

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДП «ДЕРЖАВНИЙ ЕКСПЕРТНИЙ ЦЕНТР МОЗ УКРАЇНИ»**

**ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОТЕЦІЙНИХ
ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ПЕРВИННОЇ ТА ВТОРИННОЇ
НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ**

Методичні рекомендації

Київ – 2016

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДП «ДЕРЖАВНИЙ ЕКСПЕРТНИЙ ЦЕНТР МОЗ УКРАЇНИ»**

Затверджено на засіданні
Науково-експертної ради
ДП «Державний експертний центр
МОЗ України»
протокол № 1 від 28.01.2016 року

**ДОКЛІЩІНЕ ВИВЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ
ПОТЕЦІЙНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ПЕРВИННОЇ ТА
ВТОРИННОЇ НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ**

Методичні рекомендації

Київ – 2016

Авторський колектив

І. С. Чекман
І. Ф. Беленічев
О. О. Нагорна
Н. О. Горчакова
В. Д. Лук'янчук
Н. В. Бухтіярова
С. В. Горбачова
Г. О. Сирова

Рецензенти:

член-кореспондент НАМН України, доктор медичних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України В. І. Кресюн, завідувач кафедри загальної та клінічної фармакології Одеського національного медичного університету

доктор медичних наук, професор О. К. Ярош, завідувач відділу нейрофармакології ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України»

доктор біологічних наук, професор Т. Г. Толстикова, завідувач лабораторії фармакології Новосибірського інституту органічної хімії ім. М. М. Ворожцова Сибірського Відділення Російської Академії Наук

Зміст

Вступ	4
Розділ 1. Дослідження специфічної активності потенційних нейропротекторів <i>in vitro</i>	6
Розділ 2. Дослідження специфічної активності потенційних нейропротекторів на різних експериментальних моделях ішемії головного мозку	11
Розділ 3. Оцінка неврологічного дефіциту у тварин з моделюванням ішемічних уражень головного мозку.....	21
Розділ 4. Визначення маркерів оксидативного стресу і стану антиоксидантної системи	24
Розділ 5. Вивчення тіол-дисульфідної системи головного мозку.....	46
Розділ 6. Дослідження системи оксиду азоту.....	56
Розділ 7. Дослідження деяких показників ГАМК-ергічної системи головного мозку	64
Розділ 8. Визначення показників окисного метаболізму у головному мозку	66
Розділ 9. Дослідження функціональної активності мітохондрій ішемізованого головного мозку з метою підтвердження «мітопротективної активності» потенційних нейропротекторів.....	75
Розділ 10. Морфологічні та гістохімічні методи дослідження головного мозку	78
Розділ 11. Характеристика деяких маркерів, що мають діагностичну цінність при вивченні патології нервової системи.....	80

Вступ

Проблема ішемічного інсульту в наш час стає дедалі актуальнішою. В індустріально розвинених країнах інсульт займає 2-3-тє місце у структурі загальної смертності населення і є основною причиною стійкої втрати працездатності. Пусковою ланкою ішемічної загибелі нейронів виступає енергетичний дефіцит, що ініціює глутамат-кальцієвий каскад – вивільнення збуджуючих аміноациддергічних нейротрансмітерів – аспартата і глутамату та внутрішньоклітинне накопичення іонів Ca^{2+} . Процеси, що починаються в перші години мозкового інсульту і лежать в основі глутамат-кальцієвого каскаду (зміни метаболізму глутамату і кальцію, оксидативний стрес, гіперпродукція NO^*), індукують віддалені наслідки ішемії – реакцію геному з включенням генетичне запрограмованих молекулярних механізмів, дисфункцію астроцитарного і мікрогліального пулів, розвиток імунних змін та ініціацію нейроаптозу [3, 5, 9, 11, 12, 17, 24, 34].

Концепція нейропротекції дозволяє виділити два основних напрями терапії мозкового інсульту. **Первинна нейропротекція** спрямована на переривання швидких механізмів некротичної смерті клітин – реакцій глутамат-кальцієвого каскаду (антагоністи NMDA- і AMPA-рецепторів і блокатори кальцієвих каналів – ремацемід, релутек, німотоп та ін.). **Вторинна нейропротекція** спрямована на зменшення вираженості віддалених наслідків ішемії – на блокаду прозапальних цитокінів, молекул клітинної адгезії, гальмування оксидативного стресу, нормалізацію нейрометаболических процесів, інгібування апоптозу (антиоксиданти, ноотропи, нейропептиди – емоксипін, тіотриазолін гліцин, пірацетам, тіоцетам, церебролізин, кортексин, цереброкурин та ін.) [5,9, 11] .

Незважаючи на певні успіхи в лікуванні мозкових інсультів, ця проблема залишається все ще достатньо актуальною. Сучасні нейропротектори не завжди проявляють достатню терапевтичну ефективність в умовах клініки, мають ряд побічних ефектів при тривалому застосуванні, у зв'язку з відсутністю достовірної лікувальної дії їх не можливо застосувати в гострий період ГПМК.

На даний час ведеться пошук нових нейропротекторів серед різних азагетероциклічних систем, природних сполук, нейропептидів тощо. [5, 24, 35,

36]. Надійність і достовірність результатів, отриманих при доклінічній оцінці потенційних препаратів, досліджуваних в якості перспективних коректорів порушень кровопостачання мозку при цереброваскулярних розладах, значною мірою обумовлені тим, наскільки експериментальні моделі ішемії головного мозку адекватні клінічним проявам інсульту [3, 4, 5, 11, 13, 15, 16, 34, 39, 40]. Зокрема, чи спроможні ці моделі відтворити основні цереброваскулярні феномени: дифузне зниження мозкового кровотоку, енергетичний дефіцит, глутамат-кальцієву ексайтотоксичність, оксидативний стрес, експресію генів раннього реагування тощо. Важливим моментом при оцінці ефективності церебропротективної дії препаратів є здатність експериментальної моделі відтворювати також клінічну картину церебральної ішемії: порушення рухової активності, ознаки неврологічного дефіциту (парези, паралічі та ін.), порушення уваги, навчання і пам'яті, відсутність адекватної орієнтації у просторі і часі. Важливим також є вибір біохімічних, молекулярних і клітинних маркерів, що дозволяють оцінити картину ураження нервової тканини в експерименті і дати характеристику досліджуваного потенційного нейропротектора.

Крім того, особливої актуальності в наш час набуло застосування для нейропротективної оцінки досліджуваних потенційних нейропротекторів так званих досліджень *in vitro*, що дають змогу дослідити і встановити здатність того чи іншого лікарського засобу впливати на окрему ланку патогенезу ішемічного ураження головного мозку (оксидативний нітрозуючий стрес, глутаматна ексайтотоксичність, порушення і тіол-дисульфідної рівноваги та ін).

1. ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОТЕНЦІЙНИХ НЕЙРОПРОТЕКТОРІВ IN VITRO

Розроблені в наш час методи виділення нервових клітин в індивідуальному стані дозволяють одержати якісно нову й достовірну інформацію про стан нервової тканини в умовах моделювання патологічних процесів і вивчити вплив на них досліджуваних потенційних нейропротекторів [9, 22, 31].

Для досліджень in vitro використовують білих щурів-самців у віці 4 тижні і масою 80 - 100 г. Виділення збагачених фракцій нейронів і нейроглії проводиться у два етапи. На першому етапі мозкова тканина дезінтегрується з метою одержання клітинної суспензії, на другому – здійснюється диференціальне ультрацентрифугування у градієнті щільності сахарози і фіколу. Для одержання нейронів і нейроглії щурів декапітують і швидко вилучають мозок. Кору головного мозку відокремлюють від білої речовини, подрібнюють і переносять у розчин, що містить 7,5% полівінілпіролідону (ПВП), 1% бичачий сироватковий альбумін (БСА) і 10 мМ CaCl₂. Отриману суспензію фільтрують через три сита під невеликим тиском для зменшення втрат нейрональних клітин. Після послідовного пропускання через сита клітинну суспензію нашаровують на градієнт, що складається з 2 видів сахарози — 1М і 1,75М. Центрифугування проводять при 60000g протягом 15 хв (при температурі 10 °С). У результаті центрифугування одержують два шари і щільний осад. Верхній шар представлений залишками мієлінових оболонок, другий шар складається з гліальних і нейрональних клітин. Осад, представлений тілами нейронів, відповідав ступеню чистоти 90%. Надалі проводять додаткове очищення другого шару шляхом другого фільтрування й ультрацентрифугування. Виділені нейрональні клітини відмивають від сахарози й альбуміну охолодженим фізіологічним розчином (температура розчину 4 °С).

