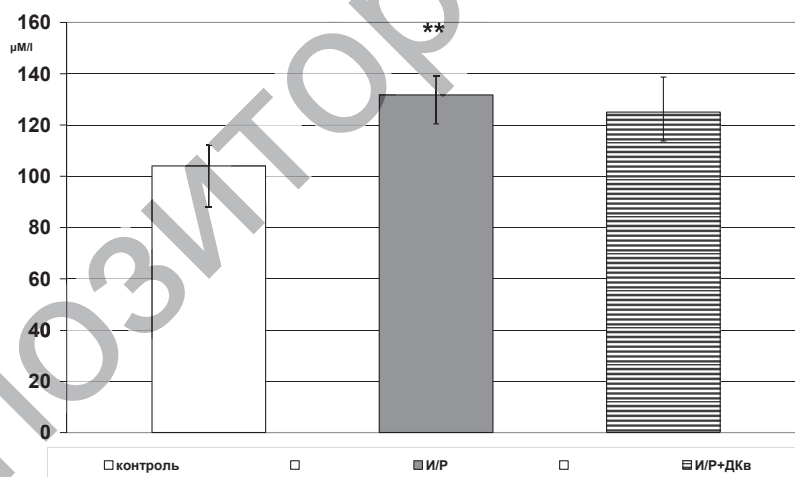


Рисунок 7.11 – Уровень продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС) у крыс с ИРГМ и введении дигидрокверцетина (ДКв)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

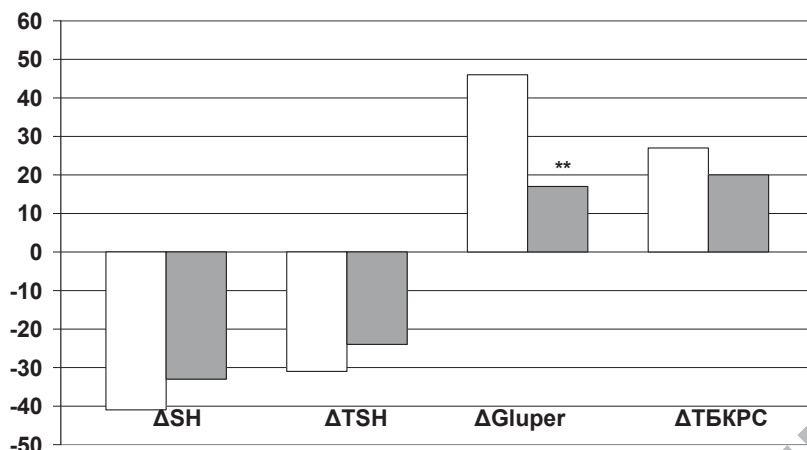


Рисунок 7.12 – Изменение уровня восстановленного глутатиона (Δ SH), общих SH-групп (Δ TSH), активности глутатионпероксидазы (Δ Gluper), продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС), у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга (светлые столбики) и введения дигидрокверцетина (ДКв) – темные столбики

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

Обобщая литературные источники и полученные данные можно заключить, что многосторонние положительные эффекты дигидрокверцетина и других биофлавоноидов на системные и регионарные показатели транспорта кислорода, микроциркуляцию, активность свободнорадикальных процессов в крови и тканях и связанных с ними нарушениях обмена веществ при различных видах патологии: сахарном диабете, артериальной гипертензии, ишемии головного мозга, ИБС и др. свидетельствуют о возможности использования дигидрокверцетина в комплексной терапии ишемически-реперфузионных поражений головного мозга.

Литература

1. Бабенкова, И.В. Механизм ингибирующего действия дигидрокверцетина на процесс пероксидного окисления фосфолипидов мембран / И.В. Бабенкова, Ю.О. Теселкин, Л.Б. Ребров // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2003. – № 6. – С. 37 – 43.

2. Бритов, А.И. Роль Капилар в коррекции метаболических нарушений у больных с атеросклерозом и артериальной гипертензией / А.И. Бритов, Т.В. Апарина // Лечащий врач. – 2006. – № 3. – С. 92 – 94.

3. Козлов, В. «Капилар» в коррекции микроциркуляторных Расстройств / В. Козлов, Г. Азизов, Бритов А.И. и др. // Российский университет дружбы народов Ежемесячный научно-практический и публицистический журнал «Врач». – № 6. – 2006.

4. Круглова, О. Г. Влияние дигидрохверцетина на продукты перекисного окисления липидов при холодовом воздействии / О.Г. Круглова и др. // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – № 3. – С.90 – 92.

5. Максимович, Н.Е. Дыхательная функция митохондрий головного мозга крыс с ишемией-реперфузией и коррекцией дигидрохверцетином / Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Э.И. Троян // Мат. респ. научно-практической конференции «Кислород и свободные радикалы» 17–18 мая 2012 г., Гродно. – Гродно: «ГрГМУ». – 2012. – С. 114 – 117.

6. Максимович, Н.Е. Коррекция биоэнергетической функции митохондрий головного мозга крыс при реперфузионном синдроме с помощью дигидрохверцетина, тиамин, сукцинат и п-Ацетилцистеина / Максимович Н.Е., Дремза И.К., Троян Э.И., Бородинский А.Н., Максимович Е.Н. // Актуальные проблемы медицины. В 2-х частях. Часть 2: материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции (22 января 2013 г.) / Отв. редактор В.А. Снежицкий. – Гродно : ГрГМУ, 2013. – Ч. 2. – С. 34 – 38.

7. Максимович, Н.Е. Коррекция функции митохондрий при реперфузионном синдроме головного мозга с помощью комплекса препаратов (дигидрохверцетин, сукцинат, тиамин, ацетилцистеин) // Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Э.И., Троян // Мат. межд. научно-практ. конф. «Белорусские лекарства», 22–23 ноября 2012 г. – Мн., 2012. – С. 150 – 152.

8. Максимович, Н.Е., Дремза И.К. Биоэнергетическая функция митохондрий при ишемии-реперфузии головного мозга и ее коррекция с помощью дигидрохверцетина и тиамин / Н.Е. Максимович, И.К. Дремза // Мат. конф. «Фундаментальные науки и современная медицина», Мн. «Экономпресс», 2012. – С. 190 – 192.

9. Шакула, А.В. Применение дигидрохверцетина в комплексном лечении при гипертонической болезни / А.В. Шакула, В.А. Некрасов, А.И. Щегольков и др. // РНЦ восстановительной медицины и курортологии, Центральная поликлиника «Газпром», ГИУВ МО РФ, Москва Ежемесячный научно-практический и публицистический журнал «Врач». – № 4. – 2008 г.

10. Щегольков, А.М. Применение биологически активной добавки «Капилар» (дигидрохверцетин) в медицинской практике / А.М. Щегольков, С.А. Белякин, И.И. Тихонов // Методические рекомендации. – ОАО «ДИОД». – Москва. – 2008. – 21 с.

11. Maksimovich, N.Ye. The Correcting Effects of Dihydroquercetin in Cerebral Ischemia–Reperfusion Injury // N.Ye. Maksimovich. I.K. Dremza, E.I. Troyan, Ya.N. Maksimovich A.N. Borodinskii // Biomedical Chemistry. – 2014. – Vol. 8, № 2. – P. 150 – 154.

12. Zinchenko, V.P. Biological activity of water–soluble nanostructures of dihydroquercetin with cyclodextrins // V.P. Zinchenko, Iu.A. Kim, Iu.S. Tarakhovskii, G.E. Bronnikov // Biofizika. – 2011. – V. 56. – P. 433 – 438.

РЕПОЗИТОРИЙ ГРГМУ

ГЛАВА 8.

ВЛИЯНИЕ ТИАМИНА НА БИОЭНЕРГЕТИКУ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ

Тиаминпирофосфат является одним из коферментов пируватдегидрогеназного комплекса митохондрий, осуществляющего окислительное декарбоксилирование пирувиноградной кислоты и превращение ее в ацетил-КоА. Он также входит в виде коферментов в состав изоцитрат и α -кетоглутаратдегидрогеназных комплексов, играющих важную роль в функционировании цикла Кребса. Тиамин выполняет коферментную функцию в составе дегидрогеназы разветвленных α -кетокислот, необходимой для катаболизма лейцина, валина, изолейцина. Витамин В₁ является активным участником пентозофосфатного пути расщепления углеводов в составе фермента транскетолазы, одним из конечных продуктов которого являются пентозы (рибоза), необходимые для синтеза нуклеиновых кислот. Многие симптомы авитаминоза В₁ обусловлены ингибированием указанных реакций и накоплением их исходных продуктов.

Участие витамина В₁ в качестве кофермента в составе дегидрогеназных комплексов цикла Кребса, локализованного в матриксе митохондрий определяют его важную роль в поддержании биоэнергетики тканей с высокой аэробной активностью производства АТФ, и прежде всего биоэнергетики нервных клеток. В частности была показана важная роль тиамин в обеспечении нормальной работы цикла Кребса, регенерации поврежденных нервных волокон, синаптической передаче. При недостатке витамина В₁ в тканях накапливаются пируват и лактат, уменьшается образование ацетил КоА из пирувата, замедляется работа цикла Кребса, нарушается синтез медиатора ацетилхолина. Известно, что тиамин оказывает корригирующее влияние при органической дисфункции головного мозга, способствует оптимизации функционирования мозга у здоровых людей, повышает способности к обучению и умственные способности в целом. Кроме того, дополнительный прием

витамина В₁ способствует более эффективному лечению депрессии, ряда других психических расстройств. Есть данные о положительном эффекте тиамин в отношении болезни Альцгеймера. Особенно резко нарушается при авитаминозе В₁ углеводный обмен в головном мозге. Действительно, при экспериментальном авитаминозе и при болезни «бери-бери» у человека происходит накопление пировиноградной кислоты, прежде всего в головном мозге, а позже в крови и других тканях. Соответственно, следствием тяжелого авитаминоза В₁ являются невриты, параличи, потеря чувствительности и др., а устранение его дефицита быстро восстанавливает способность тканей окислять пировиноградную кислоту.

Помимо участия в углеводном обмене, тиамин является модулятором нейро-мышечной передачи и обладает антиоксидантной активностью, в том числе и хелаторными свойствами.

В связи с определяющей ролью тиамин в процессах аэробного синтеза АТФ в головном мозге, мы исследовали его влияние на активность дыхания изолированных митохондрий головного мозга при его ишемии/реперфузии. Кроме того, при этом была исследована активность свободнорадикальных процессов и ключевые параметры углеводного обмена, в частности содержание в головном мозге пирувата и лактата.

Как показали полученные результаты, в группе животных, подвергнутых ИРГМ и получавших Т, при внесении в качестве субстрата дыхания сукцината отмечено снижение скорости АДФ-стимулированного дыхания (V_3) на 48% (на 57% – без Т, $p < 0,05$) (рис. 8.1.), коэффициента акцепторного контроля – на 29% (на 43%, $p > 0,05$), коэффициента дыхательного контроля на 40% или в 1,4 раза (на 18%, или в 1,4 раза, при ИРГМ без тиамин, $p < 0,05$), коэффициента фосфорилирования – в 1,1 раза (без препарата – в 2 раза, $p < 0,05$) (рис. 8.2.). Не было отмечено изменений скорости субстрат-индуцированного дыхания (V_2) и скорости дыхания в условиях потребления экзогенного АДФ (V_4) ($p > 0,05$).

Коэффициент дыхательного контроля (V_3/V_4) в условиях введения Т практически приближался к уровню контрольных животных при использовании в качестве субстрата сукцината

(рис. 8.2). Отмечалось также повышение значения коэффициента фосфорилирования (АДФ/О) в митохондриях клеток головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) в сочетании с введением Т (субстрат-сукцинат), по сравнению со значением показателя у крыс без введения витамина (рис. 8.2), что свидетельствовало о способности препарата повышать сопряженность процессов окисления и фосфорилирования.

При использовании в качестве субстрата смеси малат/глутамат, как и при внесении сукцината, предварительное однократное введение Т до моделирования ИРГМ, выявило менее выраженное снижение коэффициента фосфорилирования, а также коэффициентов акцепторного и дыхательного контроля, по сравнению со значениями показателей у крыс с ИРГМ без введения препарата.

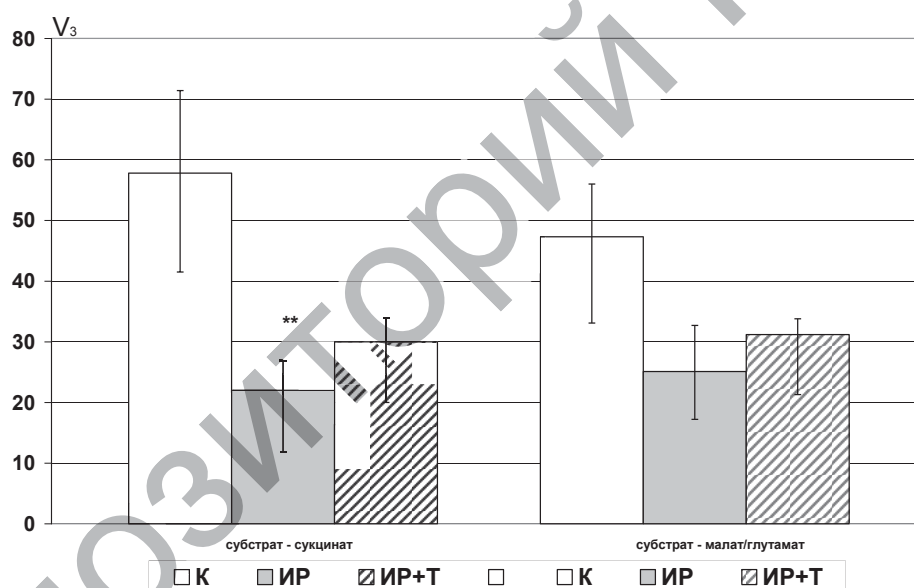


Рисунок 8.1 – Скорость АДФ-стимулированного дыхания (V_3) митохондрий клеток головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) головного мозга и ИРГМ в сочетании с введением тиамин (Т) (субстраты-сукцинат и малат/глутамат)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

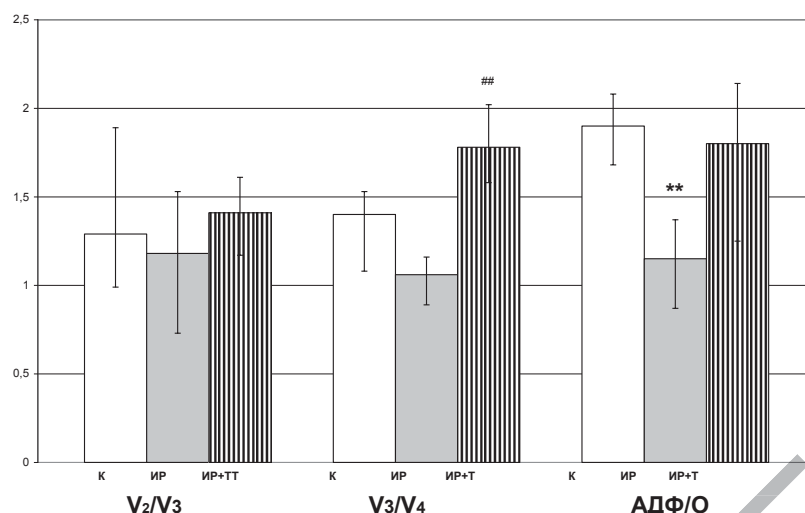


Рисунок 8.2 – Значения коэффициентов акцепторного контроля (АК), дыхательного контроля (ДК) и коэффициента фосфорилирования (АДФ/О) в митохондриях клеток головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) и ИР головного мозга в сочетании с введением Т (субстрат малат/глутамат):

V_3/V_2 – коэффициент акцепторного контроля; V_3/V_4 – коэффициент дыхательного контроля; АДФ/О – коэффициент фосфорилирования

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

В случае использования в качестве НАД-зависимых субстратов смеси малат/глутамат: V_3 снизилась на 24% (на 41% – без Т, $p < 0,05$), коэффициент акцепторного контроля (V_3/V_2) – на 9% (на 69,7%, $p < 0,01$), дыхательного контроля (V_3/V_4) – на 25% (на 39,7%, $p < 0,01$), коэффициент фосфорилирования (АДФ/О) – на 29%, по сравнению со значением у крыс с ИРГМ относительно группы ложноперированных животных (39,4%).

У крыс с ИРГМ, получавшими Т, отмечали увеличение роста активности митохондриального дыхания после внесения субстратов дыхания, по сравнению с базальным состоянием (V_2-V_1) (рис. 8.3) и после внесения АДФ, по сравнению со скоростью митохондриального дыхания, после внесения субстратов (V_3-V_2), по сравнению с животными с ИРГМ без введения Т (рис. 8.4).

У крыс с ИРГМ значение V_2-V_1 составило 26% (у ложнооперированных крыс – 92%), после внесения в качестве субстрата сукцината и 20% – у крыс с ИРГМ после внесения малат/глутаматной смеси (в контроле – 1–67%), в условиях введения Т его значение составило 52% при введении сукцината и 47% – при использовании малата/глутамата (рис. 8.3).

Наряду с повышением прироста скорости субстрат-зависимого дыхания при использовании в качестве субстратов как сукцината, так и глутамата, а также АДФ-зависимого дыхания у крыс с ИРГМ с введением Т, отмечали увеличение суммарного прироста митохондриального дыхания (V_3-V_1), определяемого путем вычисления процентного прироста скорости потребления кислорода митохондриями после внесения субстрата и после внесения АДФ до 110%, по сравнению со значением показателя у крыс с ИРГМ без введения Т (80%), $p < 0,05$, субстрат-сукцинат и до 127% (46%), $p < 0,05$, субстрат-малат/глутамат, соответственно (рис. 8.5).

Концентрация лактата в мозге крыс, получавших тиамин, снизилась в 1,25 раза, по сравнению с животными с ИРГМ, его не получавшими, оставаясь выше, по сравнению с таковым у ложнооперированных животных контрольной группы, в 1,84 раза (рис. 8.6). Концентрация пирувата в мозге крыс с ИРГМ с введением тиамина, снизилась в 1,4 раза, по сравнению с уровнем у крыс с ИРГМ, не получавших Т, но оставалась в 1,8 раза выше, чем у крыс без моделирования реперфузионных повреждений, $p < 0,05$.

Известны косвенные метаболические влияния тиамина, оптимизирующие антиоксидантный статус тканей организма путем активации утилизации пирувата в цикле Кребса, участия тиаминдифосфата в качестве кофермента пируватдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы, а также транскетолазы-ключевого фермента пентозофосфатного пути.

Эффекты тиамина в отношении показателей системы глутатиона, а также перекисного окисления липидов были аналогичными эффектам дигидрохверцетина, но носили менее выраженный корригирующий характер.

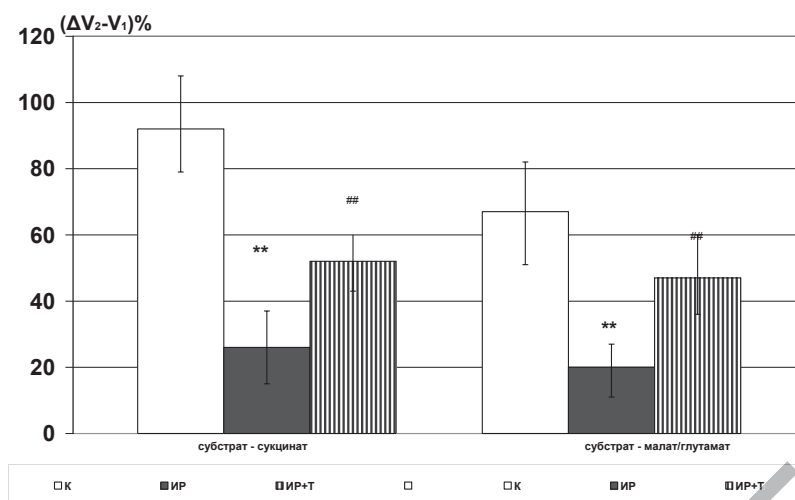


Рисунок 8.3 – Показатель роста субстрат-зависимого дыхания (V_2V_1) митохондрий крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга с введением тиамин (Т) после внесения в качестве субстрата сукцината и малат/глутамата

Примечание: * – $p < 0,05$,
 ** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;
 # – $p < 0,05$,
 ## – $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

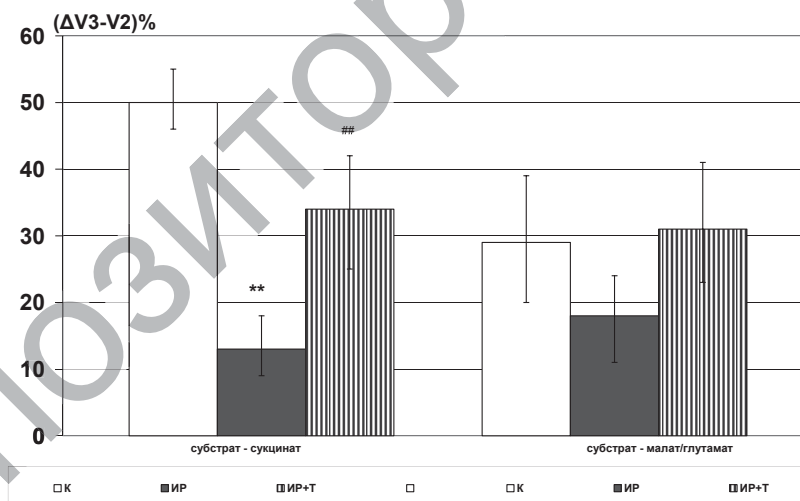


Рисунок 8.4 – Показатель роста АДФ-зависимого дыхания (V_3-V_2) митохондрий крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга с введением тиамин (Т) после внесения в качестве субстрата сукцината и малат/глутамата

Примечание: * – $p < 0,05$,
 ** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;
 # – $p < 0,05$,
 ## – $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

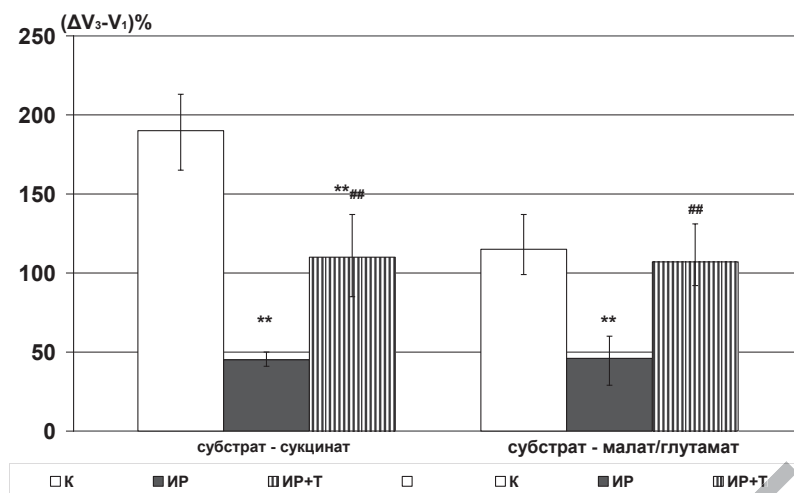


Рисунок 8.5 – Суммарный прирост скорости потребления кислорода митохондриями после внесения субстрата (сукцината или малата/глутамата) и АДФ ($V_3 - V_1$) у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга и введения тиамин (Т)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

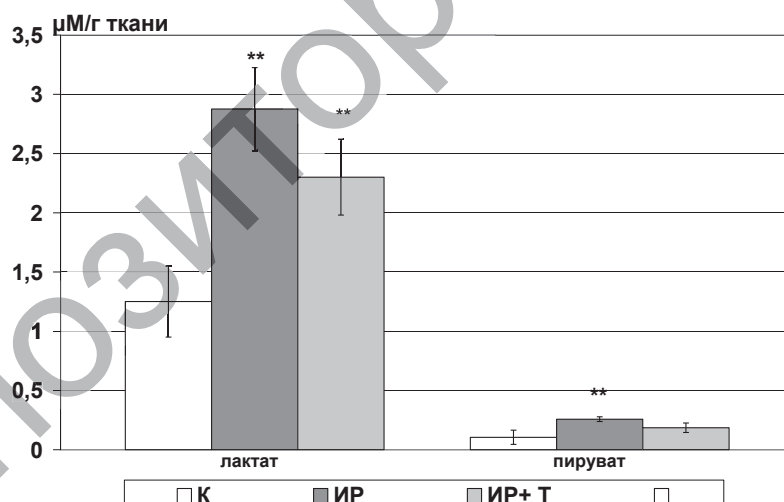


Рисунок 8.6 – Уровень лактата и пирувата в ткани мозга крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга, в условиях введения тиамин (Т)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

Определение показателей, характеризующих антиоксидантную защиту, после введения Т крысам с ИРГМ, выявило снижение концентрации восстановленного глутатиона на 36%, по сравнению с крысами контрольной группы ($p > 0,05$), что на 8,3% больше, чем в группе крыс с ИРГМ без введения Т (41%) ($p < 0,05$); уменьшение [TSH] – на 21%, $p > 0,05$ (в группе крыс с ИРГМ без введения Т – на 31%, $p < 0,05$); что на 12% больше, чем у крыс с ИРГМ, не получавших Т ($p < 0,05$) (рис. 8.7; рис. 8.10).