Отриману в такий спосіб суспензію ділять на серії:

- **інтактна:** суспензія нейронів без внесення ініціюючих агентів і досліджуваних потенційних нейропротекторів;
- **контрольна:** суспензія нейронів, до якої додають агенти, що ініціюють оксидативний і нітрозуючий стреси, глутаматну ексайтотоксичність, депривацію глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи у концентраціях, здатних викликати загибель 50% нейронів (0,1-5мкМ)

Для ініціації у суспензії нейронів *оксидативного стресу*, в інкубаційне середовище вносять 0,1-5 мкМ H_2O_2 ;

— з метою моделювання *нітрозуючого стресу*, в інкубаційне середовище у токсичній концентрації (0,1-5 мкМ) вносять динітрозольний комплекс заліза (DNIC). DNIC, на відміну від NO, виступає більш сильним нітрозилуючим агентом, взаємодіє з тіолами білків, гістидином, аспаратом, глутаміном, метіоніном, цистеїном, глутатіоном і утворює N- та S-нітрозотіоли;

— розвиток *глутаматної «ексайтотоксинності»* ініціюють додаванням до інкубаційного середовища глутамінової кислоти, каїнату або N-метил-D-аспартата (0,1-5 мкМ);

— *депривацію глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи* здійснюють шляхом введення в інкубаційне середовище хлоро-2,4-динітробензену (chloro-2,4- dinitrobenzene) (CDNB) (0,1-5 мкМ) — селективного інгібітора глутатіон-S-трансферази, що утворює кон'югати з глутатіоном у цитозольній і мітохондріальній фракціях.

Після внесення в інкубаційне середовище обраних ініціюючих агентів, проби інкубують протягом 60 хв при температурі 37 °С.

Паралельно з інтактною і контрольною пробами ставлять пробу з додаванням ініціюючих агентів і досліджуваних біологічно активних речовин (БАР) у різних концентраціях з подальшим визначенням їхньої ефективної концентрації.

Нейропротективну активність потенційних нейропротекторів оцінюють за:

а) тестом з нітритом срібла.

Принцип методу базується на вибіркового забарвлюванні (у темний колір) дегенеруючих нейронів. З цією метою готують мазки на предметному склі з суспензії нейронів інтактною, контрольною і проби з додаванням потенційних нейропротекторів, які фіксують сумішшю спирту, формаліну і оцтової кислоти (7:2:1), з наступним забарвленням нітритом срібла для виявлення дегенеруючих нейронів. Ступінь нейропротективної активності оцінюють за здатністю потенційних препаратів зменшувати кількість дегенеруючих нейронів у порівнянні з контрольною пробєю;

б) методом диференціального визначення апоптуючих клітин.

З метою впливу досліджуваних потенційних нейрон-проекторів на тип морфологічної загибелі в умовах введення в інкубаційне середовище ініціюючих агентів застосовують методику диференціального фарбування апоптуючих і некротизуючих клітин флуоресцентними барвниками: hoechst 33342 (апоптоз) та етідіумом бромідом (некроз). Для цього мазки послідовно профарбовують протягом 15 хв Hoechst 33342 (50 мкг/мл) та етідіумом бромідом (10 мкг/мл). Після кожного барвника мазки промивають фосфатним буфером із подальшою фіксацією у 5% розчині формальдегіду (20 хв). Кількість некротичних клітин підраховують, використовуючи флуоресцентний мікроскоп; некротичними вважаються великі червоні клітини, апоптичними — зелені з фрагментованими ядрами.

Крім дослідження оцінки нейропротективної активності потенційних нейропротекторів *in vitro*, за ступенем їхнього впливу на процеси клітинної загибелі, можливе також вивчення у суспензії нейронів ряду біохімічних показників енергетичного обміну, оксидативного стресу NO-; ГАМК-ергічної тіол-дисульфідної систем, а також вивчення імуноферментним методом деяких маркерів деструктивних процесів нервової тканини (нейроспецифічні білки, нейротрофічні фактори), методики проведення яких будуть описані нижче.

Дослідженнями останніх років установлена провідна роль розвитку мітохондріальної дисфункції у процесах клітинної загибелі в умовах ішемії головного мозку. В зв'язку з цим доцільно досліджувати наявність у потенційних нейропротекторів так званої «мітопротективної дії» (11, 22, 35).

Для дослідження *in vitro* «мітопротективної дії» потенційних нейропротекторів за описаною нижче методикою з головного мозку шурів виділяють мітохондріальну фракцію.

У дослідах білі щури з масою тіла 160-170 г. З головного мозку швидко видаляють кров, відділяють від мозкової оболонки і досліджувані шматочки поміщають у рідкий азот. Потім подрібнюють у рідкому азоті до порошкоподібного стану і гомогенізують при (2 °C) у 10-кратному об'ємі середовища, що містить (у ммольях): сахарози – 250, трис-НСІ-буферу - 20, ЕДТА-1 (рН 7,4). При температурі (+4 °C) методом диференціального центрифугування на рефрижераторній центрифугі виділяють мітохондріальну

фракцію. Для очистки мітохондріальної фракції від великих клітинних фрагментів попередньо проводиться центрифугування протягом 7 хв при 1000 g, а потім супернатант повторно центрифугують протягом 20 хв при 17000 g. Супернатант зливають і зберігають при - 80 °С. Осад мітохондрій ресуспендують у середовищі виділення, що містить бичачий сироватковий альбумін (0,5 мг/мл) і знову осаджують протягом 10 хв при 17000g. Мітохондрії суспендують у середовищі виділення, суспензія містить 40-60 мг білка/мл. Для тривалого зберігання мітохондрії заморожують при -80 °С. Для визначення швидкості розкриття мітохондріальної пори використовують суспензію 0,5-1,0 мг білка/мл.

Для проведення фармакологічних досліджень в інкубаційну суміш вносять суспензію мітохондрій (1 мг білка у пробі). 1 мМ K_2HPO_4 можна вносити у момент індукції розкриття пор через 5 хв після внесення діючого агента.

Варіанти інкубаційної суміші:

1. 120 мМ KCl , 0,5 мМ K_2HPO_4 , 2 мМ глутамату, 1 мМ малату, 20 мМ трис-амінометану, рН 7,4;

2. 70 мМ сахарози, 5 мМ HEPES , 70 мМ KCl , 0,5-1 мМ K_2HPO_4 , рН 7,4.

Загальний об'єм інкубаційної суміші складає 3 мл.

Перед дослідом у проби вносять досліджувані речовини (10-100 мкМ у пробі) та інкубують 2 хв.

Розкриття мітохондріальної пори у суспензії мітохондрій можна ініціювати наступними агентами [2, 5, 11, 1516, 23, 35, 39, 40]:

МФТП (1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин) – індуковане розкриття мітохондріальних пор:

До інкубаційного середовища додати 0,4 мМ МФТП і через 5 хв – 50 мкМ CaCl_2 ;

Ca^{2+} – індуковане розкриття мітохондріальних пор:

До інкубаційного середовища додати 200 мкМ CaCl_2 ;

NO – індуковане розкриття мітохондріальних пор:

До інкубаційного середовища додати 20 мкМ нітропрусида натрію через 2 хв додати 50 мкМ CaCl_2 ;

H_2O_2 – індуковане розкриття мітохондріальних пор:

До інкубаційного середовища додати 50 мМ перекису водню, через 2 хв

додати 50 мкМ CaCl_2 .

Мітопротективна дія вивчається за здатністю досліджуваної речовини повинні запобігати розкриттю мітохондріальних пор (МП) і знижувати мітохондріальний потенціал Ψ .

Розкриття МП визначають при $\lambda = 540$ нм при 25 °С, при постійному перемішуванні протягом 25 хв. Визначення мітохондріального потенціалу проводять із сафроніном О (9 мкМ на пробу) за різницею світлопоглинання при 515 і 525 нм ($\Delta A_{515-525}$ нм).

Слід наголосити, що дослідження *in vitro* як у суспензії нейронів так і мітохондрів доцільно проводити як для скринінгового вивчення великого масиву потенційних нейропротекторів, так і для розширеного дослідження найбільш перспективного поєднання з метою уточнення механізмів їхньої нейропротективної дії.

2. ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОТЕНЦІЙНИХ НЕЙРОПРОТЕКТОРІВ НА РІЗНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЯХ ІШЕМІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Незважаючи на можливі недоліки використання експериментальних моделей церебральної ішемії, їх широко застосовують при фармакологічних, фізіологічних і патоморфологічних дослідженнях. Перш за все це пов'язано з тим, що моделювання церебральної ішемії у тварин відносно, легко контролювати біохімічні, імуноцитохімічні, гістологічні зміни в тканинах мозку в різний термін після виникнення ішемії (секунди, хвилини, доби). Все це обумовлює використання моделей ішемії мозку як для вивчення механізмів ішемічної нейродеструкції, так і для до клінічних досліджень потенційних нейропротективних засобів [3, 5, 11, 18, 39].

Моделі церебральної ішемії можуть бути відтворені як на великих (кролики, собаки, свині, мавпи), так і на дрібних тваринах (миші, щури). Використання великих тварин, при вивченні церебральної ішемії, має безліч переваг. На великих тваринах легше проводити складні фізіологічні (електроенцефалографія, реографія, газовий обмін) і біохімічні (показники енергетичного обміну, оксидативного стресу, молекулярні маркери ушкодження нервової тканини) моніторинги головного мозку. Всі ці вимірювання можуть бути проведені одночасно, за рівнозначні проміжки часу на тих самих тваринах. Проте моделювання ішемії на великих тваринах достатньо дороге і трудомістке, причому, експериментальна ішемія не завжди відтворюється. Використання великих тварин часто вимагає застосування різних способів анестезії, що також може впливати на якість відтворення ішемії. Крім того, комітет з біоетики й товариство захисту тварин не схвалюють подібних досліджень.

Використання дрібних тварин має ряд переваг. Дрібні тварини, особливо гризуни, коштують не так дорого. Миші, зокрема, генетично гомогенні, і генетичні модифікації можуть бути проведені відносно легко для відтворення трансгенних тварин. Ще однією значною перевагою, особливо

використання мишей і щурів, є можливість вивчення складних форм поведінки, нейромоторики, пам'яті для оцінки ступеня важкості ішемії. Розміри головного мозку мишей і щурів дозволяють застосовувати такі процедури як швидке заморожування для подальших біохімічних і цитоімунохімічних досліджень.

Існують наступні основні експериментальні моделі гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) — глобальна, фокальна, мультифокальна ішемія та інтрацеребральна геморагія. Моделювання інтрацеребральної геморагії полягає у розриві судин головного мозку або введенні аутокрові.

Більшість моделей фокальної ішемії включають оклюзію однієї з центральних судин, яка постачає кров'ю локальну ділянку головного мозку, зі зниженням рівня локального мозкового кровотоку до 30 %, що відповідає другому критичному рівню. При мультифокальній ішемії спостерігається декілька різнолокалізованих ділянок сповільненого току крові. Характерною особливістю фокальної ішемії є наявність центрального осередку ішемічного некрозу і навколишньої зони пенумбри, в якій знаходяться загиблі і ушкоджені, але ще життєздатні нейрони, а також нейрони без виражених змін. Більшість моделей фокальної ішемії головного мозку полягає в оклюзії середньої мозкової артерії (СМА) у дрібних або великих тварин. Закупорка СМА є результатом зменшення мозкового кровотоку як у стріатумі, так і в корі, а рівень і розподіл залежать від тривалості оклюзії артерії, місця оклюзії, кількості додаткового кровотоку в ділянку СМА.

Існують різні способи оклюзії артерій для відтворення ішемії, постійні, або тимчасові на проксимальних і дистальних ділянках судини. Такі моделі інтенсивно використовуються через подібність із проявами інсульту в людини. Наявність цих моделей набуло широкого застосування для оцінки ефективності різних нейропротекторів і механізмів ураження мозку при ішемії, для визначення ролі генів, білків, ліпідів, месенджерів, що беруть участь у розвитку ішемії. Розроблено методику перманентних проксимальних оклюзій артерій на щурах, що включає субтемпоральну (тимчасову) краніотомію. Використання цієї моделі приводить до

формування зони інфаркту у корі. На моделі перманентної (постійної) оклюзії артерій, локальний мозковий кровоток у коркових кортикальних ділянках, в яких відбуваються гістологічні аномалії, приблизно дорівнює 25 мл на 100 г за хвилину, а зона ішемічного ураження відповідає ділянці зменшення локального мозкового кровотоку. Ще одним варіантом моделі фокальної ішемії мозку є оклюзія середньої мозкової артерії (СМА) разом з оклюзією загальної сонної артерії. Більшість дослідників, для відтворення ішемії, віддають перевагу перед оклюзією електро-коагуляції середньої мозкової артерії.

Моделлю фокальної ішемії є також тромбоемболія судин мозку в щурів і великих тварин. Суть її полягає у введенні гомологічних кров'яних згустків безпосередньо в загальну сонну артерію або через ретроградний катетер, розміщений у зовнішній сонній артерії [5, 15].

Також було розроблено декілька моделей ішемії-реперфузії мозку шляхом тимчасової 30-хвилинної оклюзії СМА, однак ця методика потребує доброго технічного оснащення. Для цього використовувалися великі тварини (примати і кішки).

Однак моделі фокальної ішемії, викликані оклюзією СМА, мають ряд недоліків, що обмежують їхнє широке застосування у фармакологічному експерименті. Насамперед, це трудомісткість методики, яка потребує спеціального обладнання, необхідність розтину черепної коробки, часте ушкодження твердої оболонки мозку. Даний метод не передбачає проведення нейрохімічних і біохімічних досліджень. Лише у 30-45 % щурів виникає неврологічний дефіцит і то легкої й середньої тяжкості (до 3-5 балів за шкалою С. Р. McGrow). Реєстрована загибель тварин, особливо на першу добу експерименту, переважно викликана ускладненнями при відтворенні даної моделі.

Ще одним, відносно маловідомим методом відтворення фокальної перманентної транзиторної оклюзії у гризунів є метод із застосуванням інтралюмінального філаменту. Цей метод набув поширення з моменту його розробки наприкінці 80-х років для вивчення, як механізмів ураження головного мозку, так і нейропротекції. Він включає 2 етапи. На першому

етапі проводиться перев'язка загальних сонних артерій на другому – інтравазально вводиться оклюдер у сонну артерію і далі до середньої мозкової артерії. В якості окcludера використовується нитка з хромованого кетгуту. Кетгутова нитка має здатність набухати при контакті з кров'ю і міцно прилипати до стінок судин. Це забезпечує високу надійність і відтворюваність даного методу. У зв'язку з малоінвазивністю методу і невеликою ділянкою ішемічного ураження летальність складає 25-40 % тварин. Тварини після операції продовжують жити, що дозволяє вивчати постішемичне відновлення поведінкової, дослідницької активності, навчання і пам'яті, механізми нейропротекції.

Різновидом моделі фокальної ішемії є фотоіндукований тромбоз судин, при якому утворюється постійний за обсягом і локалізацією ішемічний осередок. Методика ґрунтується на принципі фтохімічної стимуляції утворення тромбів у судинах мозку при взаємодії світлового променя з флуоресцентним барвником, попередньо введеним у кров'яне русло. Недолік цього способу полягає у тому, що фтохімічна реакція може викликати мікрovasкулярне ураження. Фокальна фотоіндукована ішемія застосовується переважно при скринінгових дослідженнях і вивченні поведінкових реакцій.

Глобальна ішемія виникає при порушенні кровотоку по великих магістральних артеріях (аорті), гострій зупинці серця. Ця модель може бути відтворена шляхом перетискання шиї або декапітацією. Вона характеризується вибірковим ураженням нейронів, локалізованих у різних структурах головного мозку. При глобальній церебральній ішемії відсутній мозковий кровотік, що є причиною ураження нейронів. Глобальна ішемія буває тотальною (повною) і субтотальною (неповною). Перша використовується для вивчення регенераційних можливостей, відстроченої загибелі нейронів окремих уразливих ділянок мозку. Найбільш легкий спосіб викликати повну глобальну ішемію без рециркуляції — це декапітація. Цю методику апробували багато років тому на дрібних тваринах для вивчення патобіохімічних змін при глобальній ішемії. Після декапітації голови, заморожений і гомогенізований мозок використовується

для метаболічних і біохімічних досліджень. В експериментальній медицині протягом тривалого історичного періоду для відтворення глобальної ішемії у тварин застосовувалася шийна надувна манжетка. Проте при цій методиці спостерігається ряд ускладнюючих факторів: венозна конгезія, стискання блукаючого нерва, що може мати небажаний (спотворюючий) вплив на розвиток ішемії. Здавлювання ший за допомогою надувної манжетки також проводилося і на великих тваринах (собаках) для відтворення глобальної ішемії. Однак при цьому вертебральні артерії повинні бути піддані оклюзії окремо, оскільки вони близько прилягають до хребта. Здавлювання ший протягом 2 хвилин, за цією методикою, призводить до втрати свідомості, а потім супроводжується повним відновленням. Після 4-6 хв ішемії, викликаній у такий спосіб, тварини перебувають у коматозному стані протягом 24 годин, а потім настає повне відновлення нормальних неврологічних функцій. Після 8 хвилин здавлювання виникає перманентний неврологічний дефіцит. Подібна методика проводилася на мавпах і полягала у зниженні артеріального тиску на 50 мм рт. ст. перед здавлюванням. При застосуванні цієї моделі на мавпах були виявлені гіпокампульні порушення після 15 хвилин ішемії з неврологічним дефіцитом, що зберігався протягом багатьох днів після ішемії.