В условиях использования тиаминa отмечалось повышение активности ГП, по сравнению со значением показателя у ложнооперированных крыс, на 10% ($p > 0,05$), на 46% ($p < 0,05$) – у крыс с ИР головного мозга (рис. 8.8; рис. 8.10).

Концентрация ТБКРС при введении Т крысам с ИР головного мозга возросла на 20%, что ниже, по сравнению с ростом показателя (на 27%, $p < 0,05$) у крыс с ИРГМ без введения Т. Это указывает на меньшую активность процессов перекисного окисления липидов у крыс с ИРГМ в условиях введения витамина (рис. 8.9, рис. 8.10).

Согласно общепринятым представлениям антиоксидантные эффекты тиаминa могут реализовываться через образование его гидрофобных метаболитов-тиохрома и оксидигидротиохрома, которые способны к инактивации диоксида азота и других активных форм кислорода, препятствуя, таким образом, нитрованию тирозинильных остатков белков при окислительном стрессе.

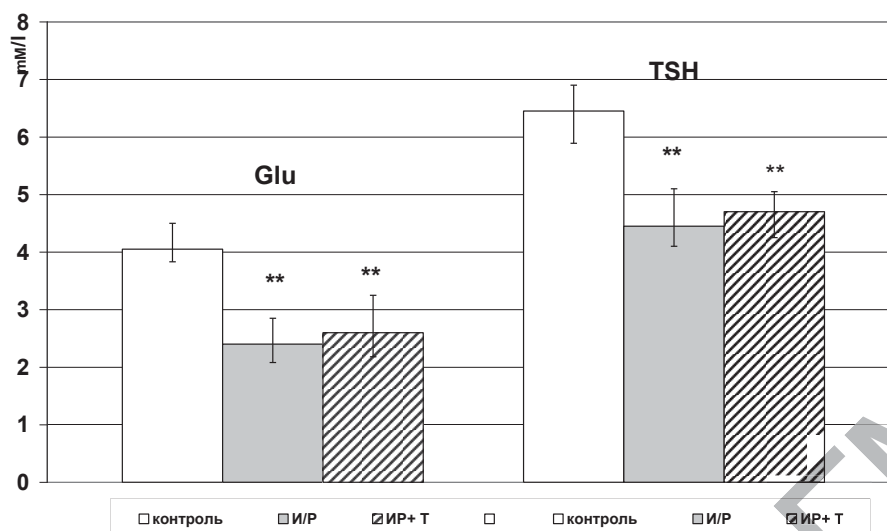


Рисунок 8.7 – Содержание восстановленного глутатиона (GSH) и общих SH-групп (TSH) в головном мозге крыс с ИРГМ при введении тиаминa (Т)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

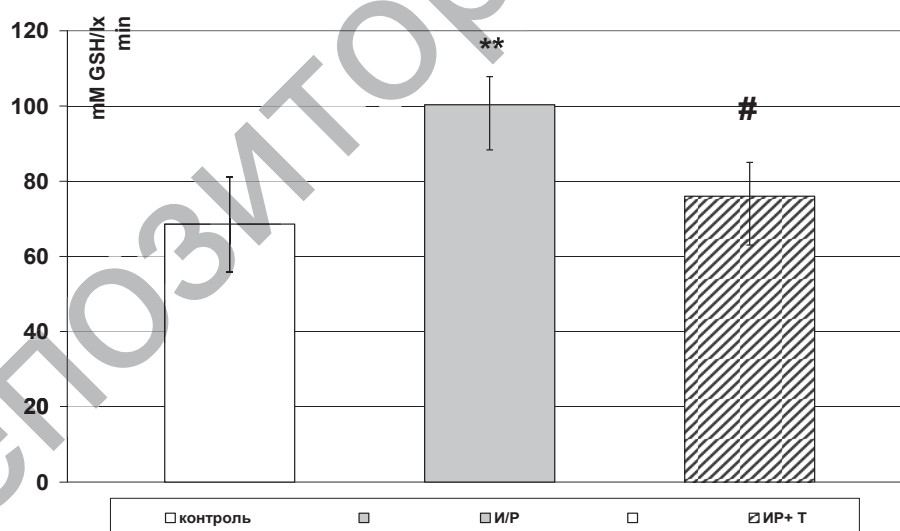


Рисунок 8.8 – Активность глутатионпероксидазы в головном мозге крыс с ИРГМ при введении тиаминa (Т)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

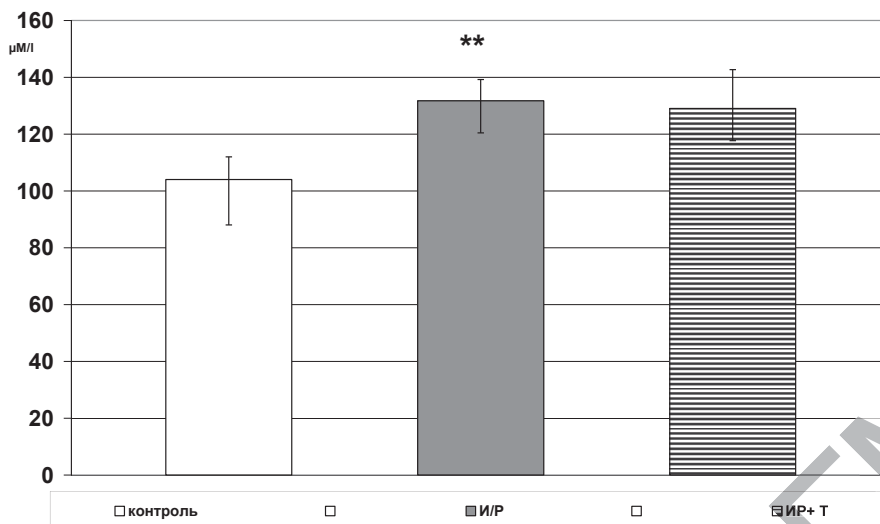


Рисунок 8.9 – Уровень продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС) в головном мозге крыс с ИРГМ и введении тиамин (Т)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

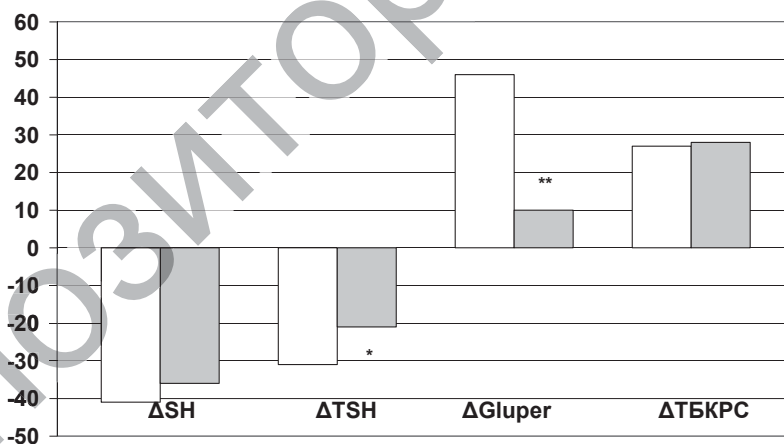


Рисунок 8.10 – Изменение содержания восстановленного глутатиона (ΔSH), общих SH-групп (ΔTSH), активности глутатионпероксидазы (ΔGluper), продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС), у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга (светлые столбики) и введением тиамин (Т) – темные столбики

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

Литература

1. Ахмеджанова, Л.Т. Витамины группы В в лечении нейрональных заболеваний / Л.Т. Ахмеджанова, О.А. Солок, Н.А. Строков // РМЖ. – 2009. – Т. 17: 11. – С. 776 – 783.
2. Бородинский, А.Н. Антиоксидантные эффекты тиамин в печени крыс при низкоинтенсивном лазерном воздействии / А.Н. Бородинский, И.К. Дремза // Весці НАН Беларусі, серыя медыцынскіх навук. – 2010. – № 2, С. 36 – 39.
3. Луцкий, И.С. Витамины группы В в неврологической практике / И.С. Луцкий, Л.В. Лютикова, Е.Н. Луцкий // Международный неврол. журн. – 2008. – V. 2. – Р. 89 – 93.
4. Максимович, Н.Е. Коррекция биоэнергетической функции митохондрий головного мозга крыс при реперфузионном синдроме с помощью дигидрохверцетина, тиамин, сукцинат и п-Ацетилцистеина / Максимович Н.Е., Дремза И.К., Троян Э.И., Бородинский А.Н., Максимович Е.Н. // Актуальные проблемы медицины. В 2-х частях. Часть 2: материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции (22 января 2013 г.) / Отв. редактор В.А. Снежицкий. – Гродно : ГрГМУ, 2013. – Ч. 2. – С. 34 – 38.
5. Максимович, Н.Е. Коррекция функции митохондрий при реперфузионном синдроме головного мозга с помощью комплекса препаратов (дигидрохверцетин, сукцинат, тиамин, ацетилцистеин) // Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Э.И. Троян // Мат. межд. научно-практ. конф. «Белорусские лекарства», 22–23 ноября 2012 г. – Мн., 2012. – С. 150 – 152.
6. Максимович, Н.Е. Митохондриотропные эффекты сукцинат и тиамин при ишемии-реперфузии головного мозга / Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Э.И. Троян, Е.Н. Максимович // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 3, Ч. 1 (59). – С. 203 – 206.
7. Максимович, Н.Е., Дремза И.К. Биоэнергетическая функция митохондрий при ишемии-реперфузии головного мозга и ее коррекция с помощью дигидрохверцетина и тиамин / Н.Е. Максимович, И.К. Дремза // Мат. конф. «Фундаментальные науки и современная медицина», Мн. «Экономпресс», 2012. – С. 190 – 192.
8. Строков, И.А. Применение высоких доз витаминов группы В в неврологии / И.А. Строков, Л.Т. Ахмеджанова, О.А. Солоха // Трудный пациент. – 2010. – № 2. – С.16 – 18.
9. Ba, A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues / A. Ba // Cell mol. Neurobiol. – 2008. – V. 28. – P. 923 – 931.
10. Davis R.E. Clinical chemistry of thiamine / Davis R.E. // Adv. Clin. Chem. – 1983. – V. 23. – P. 93 – 140.
11. Gibson, G.E. Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration/ Gibson G.E., Blass J.P. // Antioxid. Redox Signal. – 2007.

– V. 9. – P.1605 – 1619.

12. Hazell, A.S. Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation /A.S. Hazell, R.F. Butterworth // Alcohol and Alcoholism. – 2009. – V. 44 (2). – P. 141 – 147.

13. Singleton, C.K. Molecular mechanisms of thiamine utilization / C.K. Singleton, P.R. Martin // Curr. Mol. Med. – 2001. – V. 1 (2). – P. 197–207.

Репозиторий ГРГМУ

ГЛАВА 9.

ВЛИЯНИЕ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ НА БИОЭНЕРГЕТИКУ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ

На экспериментальных моделях церебральной ишемии показана эффективность многих лекарственных средств, воздействующих на различные звенья патогенеза, однако ни для одного из них она убедительно не доказана в многоцентровых плацебоконтролируемых исследованиях.

В нашей стране широко используются различные нейропротективные средства, эффективность которых установлена в неконтролируемых и небольших плацебоконтролируемых исследованиях. Назначение этих лекарственных средств обосновывается на подавлении активности многих патогенетических механизмов церебральной ишемии: гипоксии, лактатацидоза, деструктивных нарушений мозговой ткани, развития эксайтотоксичности (глутамат- и аспартатергической) в условиях возникшего оксидативного стресса, увеличения внутриклеточного содержания Ca^{2+} , приводящего к фатальному нарушению биоэнергетики, неконтролируемой активации фосфолипаз, протеаз, эндонуклеаз и гибели нейронов в зоне пенумбры.

Гипоксия является универсальным патологическим процессом, лежащим в основе появления и прогрессирования церебральной ишемии. Установлены 2 механизма гибели нейронов при церебральной ишемии – гипоксический и апоптотический, т.е. ускорение нейронального апоптоза вследствие интенсивной экспрессии некоторых генов апоптоза.

Поэтому для защиты головного мозга в условиях патологии необходимо применение лекарственных средств, способных корректировать нарушения энергетического обмена и тормозить активацию процессов перекисного окисления липидов в клетке, уменьшать образование токсических метаболитов и снижать их повреждающее действие. Лекарственные средства, обладающие указанными свойствами, относятся к разным фармакологическим группам и могут быть условно разделены на препараты с первичной и вторичной антиоксидантной активностью.

Препараты с первичной антиоксидантной активностью способны непосредственно инактивировать свободные радикалы кислорода, устраняя их действие. Препараты с вторичными антиоксидантными свойствами повышают устойчивость тканей к гипоксии путем активации ферментов антиоксидантной защиты, коррекции недостаточной или избыточной активности определенных органов и систем, перестройки обменных процессов, определяющих энергообеспечение тканей.

Особый интерес представляют разработка и внедрение в клиническую практику препаратов производных янтарной кислоты. Их позитивное влияние при разных формах цереброваскулярной патологии отмечено во многих исследованиях. Сукцинат (янтарная кислота), как энергетический субстрат цикла Кребса способен не только поддерживать высокую скорость дыхания в митохондриях по сравнению с НАД-зависимыми субстратами, но и поддерживать функциональные способности митохондрий в стрессовых ситуациях, являясь энергорегулирующим субстратом.

Так в ряде клинико-биологических исследований последних лет была подтверждена эффективность в качестве энергокорректора и, соответственно, нейропротектора препаратов янтарной кислоты в комплексной терапии цереброваскулярной ишемии и ишемического инсульта.

В головном мозге существует тесная взаимосвязь системы энергопродукции и функциональной активности органа, что обусловлено исключительно высокой интенсивностью процессов образования и утилизации энергии, отсутствием в мозге депо энергетических субстратов и кислорода, наличием гематоэнцефалического барьера. Как известно, основным энергетическим субстратом клеток мозга является глюкоза, а кинетические характеристики гликолиза допускают его 40-кратную активацию при возрастании энергозапросов. Однако, принятая концепция регуляции митохондриального окисления, основанная на контролирующей роли узких мест ЦТК (цитратсинтазная и изоцитратдегидрогеназная реакции) не позволяют объяснить каким образом осуществляется метаболизм продуцируемой при возрастающих энергозапросах молочной

кислоты, поскольку в норме ферменты работают со скоростями, близкими к максимально возможными.

Существуют многочисленные данные, показывающие высокую стабильность содержания АТФ в ткани мозга при патологических состояниях, сопровождающихся экстремальными энергозатратами. К таковым, в частности, относятся стресс-реакция, генерализованные судорожные припадки, церебральная ишемия. По существующим представлениям, основными механизмами, поддерживающими стабильность аденилатного энергетического заряда клеток мозга являются, наряду с окислительным фосфорилированием, нуклеозид-дифосфаткиназная реакция, связывающая пул ГТФ и АТФ, и креатинкиназная реакция, поддерживающая взаимосвязь пула КФ и АТФ. Пул КФ в отношении АТФ выполняет буферную функцию и затрагивается только при уменьшении аденилатного энергетического заряда, либо при снижении внутриклеточного рН. Содержание ГТФ является одним из наиболее лабильных показателей состояния системы энергопродукции головного мозга. Синтез ГТФ в реакции субстратного фосфорилирования при образовании из 2-оксоглутарата янтарной кислоты указывает на особое значение этого звена ЦТК в регуляции энергетического метаболизма мозга.

Существующее представление о функционировании ЦТК предполагает основной приток субстратов в цикл через пируватдегидрогеназный комплекс и равномерную интенсификацию кругооборота цикла при необходимости увеличения продукции АТФ митохондриями. Вместе с тем, медленные ферменты (изоцитратдегидрогеназа и цитратсинтаза), в рамках теории функционирования замкнутого цикла Кребса, ограничивают возможность интенсификации продукции макроэргов органеллами, что не согласуется с данными об уровне, компенсируемых окислительным фосфорилированием, энергозатрат мозга при экстремальных энергозапросах.

М.Н.Кондрашова на основе структурно-кинетической организации митохондриальных процессов пришла к заключению о существовании быстрого и медленного путей метаболизма субстратов в митохондриях и доминирующей

активации быстрого пути при возрастании энергозапросов органа. Быстрый путь представляет собой ускоренный механизм образования и окисления янтарной кислоты (ЯК) через сопряжение сукцинатдегидрогеназной (СДГ) реакции с аспартат-аминотрансферазой и 2-оксоглутаратдегидрогеназой. Он замыкается в цикл с участием аминотрансфераз цитозоля, поддерживая приток субстратов (глутамат, пируват, малат) в митохондрии. Обходя начальный медленный участок ЦТК, быстрый путь позволяет реализовать кинетическое преимущество СДГ и мощность окисления генерируемой в митохондриях янтарной кислоты обеспечивает интенсивную продукцию ГТФ и АТФ. В 1000 раз большая мощность потока водорода и электронов при окислении эндогенно-продуцируемой янтарной кислоты по сравнению с другими субстратами митохондрий, обеспечивает высокий уровень энергетической регуляции метаболизма органелл, поддержание ионного гомеостаза клеток мозга, вносит вклад в активную антиперекисную защиту.

Патоморфологическими основами церебральной ишемии являются многообразные патогенетические факторы, приводящие к формированию ишемических очагов в структурах мозга. Тяжесть поражений мозга определяется как размерами и локализацией зон ишемии, так и вторичными постишемическими расстройствами, прежде всего прогрессирующим отеком мозга.

Патогенез поражения головного мозга при ишемических расстройствах всегда однотипен, несмотря на фоновое многообразие причин, их вызывающих. Синдром ишемии у больных с хронической недостаточностью кровоснабжения, острым инсультом, другими формами цереброваскулярной болезни всегда определяет тяжесть функционально-морфологического поражения мозга, где главным патобиохимическим компонентом синдрома клеточной, тканевой и органной ишемии становится энергодефицит.

Сохранение энергетического гомеостаза мозга, в том числе при ишемических церебральных расстройствах, происходит при участии ряда саморегулирующих систем, поддерживающих баланс между энергозатратными и энергопродуцирующими процессами. В условиях нарушения энергообразующих

процессов, лежащих в основе ишемического церебрального инсульта, именно дисбаланс энергетического метаболизма может негативно сказаться на клетке и даже привести к ее гибели. Синтез энергии АТФ в гликолитических циклах является главной задачей энергетического конвейера клетки, который работает как в цитоплазме, где идет анаэробное разложение глюкозы, так и в митохондриях, где функционирует цикл Кребса.

Одним из важнейших этапов цикла является окисление янтарной кислоты, являющейся метаболитом пятой и субстратом шестой реакции цикла Кребса. Активация окисления янтарной кислоты и ее соли – сукцината – приводит к активации синтеза АТФ. Особенно значим ресинтез янтарной кислоты для ишемизированной ткани, так как он способен предотвратить развитие тяжелых последствий энергодефицита как для клетки и ткани, так и для всего организма. Выполняя каталитическую функцию по отношению к циклу Кребса, янтарная кислота снижает в крови концентрацию других продуктов данного цикла – лактата, пирувата и цитрата, – быстро накапливающихся на ранних стадиях гипоксии. Феномен быстрого окисления янтарной кислоты сукцинатдегидрогеназой, сопровождающийся АТФ-зависимым восстановлением пула пиримидиновых динуклеотидов, осуществляет "монополизацию дыхательной цепи", биологическое значение которой заключается в быстром ресинтезе АТФ. Особенно велика роль янтарной кислоты в адекватном функционировании нервной ткани. В нервной ткани функционирует γ -аминобутиратный шунт (цикл Робертса), в ходе которого из γ -аминомасляной кислоты через промежуточную стадию янтарного альдегида образуется янтарная кислота, являющаяся эффективным субстратом для синтеза АТФ. В условиях окислительного стресса образование янтарной кислоты возможно также в реакции окислительного дезаминирования α -кетоглутаровой кислоты в печени. Кроме того янтарная кислота обладает антиоксидантным действием путем ее влияния на транспорт медиаторных аминокислот, нормализующим действием на содержание биогенных аминов (гистамина и серотонина) и повышением микроциркуляции в органах и тканях. Противоишемический эффект янтарной кислоты связан не только

с активацией сукцинатдегидрогеназного окисления, но и с восстановлением активности ключевого окислительно-восстановительного фермента дыхательной митохондриальной цепи – цитохромоксидазы. Сочетанное применение препаратов янтарной кислоты и препаратов противосклеротического действия у больных с явлениями церебрального атеросклероза и дисциркуляторной энцефалопатии (ДЭ) позволяет добиться хороших результатов лечения, значительно снизить дозировки лекарственных средств [1].

Положительный эффект от совместного применения янтавита и митомина с ноотропилем, кавинтоном, стугероном, пикамилоном наблюдался уже через 3–5 дней от начала приема препаратов, а длительное применение в течение 2–3 месяцев приводило к снижению проявлений склеротической симптоматики: уменьшение головокружения, частоты и интенсивности головных болей, улучшение памяти, повышение концентрации внимания, улучшение и стабилизация настроения, нормализацию сна.

При длительном применении фармакологических противосклеротических препаратов зачастую возникает необходимость в прекращении их приема, что, однако, отрицательно сказывается на самочувствии больных. В таких случаях оправдывает себя сочетанное применение янтавита или митомина с препаратами, содержащими экстракт гинкового дерева (например, танакана) или биологически активными добавками типа гинко-билобы [1].

Обобщая экспериментальные и клинические данные о положительных эффектах сукцината в комплексной терапии ишемических повреждений головного мозга, мы пришли к заключению о необходимости более детального исследования влияния янтарной кислоты на функциональную активность митохондрий при ишемии/реперфузии головного мозга.

Так, исследование митохондриотропных эффектов янтарной кислоты у животных с И/Р головного мозга, получавших сукцинат натрия в условиях использования в качестве субстрата дыхания сукцината и малата/глутамата выявило менее выраженное снижение параметров дыхания митохондрий

относительно группы крыс с ИРГМ без его введения (скорость АДФ-стимулированного дыхания, коэффициента дыхательного контроля, коэффициента фосфорилирования).

При исследовании митохондриотропных эффектов сукцината натрия у животных с И/Р головного мозга выявлен положительный эффект на параметры дыхания митохондрий. Отмечено достоверное повышение скорости АДФ-стимулированного дыхания, коэффициента дыхательного контроля и коэффициента фосфорилирования относительно группы крыс с И/Р головного мозга без введения препаратов ($p < 0,05$).

Предварительное однократное введение сукцината натрия животным за 1 час до моделирования ИРГМ, выявило менее выраженное снижение АДФ/О, а скорость дыхания в условиях введения АДФ (V_3) и коэффициенты акцепторного контроля (V_3/V_2) и дыхательного контроля (V_3/V_4) практически приближались или несколько превышали уровень контрольных животных при использовании сукцината в качестве субстрата.