Вентрикулярна фібриляція — ще один спосіб відтворення повної глобальної ішемії. Ця технологія використовується для імітації клінічної ситуації зупинки серця, і багато дослідників для продовження цього стану додатково застосовують відновлення серцевої діяльності. Ця методика переважно застосовувалася на великих тваринах. Вона хоч і відтворює повноцінну ішемію, але трудомістка і дорога, оскільки передбачає наступну реанімацію тварин. При цьому методі церебральний перфузний тиск низький і рівень кровотоку значно нижчий, ніж у контрольній групі, незважаючи на спроби підвищення перфузного тиску введенням адреналіну.

Модель зупинки серця, проведена на мишах (8-10 хв зупинки серця), призводить до тривалого ураження у гіпокампі та сенсомоторній зоні кори. Вентрикулярна фібриляція спричиняє ішемію більшості органів. Тому перевагу слід віддавати моделям що полягають в оклюзії цефалічних

артерій шиї і грудної клітки без повної ішемії в реальній, вісцеральній та інших зонах. Також, розроблено модель на кішках, що включає оклюзію кільцевої та лівої підключичної артерії біля їхнього устя, у дузі аорти на фоні зниження артеріального тиску шляхом введення гангліоблокаторів, менш ніж до 80 і навіть до 50 мм рт.ст.

Церебральний кровотік при використанні цієї моделі зменшувався до нуля практично по всьому об'єму мозку. Як і при інших ішемічних моделях наслідки патологічних змін і поведінка відповідали тривалості викликаної ішемії. При цьому знижувався кровотік до 10 % у неокортексі, стріатумі та гіпокампі від початкового рівня. Через 15-30 хвилин після зняття оклюзерів розвивалася сильна церебральна гіперемія тривала до 15 хвилин. Потім спостерігалася гостра церебральна гіпоперфузія, що тривала 24-36 годин в ураженій ділянці мозку. У наш час експериментальні моделі повної глобальної ішемії через складність виконання, високу летальність, відсутність можливості тривалого динамічного спостереження за тваринами практично не використовуються при проведенні фармакологічних досліджень.

Зараз певний інтерес складають моделі транзиторної глобальної ішемії, викликані оклюзією магістральних судин. Ці моделі застосовують для вивчення механізмів відстроченої загибелі нейронів різних відділів мозку і пошуку відповідних засобів нейропротекції.

На щурах застосовують модель тимчасової чотирьохсудинної оклюзії. Моделювання проводиться у два етапи. На початку біля кожної загальної сонної артерії розміщується атравматичний оклюдер і кріпиться на шиї тварини. Вертебральні артерії електрокоагулюються. Потім через три доби, тимчасово, за допомогою оклюдерів, відключається кровотік по загальних сонних артеріях. Дана модель сприяє розвитку глобальної ішемії: у 75 % тварин після 10-15 хвилин чотирьохсудинної оклюзії спостерігалися віддалені ураження пірамі-дних нейронів СА₁ СА₃ зон гіпокампа, а після 30 хвилин оклюзії вражались нейрони 5-го шару сенсомоторної зони кори. Летальність при цій моделі варіювалася від 20 до 40 % в гіперфузійний період (1-3 доба).

Модель чотирьохсудинної оклюзії достатньо складна у виконанні і потребує певних навиків у експериментатора.

Широкого застосування у фармакологічних дослідженнях набули моделі, що викликають виражену недостатність мозкового кровотоку (субтотальна ішемія), за рахунок незворотної перев'язки магістральних судин. Найчастіше застосовують одно- чи двосторонню оклюзію загальних сонних артерій залежно від видових анатомічних особливостей кровопостачання головного мозку і можливостей ко-латерального кровопостачання у тварин. З цією метою найкращим є використання монгольських піщанок або гербелів. Ці тварини мають унікальну і зручну васкулярну анатомію, тому часто використовуються при вивченні нейропротекції в умовах ішемії головного мозку. Унікальною рисою гербелів є роз'єднаність вілізієвого кола мозкового кровообігу. Для відтворення стійкої глобальної ішемії мозку у гербелів роблять незворотну односторонню оклюзію загальної сонної артерії. В умовах такої моделі у 30-40 % гербелів розвивається тяжкий неврологічний дефіцит (15-20 балів за шкалою С. Р. McGrow), а в інших – середньої тяжкості, і односторонній інфаркт на 3-5 добу після оклюзії. Летальність на цій моделі досягає 40-60 % протягом перших 7 діб після оклюзії.

За відсутності гербелів, для формування ішемії такої вираженості часто використовують білих щурів, як лінійних, так і безпородних. У цьому випадку ішемію викликають двосторонньою оклюзією загальних сонних артерій. При цьому спостерігається падіння мозкового кровотоку на 50-60 % з поступовим відновленням до 85-90 %, і потім, через 2-3 доби до початкового рівня за рахунок компенсаторного включення колатеральної мережі. Розвиваються поетапні порушення перфузії мозку – початкова постішемична гіперемія змінюється стадією постішемичної гіпоперфузії. Неповна реперфузія обмежує можливість виживання ішемізованої тканини і призводить до додаткового оксидативного й осмотического ураження мозку.

У 40-50% прооперованих тварин розвивається важкий неврологічний дефіцит (15-20 балів за шкалою С.Р. McGrow). У тварин зберігається

стійкий когнітивний дефіцит на 21 добу після оклюзії Летальність на цій моделі досягає 60-80 % протягом перших 7 діб спостереження.

Для зниження летальності подібну модель відтворюють шляхом повної незворотної оклюзії однієї сонної артерії й обмеження кровотоку на 50-70 % по другій загальній сонній артерії. Летальність на цієї моделі 40-60 % .

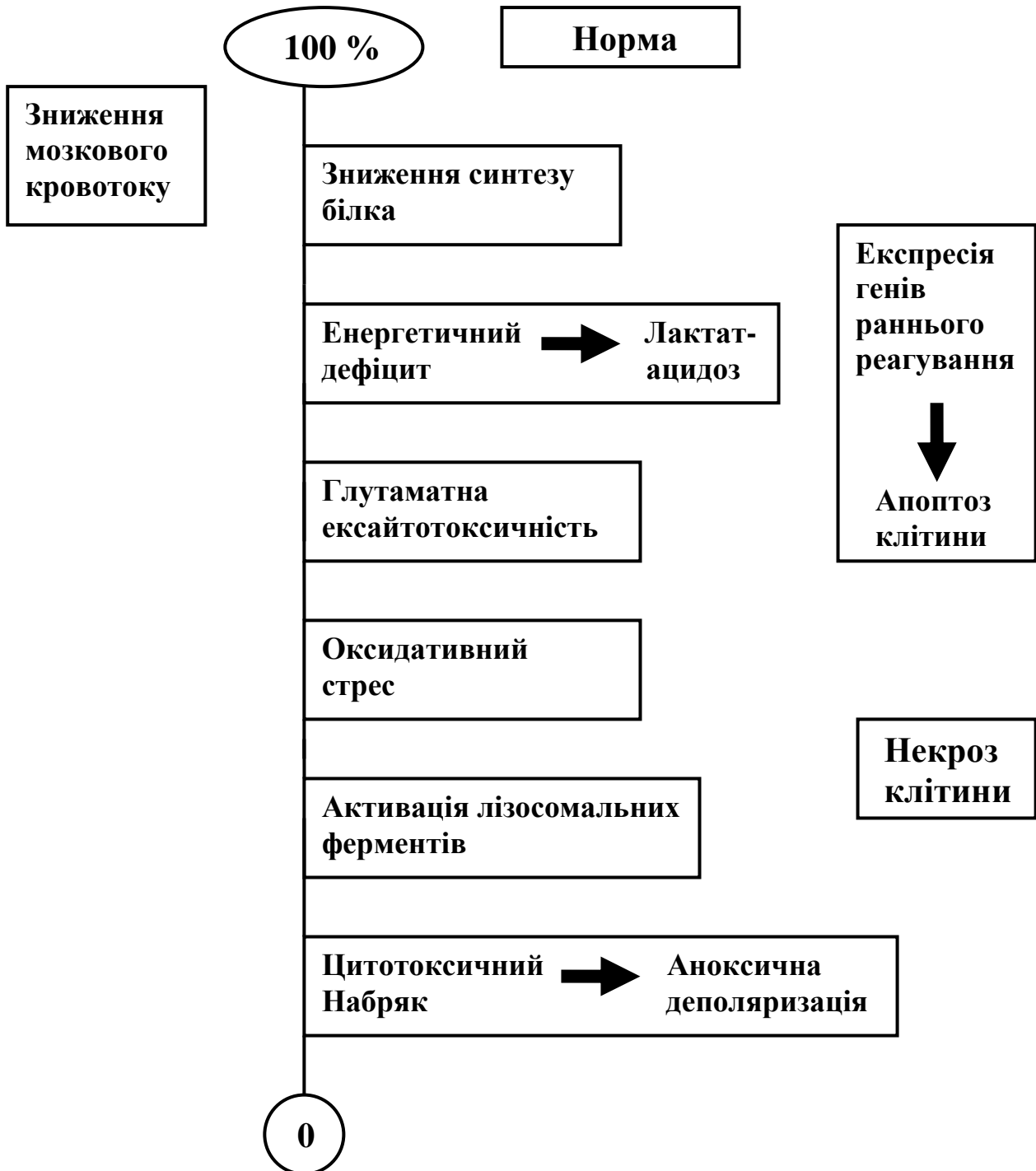
Таким чином, з усіх перерахованих вище експериментальних моделей церебральної ішемії, тільки модель глобальної субтотальної ішемії, супроводжується вираженими патобіохімічними порушеннями й активацією реакцій оксидативного стресу в тканинах мозку, що дає підставу використовувати дану модель для пошуку засобів, котрі володіють антиоксидантною і протиішемічною активністю. Крім того, дана модель має перевагу при вивченні церебропротективних препаратів вазотропною, протинабряковою, антиоксидантною та іншими видами активності, притаманними церебропротекторам, оскільки в такому разі можлива не лише оцінка сили впливу препаратів на ділянки мозку з різним ступенем ішемії, але й виявлення таких побічних ефектів вазотропних препаратів, як феномен "обкрадання".

Узагальнені методи моделювання ГПМК наведені у схемі 1, а біохімічні, цитохімічні, морфологічні наслідки ГПМК — у схемі 2.

Схема 1. Класифікація основних моделей церебральної ішемії



Схема 2. Реакції тканини мозку на зниження мозкового кровотоку.



Нахил голови вправо-вліво (П-Л)	3																		
Очі повністю закриті (праве, ліве, обидва)	3																		
Птоз (правий, лівий, обидва)	2																		
Параліч (скошеність) задньої кінцівки (П, Л, обі)	3																		
Сильна ротація задньої кінцівки (П, Л, обі)	3																		
Кругові рухи (Кружіння)	3																		
Судоми тонічні і клонічні	2																		
Обертальні судоми	3																		
Кома	6																		
Смерть	Сума + 3																		
Stroke-index значення																			

Коментарі

Видалення мозку: Дата _____

Консистенція (м'якість) _____

Також оцінюється реакція орієнтувально-дослідницької поведінки у тесті «Відкрите поле». Експериментально тварину поміщають у кут камери і спостерігають за її поведінкою протягом 3 хвилин. Велика прямокутна камера (100 x 100 см) з пластмасовими стінками висотою 40 см. Підлогою слугує лист бежевого пластику, з нанесеною чорною фарбою решіткою, що ділить поле на 25 (5 x 5) рівних квадратів. Як тільки тваринба вступає на новий квадрат обома передніми лапами, це реєструється як горизонтальний рух. У тварин необхідно протягом 3 хвилин реєструвати горизонтальну (кількість пройдених квадратів), вертикальну (кількість «стійок») і дослідницьку (кількість заглядань у «мірки») активність. Існує також багато автоматизованих систем оцінювання поведінки тварин у тесті «відкрите поле». Одною з них є розроблена і запропонована

система «Activity Cage» та «Hole-Board» виробництва «Ugo Basile» (Італія) та іншими фірмами для проведення лабораторних досліджень.

Оцінюють неврологічні рефлекс у тварин – рогівковий, відсмикування хвоста, задньої лапи, перевертання, хапання передніми лапами і здригання на звуковий подразник загальноприйнятими методами за шкалою Я. Буреша [12]. Оцінювали за балами: норма (рефлекс є) – 2 бали; не повністю відновлений – 1 бал; рефлекс відсутній – 0 балів.

Крім того, можна проводити оцінку здатності тварин з модельною патологією до навчання і запам'ятовування аверсивного стимулу в тесті умовної реакції пасивного уникання (УРПУ) [12]. Навчання щурів проводять у двокамерній установці, що складається з двох відсіків – світлого і темного. У досліджуваний термін експерименту тварину поміщають у світлий відсік у положенні «хвіст до "нірки"» і фіксують латентний час заходу в темний відсік, де тварина одержує удар струмом і вибігає у світлий відсік. Відтворення УРПУ перевіряють через 24 години. Про збереженість навику роблять висновки за зміною латентного часу заходу експериментальної тварини у темний відсік. Також відзначають кількість тварин, котрі не зайшли повністю у темну камеру.

4. ВИЗНАЧЕННЯ МАРКЕРІВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ І СТАНУ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ

Реакції оксидативного стресу практично на всіх етапах (ініціальні вільнорадикальні, перекисні) свого перебігу утворюють ряд продуктів, що є результатом взаємодії вільних радикалів між собою і біологічними макромолекулами. За рівнем даних продуктів можна робити висновки про інтенсивність оксидативного стресу у різних відділах головного мозку, найронах, гліальних клітинах і субклітинних структурах, тобто вони можуть бути маркерами нейродеструкції і ефективності потенційних нейропротекторів [1-5]. Найважливішими маркерами виступають продукти окислення поліненасичених жирних кислот (ПНЖК). Це коротколанцюгові алкани і алкени, а також алканалі 2,4-алкадієналі, алкатрієналі, гідроксиалкєналі, 4-гідроксиалкєналі та їх перекиси, малоновий діальдегід (МДА), нормальні аліфатичні кетони. Маркерами оксидативного стресу можуть бути також ізопростани – продукти взаємодії арахідонової кислоти і вільних радикалів.

Маркерами оксидативного стресу є активні форми кисню, а також стабільні метаболіти оксиду азоту. Останні утворюються в результаті метаболізму нітрит- і пероксинітритрадикалів, а також з нітрозильованих за S-; N-; O- макромолекул. Крім того, як маркери оксидативного стресу можна використовувати продукти окислення нуклеїнових кислот, а саме 8-гідрокси-2-дезоксигуанідину [1, 5, 10, 11, 18, 33, 36]. Кожна група продуктів характеризує інтенсивність оксидативного стресу і ступінь окисної модифікації ліпідів, амінокислот, нуклеїнових кислот, окремих функціональних груп білків, що містять SH- і NH-групи, SCH₃-групи метіоніну, аміногрупи L-лізину. Все це може викликати не тільки модифікацію білків і ферментів, але й зміни їхньої активності, руйнування біоантиоксидантів (вітамінів, убіхінону, стероїдних гормонів та ін.), зміни фосфоліпідного складу біомембран, появу у гідрофобній частині клітини продуктів окислення, що гальмують процеси іонного транспорту, зміни конформації ліпідів і білків, і як результат – структурних та функціональних властивостей мембран. Однак, точне кількісне визначення продуктів оксидативного стресу є надзвичайно складним процесом. Перш за все, це пов'язано з тим, що в біологічних системах одночасно з утворенням продуктів реакцій оксидативного стресу йде їхній метаболізм

(окислення, відновлення, ізоеризація, полімеризація тощо), до того ж значна частина цих продуктів є нестійкою і має короткий термін життя. По-друге, кількість цих продуктів незначна, що вимагає високочутливих фізико-хімічних методів ідентифікації. По-третє, перетворення продуктів оксидативного стресу може відбуватися у процесі обробки біологічного матеріалу, особливо при дослідженні ішемізованої тканини, тобто посилення вільно радикальних процесів може відбуватися при контакті гомогенату чи екстрагованої системи з киснем повітря. Тому визначення продуктів реакцій оксидативного стресу, що утворюються в ішемізованих тканинах, потрібно проводити в умовах, які виключають контакт матеріалу з повітрям, що буде запобігати протіканню ланцюгових реакцій. Продукти реакцій оксидативного стресу умовно можна поділити на такі групи [1, 5, 10].