В группе животных, подвергнутых ИРГМ и получавших С, при внесении в качестве субстрата дыхания сукцината отмечено снижение скорости субстрат-стимулированного дыхания (V_2) на 20% (на 48% – у крыс с ИРГМ без введения препарата), скорости АДФ-стимулированного дыхания (V_3) на 31% (на 57% – без препарата, $p < 0,05$) (рис. 9.1).

Значение коэффициентов акцепторного, дыхательного контроля (V_3/V_4) и коэффициент фосфорилирования в условиях введения С практически приближались к значениям показателей у контрольных животных при использовании в качестве субстрата сукцината (рис. 9.2) ($p > 0,05$). Различия значения показателя дыхательного контроля (V_3/V_4), по сравнению с группой ложнооперированных животных (контроль-1) составили 1,16 раза, в то время как в группе крыс с ИРГМ его значения отличались от значений в контроле в 1,45 раза, $p > 0,05$).

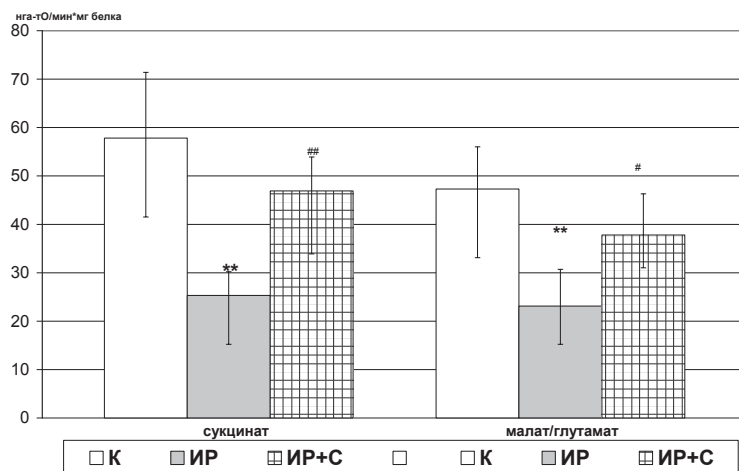


Рисунок 9.1 – Скорость АДФ-стимулированного дыхания (V_3) митохондрий клеток головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) и ИР в сочетании с введением сукцината натрия (С) (субстраты-сукцинат и малат/глутамат)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

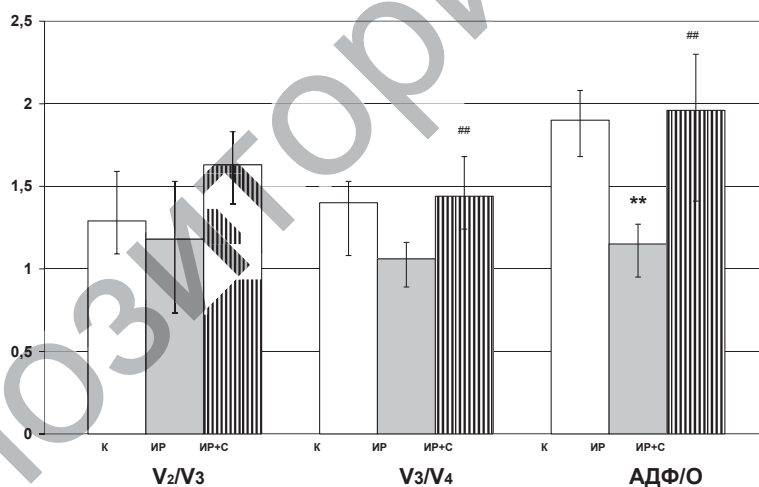


Рисунок 9.2 – Показатель акцепторного и дыхательного контроля, а также коэффициент фосфорилирования у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга в условиях использования сукцината натрия (С). Субстрат-сукцинат:

V_3/V_2 – коэффициент акцепторного контроля; V_3/V_4 – коэффициент дыхательного контроля; АДФ/О – коэффициент фосфорилирования

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

Повышение значения коэффициента фосфорилирования (АДФ/О) в митохондриях клеток головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) в сочетании с введением С (субстрат сукцинат), по сравнению со значением показателя у крыс без введения препарата (рис. 9.3), свидетельствовало о его способности повышать сопряженность процессов окисления и фосфорилирования. В случае использования в качестве НАД-зависимых субстратов смеси малат/глутамат: V_3 снизилась на 23% (на 41% – при ИРГМ, $p < 0,05$), коэффициент акцепторного контроля (V_3/V_2) – на 9% (на 69,7%, $p < 0,01$), дыхательного контроля (V_3/V_4) – на 16% (на 39,7%, $p < 0,01$), коэффициент фосфорилирования (АДФ/О) – на 10%, по сравнению со значениями у крыс с ИРГМ относительно группы ложнооперированных животных (39,5%, $p < 0,05$).

При использовании в качестве субстрата смеси малат/глутамат, как и при внесении сукцината, предварительное однократное введение С до моделирования ИРГМ, выявило менее выраженное снижение коэффициента фосфорилирования, а также коррекцию коэффициентов акцепторного и дыхательного контроля (рис. 9.3).

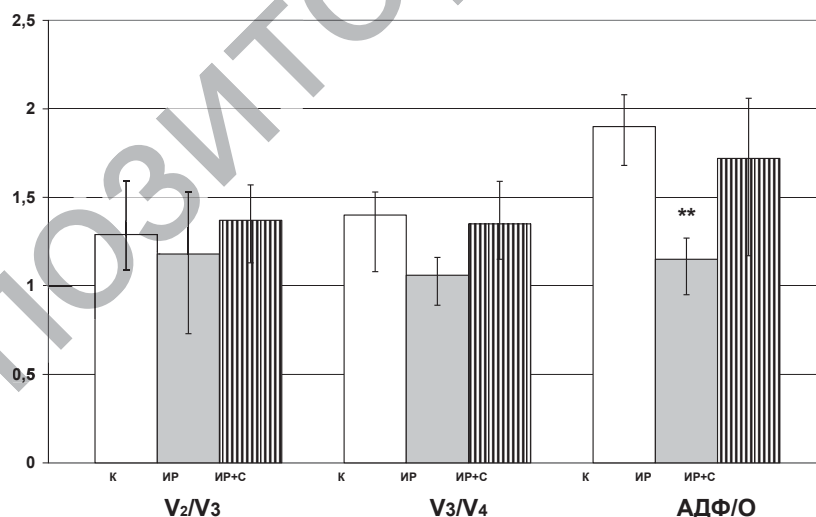


Рисунок 9.3 – Значения коэффициентов акцепторного контроля (АК), дыхательного контроля (ДК) и коэффициента фосфорилирования (АДФ/О) в митохондриях клеток головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) и ИР в сочетании с введением сукцината натрия (С) (субстрат малат/глутамат)

У крыс с ИРГМ, получавшими С, при внесении сукцината в качестве субстрата отмечали увеличение роста активности митохондриального дыхания после внесения субстратов дыхания, по сравнению с базальным состоянием (V_2-V_1) на 87% (при ИРГМ – на 26%, в контроле – на 92%) (рис. 9.4), после внесения малат/глутаматной смеси у крыс этой группы значение показателя V_2-V_1 составило 48% (20% – у крыс с ИРГМ, $p<0,05$; в контроле-1 – 67%, $p<0,05$).

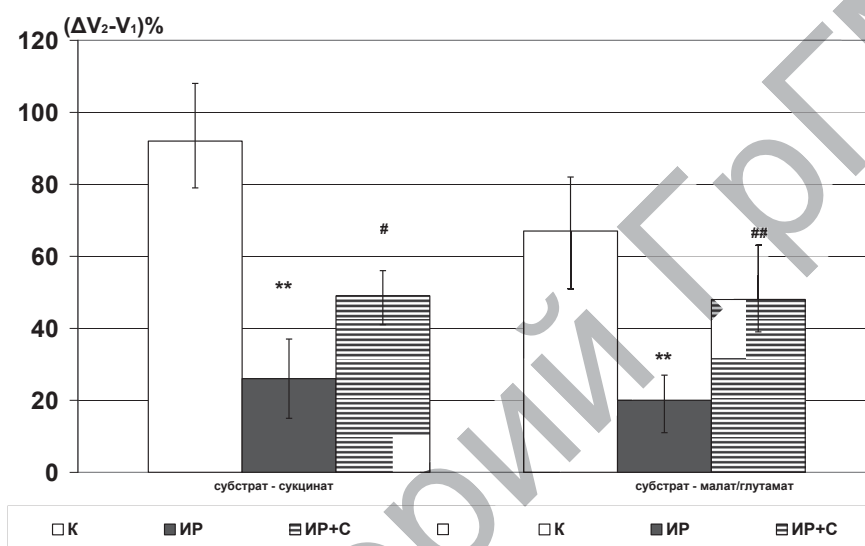


Рисунок 9.4 – Показатель роста показателя субстрат-зависимого дыхания (V_2-V_1) митохондрий крыс с ИРГМ с введением сукцината натрия (С) после внесения в качестве субстрата сукцината и малат/глутамата

Примечание: * – $p<0,05$,

** – $p<0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p<0,05$,

– $p<0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

В условиях введения С значение показателя V_3-V_2 составило 62% при введении сукцината и 37% – при использовании малата/глутамата, в то время как без введения препарата значения составили 13% и 18%, соответственно (в контроле – 50% и 29%, соответственно) (рис. 9.5).

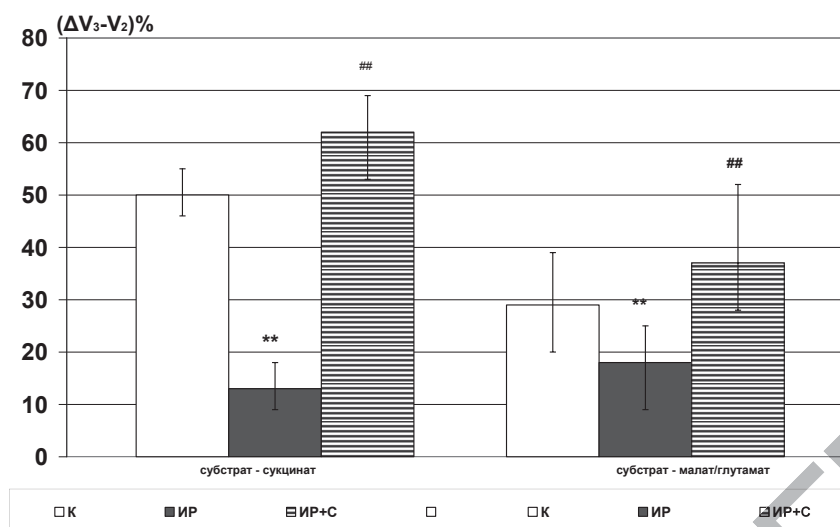


Рисунок 9.5 – Показатель роста АДФ-зависимого дыхания (V_3-V_2) митохондрий крыс с ИРГМ с введением сукцината натрия (С) после внесения в качестве субстрата сукцината и малат/глутамата

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

Наряду с повышением прироста скорости субстрат-зависимого дыхания при использовании в качестве субстратов как сукцината, так и глутамата, а также АДФ-зависимого дыхания у крыс с ИРГМ с введением С, отмечали увеличение суммарного прироста митохондриального дыхания (V_3-V_1), определяемого путем вычисления процентного прироста скорости потребления кислорода митохондриями до внесения субстрата и скорости потребления кислорода, после внесения субстрата и АДФ, до 141%, по сравнению со значением показателя у крыс с ИРГМ без введения С (42%), субстрат-сукцинат и до 103%, субстрат-малат/глутамат (без препарата – 46%), соответственно (рис. 9.6).

Концентрация лактата в мозге крыс, получавших С, снизилась на 23%, составив 2,1 (1,8; 2,4), по сравнению с животными с ИРГМ, его не получавшими 2,9 (2,6; 3,2), оставаясь повышенной, по сравнению с уровнем у ложнооперированных животных контрольной группы на 40% (1,8 (1,4; 2,1), $p < 0,05$) (рис. 9.7).

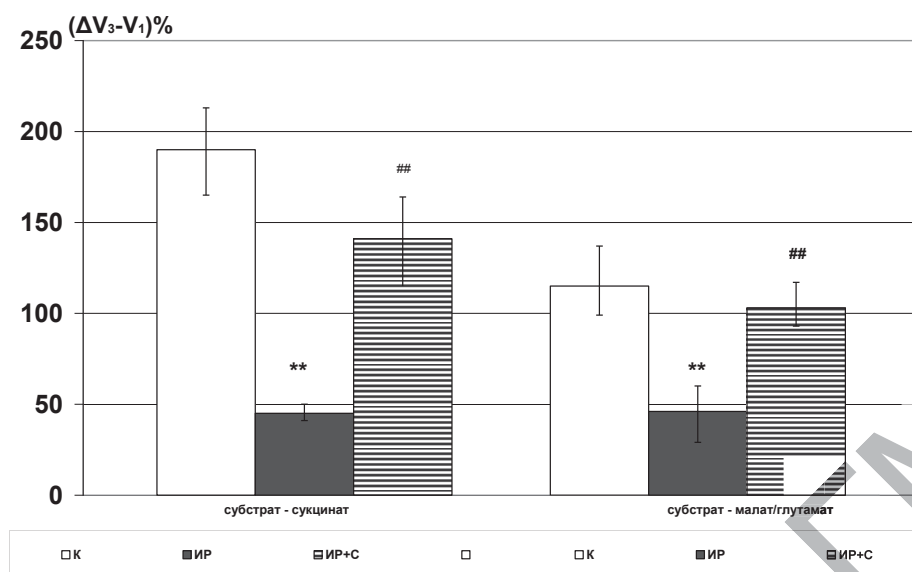


Рисунок 9.6 – Суммарный прирост скорости потребления кислорода митохондриями после внесения субстрата (сукцината и смеси малат/глутамат) и АДФ ($V_3 - V_1$) у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга и введения сукцината натрия (С)

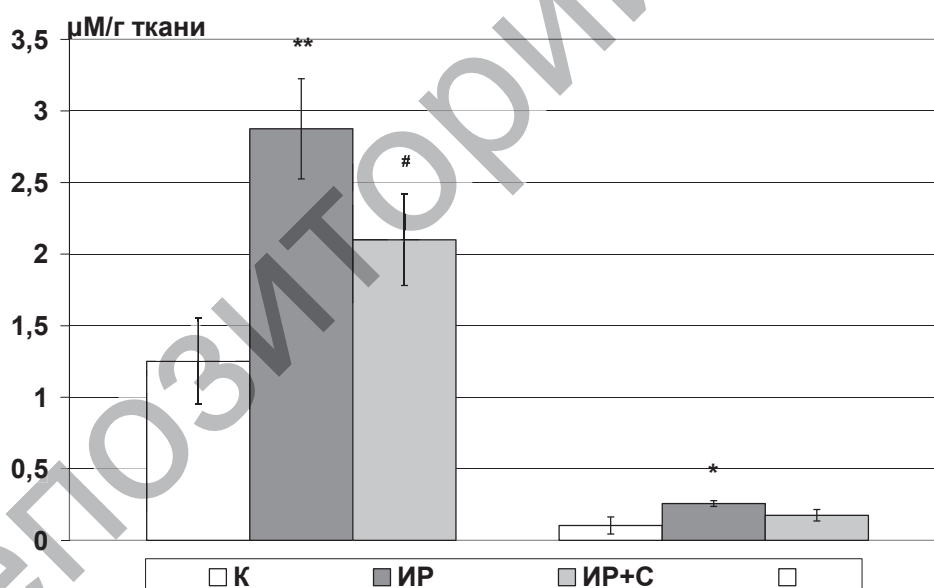


Рисунок 9.7 – Изменение концентрации лактата и пирувата в ткани мозга крыс с ишемией-реперфузией (ИР) после введения сукцината

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

Концентрация пирувата в мозге крыс, получавших сукцинат, уменьшилась в 1,5 раза (до 0,175 (0,135; 0,205), по сравнению с животными с ИРГМ, его не получавшими – 0,257 (0,215; 0,296), оставаясь повышенной, по сравнению с таковым у ложнооперированных животных контрольной группы в 1,4 раза (0,104 (0,77; 0,15), $p < 0,05$).

Исследование показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния у крыс с ИРГМ и введением сукцината не выявило существенных эффектов данного препарата в отношении активности окислительного стресса.

Также был изучен эффект введения сукцината натрия на изменения прооксидантно-антиоксидантного состояния в условиях ишемии/реперфузии головного мозга (рис. 9.8).

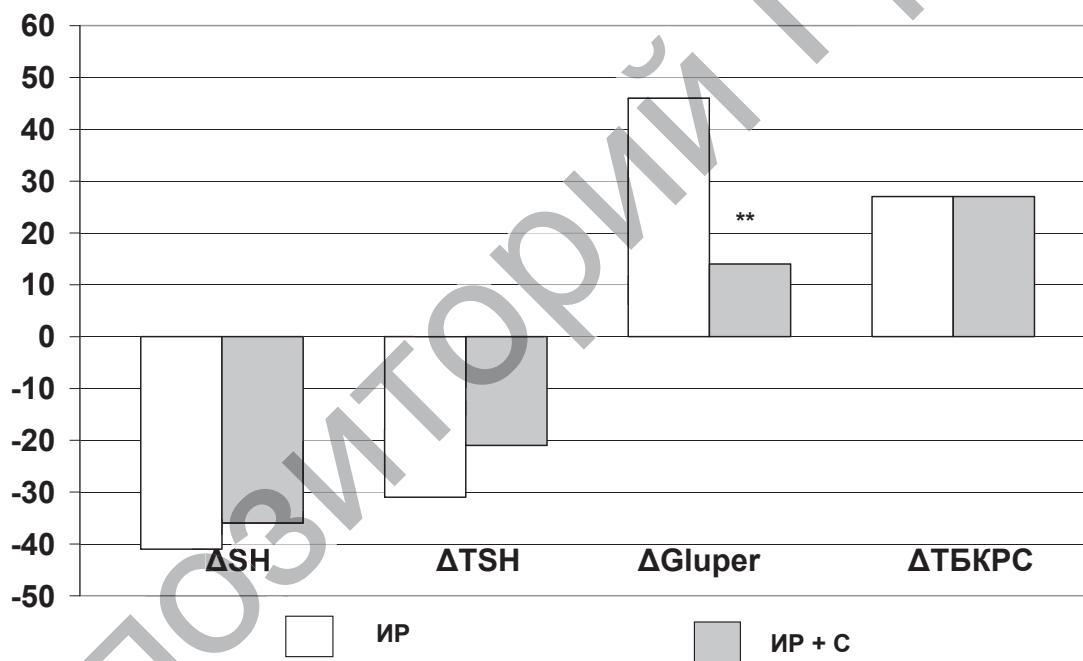


Рисунок 9.8 – Изменение содержания восстановленного глутатиона (Δ SH), общих SH-групп (Δ TSH), активности глутатионпероксидазы (Δ Gluper), продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС) у крыс с ишемией-реперфузией (И/Р) головного мозга и введением сукцината натрия (С)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

Определение показателей окислительного стресса в мозге крыс, получавших сукцинат натрия, выявило снижение концентрации восстановленного глутатиона на 36%, по сравнению с крысами первой контрольной группы ($p < 0,05$), и его повышение (на 7,1%) с отсутствием различий, по сравнению со значением в группе крыс с И/Р без введения препарата ($p < 0,05$).

В содержания общих SH групп глутатиона и белка [Δ TSH] отмечали снижение показателя на 21%, $p > 0,05$, по сравнению со значением у ложноперирированных крыс (у крыс с ИРГМ – на 31%, $p < 0,05$) и повышение на 12%, по сравнению с крысами этой группы без введения препаратов, $p < 0,05$).

В условиях введения сукцината отмечали повышение активности фермента ГП в ткани мозга крыс, по сравнению со значением у ложноперирированных крыс на 14% ($p > 0,05$), и увеличение активности показателя на 46% ($p < 0,05$), по сравнению со значением показателя у крыс с И/Р без введения препарата.

Изменений концентрации ТБКРС при введении препарата крысам с И/Р не отмечалось, составив 27%, $p > 0,05$, что не ниже, по сравнению с ростом показателя на 29,5% ($p < 0,05$) у крыс с И/Р без его введения.

Таким образом, полученные данные в целом свидетельствуют о положительном влиянии янтарной кислоты на показатели митохондриального дыхания и прооксидадантно-антиоксидантный баланс при кратковременной ишемии и последующей реперфузии головного мозга.

Литература

1. Богданова, Л.А. Клинический опыт применения препаратов янтарной кислоты (янтавита и митомина) / Л.А. Богданова, Е.М. Жеребкер, Н.И. Косяков, Е.И. Маевский // Текст доклада на клинической конференции. – Ульяновск. – 1999. – С. 127 – 128.

2. Максимович, Н.Е. Использование биорегуляторного комплекса для коррекции повреждений головного мозга в условиях ишемии-реперфузии Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Э.И. Троян, А.Н. Бородинский // Достижения медицинской науки Беларуси. – 2012. – С. 164 – 166.

3. Максимович, Н.Е. Коррекция биоэнергетической функции митохондрий головного мозга крыс при реперфузионном синдроме с помощью дигидрохверцетина, тиамин, сукцината и n-Ацетилцистеина / Максимович Н.Е., Дремза И.К., Троян Э.И., Бородинский А.Н.,

Максимович Е.Н. // Актуальные проблемы медицины. В 2-х частях. Часть 2: материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции (22 января 2013 г.) / Отв. редактор В.А. Снежицкий. – Гродно: ГрГМУ, 2013. – Ч.2. – С. 34 – 38.

4. Максимович, Н.Е. Коррекция функции митохондрий при реперфузионном синдроме головного мозга с помощью комплекса препаратов (дигидрохверцетин, сукцинат, тиамин, ацетилцистеин) // Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Э.И. Троян // Мат. межд. научно-практ. конф. «Белорусские лекарства», 22-23 ноября 2012 г. – Мн., 2012. – С.150 – 152.

5. Максимович, Н.Е. Перспективы использования комплекса метаболитов и антиоксидантов в качестве нейропротекторов при ишемии-реперфузии головного мозга / Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Э.И. Троян, А.Н. Бородинский // Сколково, 2012. – С. 68.

ГЛАВА 10.

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА БИОЭНЕРГЕТИКУ И ПРОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ

Ацетилцистеин является производным аминокислоты цистеина, и, прежде всего, используется как муколитическое и отхаркивающее средство и назначается для разжижения мокроты при заболеваниях легких. Благодаря наличию в молекуле свободной сульфгидрильной группы, ацетилцистеин способен разрывать дисульфидные связи кислых мукополисахаридов мокроты, что нарушает их полимеризацию и вязкость бронхиального секрета, ускоряя мукоцилиарный клиренс.

Кроме того, благодаря наличию свободной сульфгидрильной группы ацетилцистеин оказывает выраженное антиоксидантное, антитоксическое, иммуномодулирующее действие, нейтрализует свободные радикалы, образующиеся в организме даже при нормальной метаболической активности. Большинство исследователей считают, что свободные радикалы, оказывающие неблагоприятное влияние на клетку и ДНК, являются важнейшим фактором, участвующим в процессе биологического старения организма. Благодаря выраженным антиоксидантным и пневмопротекторным свойствам, ацетилцистеин обеспечивает защиту органов дыхания от токсического воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды, например, табачного дыма.

С другой стороны, ацетилцистеин активизирует синтез глутатиона – важнейшего эндогенного антиоксиданта.

Ацетилцистеин защищает клетки организма от действия свободных радикалов как путем прямой реакции с ними, так и поставляя цистеин для синтеза глутатиона. Ряд исследователей считают, что именно второй механизм действия препарата наиболее важен. Уровень содержания глутатиона в клетках организма во многом определяет устойчивость к окислительным воздействиям и имеет тенденцию к снижению с возрастом.

Кроме того, препарат можно использовать в качестве иммуномодулятора и антимуtagenного средства, а также как

радиопротектор у лиц, подвергшихся воздействию ионизирующих излучений.

В 1989 г. O.T. Aгуоmа и соавторы при изучении *in vivo* и *in vitro* антиокислительных свойств ацетилцистеина обнаружили его неспецифическую активность в нейтрализации различных свободнорадикальных групп.