Група продуктів реакцій оксидативного стресу	Хімічні сполуки	Методи визначення*
I. Нестабільні (радикальної природи)	Алкільні, алкоксильні, пероксильні, нітрит-, пероксинітрит радикали	Спонтанна ХЛ, ХЛ індукована Fe ²⁺ або H ₂ O ₂ , ЕПР
II. Стабільні (нерадикальної природи): 1) первинні	Гідроперекиси, дієнові кон'югати, ендперекиси, діалкілперекиси, епоксиди	Поляррографія, йодометрія, УФ, ІЧ, ЯМР, ВЕРХ.
2) вторинні	Алканалі, алкєналі, гідрокси-алкєналі, малоновий діальдегід, триєнкетони, 8-ізопростани, 8-гідрокси-2-дезоксигуанідин, о-нітротирозин, о-хлортирозин, тимідингліколь	УФ, ВЕРХ, ВЕРХ/Ф, ВЕРХ/УФ, флюорометрія, ТСХ, ГХ, ГХ/МС.

3) кінцеві	Газоподібні продукти (пентан, гептан та ін.), основи Шиффа, нітрати і нітрити	флюорометрія, ГРХ
------------	--	-------------------

Примітки:

ХЛ – хемілюмінесценція, ЕПР – електронний парамагнітний резонанс, УФ – ультрафіолетова спектрофотометрія, ІЧ – інфрачервона спектрофотометрія, ЯМР – ядерно-магнітний резонанс, ВЕРХ – вискоефективна рідинна хроматографія, ВЕРХ/Ф – вискоефективні рідинна хроматографія з наступною флюорометрією, ВЕРХ/УФ – вискоефективна рідинна хроматографія з наступною детекцією в ультрафіолеті, ТШХ – тонкошарова хроматографія, ГХ – газова хроматографія, ГХ/МС – газова хроматографія з наступною мас-спектрометрією, ГЖХ – газорідинна хроматографія.

Нестабільні продукти реакцій оксидативного стресу мають радикальну природу, тому практично непридатні як маркери. Необхідно відзначити, що вільні радикали мають молекулярний або зовнішній на атомній орбіталі неспарений електрон, який наділяє молекулу чи її частину парамагнітними властивостями, що дозволяє реєструвати ці сполуки за допомогою магнітно-вимірювальних приладів. Однак прямий метод кількісного визначення радикалів за допомогою ЕПР технічно складний і при його використанні визначаються радикали не тільки активних форм кисню, але й ліпідів, амінокислот, білків, нуклеїнових кислот тощо. Раніше для оцінки інтенсивності вільнорадикальних процесів застосовували також метод ХЛ, оскільки реакція взаємодії радикалів ліпопероксидів супроводжується світінням. Вимірювання ХЛ – один з методів вивчення продуктів реакцій оксидативного стресу в різних об'єктах. Проте, ХЛ і ЕПР не завжди можуть давати точну кількісну оцінку нестабільних продуктів реакцій оксидативного стресу. До нестабільних продуктів оксидативного стресу також відносять NO. Монооксид азоту (NO), як і інші радикали, містить неспарений електрон, однак, від інших радикалів він відрізняється відносною стабільністю. З огляду на важливість вивчення метаболізму NO і насамперед –

його роль у розвитку різних патологічних станів, в біологічних рідинах. Найбільш адекватні прямі методи визначення NO. Найчутливішими прямими методами визначення NO є електрохімічні і хемілюмінесцентні. Перші базуються на використанні металопорфіринового електрода, який каталізує окислення NO з наступною реєстрацією зміни електрохімічного потенціалу. Принцип хемілюмінесцентного методу полягає у кількісному визначенні фотонів, генерованих у реакції NO з озоном. До прямих методів належить також метод електричного парамагнітного резонансу (ЕПР), основу якого становить аналіз спектрів ЕПР нітрозильних залізовмісних комплексів [30, 31]. Акцепторами (спінової пастки) для NO-радикалів у вказаному методі виступають відновлені форми гемоглобіну і похідні дитіокарбамінові кислоти. Загальним недоліком прямих методів є неможливість кількісного визначення NO внаслідок короткого періоду напіврозпаду *in vivo*. У більшості випадків це пов'язано з високою швидкістю реакції між NO і супероксидними радикалами в умовах *in vivo* і менш швидким (період напіввиведення біля 10 с) його метаболізмом з утворенням кінцевих стійких продуктів: нітритів і нітратів.

Найбільшого поширення в якості біомаркерів набули стабільні продукти реакцій оксидативного стресу, які утворюються в результаті окислення поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), арахідонової і нуклеїнових кислот, тирозину, аргініну. Пероксидація ПНЖК, як відзначалося раніше, призводить до утворення перекисних сполук (гідро перекиси, ендоперекиси, діалкілперекиси, епоксиди) ліпідів і дієнові кон'югати. Останні утворюються за рахунок перерозподілу електронної щільності у молекулах лінолевої, ліноленової та арахідонової (але не олеїнової) кислот. Оскільки діє нова кон'югація з'являється на стадії утворення вільних радикалів, і відповідно, підтверджує вільно радикальний механізм окислювання ПНЖК.

Для визначення перекисних сполук (перекиси, гідро-перекиси) ліпідів застосовують метод йодометричного титрування. Точку еквівалентності при титруванні перекисів ліпідів установлюють амперометрично, а гідроперекисів – полярографічно.

Вторинні продукти реакцій оксидативного стресу утворюють при деструкції гідроперекисів ПНЖК з утворенням великої кількості карбонільних сполук (н-

алкеналі, 2-алкеналі 2,4-алкадієналі, алкатрієналі, гідроксиалкеналі, гідроксипероксиалкеналі, 4-гідрокси-алкеналі, 4-гідроксипероксиалкеналі, малоновий діальдегід (МДА), кетони, алкани та алкени), котрі завдяки своїй хімічній природі (стабільністю виступають основними маркерами оксидативного стресу).

Крім МДА основними карбонільними сполуками, що утворюються в результаті перекисного окислення w-6 ПНЖК, є гексанал і 4-гідрокси-2,3-транс-ноненаль; w-3 ПНЖК утворюють пропаналь і 4-гідрокси-2,3-транс-гексанал. Крім вказаних сполук, у результатах вільнорадикального — перекисного окислення утворюються також 4-гідрокси-2,3-октеналь, 4-гідроксидекеналь, 4-гідроксиундекеналь 4,5 дигідроксидекеналь, 4-гідрокси-2,5 ноненаль, 2-гідроксигептеналь, 2-гідроксиге-ксеналь, бутаналь, пентаналь, октеналь і ноненаль, які були виявлені у незначній кількості. Деякі з цих продуктів проявляють цитотоксичну і мутагенну дію, здатні вступати у взаємодію з біомолекулами (білки, нуклеїнові кислоти та ін.), змінювати структуру рецепторів, іонних каналів, ферментів, пригнічувати синтез внутрішньоклітинних посередників і викликати деструкцію ДНК і РНК. На відміну від вільних радикалів, карбонільні сполуки більш стабільні і можуть перебувати як всередині клітини, так і за її межами [1, 10, 31].

Для визначення вторинних продуктів загалом застосовують фізико-хімічні методи, що базуються на поглинанні енергії карбонільним сполуками або продуктами їхньої взаємодії з аналітичними реагенті ми в ультрафіолетовій частині спектру. Ступінь окислення ліпідів можна визначити також за співвідношенням вмісту у них продуктів (окислених і неокислених), які поглинають УФ-випромінювання на різній довжині хвилі - тобто за відношенням 232/215 нм (індекс окислення), де 215 нм — максимум поглинання ненасичених ліпідів.

З-помік стабільних продуктів реакцій оксидативного стресу в якості маркера можуть виступати МДА і ряд карбонільних сполук. Малоновий діальдегід (МДА) оцінюють за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) і визначають спектрофотометрично за максимумом поглинання забарвленого азаметинового комплексу при довжині хвилі 532 нм.

Даний метод достатньо простий у виконанні й тому набув широкого застосування. Однак він мало специфічний, оскільки ТВК реагує не лише з МДА, а й з іншими альдегідами, амінокислотами, карбогідратами, білірубіном. Вказані недоліки ТВК-тесту привели до появи численних модифікацій, що передбачають подальшу селективну екстракцію азаметинового комплексу н-бутанолом, проведення реакції у присутності солей заліза (II), які призводять до розпаду гідроперекисів, тощо. На даний час розроблено принципово нові методи визначення МДА і карбонільних сполук (формальдегід, ацетальдегід, ацетон, насичені та ненасичені альдегіди), що полягають у використанні специфічних реактивів, таких як пентафторфенілгідразин (ПФФГ), метилгідразин (МГ), 4-(2-фталімідил) - бензогідразин (ФБГ), динітрофенілгідразин (ДНФГ), о-(2,3,4,5,6-пентафтор-бензил) гідроксиламіну гідрохлорид (ПФБГ), трет-бутилдиметилхлорсилан (БДХС), N,O-ди-(триметилсиліл)-трифторацетамід (ДТСТФА), 2-гідразинобензотіазол (ГБТ) і подальшим кількісним визначенням продуктів реакції методами ТШХ, ГХ, ВЕРХ, спектрофотометрії в УФ- та ІЧ ділянках спектру, масспек-троскопії та ін.

До стабільних продуктів реакцій, які можуть використовуватися як маркери оксидативного стресу, останнім часом відносять продукти окисної модифікації арахідонової кислоти ізопростани. 8-ізопростан (8-епіPGFa₂) можна точно кількісно визначити у добовій сечі експериментальних тварин флюорометрично або спектрофотометрично в УФ-ділянці спектру після виділення їх методами ТШХ і ВЕРХ [30].

Циклічні ендоперекиси (P_gG₂-P_gH₂), які утворюються з арахідонової кислоти за участю циклооксигенази, є нестійкими продуктами, тому в якості маркерів не використовуються. Гідроперекиси арахідонової кислоти, що утворюються під дією ліпооксигенази інактивуються глутатіонпероксидазою (ГПР) або лейкотрієн-А-синтетазою, перетворюючись на лейкотрієни. Необхідно відзначити, що гідроперекиси арахідонової кислоти, в цьому випадку, утворюються в незначних концентраціях і тому в якості маркерів оксидативного стресу їх використання не завжди можливе.

Властивостями маркерів оксидативного стресу володіють також продукти окисної модифікації нуклеїнових кислот. Так, ушкоджуючи дія

гідроксилрадикалу і синглетного кисню на нуклеїнові кислоти призводить до утворення таких продуктів, як 5-гідроксиметилурацил, 8-гідроксиаденін, тимідингліколь і 8-гідроксигуанін. 8-Гідроксигуанін хімічно стабільний, що дозволяє використовувати його як маркер оксидативного ушкодження геному. Останніми дослідженнями виявлено, що рівень 8-гідроксигуаніну значно підвищується у сечі при ряді нейродегенеративних захворювань, після перенесеного ГПМК, до того ж у сечі він визначається значно раніше, ніж ці захворювання діагностуються клінічно. Дані продукти визначаються у сечі флюорометрично в УФ-ділянці спектру або методом ВЕРХ. Іншим, не менш значним біомаркером ушкодження геному, є тимідин гліколь, проте як маркер оксидативного стресу він не знайшов широкого застосування у зв'язку з більш складними методами виділення і визначення. При активації реакцій оксидативного стресу у тканинах організму внаслідок послідовного розпаду гідроперекисів ліпідів і розщеплення алкоксильних радикалів утворюються нижчі вуглеводи. Вони виділяються з повітрям під час видиху, і вміст цих газів у ньому є специфічним і високочутливим критерієм інтенсивності процесів оксидативного стресу. Кількісний аналіз вуглеводів у повітрі, що видихали, проводили методом ГХ. Основним кінцевим продуктом окисної модифікації ПНЖК виступає пентан — 90 %, а інші 10 % припадають на гептан і гексан. У зв'язку з тим, що методи визначення нижчих вуглеводів неінвазивні, ці маркери рекомендується визначати в динаміці у великих тварин при проведенні хронічного експерименту, а також метою збереження життя тварині [5, 30, 31].

Шифові основи як продукти взаємодії карбонільних сполук з аміногрупами білків, амінокислот і нуклеїнових кислот екстрагують сумішшю Фолча (хлороформ-метаном) з наступним спектрофлюорометричним визначенням їхнього вмісту у хлороформному екстракті при довжині хвилі збудження 360 нм і максимумі емісії в межах 420-440 нм. Вміст нітратів і нітритів у біологічній рідині еквівалентний продукції NO. Однак варто враховувати, що NO не єдине ендогенне джерело утворення нітратів і нітритів в організмі. Визначення нітриту і нітрату, стабільних кінцевих продуктів NO у крові та інших біологічних рідинах проводять різними методами.

Найбільш широкого застосування набув спектрофотометричний метод,

заснований на реєстрації забарвленого продукту реакції нітрит-іона з реактивом Грісса (нафтилацетатом і сульфаніловою кислотою) у лужному середовищі. Чутливість цього методу становить 1 мкМ. Проте цей метод не позбавлений недоліків, притаманних вищеописаному методу, і дозволяє з високою точністю визначати вміст нітрит-іонів. Менш широко застосовується флюорометричний метод, що базується на зміні флюоресценції 2,3-діамінонафталену після його зв'язування з нітрит-іонами; продукти їх реакції реєструються за допомогою флюоресцентного спектрофотометра. Чутливість флюорометричного методу становить 100 нМ.

Тотальне визначення вмісту нітриту й нітрату також проводиться фотометричним методом, однак попередньо перетворюють нітрати в нітрити за допомогою покритого міддю кадмієвого електрода або нітроредуктазою. Останнім часом для визначення нітратів і нітритів у біологічних рідинах використовуються ТСХ, ВЕРХ і капілярний електрофорез [31].

Визначення маркерів окисної деструкції білків — альдегідфенілгідазонів (АФГ) і кетонфенілгідазонів (КФГ) методом В. Halliwell [30]:

Маркери окисної деструкції білків є найбільш інформативними маркерами окислювального ушкодження функціональних макромолекул. Обговорення можливої окисної деструкції білків в організмі до останнього часу мало, в основному, теоретичний характер. У ряді досліджень цей процес розглядався як один з можливих факторів інактивації ферментів, зміни структурної організації білків при стані окисного стресу. Сьогодні розроблені методи оцінки спонтанного окислювання білків, що характеризує окисний потенціал організму, і стимульованого, що характеризує ступінь резервно-адаптаційних можливостей організму. Окислені білки можуть бути джерелом вільних радикалів, виснажувати запаси клітинних антиоксидантів, таких як аскорбінова кислота і глутатіон. *In vitro* показано, що продукти вільнорадикального окислювання білків опосередковують окисні ушкодження ДНК. Окисна модифікація білка також приводить до зниження функції білків у ланцюзі переносників електронів,

активності АТФ-ази, вибіркості функціонування транспортних пор. Зміна Red/Ox-потенціалу мітохондріальної мембрани може викликати дисфункцію каскаду дихального ланцюга. Відповідно окислені протеїни є не тільки "свідками", але й активними учасникам окислативного стресу. Таким чином, окисна модифікація білків відіграє ключову роль у молекулярних механізмах окисного стресу і є пусковим механізмом до окисної деструкції інших молекул (ліпіди, ДНК) клітини. Оскільки окисна модифікація білків має вибіркості і специфічні характер, а її продукти є маркерами раннього окислативного стресу, то подальше дослідження цього процесу буде сприяти вдосконалюванню заходів діагностики і лікування нейрон-деструктивних патологій.

Метод визначення продуктів перекислового окислювання білків заснований на тому, що кінцеві продукти вільнорадикального окислювання білків можуть кількісно реагувати з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів.

Принцип методу. Біохімічний метод оцінки заснований на реакції взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофеніл-гідразонів.

Реактиви:

- 0,5 М фосфатний буфер;
- 2,8 % розчин заліза (II) сульфату;
- 4 % розчин перекису водню;
- 25 % трихлороцтова кислота;
- 0,9 % розчину хлориду натрію;
- 2,2% розчин 2,4-динітрофенілгідразину (приготований на 7 % розчині соляної кислоти);
- етилацетат;
- 50 % розчин сечовини.

Проведення дослідження.

До 0,2-0,5 мл біологічного матеріалу (0,5-1,0 мг білка) доають 0,1 мл 25 % трихлороцтової кислоти і центрифугують 30 хв при 3000 об/хв (при температурі

15 °С). До осаду, що залишився після центрифугування, додають 1 мл 2,2 % 2,4-дигідрофенілгідразину (приготованого на 7 % розчині соляної кислоти) і інкубують 1 годину при температурі 37 °С, після цього центрифугують 10 хв при 3000 об/хв (при температурі 15 °С). Осад промивають 3 мл етилацетату, розводять у 3 мл 50 % розчину сечовини, додають 1 краплю 7 % розчину соляної кислоти і розводять дистильованою водою у 12 разів. Підготовлений розчин спектрофотометрують при довжині хвилі 274, 363 нм, розчин порівняння - 0,5 М фосфатний буфер. При довжині хвилі 274 нм визначали вміст АФГ, а при довжині хвилі 363 нм — карбоксилфенілгідразонів КФГ. Вміст АФГ і КФГ відображали в у.о./ г тканини чи білка.