Ацетилцистеин проявляет выраженный антиокислительный эффект даже в низких концентрациях. Очевидно, это происходит не только на биохимическом, но и на биологическом уровне.

Ацетилцистеин защищает клетки, в частности олигодендроциты и фибробласты, от гибели вследствие влияния различных неблагоприятных факторов – программированной клеточной смерти (апоптоза), вызванной воздействием неадекватного количества фактора некроза опухолей (tumor necrosis factor, TNF). К такому выводу пришли M. Mayer и M. Noble (1994), исследуя *in vitro* свойства ацетилцистеина как клеточного протектора.

Эти данные сопоставимы с результатами, приведенными коллективом авторов, относительно апоптоза клеток сосудистого эндотелия. Согласно одной из существующих патофизиологических моделей, воздействие мононуклеарных клеток периферической крови, активированных ионизирующими излучениями, или бактериальных эндотоксинов (липополисахаридов, LPS) блокирует восстановление поврежденного эндотелия сосудов и усиливает апоптоз. Этот механизм может лежать в основе различных клинических осложнений, вовлекающих в процесс внутреннюю сосудистую стенку.

Цитопротекторное действие ацетилцистеина тесно связано с его антиоксидантными свойствами и определяет области возможного использования препарата. Естественно, что у клиницистов всего мира вызывает интерес прежде всего потенциальный эффект применения ацетилцистеина при различных заболеваниях и патологических состояниях.

По данным K. Erkkila и соавторов (1998), антиоксидантная защита играет важную роль в регуляции программированной клеточной смерти, даже если эта смерть индуцирована неокислительными стимулами.

Еще несколько лет назад антиокислительные свойства ацетилцистеина были признаны важным фактором, оказывающим дополнительное влияние на течение патологического процесса в легких. Дело в том, что воспалительные заболевания легких характеризуются резким усилением окислительных процессов в легочной ткани. Это приводит к снижению содержания глутатиона, что в свою очередь сопровождается нарушением функции сурфактанта и усилением активности цитокининов – медиаторов воспаления. В норме внутриклеточный глутатион подавляет выработку медиаторов воспаления, препятствует прямому повреждению легочной ткани под влиянием свободнорадикальных реакций. Поставщик тиоловых групп ацетилцистеин способствует восстановлению содержания внутриклеточного глутатиона, оказывает прямое антиоксидантное действие. Это создает дополнительные преимущества при использовании ацетилцистеина при воспалительных заболеваниях легких.

Еще одно важное преимущество применения ацетилцистеина отмечено С.Н. Zheng и соавторами (1999). Исследовано влияние мукоурегулирующих средств карбоксиметилцистеина и ацетилцистеина на адгезивные свойства бактерии *Moraxella catarrhalis* по отношению к клеткам фарингеального эпителия. При применении этих препаратов адгезивные свойства *M. catarrhalis* дозозависимо снижались – максимально на 57% от начальной. Эти результаты позволяют сделать заключение, что дополнительным фактором, влияющим на эффективность лечения ацетилцистеином пациентов с острыми и хроническими респираторными заболеваниями, является свойство препарата ингибировать адгезию бактерий на эпителии верхних дыхательных путей.

В 1995 г. были опубликованы результаты двойного слепого исследования эффективности ацетилцистеина у 24 больных, оперированных с применением аппарата искусственного кровообращения (АИК). Из них 12 пациентам ацетилцистеин вводили болюсом в дозе 100 мг/кг на фоне постоянного капельного введения ацетилцистеина в дозе 20 мг/кг в 1 ч (1-я группа); 12 – плацебо (2-я, контрольная, группа).

Кровь для определения окислительной реакции нейтрофильных гранулоцитов (НГ) брали несколько раз через разные промежутки времени. У больных 1-й группы окислительная реакция НГ была значительно менее выражена, чем у пациентов контрольной группы.

На основании этих данных авторы определяют роль ацетилцистеина как нейтрализатора свободных радикалов кислорода, эффективного при проведении операций с использованием АИК.

Недавно опубликованы результаты другого проспективного рандомизированного исследования. Установлена важная роль кислородных радикалов в этиологии синдрома полиорганной недостаточности и инфекционных осложнений посредством прямой клеточной токсичности и активации внутриклеточных медиаторных процессов.

Выявлено снижение активности антиоксидантной защиты у больных с травматическими повреждениями. Отмечено снижение содержания глутатиона, для которого ацетилцистеин является предшественником, и селена, являющегося кофактором для глутатиона.

R.W. Hurd и соавторы (1996) у 4 больных с прогрессирующей миоклонической эпилепсией типа Unverricht-Lundborg (PME-UL) обнаружили повышенную активность внеклеточного фермента супероксиддисмутаза. Это послужило основанием для включения в план лечения ацетилцистеина в суточной дозе 4000–6000 мг. Под влиянием лечения отмечено значительное снижение миоклонуса и нормализация соматосенсорно-индуцированных потенциалов.

С помощью ацетилцистеина можно улучшить состояние пациентов и с другими нейродегенеративными процессами, при которых прогрессирование обусловлено избыточной продукцией свободных радикалов.

Подобную гипотезу высказали M. Matinez и соавторы (1999). Они предложили использовать ацетилцистеин как средство лечения пациентов с болезнью Паркинсона. Учитывая снижение активности митохондриального комплекса в клетках substantia nigra при болезни Паркинсона, что сопровождается

снижением синтеза АТФ и накоплением активных кислородных радикалов, авторы предположили, что именно избыток активных радикалов ведет к гибели клеток *substantia nigra* и появлению клинических признаков болезни.

По мнению авторов, если гипотеза верна, то антиоксиданты, содержащие тиоловую группу как необходимый компонент окислительного фосфорилирования, смогут защитить клеточные структуры от оксидативного повреждения. Предполагается, что применение антиоксидантов, содержащих тиоловую группу, может стать новой стратегией в нейропротекторной терапии болезни Паркинсона.

В большинстве стран антиоксидантная терапия включена в стандартный протокол лечения пациентов с ожогами. В патогенезе повреждений такого рода важную роль играет снижение клеточного иммунитета.

О. Cetinkale и соавторы (1999) опубликовали результаты проведенного на крысах исследования с целью изучения влияния антиоксидантной терапии на состояние клеточного иммунитета после ожогового поражения. Использовали различные антиоксидантные препараты: аллопуринол (50 мг/кг в день), дефероксамин (15 мг/кг в день), PEG-каталазу (PEG-CAT) (1200 ед/кг в день), аскорбиновую кислоту (0,5 мг/кг в день), ацетилцистеин (1 мг/кг в день). Все препараты назначали сразу после ожога и применяли в течение 7 дней. Полученные данные свидетельствуют о том, что предотвратить глубокую иммуносупрессию при тяжелых ожогах в значительной мере можно путем своевременного назначения антиоксидантной терапии, в частности, ацетилцистеина.

Впрочем, еще в 1993 г. в мировой медицинской литературе появились данные о комплексном влиянии ацетилцистеина на иммунитет у ВИЧ-инфицированных пациентов (Eylar E. et al., 1993).

В статье приведены доказательства иммуностимулирующего действия ацетилцистеина на Т-лимфоциты, в частности на митогенез, продукцию интерлейкина-2 (IL-2) и на рост Т-лимфоцитов в культуре клеток. Ссылаясь на работы других авторов и данные собственных исследований *in vitro*, свидетельствующих об ингибирующем влиянии ацетилцистеина

на репликацию ВИЧ, авторы рекомендуют ацетилцистеин для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов.

По данным М. Roederer и соавторов (1993), у пациентов со СПИДом установлена зависимость тяжести инфекционных осложнений от степени снижения уровня глутатиона. При низком уровне глутатиона клетки организма подвергаются дополнительной нагрузке в виде оксидативного стресса, что потенцирует развитие инфекционных осложнений.

Авторы рекомендуют ввести ацетилцистеин в схему лечения больных с ВИЧ-инфекцией как средство, ингибирующее развитие любых воспалительных процессов, в том числе непосредственно связанных с репликацией ВИЧ. Такого же мнения придерживается W. Droge (1993).

Результаты ряда клинических и лабораторных исследований позволяют предположить, что развитие СПИДа может быть в значительной степени обусловлено вызванным ВИЧ недостатком цистеина.

Снабжение клетки цистеином влияет на внутриклеточное содержание глутатиона, IL-2-зависимую пролиферацию Т-лимфоцитов и активацию фактора транскрипции NF-κB. Следовательно, дефицит цистеина у ВИЧ-инфицированных пациентов ответственен не только за клеточную дисфункцию, но также за целый ряд патогенетических факторов болезни.

Ацетилцистеин оказывает не только непосредственное, но и косвенное влияние на иммунитет. В одном из исследований, например, отмечено его индуцирующее влияние при лечении интерфероном больных вирусным гепатитом С.

Ацетилцистеин обладает выраженной неспецифической антиоксидантной активностью. Его применение одинаково эффективно и в «домашней терапии», например, для устранения похмельного синдрома вследствие избыточного употребления алкоголя, и в терапии серьезных, опасных для жизни отравлений. Ацетилцистеин сочетает в себе свойства одновременно инеспецифического токсикотропного противоядия (вступающего в физико-химические взаимодействия с токсичными веществами в организме человека), и токсикокинетического противоядия (оказывающего влияние на скорость процессов деградации

токсичных молекул). Ацетилцистеин активизирует синтез глутатиона, который является важным фактором химической детоксикации. Нами изучены нейропротекторные эффекты ацетилцистеина у крыс при ишемии/реперфузии головного мозга. Так, исследование митохондриального дыхания при введении ацетилцистеина у животных с И/Р в условиях использования в качестве субстрата дыхания сукцината и малата/глутамата выявило менее выраженное снижение параметров дыхания митохондрий относительно группы крыс с ИРГМ без его введения (скорость АДФ-стимулированного дыхания, коэффициента дыхательного контроля, коэффициента фосфорилирования) (рис. 10.1). При исследовании митохондриотропных эффектов ацетилцистеина у животных с И/Р выявлен положительный эффект на параметры дыхания митохондрий.

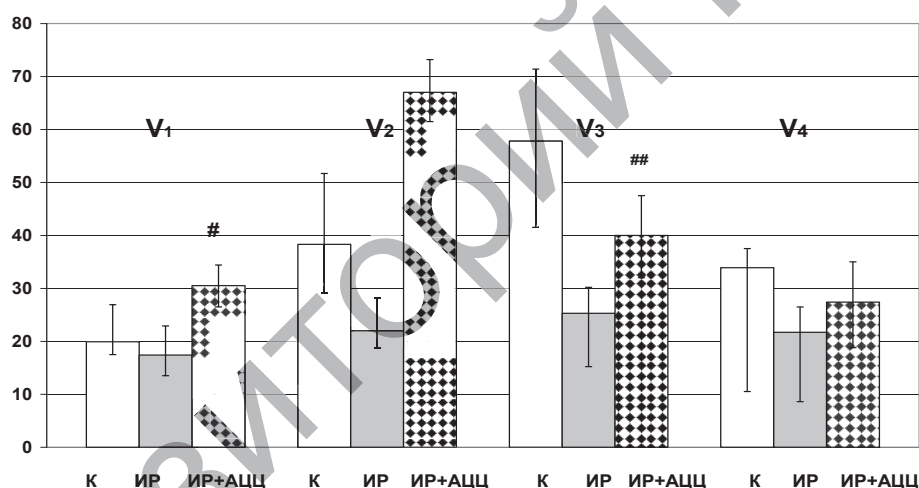


Рисунок 10.1 – Митохондриальное дыхание у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга и введении ацетилцистеина (АЦЦ).

Субстрат – сукцинат:

К – контроль, ИР – ишемия/реперфузия; V₁ – базальное (эндогенное) поглощение кислорода интактными митохондриями; V₂ – скорость субстрат-стимулируемого дыхания (сукцината, малата/глутамата);

V₃ – АДФ-стимулированное дыхание – скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием; V₄ – дыхание митохондрий после потребления добавленного АДФ

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ.

Отмечено повышение скорости АДФ-стимулированного дыхания, коэффициента дыхательного контроля и коэффициента фосфорилирования относительно группы крыс с И/Р без введения препарата ($p < 0,05$).

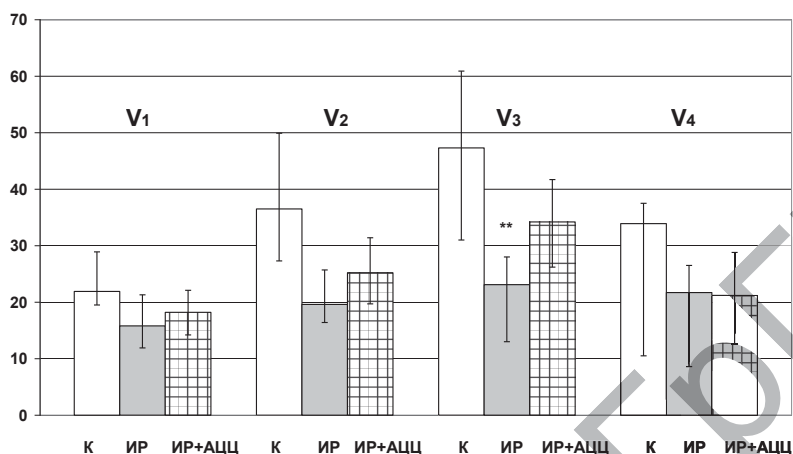


Рисунок 10.2 – Митохондриальное дыхание у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга и введения ацетилцистеина (АЦЦ). Субстрат – малат/глутамат

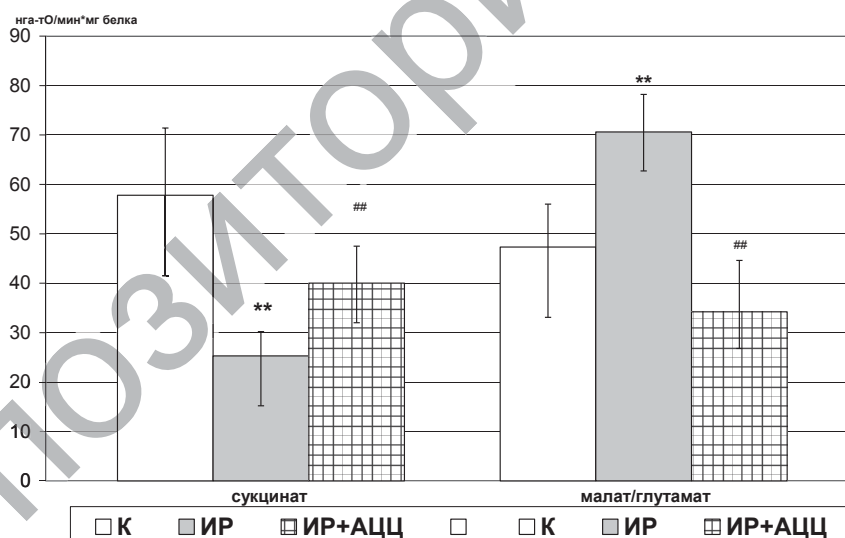


Рисунок 10.3 – Скорость АДФ-стимулированного дыхания (V_3) митохондрий головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) и ИР в сочетании с введением ацетилцистеина (АЦЦ) (субстраты – сукцинат и малат/глутамат)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

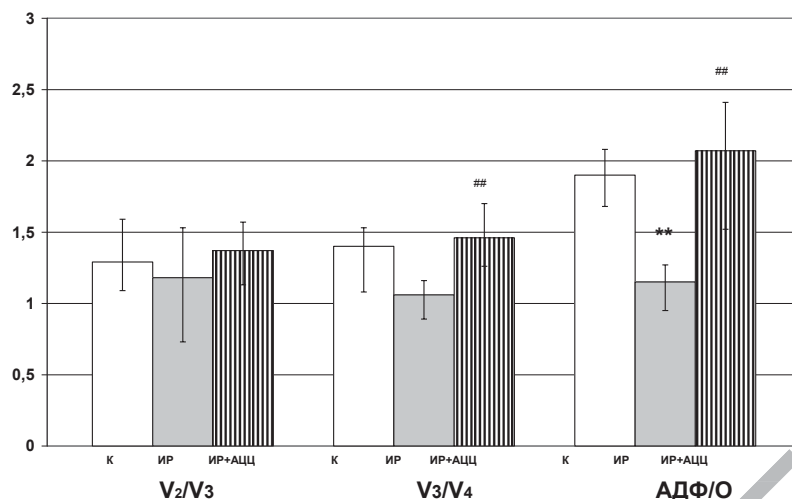


Рисунок 10.4 – Показатель акцепторного и дыхательного контроля, а также коэффициент фосфорилирования у крыс с ИР головного мозга в условиях использования ацетилцистеина (АЦЦ). Субстрат – сукцинат: V_3/V_2 – коэффициент акцепторного контроля; V_3/V_4 – коэффициент дыхательного контроля; АДФ/О – коэффициент фосфорилирования

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

В группе животных, подвергнутых ИРГМ и получавших АЦЦ, при внесении в качестве субстрата дыхания сукцината отмечено снижение скорости субстрат-стимулированного дыхания (V_2) на 20% (на 48% – без введения препарата), скорости АДФ-стимулированного дыхания (V_3) на 31% (на 57% без препарата, $p < 0,05$) (рис. 10.2). При внесении в качестве субстрата дыхания малата/глутамата отмечено снижение скорости субстрат-стимулированного дыхания (V_2) на 31% (на 55% – без введения препарата), скорости АДФ-стимулированного дыхания (V_3) на 28% (на 47% – без препарата, $p < 0,05$). Изменений коэффициентов акцепторного и дыхательного контроля (V_3/V_4) в условиях введения АЦЦ не отмечалось ($p > 0,05$) при использовании в качестве субстратов сукцината и малата/глутамата (рис. 10.3). Однако отмечалось увеличение значения коэффициента фосфорилирования относительно животных с ИРГМ ($p < 0,05$) при внесении в среду обоих

субстратов, что свидетельствовало о способности препарата повышать сопряженность процессов дыхания и фосфорилирования.

Повышение значения коэффициента фосфорилирования (АДФ/О) в митохондриях клеток головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) в сочетании с введением С (субстрат сукцинат), по сравнению со значением показателя у крыс без введения донатора SH-групп, свидетельствовало о способности препарата повышать сопряженность процессов окисления и фосфорилирования.

В случае использования в качестве НАД-зависимых субстратов смеси малат/глутамат отмечено снижение: V_3 – на 23% (на 41% – при ИРГМ, $p < 0,05$), коэффициента акцепторного контроля (V_3/V_2) – на 9% (на 69,7%, $p < 0,01$), коэффициента дыхательного контроля (V_3/V_4) – на 16% (на 39,7%, $p < 0,01$), коэффициента фосфорилирования (АДФ/О) – на 10%, по сравнению со значениями у крыс с ИРГМ относительно группы ложнооперированных животных (39,5%).

У крыс с ИРГМ, получавшими АЦЦ, при внесении сукцината в качестве субстрата отмечали увеличение роста активности митохондриального дыхания, по сравнению с базальным состоянием, показатель (V_2-V_1) – на 87% (при ИРГМ – на 26%, в контроле – на 92%) (рис. 10.6) и изменение скорости митохондриального дыхания после внесения АДФ (V_3), по сравнению с V_2 после внесения субстратов, (V_3-V_2) на 17%, у животных с ИРГМ без введения АЦЦ этот показатель изменился на 13%, в контроле (у ложнооперированных животных) – на 50% (рис. 10.7).

После внесения малат/глутаматной смеси у крыс с ИРГМ, получавших АЦЦ, значение показателя (V_2-V_1) составило 38% (у крыс с ИРГМ – 20%, у ложнооперированных крыс – 67%) (рис. 10.6) и значение изменения скорости митохондриального дыхания после внесения АДФ (V_3), по сравнению с V_2 (после внесения субстратов) – показатель (V_3-V_2) составил 36%, у животных с ИРГМ без введения АЦЦ – 18%, в контроле – 29% (рис. 10.7).

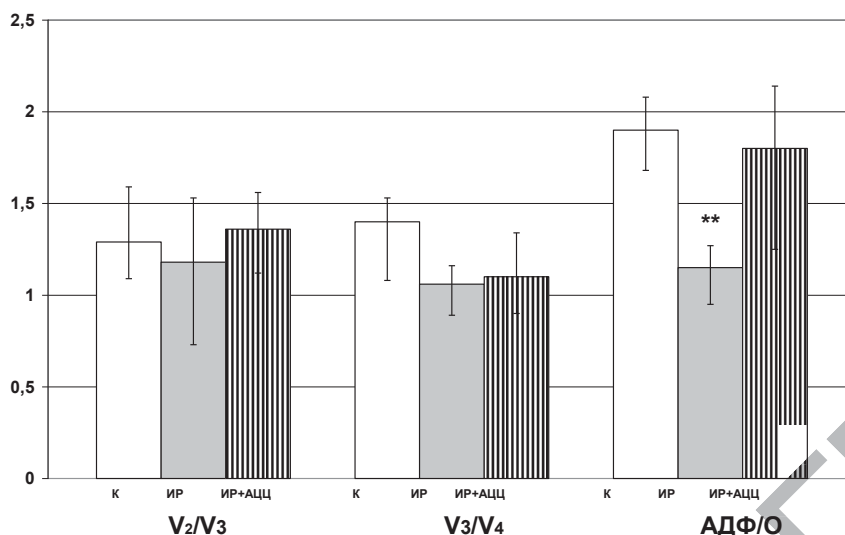


Рисунок 10.5 – Значения коэффициентов акцепторного контроля (АК), дыхательного контроля (ДК) и коэффициента фосфорилирования (АДФ/О) в митохондриях клеток головного мозга крыс при ишемии/реперфузии (ИР) и ИР в сочетании с введением ацетилцистеина (АЦЦ) (субстрат малат/глутамат)

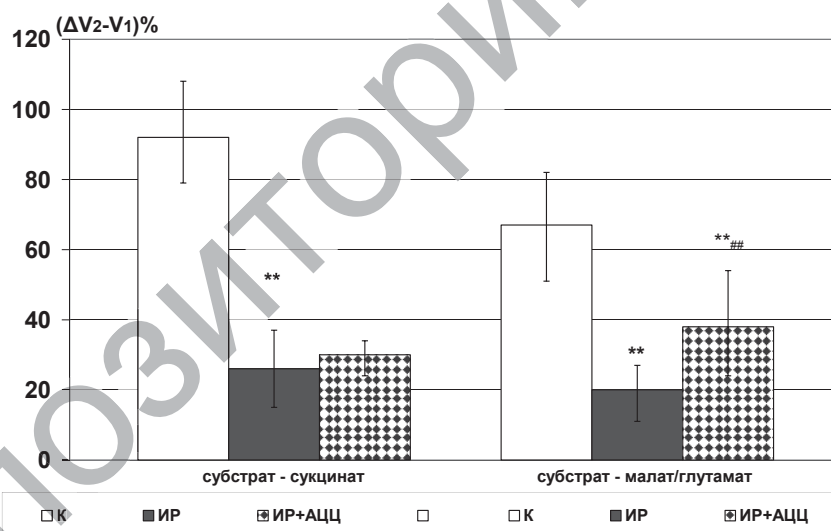


Рисунок 10.6 – Показатель роста субстрат-зависимого дыхания ($V_2 - V_1$) митохондрий крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга с введением ацетилцистеина (АЦЦ) после внесения в качестве субстрата сукцината и малат/глутамата: V_1 – базальное (эндогенное) поглощение кислорода интактными митохондриями; V_2 – скорость субстрат-стимулируемого дыхания (сукцината, малата/глутамата)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

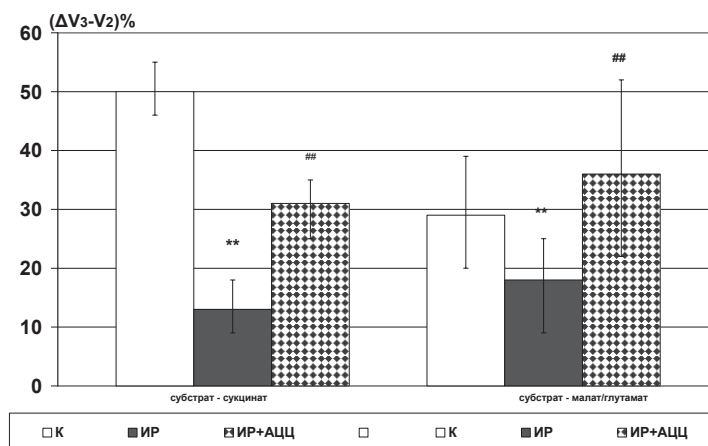


Рисунок 10.7 – Показатель роста АДФ-зависимого дыхания ($V_3 - V_2$) митохондрий крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга с введением ацетилцистеина (АЦЦ) после внесения в качестве субстрата сукцината и малат/глутамата

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

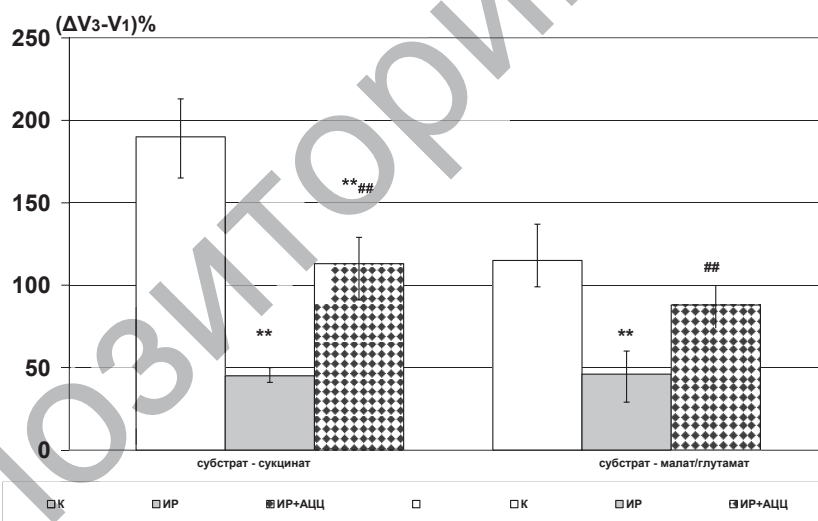


Рисунок 10.8 – Суммарный прирост скорости потребления кислорода митохондриями после внесения субстрата и АДФ ($V_3 - V_1$) у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга и введения ацетилцистеина (АЦЦ): V_1 – базальное (эндогенное) поглощение кислорода интактными митохондриями; V_3 – АДФ-стимулированное дыхание – скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

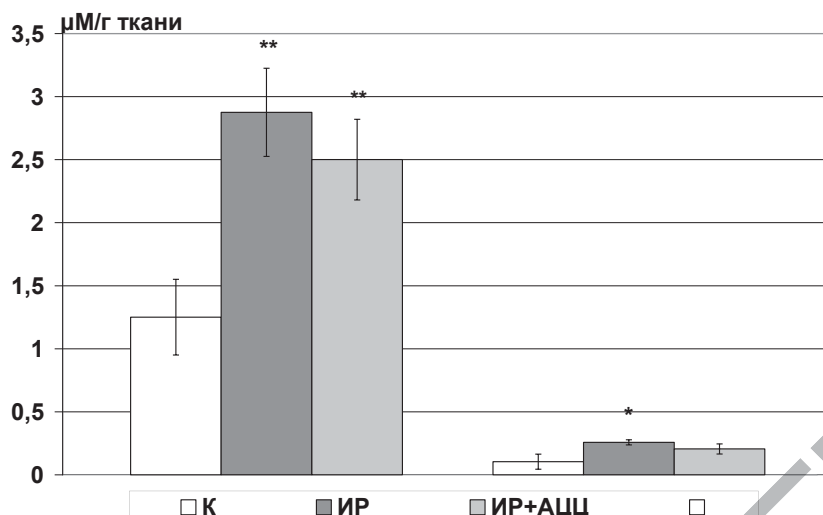


Рисунок 10.9 – Содержание лактата и пирувата в головном мозге крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга и введении ацетилцистеина (АЦЦ)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

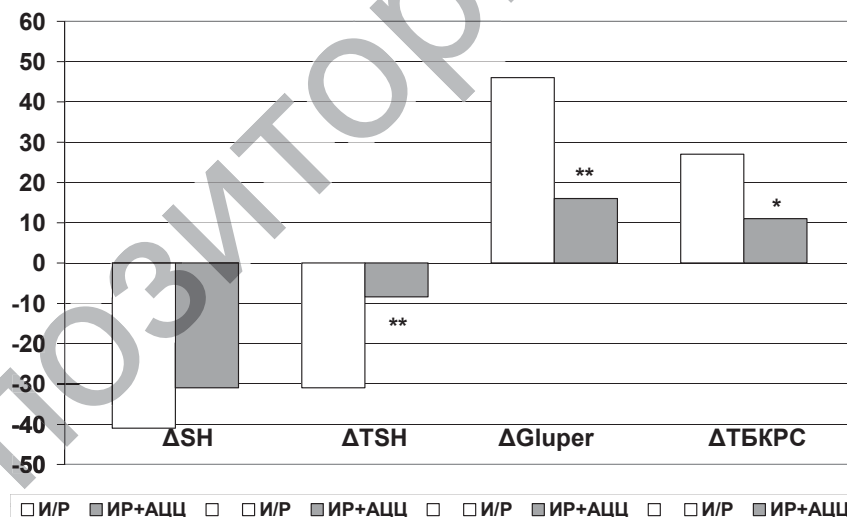


Рисунок 10.10 – Изменение содержания восстановленного глутатиона (ΔSH), общих SH-групп (ΔTSH), активности глутатионпероксидазы (ΔGluper), продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС) у крыс с ишемией-реперфузией (И/Р) головного мозга и введением ацетилцистеина (АЦЦ)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

В условиях введения АЦЦ значение суммарного прироста скорости митохондриального дыхания после введения субстрата и АДФ (V_3-V_1) составило 113% после внесения в среду митохондрий сукцината и 47% – при использовании малата/глутамата, в то время как без введения препарата значения составили 80% и 46%, соответственно (в контроле – 92% и 115%, соответственно) (рис. 10.8).

Концентрация лактата в мозге крыс, получавших АЦЦ, снизилась на 13%, составив 2,5 (2,1; 2,9), по сравнению с животными с ИРГМ, его не получавшими 2,9 (2,6; 3,2), оставаясь повышенной, по сравнению с уровнем у ложнопериорированных животных контрольной группы на 50% – 1,25 (1,4; 2,1), $p < 0,05$ (рис. 10.9.). Концентрация пирувата в мозге крыс, получавших АЦЦ, уменьшилась на 20%, составив 0,205 (0,18; 0,235), по сравнению с животными с ИРГМ, его не получавшими по сравнению с животными с ИРГМ, его не получавшими – 0,257 (0,215; 0,296), оставаясь повышенной, по сравнению с таковым у ложнопериорированных животных контрольной группы в 2 раза (0,104 (0,77; 0,15), $p < 0,05$).

Эти результаты свидетельствуют о некотором корригирующем углеводный обмен эффекте у ацетилцистеина, что важно для реализации энергетической функции митохондрий.

Также был изучен эффект введения АЦЦ на изменения прооксидантно–антиоксидантного состояния в условиях ишемии/реперфузии головного мозга. Определение показателей, характеризующих редокс – состояние у крыс с И/Р головного мозга в условиях введения ацетилцистеина, выявило в постреперфузионный период достоверное снижение концентрации восстановленного глутатиона на 31% (на 41% у крыс с ИРГМ) ($p < 0,05$), общих SH-групп белков и глутатиона – на 8,4% (на 31% – у крыс с ИРГМ, $p < 0,05$), повышение активности глутатионпероксидазы на 16% (на 46% у крыс с ИРГМ, $p < 0,05$), рост ТБКРС на 11% (на 27% – при ИРГМ, $p < 0,05$), по сравнению со значениями показателей у крыс первой контрольной группы.

Полученные результаты согласуются с данными литературы о способности ацетилцистеина к корригированию тиолдисульфидного отношения, нарушение которого способствует активации апоптоза вследствие уменьшения митохондриального мембранного потенциала и образования АТФ, ингибирования транспорта mtGSH, поддержания системы глутатиона как наиболее важной антиоксидантной системы клетки, необходимой для поддержания активности ключевых тиолсодержащих белков.

ГЛАВА 11.
**ЭФФЕКТЫ КОМПЛЕКСА (ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН,
ТИАМИН, СУКЦИНАТ, АЦЕТИЛЦИСТЕИН) НА
БИОЭНЕРГЕТИКУ И ПРООКСИДАНТНО-
АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС ГОЛОВНОГО МОЗГА
ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ**

Проведены исследования состояния биоэнергетической функции митохондрий головного мозга крыс при его ишемии-реперфузии в условиях коррекции с помощью комплекса препаратов, включающего дигидрохверцетин, тиамин, сукцинат натрия, ацетилцистеин.

Введение комплекса препаратов животным с И/Р головного мозга сопровождалось существенным улучшением параметров респираторной активности митохондрий нейронов головного мозга в условиях ишемии/реперфузии. Выявлено повышение субстрат-индуцированного дыхания (V_2) на 51%, $p < 0,01$, по сравнению с крысами с ИРГМ при внесении в исследуемую среду сукцината и на 56%, $p < 0,01$, при использовании малата/глутамата. В условиях введения комплекса препаратов значение показателя V_2 возросло на 18%, $p < 0,01$, по сравнению с крысами группы контроль-1 в условиях внесения сукцината и на 21%, $p < 0,01$ – в условиях внесения малата/глутамата.

В условиях внесения в среду сукцината повышалась скорость АДФ-стимулированного дыхания (в 2 раза, $p < 0,05$), скорость дыхания после завершения фосфорилирования АДФ (в 1,7 раза), по сравнению с животными группы с И/Р головного мозга. В условиях внесения в среду малата/глутамата скорость АДФ-стимулированного дыхания возросла в 2,3 раза, $p < 0,05$), скорость дыхания после завершения фосфорилирования АДФ – в 1,8 раза), по сравнению с животными группы с И/Р головного мозга.

В условиях введения комплекса исследуемых препаратов крысам с ИРГМ отмечено возрастание значения коэффициента акцепторного контроля в 1,39 раза (на 28%, $p < 0,01$) при использовании в качестве субстрата сукцината и в 1,36 раза (на 27%, $p < 0,05$) – при использовании малата/глутамата,

коэффициента дыхательного контроля – в 1,74 раза (на 43%, $p < 0,01$) – при использовании в качестве субстрата сукцината и в 1,68 раза (на 40%, $p < 0,05$) – при использовании малата/глутамата, коэффициента фосфорилирования – в 2,2 раза ($p < 0,01$) при использовании сукцината и в 1,56 раза (на 36%, $p < 0,05$) – при использовании малата/глутамата, что свидетельствует о повышении эффективности дыхания митохондрий в условиях повышения сопряжения процессов окисления и фосфорилирования.

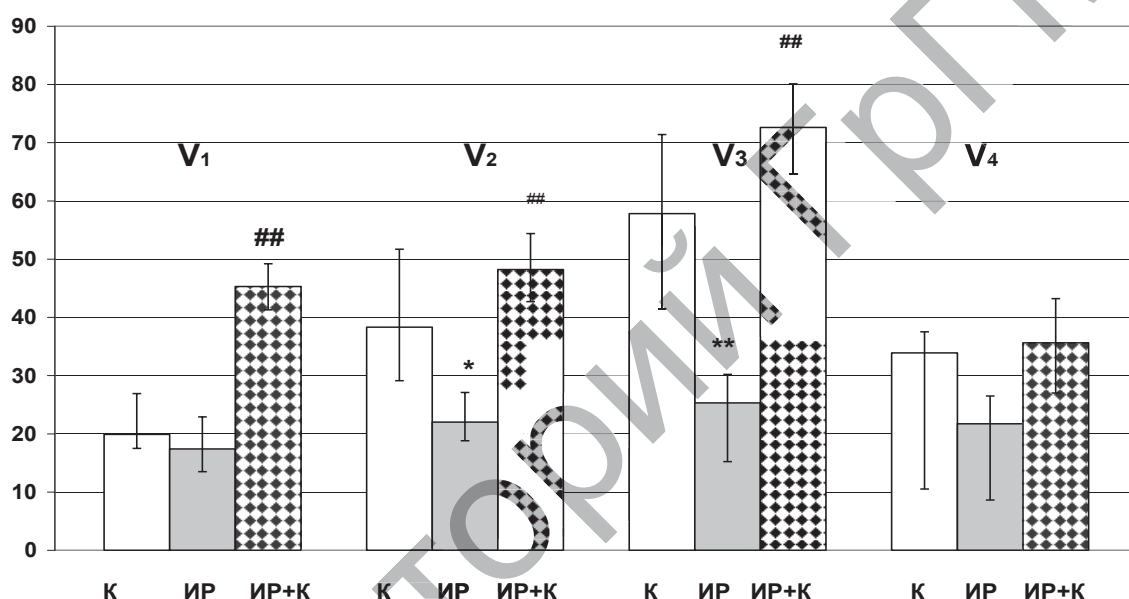


Рисунок 11.1 – Митохондриальное дыхание у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга в условиях применения комплекса препаратов (К), включающего дигидрокверцетин, тиамин, сукцинат и N-ацетилцистеин. Субстрат – сукцинат: V₁ – базальное (эндогенное) поглощение кислорода интактными митохондриями; V₂ – скорость субстрат-стимулируемого дыхания (сукцината, малата/глутамата); V₃ – АДФ-стимулированное дыхание – скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием; V₄ – дыхание митохондрий после потребления добавленного АДФ

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

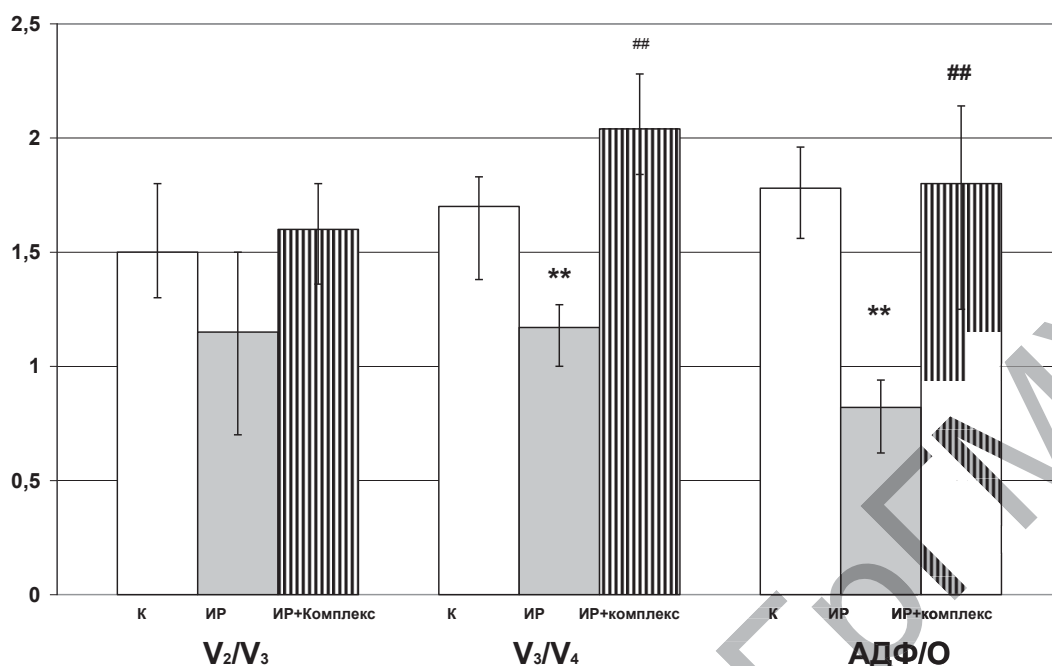


Рисунок 11.2 – Коэффициенты, характеризующие дыхание митохондрий в гомогенатах головного мозга крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга и введении комплекса препаратов, включающего дигидрохверцетин, тиамин, сукцинат и N-ацетилцистеин. Субстрат – сукцинат: V_3/V_2 – коэффициент акцепторного контроля; V_3/V_4 – коэффициент дыхательного контроля; АДФ/О – коэффициент фосфорилирования

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

У крыс с ИРГМ, получавшими комплекс препаратов, при внесении сукцината в качестве субстрата, отмечали увеличение роста активности митохондриального дыхания после внесения субстратов, по сравнению с базальным состоянием, или показатель (V_2-V_1), на 153% (при ИРГМ – на 26%, в контроле – на 92%) (рис. 11.3) и изменение скорости митохондриального дыхания после внесения АДФ (V_3), по сравнению с V_2 , или показатель (V_3-V_2) на 60%, у животных с ИРГМ без введения препаратов этот показатель изменился на 13%, в контроле (у ложнооперированных животных) – на 50% (рис. 11.3).

После внесения малат/глутаматной смеси у крыс с ИРГМ, получавших комплекс препаратов, значение показателя (V_2-V_1) составило 121% (у крыс с ИРГМ – 20%, у ложнооперированных крыс – 67%) (рис. 11.3) и значение изменения скорости митохондриального дыхания после внесения АДФ (V_3), по сравнению с V_2 (после внесения субстратов) – показатель (V_3-V_2) составил 60%, у животных с ИРГМ без введения комплекса препаратов – 18%, в контроле (у ложнооперированных животных) – 29% (рис. 11.3).

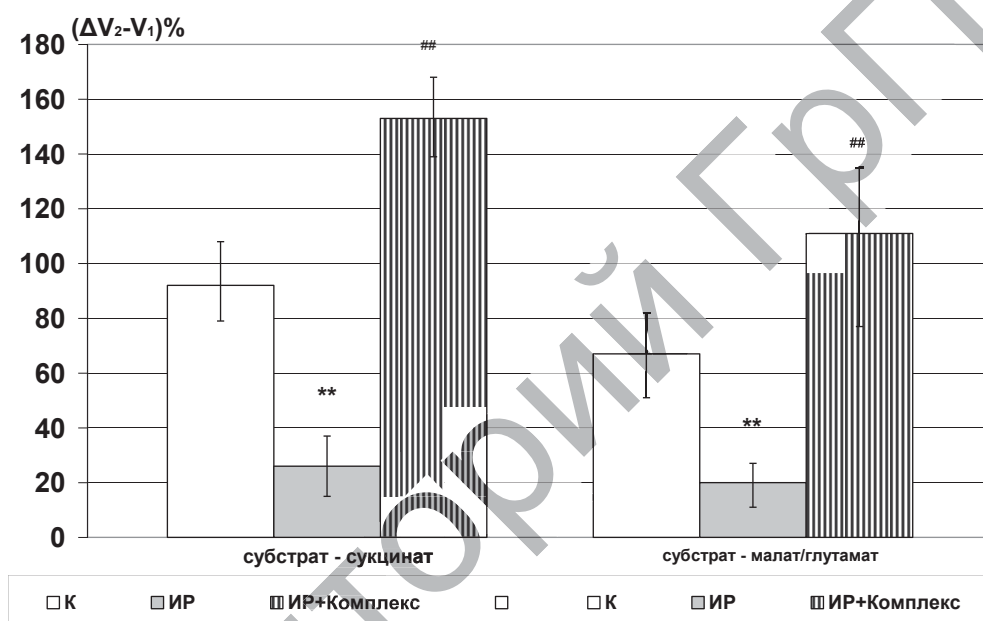


Рисунок 11.3 – Показатель роста субстрат-зависимого дыхания (V_2-V_1) митохондрий крыс с ИРГМ и комплекса препаратов, включающего дигидрокверцетин, тиамин, сукцинат и N-ацетилцистеин, после внесения в качестве субстрата сукцината и малат/глутамата: V_1 – базальное (эндогенное) поглощение кислорода интактными митохондриями; V_2 – скорость субстрат-стимулируемого дыхания (сукцината, малата/глутамата)

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ

Наряду с повышением прироста скорости субстрат-зависимого дыхания при использовании в качестве субстратов как сукцината, так и малата/глутамата, а также АДФ-зависимого дыхания у крыс с ИРГМ с введением комплекса препаратов отмечали увеличение суммарного прироста митохондриального дыхания (V_3-V_1), определяемого путем вычисления процента прироста скорости потребления кислорода митохондриями до внесения субстрата от показателя скорости потребления кислорода, после внесения субстрата и АДФ, до 300%, $p < 0,05$, по сравнению со значением показателя у крыс с ИРГМ без введения исследуемого комплекса препаратов (57%), в контроле – 190%, субстрат-сукцинат и до 238%, $p < 0,05$, субстрат-малат/глутамат (без препарата – 46%, в контроле-1 – 115%), соответственно (рис. 11.4).

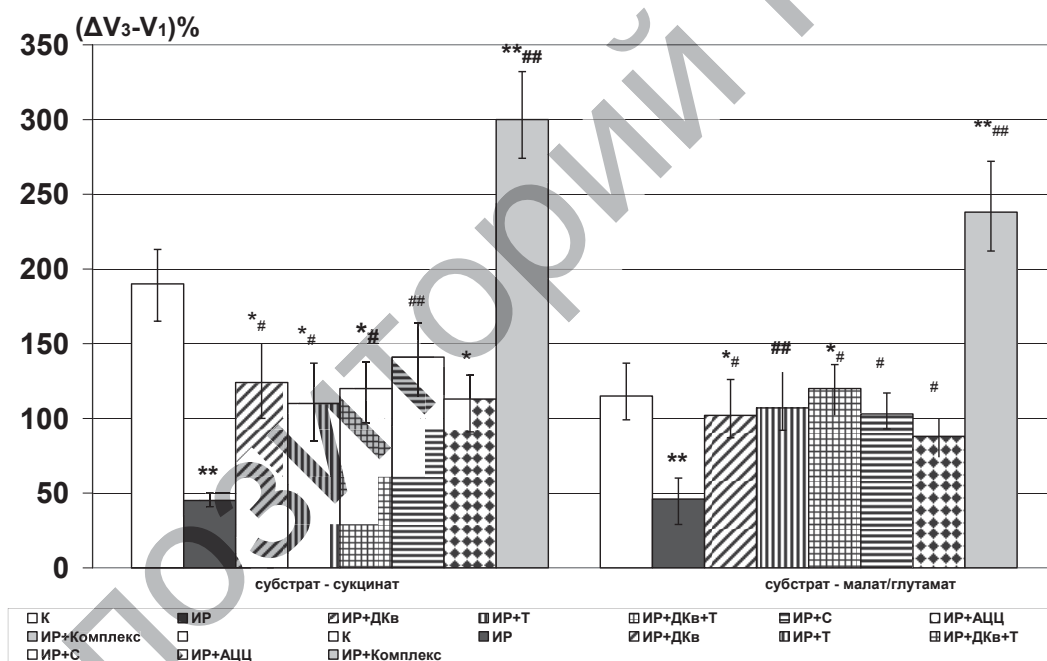


Рисунок 11.4 – Суммарный прирост скорости потребления кислорода митохондриями после внесения субстрата и АДФ (V_3-V_1) у крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга и введения комплекса препаратов, включающего дигидрохверцетин, тиамин, сукцинат и N-ацетилцистеин, после внесения в качестве субстрата сукцината и малат/глутамата:

V_1 – базальное (эндогенное) поглощение кислорода интактными митохондриями; V_3 – АДФ-стимулированное дыхание–скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием

Также исследованы состояние углеводного обмена в головном мозге крыс при реперфузионном синдроме и его коррекции с помощью комплекса препаратов, включающего дигидрохверцетин, тиамин, сукцинат и N-ацетилцистеин (n=22).

Концентрация лактата в мозге крыс, получавших комплекс препаратов, снизилась на 36%, по сравнению с животными с ИРГМ, его не получавшими, оставаясь повышенной, по сравнению с уровнем у ложнооперированных животных контрольной группы, на 32%, $p < 0,05$ (рис. 11.5).