Визначення концентрації нітротирозину

Нітротирозин є специфічним маркером окисного стресу головного мозку. Посилення продукції нітротирозину в головному мозку при ішемії призводить до порушення здатності мембран генерувати, проводити відтворювати нервовий імпульс, до порушень рецепторних, медіаторних, енергетичних, секреторних і метаболічних систем нейрона.

На сьогодні розроблено імуноферментний метод кількісного вимірювання нітрозилуваних протеїнів, як у плазмі крові, так і в гомогенатах тканини і культурах клітин. Принцип методу базується на твердофазній ензимозв'язаній імуносорбентній за принципом «сендвіча».

Визначення концентрації маркера окисної деструкції нуклеїнових кислот – 8-гідроксигуаніну (8-OHG) [8]

Виступає доведеним маркером окисного стресу. Підвищення концентрації 8-OHG корелює із тривалістю ішемічного ураження головного мозку.

Біохімічним методом визначення 8-OHG можливе тільки у сечі. Сьогодні існують імуноферментні набори, що дозволяють визначити вміст 8-OHG не тільки в сечі, але й у плазмі, клітинних культурах, гомогенатах тканин [63].

Біохімічне визначення 8-OHG у сечі:

Реактиви:

- 96 % етиловий спирт;
- 0,1 н соляна кислота;
- Н-бутанол;
- ацетон;
- 5 % оцтова кислота;
- гідроксид натрію;

Проведення дослідження:

З добової сечі щурів відбирають середню порцію (10) мл і випаровують до 2 мл на водяній бані. Потім до сечі додають 2 мл 96 % етилового спирту, підкисленого 0,1 н соляною кислотою і ретельно перемішують протягом 20 хв. Після цього проби центрифугують 30 хв при 2000 об.хв. З надосадової рідини відбирають 0,1 мл об'єму, наносять на лінію старту хроматографічної пластинки «Силуфол» і висушують при 37 °С. Хроматографію проводять у суміші н-бутанол : ацетон : оцтова кислота 5 % : NH₄OH : вода (3,5 : 2,5 : 1,5 : 1,5 : 1) у хроматографічній камері. Потім пластину висушують при 37 °С і проявляють в ультрафіолеті при довжині хвилі 263 нм. Після проявлення ділянки сорбенту з плямами відповідних 8-ОНГ вирізають і елюють при кімнатній температурі протягом 16 годин 0,1 н HCl, періодично збовтуючи. Після фільтрування проводять спектрофотометричне визначення при довжині хвилі 260 нм. Для «холостого» досліду служить елюат з рівновеликих за площею фрагментів сорбенту. За хроматографічний стандарт вважають 8-ОНГ. Розрахунок проводиться за калібрувальним графіком.

Визначення 8-ізопростагландину (8-ІП) [10]

Імуноферментне визначення 8-ІП у гомогенаті головного мозку, культурах клітин, плазмі крові, часі є чутливим методом визначення інтенсивності окисного стресу. Будучи продуктом метаболізму арахідонової кислоти, 8-ІП може бути надійним маркером рівня окисного стресу і при нейродеструктивних захворюваннях і при визначенні ефективності проведеної фармакологічної корекції.

Визначення перекисів ліпідів у тесті з тіобарбітуровою кислотою

Тіобарбітурова кислота (ТБК) і залежні від неї продукти перекисного окислення ліпідів – малоновий діальдегід – виступають пізніми маркерами окисного ураження макромолекул клітин головного мозку.

Вміст ТБК-залежних продуктів – МДА визначають спектрофотометрично за методикою, описаною Л. І. Андрєєвою зі співавт. [5].

Принцип методу. При кип'ятінні у кислому середовищі МДА (і ряд інших карбонільних продуктів) реагують із тіобарбітуровою кислотою (ТБК), утворюючи забарвлений комплекс із максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм, оптична щільність у цьому випадку прямо пропорційна вмісту МДА.

Реактиви:

- 1 % розчин ортофосфорної кислоти;
- 0,8 % розчин (ТБК);
- н-бутанол.

Проведення дослідження.

До 0,5 мл цитозолу або лизату мітохондрій головного мозку додають 3,0 мл 1% розчину ортофосфорної кислоти і 1,0мл 0,8 % розчину ТБК. Пробірки ставлять у киплячу водяну баню на 1 годину. Потім пробірки охолоджують у холодній воді, додають 4,0 мл н-бутанолу, ретельно перемішують і центрифугують 10 хв при 3000 об/хв (при температурі 15 °С). Вимірюють оптичну щільність верхньої фази при довжині хвилі 532 нм навпроти н-бутанолу. Розрахунок вмісту ТБК-залежних продуктів проводять з урахуванням коефіцієнту молярної екстинкції МДА, що дорівнює $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, за формулою:

$$A = \frac{E \cdot 10 \cdot V}{1,56 \cdot 10^5 \cdot a} \cdot N,$$

де: V – об'єм н-бутанолового екстракту;

E – екстинкція проби;

a – наважка тканини;

N – показник розведення.

Вміст МДА відображають у мкмоль/г тканини.

Визначення рівня активності деяких ферментів антиоксидантного захисту

Визначення супероксиддисмутази (СОД)

Супероксиддисмутази – ферменти, що каталізують реакції дисмутації супероксидного радикалу на перекис водню (H_2O_2) і кисень (O_2). Сьогодні відомі три ізоформи супероксиддисмутази, відмінні за своєю локалізацією. Супероксиддисмутаза 1 (СОД₁) або CuZn-СОД, являє собою димер з м.м. 32,5 кДа, який локалізується у цитоплазму клітин і містить мідь. Супероксиддисмутаза 2 (СОД₂) або Mn-SOD міститься у мітохондріях і є тетрамером з м.м. 86-88 кДа, з марганцем в якості кофактора активного центру. Супероксиддисмутаза 3 (СОД₃) або EC-СОД – позаклітинна форма з м.м. 135 кДа, містить в активному центрі мідь і цинк як структурний компонент і гепаринзв'язуючий домен зі сторони С-кінця.

У наш час для визначення СОД₁ і СОД₂ користуються прийомом диференційованого центрифугування суспензії нейронів, виділених з головного мозку ішемізованих тварин з подальшим розподілом фракцій на цитозольну і мітохондріальну (детальніше див. нижче). У цитозольній фракції біохімічним методом визначається СОД₁, у мітохондріальній – СОД₂. Біохімічний метод визначення SOD можна застосовувати і для визначення СОД₃ у плазмі крові або гомогенаті тканини [3, 5, 11, 18, 29].

Біохімічне визначення активності СОД

Принцип метода. СОД конкурує з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидрадикали, що утворюються в результаті аеробної взаємодії НАДН і феназинметасульфату (ФМС). У результаті цієї реакції НСТ відновлюється до гідразинтетразолію. У присутності СОД процент відновлення НСТ змінюється.

Реактиви:

- 0,15 М фосфатный буфер, рН 7,8;
- 0,1 М трисамінометан НС1 буфер, рН 7,8;

– реагент 1 (6,2 мг трилону Б; 50,0 мг НСТ; 9,2 мг ФМС; розчинених у 100,0 мл фосфатного буфера, рН 7,8);

– реагент 2 (76,7 мг НАДН, розчиненого в 100,0 мл трисамінометан НСІ буфера, рН 8,0).

Проведення дослідження.

До 0,1 мл цитозолі/лізату мітохондрій тканини мозку додають 2,0 мл реагенту 1, після ретельного перемішування додають 0,1 мл реагенту 2. Через 10 хвилин фотометрують при довжині хвилі 540 нм. Паралельно ставлять контрольну пробу без гомогенату тканини. Реакцію проводять при температурі 37 °С.

Нуль виставляють за реагентом 1. Для розрахунку активності СОД обчислюють відсоток гальмування відновлення НСТ за формулою:

$$T_1 = \frac{E_k - E_0}{E_k} \cdot 100 \%,$$

де: E_k – оптична щільність контрольної проби;

E_0 – оптична щільність дослідної проби.

Активність СОД розраховують за формулою:

$$A = \frac{T\%}{(100 - T\%)} \cdot \frac{2N}{a},$$

где: $T\%$ – процент гальмування відновлення НСТ;

N – фактор кінцевого розведення;

a – вміст білка у пробі.

Активність СОД відображають в у.о./мг білка/