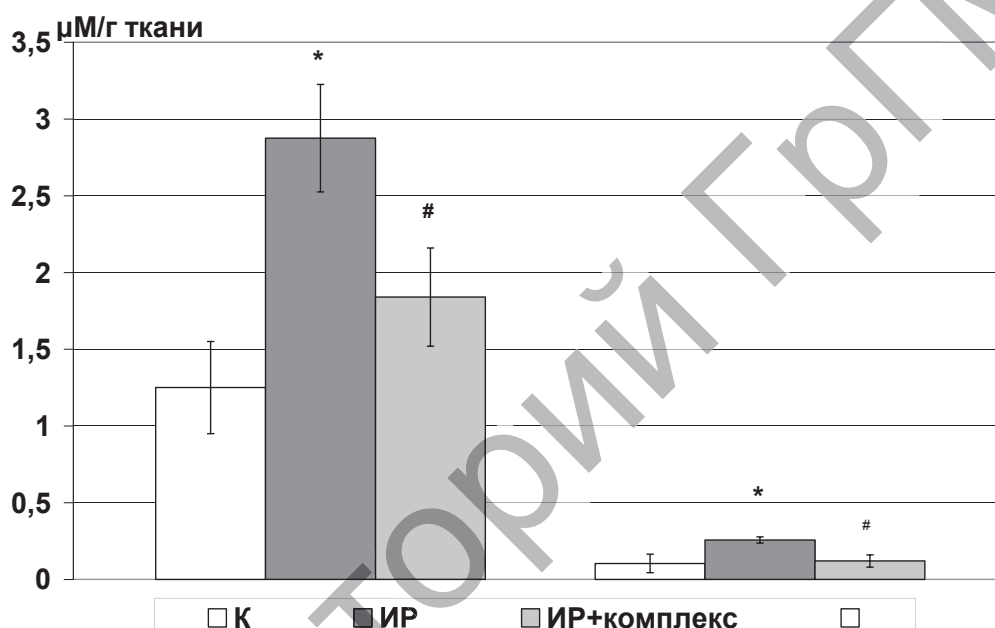


Рисунок 11.5 – Уровень лактата и пирувата в ткани мозга крыс с ишемией-реперфузией (ИР) головного мозга, в условиях введения комплекса препаратов, включающего дигидрохверцетин, тиамин, сукцинат и N-ацетилцистеин.

Примечание: * – $p < 0,05$,

** – $p < 0,001$, по сравнению со значением показателей в контрольной группе;

– $p < 0,05$,

– $p < 0,001$, по сравнению со значением в группе ИРГМ.

Уровень пирувата в мозге крыс, получавших комплекс препаратов, уменьшился на 53% или в 2,1 раза, по сравнению с животными с ИРГМ, его не получавшими, $p < 0,05$, оставаясь выше, по сравнению с уровнем у ложнооперированных животных контрольной группы без моделирования реперфузионных повреждений в 1,15 раза (или на 14%, $p > 0,05$).

Эти результаты свидетельствуют о корригирующем углеводный обмен эффекте у исследуемого комплекса, что важно для реализации энергетической функции митохондрий.

Также исследовали эффективность комплекса препаратов, включающего дигидрокверцетин, тиамин, сукцинат и N-ацетилцистеин, для коррекции редокс-состояния клеток мозга в реперфузионный период (n=15).

Определение показателей, характеризующих прооксидантно-антиоксидантное состояние, после введения комплекса препаратов выявило повышение концентрации восстановленного глутатиона [-SH] на 23%, по сравнению с уровнем показателя у крыс с ИРГМ без введения комплекса, но ниже, чем в контрольной группе на 23% ($p > 0,05$); повышение [SH] групп глутатиона и белка – на 38%, $p > 0,05$, по сравнению со значением показателя в группе крыс с ИРГМ без введения комплекса препаратов, ($p < 0,05$); повышение активности глутатионпероксидазы, по сравнению со значением у ложнооперированных крыс на 18,6% ($p > 0,05$), у крыс с ИРГМ – на 46% ($p < 0,05$) (рис. 11.6).

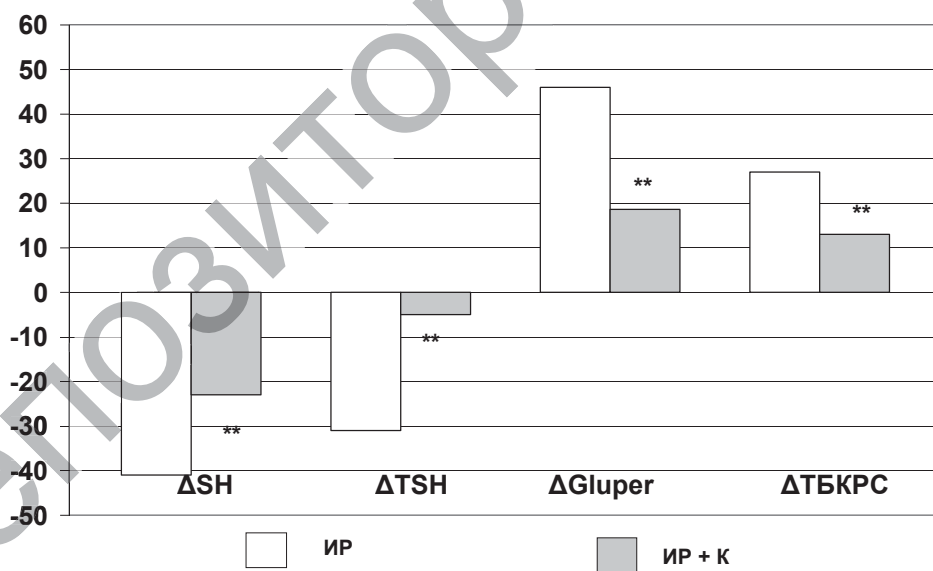


Рисунок 11.6 – Изменение содержания восстановленного глутатиона (ΔSH), общих SH-групп (ΔTSH), активности глутатионпероксидазы ($\Delta Gluper$), продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБРКС) у крыс с ишемией-реперфузией (И/Р) головного мозга и введением комплекса препаратов, включающего дигидрокверцетин, тиамин, сукцинат и N-ацетилцистеин

Концентрация продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБРКС), в группе крыс с введением комплекса препаратов крысам с ИРГМ возросла на 13%, что ниже, по сравнению с ростом показателя (на 27%, $p < 0,05$) у крыс с ИРГМ без его введения, указывая на меньшую активность процессов перекисного окисления липидов у крыс этой группы.

Проведенные исследования указывают на наличие выраженных антиоксидантных свойств у комплекса препаратов, включающего дигидрохверцетин, тиамин, сукцинат и N-ацетилцистеин, что, по-видимому, является с одной стороны следствием нормализации процессов тканевого дыхания, а с другой стороны – причиной улучшения респираторной функции митохондрий.

Литература

1. Максимович, Н.Е. Использование биорегуляторного комплекса для коррекции повреждений головного мозга в условиях ишемии-реперфузии Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Э.И. Троян, А.Н. Бородинский // Достижения медицинской науки Беларуси. – 2012. – С. 164 – 166.

2. Максимович, Н.Е. Коррекция функции митохондрий при реперфузионном синдроме головного мозга с помощью комплекса препаратов (дигидрохверцетин, сукцинат, тиамин, ацетилцистеин) // Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Э.И. Троян // Мат. межд. научно-практ. конф. «Белорусские лекарства», 22–23 ноября 2012 г. – Мн., 2012. – С. 150 – 152.

3. Максимович, Н.Е. Перспективы использования комплекса метаболитов и антиоксидантов в качестве нейропротекторов при ишемии-реперфузии головного мозга/ Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Э.И. Троян, А.Н. Бородинский // Сколково, 2012. – С. 68.

4. Максимович, Н.Е. Коррекция биоэнергетической функции митохондрий головного мозга крыс при реперфузионном синдроме с помощью дигидрохверцетина, тиамина, сукцината и n-Ацетилцистеина / Максимович Н.Е., Дремза И.К., Троян Э.И., Бородинский А.Н., Максимович Е.Н. // Актуальные проблемы медицины. В 2-х частях. Часть 2: материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции (22 января 2013 г.) / Отв. редактор В.А. Снежицкий. – Гродно: ГрГМУ, 2013. – Ч. 2. – С. 34–38.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ишемия – типовой патологический процесс, являющийся следствием многих заболеваний и патологических процессов: инфаркта миокарда, поражения периферических сосудов, инсульта, гиповолемического шока и др. Для предотвращения необратимости клеточного повреждения при ишемии требуется как можно быстро восстановить кровоток. Однако проводимая реоксигенация ишемизированной ткани во многих случаях приводит к развитию реперфузионного синдрома, усугубляя ишемическое повреждение. Было показано, что гистологические изменения в зоне повреждения, вызванные 3-часовой ишемией кишечника и последующей 1-часовой реперфузией у кошек, намного серьезнее, чем изменения, вызванные только 4-часовой ишемией. Кроме того, ишемия-реперфузия, связанная с тромболитической терапией, трансплантацией органов, коронарной ангиопластикой, реанимацией пациентов, как правило, сопровождается развитием местного и/или системного воспаления. Статистика показывает, что в отделениях интенсивной терапии на долю синдрома системного воспалительного ответа и связанного с ним синдрома полиорганной недостаточности приходится 30–40% смертности. Следовательно, ишемически/реперфузионное повреждение может распространяться за пределы ишемической области, вызывая расстройство функций других (неишемизированных) органов.

Одним из часто встречаемых в практике врача видов ишемии является ишемия головного мозга, развивающаяся вследствие тромбоза или тромбоэмболии. Ишемия головного мозга сопровождается нарушением аэробного синтеза АТФ, компенсаторной активацией анаэробного гликолиза, развитием ацидоза и как следствие нарушением мозговых функций. Развивающийся энергодефицит запускает каскад реакций клеточного повреждения, главными из которых являются: глутаматная эксайтотоксичность, повышение внутриклеточного содержания кальция, связанная с этим неконтролируемая активация внутриклеточных и мембраносвязанных ферментов, повышенное образование оксида азота с участием нейрональной

и индуцибельной NO-синтаз. Следствием этих процессов является существенное возрастание образования первичных и вторичных АФК и АФА, воздействие которых на клеточные структуры является одним из важнейших механизмов повреждения и гибели клеток в зоне «ишемической полутени» и, соответственно, расширения зоны ишемического повреждения головного мозга при инсульте.

В целом, повреждение клетки (нейрона) при ишемии приводит: к снижению содержания АТФ, повышению содержания гипоксантина, нарушению мембранного потенциала, ионному дисбалансу (повышение содержания в клетке ионов натрия и кальция), набуханию (отеку) клетки, дезорганизации цитоскелета, снижению содержания восстановленного глутатиона, развитию ацидоза.

Биоэнергетическая функция клеток головного мозга поддерживается преимущественно за счет непрерывного потребления глюкозы и аэробного синтеза АТФ в митохондриях, поэтому для восполнения энергодефицита при ишемии головного мозга терапевтические мероприятия должны быть, прежде всего, направлены на восстановление кровотока в зоне ишемии. Однако поздняя реперфузия головного мозга приводит к пролонгированию ишемического патобиохимического каскада повреждений, что не способствует его устранению и требует, соответственно, поиска средств для патогенетической коррекции.

С момента открытия феномена «полутени» (пенумбры) в зоне ишемии и формулирования понятия «терапевтическое окно», активизировался поиск медикаментозных средств и методов, способных защитить поврежденные, но еще не погибшие нейроны. Так по данным М.Д в последнее время существенно возросло число экспериментальных и клинических исследований, посвященных поиску новых лекарственных средств и методов терапии, позволяющих повысить эффективность нейропротекции и расширить границы «терапевтического окна». Существует мнение, что наиболее эффективной является ранняя фибринолитическая терапия (первые 3 часа после инсульта), связанная с использованием тканевого активатора плазминогена. К сожалению,

использование тромболитической терапии ограничено короткой (3-часовой) продолжительностью «терапевтического окна», перекрываясь риском геморрагических осложнений. Ведется активный поиск и других тромболитиков, в частности обсуждается эффективность препарата десмотеплазы, но на сегодняшний день все же наиболее эффективным препаратом для восстановления нарушенного кровотока (реперфузии) при ишемическом инсульте остается тканевой активатор плазминогена. В связи с короткой продолжительностью терапевтического окна, по мнению, хорошие результаты от реперфузии могут быть достигнуты менее чем у 5% пациентов с ишемическим инсультом. Одним из способов решения этой проблемы являются меры, направленные на увеличение количества пациентов, доставляемых в клинику в пределах «терапевтического окна», но это требует существенного реформирования службы оказания первой медицинской помощи при инсультах и существенных материальных затрат. Как альтернативный вариант рассматривается возможность увеличения «терапевтического окна» за счет разработки и использования новых лекарственных средств и терапевтических схем, позволяющих повысить устойчивость нейронов к гипоксии, что в перспективе может обеспечить эффективное восстановление их функции и в более поздние сроки возобновления кровотока в пораженных структурах головного мозга. Таким образом, с помощью медикаментозных средств «терапевтическое окно» может быть расширено, но следует помнить и о том, что чем раньше будет проведена реперфузия, тем в меньшей степени будут выражены ее негативные последствия.

Знание патофизиологических механизмов ишемической гибели клеток, включающих разнообразные патохимические реакции и, воздействуя на эти механизмы, можно повысить выживаемость частично поврежденных ишемией нейронов. Кроме того, отыскав необходимые точки воздействия в клетке для лекарственных веществ, можно не только увеличить эффективность реперфузии, но и продолжительность «терапевтического окна» для ее применения. Не менее важным в

патогенезе ишемии, по мнению многих ученых, является ишемическая деструкция микроциркуляторного русла, приводящая к тяжелым вторичным повреждениям мозга.

В последнее время в качестве перспективных средств для нейропротекции при ишемии активно изучаются антагонисты глутамата, антиоксиданты, блокаторы кальциевых каналов, хелаторы кальция и некоторые другие фармакологические препараты, а также их различные комбинации. По данным многих ученых именно комбинация препаратов с разнонаправленным нейропротекторным действием позволит создать прорыв в изучении выживаемости нейронов при ишемических инсультах. Практическое применение такого подхода будет состоять в использовании не одного или двух препаратов, а целой схемы лечения несколькими препаратами с разнонаправленными механизмами действия, нацеленными не только на основное, но и на другие звенья патогенеза ишемии мозга. Также высказывается мнение, что многие средства – кандидаты в нейропротекторы, оказывающие эффективное терапевтическое действие в эксперименте, не всегда эффективны в клинике, что может быть связано с тем, что ишемический инсульт у человека развивается чаще всего на фоне какого-либо заболевания (артериальной гипертензии, атеросклероза и др.) и преимущественно у лиц пожилого возраста, в то время, как эксперименты выполняются в основном на молодых и здоровых животных. Кроме того, считают, что, вероятно, проблема состоит в том, что исследователи концентрируют внимание на защите нейронов. Однако инсульт – это не только повреждение и гибель нейронов, это болезнь головного мозга в целом. Поэтому нейропротекция должна состоять в защите не только нейронов, но и глиальных клеток: астроцитов, олигодендроцитов, микроглии и всех других механизмов, страдающих при ишемии. Важно также обратить внимание на изменения, которые имеют место во время ишемии не только в сером, но и в белом веществе головного мозга. По мнению авторов недостаточно внимания уделяется проблеме повреждения микроциркуляторного русла и, в частности, внутреннего эндотелиального слоя. Авторы статьи указывают на необходимость защиты не столько нейронов,

сколько условной нейроваскулярной единицы, составляющей единый структурно-функциональный элемент ткани головного мозга, подобно тому, как в почках принято рассматривать в качестве единого целого нефрон с его канальцами и связанными с ним микрососудами.

Авторами известного руководства перечисляются некоторые препараты, позиционирующиеся производителями как нейропротекторы и предлагающиеся для лечения и профилактики инсультов, однако не продемонстрировавшие убедительных преимуществ в крупных и хорошо спланированных исследованиях (нимодипин, флунаризин, исрадипин, дародипин, другие блокаторы кальциевых каналов; антагонисты NMDA-селфотел, аптиганел, декстрорфан, ремацемид, элипродил; антагонисты глицина-гавестинел, ликостинел; любелюзол; антагонист серотонина репинотан; сульфат магния; цитиколин; пирацетам и многие другие). При этом отмечается, что в ряде исследований исходы у пациентов, получавших эти «нейропротекторы», были даже хуже, чем в группе контроля, учитывая побочные эффекты используемых препаратов. Но несмотря на неудачи в поиске эффективных нейропротекторов, специалисты уверены, что не стоит терять надежду на то, что когда-нибудь они будут найдены.

Таким образом, решение проблемы нейропротекции при инсульте представляет собой одну из самых сложных, но вместе с тем и перспективнейших целей. По всей видимости, необходимо кардинально пересмотреть подходы к изучению этой проблемы, определить строгие критерии, которые позволят уменьшить разрыв между данными, получаемыми в экспериментальных и клинических исследованиях.

На сегодняшний день продолжают множественные исследования и с известными лекарственными препаратами, которые уже показали свои нейропротективные эффекты, и с новыми молекулами-кандидатами в нейропротекторы, а также с некоторыми немедикаментозными подходами (например, гипотермией). Консенсусный документ европейской инициативы по научным исследованиям в области физиологии и патологии головного мозга (European brain research) от 2006 г. указывает на

то, что изучение вопросов ишемического повреждения клеток головного мозга, феномена пенумбры и поиска нейропротективных подходов, которые дадут возможность ограничить или уменьшить степень повреждения при инсульте и тем самым увеличить эффективность реперфузионной терапии, остаются одними из наиболее приоритетных задач современной медицинской науки [Olesen J., 2006]. Особое внимание, подчеркивается в документе, необходимо уделить созданию адекватных экспериментальных моделей, которые позволят в дальнейшем воспроизвести полученные результаты в реальной клинической практике.

Кроме того, существенные пробелы касаются вопросов нейропротекции как инструмента для предупреждения инсульта в случае продромальных ишемических атак, использования потенциальных механизмов «прекондиционирования» мозговой ткани, а также защиты нейронов от реперфузионных повреждений. Исследования в этой области имеют очень большое значение для клинической медицины.

Следует еще раз подчеркнуть, что патогенез реперфузионных повреждений головного мозга сводится к пролонгированию ишемического повреждения тканей, формированию дополнительной альтерации тканей факторами реперфузии и реоксигенации, возможному возникновению синдрома “no-reflow” – повторному развитию ишемии после возобновления кровотока в сосудах вследствие деструкции микроциркуляторного русла и развитию микрососудистого ретромбоза. Патобиохимический каскад повреждений головного мозга при его ишемии включает анаэробный путь расщепления глюкозы, нейротрансмиттерный дисбаланс (избыток глутамата, аспартата, дефицит ГАМК), эксайтотоксическое повреждение (активация глутамат-кальциевого каскада), окислительный и нитрозативный стресс, воспаление, отек, апоптоз.

При ишемии/реперфузии мозга образующиеся в митохондриальном матриксе и комплексах электронно-транспортной цепи радикалы кислорода вызывают окислительные повреждения митохондрий и их последующую дисфункцию, приводя к дефициту энергии АТФ и, в конечном

итоге, к гибели нейронов по некротическому либо апоптотическому механизму.

Нарушение функционирования комплекса I в условиях недостатка кислорода приводит к снижению окисления НАДН, торможению цикла Кребса и накоплению в этих условиях глутамата, повышению активности глутамат-кальциевого каскада и развитию глутаматной эксайтотоксичности, как одного из центральных патогенетических механизмов ишемического повреждения головного мозга [72].

Последствиями энергетического дефицита на начальных этапах ишемического повреждения являются ионный дисбаланс, ацидоз, повреждение рецепторного аппарата клеток, нарушение генерации биопотенциалов, инактивация ферментов (антиоксидантной природы), снижение биосинтетических процессов. На поздних стадиях ишемии головного мозга возникают структурные нарушения (дезорганизация клеточных мембран), высвобождение лизосомальных ферментов, избыток K^+ , H^+ , Ca^{2+} , интоксикация продуктами распада тканей.

Изучение показателей дыхания митохондрий головного мозга с экспериментальной моделью его ишемии-реперфузии показало развитие существенных нарушений тканевого дыхания, выражающееся в уменьшении субстрат-индуцированного дыхания (субстраты-сукцинат и малат/глутамат) и АДФ-стимулированного дыхания, определяемого скоростью дыхания после добавления к взвеси изолированных митохондрий АДФ. Проявлением нарушений дыхания митохондрий у крыс с ишемией-реперфузией головного мозга было уменьшение показателей прироста скорости дыхания после внесения субстрата или АДФ, а также суммарного показателя, который отражал сумму скоростей поглощения кислорода митохондриями после добавления к взвеси митохондрий субстрата и АДФ. Также мы отмечали снижение коэффициентов акцепторного и дыхательного контроля, показателя, отражающего сопряженность процессов окисления и фосфорилирования – АДФ/О [15]. Исследование показателей углеводного обмена – уровней лактата и пирувата выявило уменьшение активности кислородзависимых механизмов [9] и компенсаторной активации анаэробных

механизмов энергообразования вследствие дефицита кислорода и развития окислительного стресса в головном мозге, о чем свидетельствовал характер изменения показателей, характеризующих редокс-состояние головного мозга. Развитию окислительного стресса способствует избыточное поступление кислорода в клетки после предшествующей ишемии, что приводит к пролонгированию ишемического повреждения мозга. Об этом, в частности свидетельствует существенное снижение показателей антиоксидантной защиты в гомогенате головного мозга: восстановленного глутатиона, общих SH-групп белков и глутатиона, изменение активности глутатионпероксидазы и повышение содержания альдегидных продуктов перекисного окисления липидов.

В возникновении окислительного стресса при ИРГМ наряду с повышением восстановленности компонентов дыхательной цепи и последующей утечки электронов на кислород и другие молекулы, могут играть роль образование простагландинов из арахидоновой кислоты (из-за повышения активности фосфолипаз и iCOX), активация ксантин-ксантин-оксидазной системы, синтез катехоламинов, «респираторный взрыв» в лейкоцитах, секвестрированных в сосудах и глиии мозга [50], гиперпродукция NO и пероксинитрита ONOO^- .

Как известно, головной мозг обладает повышенной чувствительностью к действию активных форм кислорода, что обусловлено преобладанием в нем липидов, высокими энергетическими потребностями, высокой степенью кислородного насыщения, большой концентрацией железа, а также относительно низким уровнем антиоксидантов. Недавними исследованиями показано, что снижение митохондриального тиолдисульфидного отношения может сопровождаться активацией апоптоза.

Надо полагать, что в течение реперфузионного периода развивается повреждение, как ферментов цикла Кребса, так и комплексов электротранспортной цепи митохондрий образующимися свободными радикалами вследствие утечки электронов, что в конечном итоге приводит к снижению включения пирувата в процесс аэробного ресинтеза АТФ в

митохондриях и активации его превращения в лактат. Вызываемые окислительным стрессом повреждения в митохондриях сопровождаются снижением трансмембранного потенциала, изменением проницаемости мембран и ускорением высвобождения апоптотических факторов, что приводит к гибели клеток.

Митохондрия является основным местом потребления кислорода и источником АФК, большая часть которых генерируется за счет работы цепи переноса электронов. При физиологических условиях за счет одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода может образоваться супероксидный анион-радикал $O_2^{\cdot-}$, дающий начало другим АФК. Концентрация $O_2^{\cdot-}$ в матриксе митохондрии в стационарном состоянии от 5 до 10 раз выше, чем в цитоплазме [4]. Большой интерес вызывает исследование роли митохондриального глутатиона (GSHm). Функции митохондрий очень тесно связаны с поддержанием клеточного редокс-баланса. Действие разного рода токсинов и развитие патологических состояний, нарушающих функционирование митохондрии, может вызывать повышение уровня АФК. Наличие в митохондрии антиоксидантной защитной системы позволяет сохранить ее функции без значительных нарушений. Существенной составной частью этой системы служит mGSH, предохраняя либо восстанавливая повреждения, образующиеся при аэробном метаболизме. Инактивацию $O_2^{\cdot-}$ в митохондрии осуществляет марганец-зависимая супероксиддисмутаза, дисмутирующая $O_2^{\cdot-}$ с образованием H_2O_2 , которая может быть обезврежена глутатионпероксидазой. Наиболее активна в отношении H_2O_2 изоформа глутатионпероксидазы GPx1, локализованная главным образом в цитоплазме, однако небольшое ее количество присутствует и в матриксе митохондрий [46]. В митохондриях GST катализирует образование GS-конъюгатов и восстановление органических гидроперекисей с участием GSH в качестве косубстрата. В отличие от селенсодержащей GPx GST не взаимодействует с H_2O_2 , однако эффективно восстанавливает гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (линоленовой и арахидоновой), фосфолипидов, гидроперекиси

мононуклеотидов и ДНК. В детоксикации гидроперекисей липидов митохондрий важное значение имеет Se-независимая GPx4. Недавно показано, что GPx4 защищает клетки от активации апоптоза с участием белка AIF (от англ. apoptosis inducing factor, апоптоз-индуцирующий фактор) и поддерживает процесс окислительного фосфорилирования в клетках 310 [Е.В. Калинина и соавт.] эпителия кишечника [Cole–Ezea, 2012]. Благодаря способности восстанавливать гидроперекиси кардиолипина GPx4 участвует в регуляции выхода апоптогенных белков из митохондрий [39]. В митохондриях клеток человека пероксидазной активностью обладают изоформы GST hGSTA4-4, hGSTA1, hGSTA2 и hGSTP1, среди которых наиболее активна hGSTA4-4 [46]. Митохондриальной изоформой глутаредоксина является Grx2, которая также локализуется в ядре. Интересно, что его окисленная форма может быть восстановлена как тиоредоксинредуктазой (TrxR), так и GSH, что обеспечивает функциональную активность Grx2 в окисленном микроокружении, характерном для митохондрии. В митохондриях Grx2 играет важную роль во взаимодействии пула GSH с тиолами белков, в системе антиоксидантной защиты и при осуществлении редокс-зависимого сигналинга. Тиоредоксин-зависимая система представлена в митохондриях тиоредоксином 2 (Trx2) и TrxR2, а среди изоформ пероксиредоксина существенную роль играет Prx3. Системы mGSH/GPx и Prx3/Trx2, защищающие от H₂O₂, взаимосвязаны. Так, показано, что снижение mGSH приводит к окислению Trx2 [99]. Очевидна роль редокс-цикла mGSH в поддержании работоспособной антиоксидантной системы и гомеостаза пероксида водорода в митохондриях. Содержание mGSH примерно такое же, как в цитоплазме (10-14 mM) [46]. Так как в митохондрии синтеза глутатиона не происходит, он поступает в нее извне. Через наружную митохондриальную мембрану GSH легко проходит по пориновым каналам. Поскольку при физиологических условиях GSH имеет анионную природу, он не способен диффундировать в матрикс через внутреннюю мембрану митохондрии, имеющую высокий отрицательный трансмембранный потенциал. В митохондриальный матрикс GSH поступает с помощью

транспортеров, локализованных на внутренней мембране митохондрии и работающих против градиента электрохимического потенциала. В митохондриях почек и печени эту роль выполняют переносчик 2-оксоглутарата (OGC) и переносчик дикарбоксилатов (DIC), которые по механизму антипорта закачивают GSH в митохондриальный матрикс в обмен на 2-оксоглутарат и неорганический фосфат соответственно [46]. Так как эти транспортеры только на 45–50% обеспечивают потребление глутатиона митохондриями печени, предполагается существование дополнительного механизма транспорта GSH в митохондрии. GSSG не поступает из митохондрии в цитоплазму и восстанавливается митохондриальной глутатионредуктазой в GSH. Этот процесс зависит от наличия достаточного количества НАДФН(H^+). Следует отметить что глутатион, глутатионтрансфераза и глутаредоксин, накопление GSSG влияет на глутатионирование митохондриальных белков, что изменяет их функциональную активность. Так, регуляция активности НАДН-убихинон-редуктазы (комплекс I дыхательной цепи митохондрий) связана с величиной отношения GSH/GSSG [90]. В экспериментальной модели с использованием митохондриальных мембран из сердца крысы установлено, что добавление GSSG вызывало глутатионирование комплекса I. Напротив, введение GSH и Grx2 активировало его деглутатионирование [1]. Для митохондрий сердца быка показано, что остатки цистеина Cys531 и Cys704 субъединицы весом 75кДа (субъединица NDUSF1) являются сайтами S-глутатионирования в комплексе I [31]. Следует подчеркнуть, что роль S-глутатионирования важна в защите НАДН-убихинон-редуктазы от необратимого окисления и в контроле образования в митохондриях АФК в ответ на изменения в локальном редокс-окружении. При этом важным условием является согласованное S-глутатионирование комплекса I и α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса, так как последний поставляет НАДН(H^+) для окисления комплексом I, т.е. оба белковых комплекса вносят вклад в генерацию АФК в митохондриях [Mailloux, 2013]. В условиях окислительного стресса глутатионирование двух ферментных комплексов снижает их

активность и образование АФК. При снижении уровня $O\cdot^-_2$ и H_2O_2 до нормального α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс и НАДН-дегидрогеназа деглутатионируются с помощью Grx2 и окислительное фосфорилирование восстанавливается.

Значительное нарастание концентраций лактата при острой ишемии вызывает снижение рН до 6,4–6,7, оказывая непосредственное цитотоксическое действие, вызывая «разрыхление» клеточных мембран, изменяя их физико-химические свойства, способствуя повышенной проницаемости нейронов и эндотелия сосудов, и, кроме того, усугубляя энергетические нарушения, глутаматную «эксайтотоксичность», изменяя регуляторные свойства вторичных мессенджеров и т.д. Комплексное повреждающее действие ацидоза является важным компонентом процессов острой церебральной ишемии и развития инфаркта мозга. Молочная кислота в тканях организма играет особую роль в связи с тем, что этот субстрат представляет собой своеобразный метаболический тупик, поскольку основным путем обмена лактата является легко обратимая лактатдегидрогеназная реакция.

Повышение концентрации пирувата в реперфузионный период может быть связано с нарушением активности цикла Кребса и менее активным включением субстрата в аэробный энергообмен, а также с низкой активностью лактатдегидрогеназы, нарушающей превращением пирувата в лактат [9].

Полученные результаты свидетельствуют о резких нарушениях биоэнергетического обмена в головном мозге крыс, подвергнутых ишемии и реперфузии, которые заключаются в существенном снижении скорости митохондриального дыхания и развитии лактат-ацидоза. Нарушение митохондриального дыхания, вероятно, обусловлено значительной активацией свободнорадикальных процессов за счет утечки электронов из комплексов (I–III) электротранспортной цепи митохондрий.

Анализ полученных результатов по исследованию антиоксидантных и митохондриотропных эффектов дигидрохверцетина, тиамин, сукцинат натрия, ацетилцистеина у крыс с ишемией/реперфузией головного мозга выявил наличие

корректирующих эффектов препаратов в отношении энергетических и оксидативных сдвигов при их изолированном и совместном использовании [28, 29, 31, 32].

Флавонол дигидрокверцетин обладает выраженными антиоксидантными и мембранопротекторными свойствами, способен улучшать микроциркуляцию, препятствуя развитию стазов и образованию микротромбов, экспрессии молекул клеточной адгезии, восстанавливает микроциркуляцию при ее нарушении [27, 30]. При ИР усиливается экспрессия генов молекул адгезии лейкоцитов и цитокинов посредством активации факторов транскрипции, таких как ядерный фактор – $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Таким образом, кроме прямого повреждения клеток свободными радикалами, активируется опосредованное повреждение за счет факторов лейкоцитов, вследствие их хемотаксиса и адгезии к эндотелию при ИР. Ишемия-реперфузия приводит к активации системы комплемента и образованию провоспалительных медиаторов. Особо важными из них являются компоненты комплемента – анафилатоксины C3a и C5a , iC3b и C5b-9 . Самым мощным из этих провоспалительных медиаторов является C5a , который приблизительно в 20 раз сильнее, чем C3a . Кроме того, C5a может усиливать воспалительный процесс, путем активации продукции белков хемоаттрактантов моноцитами: интерлейкина 1, фактора некроза опухоли и интерлейкина-6. iC3b образуется после расщепления C3b и является специфическим лигандом для адгезии лейкоцитов к сосудистому эндотелию через интегрин CD11b-CD18 (Mac-1). Кроме того, C5b-9 может активировать эндотелиальный ядерный фактор- $\text{NF-}\kappa\text{B}$ для увеличения транскрипции и экспрессии молекул адгезии лейкоцитов. Молекулы адгезии лейкоцитов к эндотелию с участием комплемента, включают молекулу адгезии сосудистых клеток 1, молекулу межклеточной адгезии 1, E-селектина и P-селектина. C5b-9 также стимулирует активацию лейкоцитов и хемотаксис, индуцируя секрецию интерлейкина-8 и моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1. Наконец, C5b-9 может изменять сосудистый тонус путем ингибирования эндотелий-зависимой релаксации и уменьшения образования эндотелием циклического гуанозинмонофосфата. Таким образом, комплемент может еще

больше уменьшить кровоток в ишемизированном органе и увеличить адгезию лейкоцитов к эндотелию.

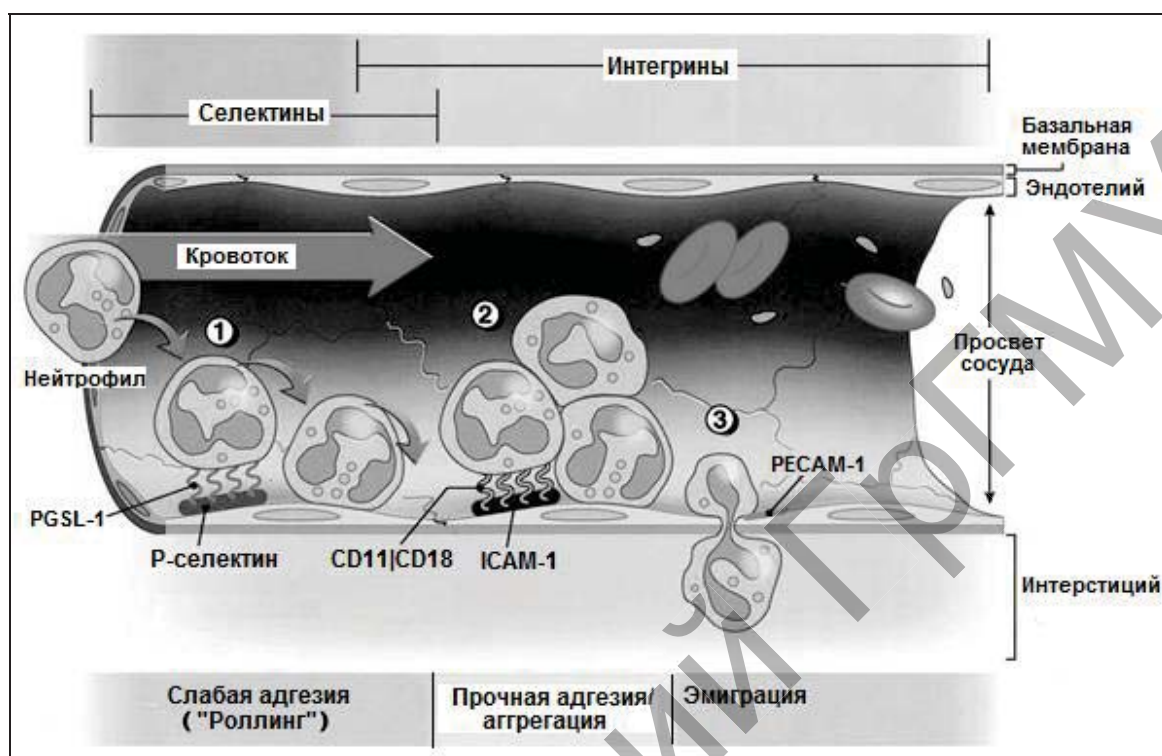


Рисунок 1. – Адгезия и эмиграция лейкоцитов после ишемии-реперфузии. Активированные лейкоциты взаимодействуют с сосудистым эндотелием посредством ряда отдельных стадий:

- 1 – Начальная стадия «роллинг» инициируется при ишемии-реперфузии увеличением экспрессии эндотелиального Р-селектина, который взаимодействует с его контррецептором на лейкоците-гликопротеином Р-селектина 1 (PGSL-1).
- 2 – Взаимодействие лейкоцитарных b_2 -интегринов CD11a/CD18 и CD11b/CD18 или VFC-1 с молекулой межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) на эндотелии, что приводит к прочной адгезии и агрегации лейкоцитов.
- 3 – Эмиграция лейкоцитов в интерстициальное пространство с участием молекулы адгезии 1 (PECAM-1), локализованной в межэндотелиальных участках эндотелия (3)

Ишемия–реперфузия приводит к активации лейкоцитов, их хемотаксису, адгезии и эмиграции [Carden DL, 2000]. Переход лейкоцитов в интерстициальное пространство происходит с участием молекулы тромбоцит–эндотелиальной клеточной адгезии–1–PECAM–1, которая конститутивно экспрессируется вдоль межэндотелиальных клеточных контактов. Во

внесосудистом пространстве активированные лейкоциты выделяют токсичные АФК, ферменты (протеазы, эластазы), что приводит к повышению сосудистой проницаемости, отеку, тромбозу и гибели паренхиматозных клеток [4].

Клинические проявления ИР повреждения в разных органах варьируют от транзиторных реперфузионных аритмий в сердце до, во многих случаях, фатального синдрома полиорганной недостаточности. Эффекты ИР у отдельных индивидуумов существенно варьируют, а факторы риска, такие как гиперхолестеринемия, гипертензия или сахарный диабет, усиливают уязвимость микрососудов и тканей к пагубным последствиям ИР-повреждения и феномена невосстановления кровотока после реперфузии – «no reflow» [4]. Суть последнего состоит в том, что кровоток в ишемизированном органе в некоторых случаях не восстанавливается до нормального уровня после полного устранения окклюзии сосудов. Механизмы этого явления, связанного с ИР, включают: усиление адгезивности лейкоцитов и эндотелиальных клеток, агрегацию тромбоцитов и лейкоцитов, накопление интерстициальной жидкости и снижение эндотелийзависимой вазорелаксации, которые совместно приводят к механической обструкции сосудов и нарушению кровотока [49]. Клинически это может проявляться в виде постреперфузионной дисфункции органа например: оглушенный миокард – «stunning», отторжение пересаженного трансплантата или увеличения размера инфаркта. Роль лейкоцитарной адгезии в феномене «no reflow» убедительно подтверждается исследованиями на собаках, показавшими, что подавление активности лейкоцитов в очаге ишемии нормализует коронарное кровяное давление, уменьшает размер инфаркта миокарда и снижает частоту желудочковых аритмий [Romson J.L., 1983].

Эффект тиамината может быть обусловлен способностью тиамината пирофосфата выполнять функцию простетической группы декарбоксилаз, играющих важную роль в межклеточном обмене углеводов. Кофермент пируватдегидрогеназы осуществляет окислительное декарбоксилирование пирувиноградной кислоты, превращающее ее в ацетил-КоА. Другая коферментная форма витамина В₁ входит в состав

фермента транскетолазы, участвующей в пентозофосфатном пути расщепления углеводов, одним из конечных продуктов которого является рибоза, необходимая для синтеза нуклеиновых кислот [26]. Тиамин способен оказывать как антиоксидантное, так и регулирующее активность дыхательной цепи действие. Известно косвенное метаболическое влияние тиамина, оптимизирующее антиоксидантный статус тканей организма путем активации утилизации пирувата в цикле Кребса, участия тиаминдифосфата в качестве кофермента пируватдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы, а также транскетолазы – ключевого фермента пентозофосфатного пути [64, 68]. Антиоксидантные эффекты тиамина реализуются через образование его гидрофобных метаболитов – тиохрома и оксидигидротиохрома, которые способны к инактивации диоксида азота и других активных радикалов, препятствуя, таким образом, нитрованию тирозинильных остатков белков при окислительном стрессе [39].

Важно отметить, что совместное введение дигидрокверцетина и тиамина проявлялось в более существенных антиоксидантных и корригирующих метаболических эффектах, чем их изолированное применение [34]. Таким образом, эти лекарственные препараты способны потенцировать в этом плане эффекты друг друга.

Введение сукцината натрия и ацетилцистеина у крыс с ишемией/реперфузией головного мозга крыс также показало наличие антиоксидантных эффектов при их изолированном введении, что привело к снижению проявлений окислительного стресса, способствовало улучшению показателей углеводного обмена, как основного поставщика энергии нервной ткани в головном мозге, что нашло проявление в улучшении показателей митохондриального дыхания у крыс с ишемией/реперфузией головного мозга [35].

Согласно данным литературы сукцинат препятствует митохондрионекрозу при гипоксии и возвращает их из парабиотического состояния к нормальному. Янтарная кислота, как энергодающий субстрат цикла Кребса, способен не только поддерживать высокую скорость дыхания, в сравнении с НАД-зависимыми субстратами, но и сохранять функциональные

способности митохондрий в стрессовых ситуациях, являясь энергорегулирующим субстратом.

В условиях недостатка кислорода наблюдается нарушение функционирования комплекса I, что приводит к снижению окисления НАДН и торможению цикла Кребса. Предполагается, что накапливающийся в этих условиях (при возросшей концентрации сукцината) малат может вступать в реакцию переаминирования с глутаматом и снижать повреждающие эффекты глутамат-кальциевого каскада. Ингибирование активности глутамат-кальциевого каскада чрезвычайно важно, поскольку глутаматная эксайтотоксичность представляет собой центральный патогенетический механизм ишемического повреждения мозга. Другие компоненты антиоксидантного и биорегуляторного комплекса оказывают как антиоксидантное, так и регулирующее активность дыхательной цепи действие.

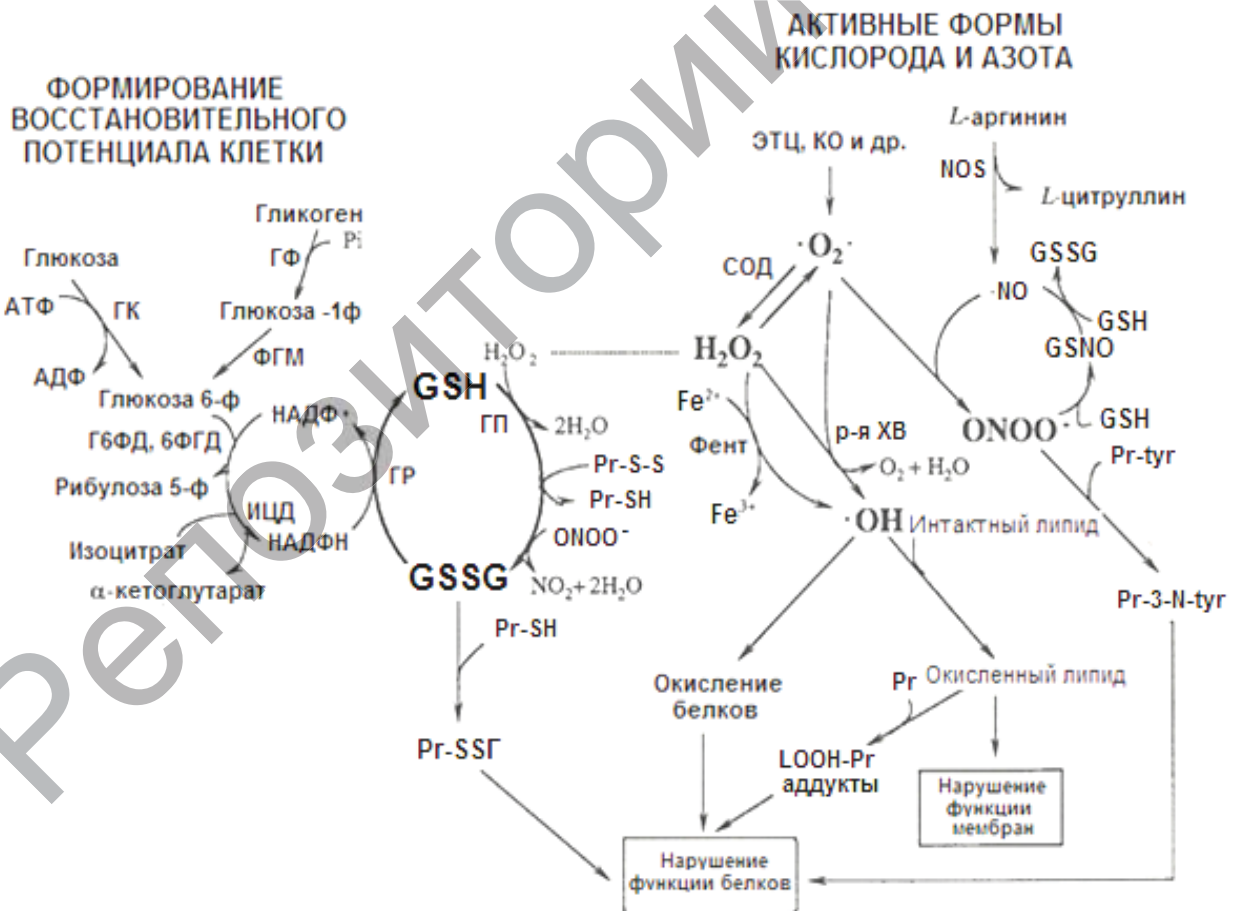


Рисунок 2. – Механизмы регенерации и антиоксидантного действия восстановленного глутатиона в клетке

Установлена зависимость между снижением клеточного отношения GSH/GSSG и апоптозом в культуре эпителиальных клеток и недифференцированных клетках PC12, которые могут быть предотвращены предварительным введением N-ацетилцистеина. Недавними исследованиями показано, что снижение митохондриального тиолдисульфидного отношения (а именно, увеличение GSSG и протеин-связанного-SSG) может сопровождаться активацией апоптоза в эпителиальных клетках линии CM460 ободочной кишки. Примечательно, что апоптоз клеток обусловлен нарушением митохондриальной дыхательной функции, включая уменьшение митохондриального мембранного потенциала и образования АТФ, ингибированием транспорта mtGSH, что предупреждалось введением N-ацетилцистеина. N-ацетилцистеин способен выполнять в клетке антиоксидантную и биорегуляторную (соотношение пулов восстановленного и окисленного глутатиона, GSH/GSSG) функцию.

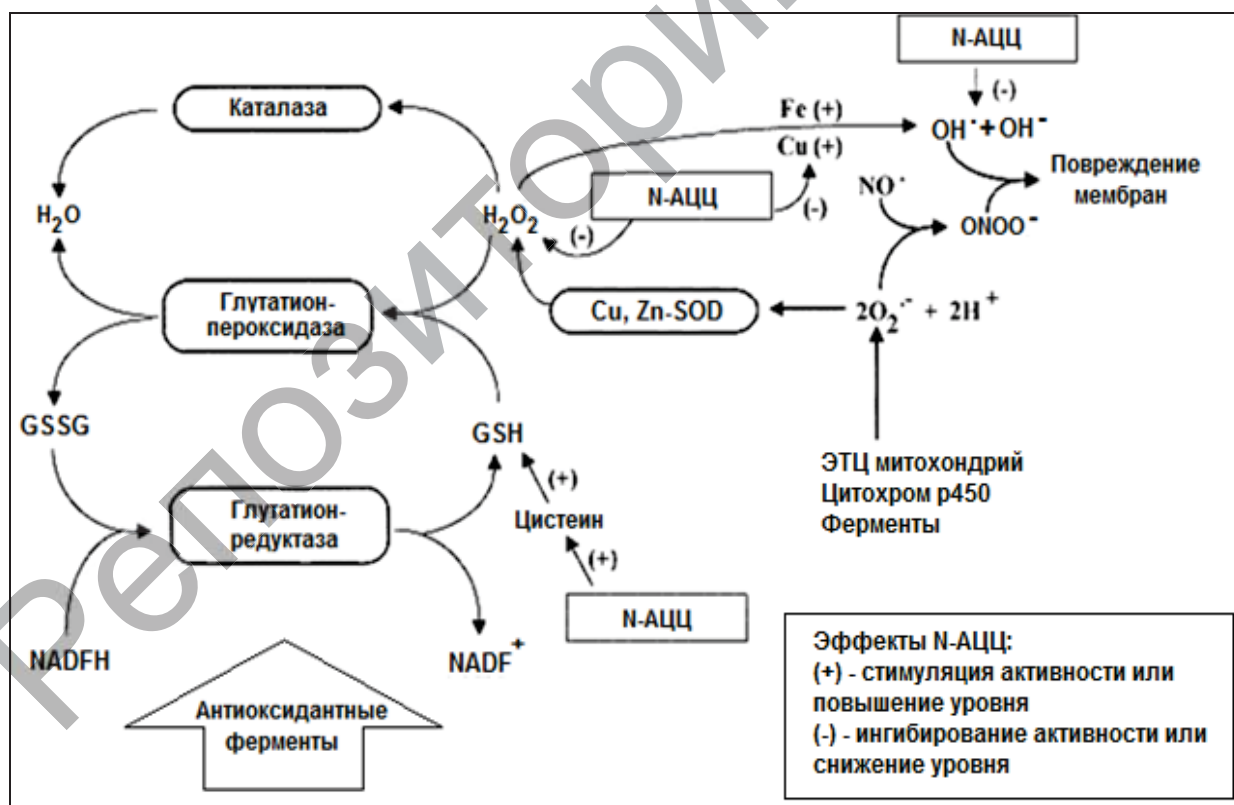


Рисунок 3. – Предполагаемые механизмы антиоксидантного действия N-ацетилцистеина

Ацетилцистеин поддерживает активность важной антиоксидантной системы клетки – системы глутатиона, необходимой для активности ключевых тиолсодержащих белков [79]. Это проявлялось повышением содержания в головном мозге крыс восстановленного глутатиона, общих сульфгидрильных групп глутатиона и белка, снижением активности глутатионпероксидазы, отражающей напряженность антиоксидантных механизмов в головном мозге в реперфузионный период, а также уменьшение уровня малонового диальдегида [14, 47].

Полученные результаты свидетельствуют о значительном угнетении аэробной респираторной активности головного мозга крыс и разобщении процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях при ишемии-реперфузии головного мозга. В течение реперфузионного периода развивается повреждение, как ферментов цикла Кребса, так и комплексов электронтранспортной цепи митохондрий, проявляющееся в уменьшении активности кислородзависимых механизмов энергообразования [63].

Исследование митохондриотропных эффектов биорегуляторного комплекса препаратов, содержащего дигидрохверцетин, тиамин, сукцинат и ацетилцистеин, у животных с ИР головного мозга, выявило менее выраженное снижение параметров дыхания митохондрий после его введения, что может быть использовано с целью коррекции энергетического обмена при реперфузионном синдроме, обусловленном восстановлением кровотока.

Результаты выполненных исследований в определенной степени позволили выяснить механизмы биоэнергетических нарушений в головном мозге крыс при его ишемии-реперфузии, исследовать антиоксидантную, метаболическую, нейропротективную активность биорегуляторного комплекса, включающего: дигидрохверцетин, тиамин, сукцинат натрия и ацетилцистеин путем комплексного воздействия на звенья патогенеза ишемически/реперфузионного повреждения головного мозга. Теоретические положения работы расширяют существующие представления о роли биоэнергетических

нарушений в механизмах транзиторных ишемических повреждений головного мозга. Биорегуляторный комплекс может быть рекомендован для комплексной терапии транзиторных нарушений мозгового кровообращения у пациентов.

Литература

1. Beer, S. M., Taylor, E. R., Brown, S. E., Dahm, C. C., Costa, N. J., Runswick, M. J., and Murphy, M. P. Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant DEFENSE, *The Journal of Biological Chemistry*, (2004) 279, 47939 – 47951.

2. Biffl, W.L. Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 / W.L. Biffl, E.E. Moore, F.A. Moore, C. Barnett // *J. Surg. – Res.* – 1996. – V. 63 (1). – P. 328 – 332.

3. Cadenas, E. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging / Cadenas, E., Davies, K.J. // *Free Radical Biology and Medicine*, 2000. – V. 29. – P. 222 – 230.

4. Carden, D.L. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury / DL Carden // *J Pathol.* – 2000. – Vol. 190. – P. 255 – 266;

5. Clemens, J. A. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants / J.A. Clemens // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28. – P. 1526 – 1531.

6. Coeroli, L. Nitric oxide production and perivascular tyrosine nitration following focal ischemia in neonatal rat / L. Coeroli, S. Renolleau, S. Arnaud // *J. Neurochem.* – 1998. – V. 70 (6). – P. 2516 – 2525.

7. Cole-Ezea, P. Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells / Cole-Ezea, P., Swan, D., Shanley, D., and Hesketh, J. // *Free Radical Biology and Medicine*, 2012. – V. 53, P. 488 – 497.

8. Cooke, J.P. Nitric oxide synthase; role in the genesis of vascular disease / J.P. Cooke, V.J. Dzau // *Ann. Rev. Med.* – 1997. – Vol. 96. – P. 379 – 382.

9. Crow J., Beckman J. The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity // In: *The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology* (eds. Koprowski, H.). – Springer-Verlag-Berlin-Heidelberg. – 1995. – P. 57 – 73.

10. Darley-Usmar V., Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system // *Pharm. Res.* – 1996. – V. 13 (5). – P. 649 – 662.

11. Dawson V. L., Dawson T. M. Pathologic roles of nitric oxide in the central nervous system // *Free Radicals in brain physiology and disorders.* – 1996. – P. 83 – 100.

12. Dawson, T.M. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide / T.M. Dawson, V.L. Dawson // *Ann. Neurol.* – 1992. –

Vol. 32(3). – P. 297 – 311.

13. Dawson, V.L. Nitric oxide neurotoxicity // T.M. Dawson, V.L. Dawson // *J. Chem. Neuroanat.* – 1996. – V. 10 (3 – 4). – P. 179 – 190.

14. Demopoulos H.B., Flamm E. S., Pietronigro D. D. et al. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders// *Acta Physiol. Scand. Suppl.* – 1980. – Vol. 492. – P. 91 – 119.

15. Desapher, S. Mitochondria as the central control point of apoptosis / S. Desapher, J.C. Martinou // *Trends Cell Biol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 369–377.

16. Dobrucki, L.W. The protective role of nitric oxide in the brain ischemia / L.W. Dobrucki, L. Kalinowski, W. Uracz, T. Malinski // *Journal of Physiology and Pharmacology.* – 2002. – Vol. 51(4 Pt 1). – P. 695 – 703.

17. Dringen, R. Metabolism and function of glutathione in brain / R. Dringen // *Progress in Neurobiology.* 2000. – Vol. 62, N 6. – P.649 – 671.

18. Eliasson, M. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage / M. Eliasson, Z. Huang, R. Ferrante, M. Sasamata // *J. Neurosci.* – 1999. – V. 19. – P. 5910 – 5918.

19. Faherty, CJ. Caspase-3-dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment / CJ Faherty, S. Xanthoudakis, RJ. Smeyne // *Brain Res Mol Brain Res.* – 1999. – V. 70. – P. 159 – 163.

20. Fassbender, K. Mood disorders and dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in multiple sclerosis: association with cerebral inflammation / K. Fassbender et al. / *Arch. Neurol.* Jan. – 1998: 55(1):66 – 72.

21. Fellman, V. Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia / V. Fellman, K.O. Raivio // *Pediatr. Res.* – 1997. – V. 41. – P. 599.

22. Forman, L.J. Augmentation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite production during cerebral ischemia and reperfusion in the rat / L.J. Forman, P. Liu, R.G. Nagele // *Neurochem. Res.* – 1998. – V. 23 (2). – P. 141 – 148.

23. Fukuda, H. Supplement of Nitric Oxide Attenuates Neutrophil-Mediated Reperfusion Injury / H. Fukuda, Y. Sawa, K. Kadoba // *Circulation.* – 1995. – Vol. 92 (9). – P. 413 – 416.

24. Gaboury, J. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide / Gaboury, J., Woodman R.C., Granger D.N. // *Am. J. Physiol.* 1993. – Vol. 265. – № 3 (Pt 2). – P. H862 – 867.

25. Garthwaite J., Boulton C. Nitric oxide signalling in the central nervous system // *Annu. Rev. Physiol.* – 1995. – V. 57. – P. 683 – 706.

26. Groussard, C. Changes in Blood Lipid Peroxidation Markers and Antioxidants after a Single Sprint Anaerobic Exercise / Groussard, C.; Rannou-Bekono, F.; Machefer, G.; Chevanne, M. // *European Journal of Applied Physiology*, 2003. – Vol. 89, – N 1, (March 2003), pp. 14 – 20.

27. Guidelines for Management of Ischaemic Stroke of the European

Stroke Organisation, 2008 .<http://www.eso-stroke.org/recommendations>.

28. Guix F. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain / Guix F., Uribealago I., Coma M., Munoz F. // *Prog. Neurobiol.* – 2005. – V. 76. – P. 126 – 152.

29. Gusev, E.I. Ishemicheskiy insul't. Sovremennoe sostoyanie problemy / E.I. Gusev, M.Yu. Martynov, P.R. Kamchatnov // *Doktor.ru. Moscow*; 2013, 5 (83): 2 – 7 (in Russian).

30. Hossmann K.A. Reperfusion of the brain after global ischemia: hemodynamic disturbances // *Shock.* – 1997. – V. 8 (2). – P. 95 – 101.

31. Hurd, T.R., Requejo, R., Filipovska, A., Brown, S., Prime, T.A., Robinson, A.J., Fearnley, I.M., and Murphy, M.P. (2008) Complex I within oxidatively stressed bovine heart mitochondria is glutathionylated on Cys – 531 and Cys – 704 of the 75 – kDa subunit: potential role of CYS residues in decreasing oxidative damage, *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 24801 – 24815.

32. Ischiropoulos H., Zhu L., Beckman J. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide // *Arch. Bioch. Biophys.* – 1992. – V. 298. – P. 446 – 451.

33. Jacobson, M.D. Reactive oxygen species and programmed cell death / M.D. Jacobson // *Trends Biochem. Sci.* – 1996. – V. 21. – P. 83.

34. Johansson, C., Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2004) Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase / *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 7537–7543.

35. Juurlink, B.H. Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione / B.H. Juurlink // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997.–Vol. 21, N 2.–P. 151–166.

36. Kanner, B.I. Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and haemoglobin / B.I. Kanner, S. Harel, R. Granit // *Lipids.* – 1992. – Vol. 27. – P. 46 – 49.

37. Knoops, B. Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2 – Cys peroxiredoxin/ Knoops, B., Goemaere, J., Van der Eecken, V., and Declercq, J.P. // *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011. – V. 15, – P. 817 – 829.

38. Kunstmann, S. High metabolic rates of 4-hydroxynonenal in brain capillary endothelial cells during hypoxia/reoxygenation / S. Kunstmann, K. Mertsch, I.E. Blasig, T. Grune // *Brain Res.*–1996.–V. 740 (1–2).– P. 353–355.

39. Liang, H. Glutathione peroxidase 4 differentially regulates the release of apoptogenic proteins from mitochondria/ Liang, H., Ran, Q., Jang, Y.C., Holstein, D., Lechleiter, J. // *Free Radical Biology and Medicine*, 2009.– V. 47,–P. 312 –320.

40. Love, S. Oxidative stress in brain ischemia / S. Love // *Brain Pathol.*–1999.–V. 9 (1).–P. 119–131.

41. Mailloux, R.J. Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions/ Mailloux, R.J., Jin, X., and Willmore, W.G. // *Redox Biology.*–2013.–V. 2, 123–139.

42. Maksimovich N. The correction of the ischemia–reperfusion brain injury by bioregulatory complex/ N. Maksimovich, I. Dremza// *Abstr. Book for: Frontiers in cardiovascular biology, 2014.–Barcelona, 4th–6th July Third congress of the ESC council on basic cardiovascular science//Cardiovascular research supplements (2014) 103, S57–S94.*

43. Maksimovich, N. E. Tolerance of hypoxic hypoxia in rats with cerebral ischemia treated by NO–synthase modulators // *Hypoxia medical.*–2004.–V.(1–2).–P.20–23.

44. Maksimovich, N. The degree of oxidative stress in the rat brain during ischemia and reperfusion in conditions of correction of the L–arginine–NO system / N. Maksimovich, V. Zinchuk, D. Maslakov // *Neuroscience and Behavioral Physiol.*–2006.–V. 36, № 4.–P. 373–378.

45. Mari, M. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant / Mari, M., Morales, A., Colell, A., Garcia–Ruiz, C., and Fernandez Checa // *Antioxidants & Redox Signaling*, 200911, 2685–2700.

46. Mari, M. Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease/ Mari, M., Morales, A., Colell, A., García–Ruiz, C. // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013.–V.1830, 3317–3328.

47. Mari, M., Morales, A., Colell, A., Garcia–Ruiz, C., and FernandezCheca, J.C. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant, *Antioxidants & Redox Signaling*, 200911, 2685–2700.

48. Mason R. B. Production of reactive oxygen species after reperfusion in vitro and in vivo: protective effect of nitric oxide/ Mason R. B., Pluta R.M., Walbridge S., Wink D.A. // *Journal of Neurosurgery.*–2000.–Vol. 93(1).–P. 99–107.

49. Maxwell, S.R. Reperfusion injury: A review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options / Maxwell S.R., Lip G.Y. // *Int. J. Cardiol.*–1997.–V. 58.–P.95–117.

50. Mc Rae, A. Microglia activation after neonatal hypoxic–ischemia / A. Mc Rae, E. Gilland, E. Bona // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1995. – V. 84. – P. 245.

51. Meister, A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency / A. Meister // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – Vol. 1271.–P. 35–42.

52. Meldrum D. R. L–arginine decreases alveolar macrophage proinflammatory monokine production during acute lung injury by a nitric oxide synthase–dependent mechanism// *J. Trauma.*–1997.–V. 43 (6).–P. 888–893.

53. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide,

s-nitrosoglutathione, and peroxyxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation / V. Tortora [et al.] // *Free radic biol med.*–2007.–VOL. 42. – P. 1075–1088.

54. Mitochondrial electron–transport–chain inhibitors of complexes i and ii induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species / Y. Chen [et al.] // *J. Cell sci.* – 2007. – VOL. 120. – P. 4155–4166.

55. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia–induced apoptosis / K. Nomura [et al.] // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 351. – P.183–193.

56. Moran, L.K. Thiols in cellular redox signaling and control / L.K. Moran, J.M. Gutteridge, G.J. Quinlan // *Curr. Med. Chem.* 2001.–Vol. 8, N 7.–P. 763–772.

57. Morrison, H.W. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion / H.W. Morrison, J.A. Filosa // *J. Neuroinflammation.*–2013.–V. 1.–P. 1742–2094.

58. Murray, CJL, Lopez AD. Progress and directions in refining the global burden of disease approach: response to Williams / CJL Murray, AD Lopez // *Health EconomicsDem.*–2000; 9.–P. 69–82.

59. Nagashima, T. The role of nitric oxide in reoxygenation injury of brain microvascular endothelial cells / T. Nagashima, S. Wu, K. Ikeda, N. Tamaki // *Acta Neurochirurgica–Supplementum.*–2002.–Vol. 76.–P.471–473.

60. Nohl, h. intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria / H. NOHL, L. GILLE, K. STANIEK // *BIOCHEM. PHARMACOL.*–2005.–VOL. 69.–P. 719–723.

61. Nomura, Y.A. Transient brain ischemia–and bacterial endotoxin–induced glial iNOS expression and NO–induced neuronal apoptosis / Y.A. Nomura // *Toxicology Letters.* –1998.–Vol.102–103.–P.65–69.

62. Oja, S.S. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione / S.S.Oja, R.Janaky, V.Varga, P.Saransaari.// *Neurochem. Int.* 2000.–Vol. 37, N2–3.–P.299–306.

63. Olivenza, R. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex / R. Olivenza, M.A. Moro, I. Lizasoain, P. Lorenzo et al. // *J. Neurochem.* 2000.–V. 74.–P. 785–791.

64. Ortega, A.L. Glutathione in Cancer Cell Death / Ortega, A.L., Mena, S., Estrela, J.M. // *Cancers*, 2011.–V. 3,–P. 1285–1310.

65. Palmer, R.M.J. Synthesis of nitric oxide from L–arginine by neutrophils: release and interaction with superoxide anion / R.M.J. Palmer, B.J.R. Whittle, S. Moncada// *Biochem. J.*–1989.–Vol. 261.–P. 293–296.

66. Panés, J. Leukocyte endothelial cell adhesion: Avenuesfor therapeutic intervention/ Panés J., Perry M, Granger D.N. // *J. Pharmacol.*–1999.–Vol. 126.–P. 537 –550.

67. Piantadosi, C.A. Mitochondrial generation of reactive oxygen species

after brain ischemia in the rat / C.A. Piantadosi, J. Zhang // *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 1996.–332 p.

68. Poderoso, J. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles / J.J. Poderoso [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1996. – Vol. 328. – P. 85–92.

69. Przegaliński, E. Anxiolytic – and antidepressant-like effects of an antagonist at glycine receptors / E. Przegaliński, E. Tatarczyńska, E. Chojnacka-Wójcik // *Pol J Pharmacol.*–1998.–50:349–354.

70. Radi R. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria / R. Radi [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.*–2002.–Vol. 33.–P. 1451–1464.

71. Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide// *Arch. Biochem. Biophys.*–1991.–V. 288.–P. 481–487.

72. Radi, R. Detection of catalase in rat heart mitochondria / R. Radi [et al.] // *J. Biol. Chem.*–1991.–Vol. 266.–P. 22028–22034.

73. Recommendations for stroke management. Update 2003.–European Stroke Initiative, 2003.–92 p.

74. Recommendations for stroke management. Update 2003. European Stroke Initiative, 2003.–92 p.

75. Robak, J. Nitric oxide donors as scavengers of superoxide anions / J. Robak, R.J. Gryglewski // *Pol. J. Pharmacol.*–1993.–Vol. 45.–P. 51–58.

76. Robey, R.B. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and akt / R.B. Robey, N. Hay // *Oncogene.*–2006.–VOL. 25.–P. 4683–4696.

77. Romson, J.L. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog / Romson J.L., Hook B.G., Kunkel SL, Abrams GD // *Circulation.*–1983.–V. 67.–V.1016–1023.

78. Rossig Dobrucki L.W. The protective role of nitric oxide in the brain ischemia / Dobrucki L.W., Kalinowski L., Uracz W., Malinski T. // *Journal of Physiology and Pharmacology.*–2002.–V. 51 (4 Pt 1).–P. 695–703.

79. Rubanyi, G.M. Cytoprotective function of nitric oxide: Inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes / G.M. Rubanyi, E.H. Cantor, W.C. Lumma, L.H. Parker Botelho// *Biochem Biophys Res Commun.*–1991.–Vol. 181.–P. 1392–1397.

80. Sacco, R. L. Risk factors and outcomes for ischemic stroke / R.L. Sacco // *Neurology.* 1995.–Vol. 45.–P. 10–14.

81. Salvemini, D. Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: in vitro, ex vivo, and in vivo studies / D. Salvemini, J.L. Masferrer // *Methods in Enzymology.*–1996.–Vol. 269.–P. 12–25.

82. Saugstad, O.D. Plasma hypoxanthine concentrations in pigs.A prognostic aid in hypoxia / O.D. Saugstad, A.O. Aasen // *Eur. Surg. Res.* – 1993.–V. 81.–P. 22.

83. Shikama H. Transport and metabolism of glutathione isopropyl ester in cerebrospinal fluid / H. Shikama, A. Ohta, A. Iwai, H. Koutoku, M. Umeda, K. Noguchi, M. Takeda, I. Ohhata // *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*–1995. – Vol. 88, – N 3. – P. 349–357.

84. Siesjo, B.K. Mechanisms of secondary brain injury / B. K. Siesjo, P. Siesjo // *Eur. J. Anaesthesiol.*–1996.–Vol. 13 (3).–P. 247–268.

85. Southam, E. Excitatory amino acid receptors coupled to the nitric oxide: cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development / E. Southam, S.J. East, J. Garthwaite // *Neurochem.*–1991.–Vol. 56.–P. 2072–2081.

86. Spinnewyn, B. Synergistic protective effects of antioxidant and nitric oxide synthase inhibitor in transient focal ischemia / B. Spinnewyn, S. Cornet, M. Auguet, P.E. Chabrier // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1999. – Vol. 19 (2).–P. 139–143.

87. Stagliano, N. E. The role of nitric oxide in the pathophysiology of thromboembolic stroke in the rat / N.E. Stagliano, W.D. Dietrich, R. Prado, E.J. Green, R. Busto // *Brain Res.*–1997.–V. 759 (1).–P. 32–40.

88. Suslina Z.A., Piradov M.A., Domashenko M.A. Insul't: otsenka problemy (15 let spustya) [Stroke: the review of the problem (15 years later)]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova.* 2014; 11: 5–13 (in Russian).

89. Szabó, C. Changing magma ascent rates in the Nógrád-Gömör Volcanic Field Northern Hungary/Southern Slovakia: evidence from CO₂-rich fluid inclusions in metasomatized upper mantle xenoliths / C. Szabó, R.J. Bodnar // *Petrology* 4 (3).–1996.–P. 221–230.

90. Taylor, E.R., Hurrell, F., Shannon, R.J., Lin, T.K., Hirst, J., and Murphy, M.P. Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation, *The Journal of Biological Chemistry.*–2003.–Vol. 278,–P. 19603–19610.

91. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol / Poderoso J.J. [et al.] // *J. Biol. Chem.*–1999.–VOL. 274.–P. 37709–37716.

92. Tretter, L., and Adam-Vizi, V. 2000) Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress // *The Journal of Neuroscience*, 2000.–Vol. 20,–P. 8972–8979.

93. Valdez, L.B. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity / L.B. Valdez, T. Zaobornyj, A. Boveris // *Biochim. Biophys. Acta.*–2006.–Vol. 1757.–P. 166–172.

94. Vital Signs: Recent trends in stroke death rates–United States, 2000–2015. *MMWR*–2017–66 p.

95. Warlow, C.P. Stroke. A practical guide to management Stroke / C.P. Warlow, M.S. Dennis, J. van Gijn [et al.] // London, 1997.–664 p.

96. Wink, D.A. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species / D.A. Wink, J.A. Cook, R. Pacelli, J. Liebmann

// Toxicol. Lett.–1995.–V. 82–83.–P. 221–226.

97. Wu, S. The mechanism of free radical generation in brain capillary endothelial cells after anoxia and reoxygenation / S. Wu, T. Nagashima, K. Ikeda, T. Kondoh // Acta Neurochir. Suppl. Wien. – 1997. – V. 70. – P. 37–39.

98. Yonetani, M. The role of nitric oxide in hypoxic ischemic injury / M. Yonetani // No To Hattatsu. – 1996. – Vol. 28 (2). – P. 125–127.

99. Zhang, H., Go, Y.M., and Jones, D.P. Mitochondrial thioredoxin-2/ peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress, Archives of Biochemistry and Biophysics // 2007. – Vol. 465. – P. 119–126.

Репозиторий ГРГМУ

Научное издание

Максимович Наталья Евгеньевна
Дремза Иосиф Карлович
Троян Элина Ивановна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ
НАРУШЕНИЙ БИОЭНЕРГЕТИКИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА**

Монография

Ответственный за выпуск С. Б. Вольф

Компьютерная верстка И. И. Прецкайло
Корректурa Н. Е. Максимович

Подписано в печать 28.12.2018.

Формат 60x84/16. Бумага офсетная.

Гарнитура Таймс. Ризография.

Усл. печ. **14,88** л. Уч.-изд. **11,00** л. Тираж **20** экз. Заказ **220**.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет»
ЛП № 02330/445 от 18.12.2013. Ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно.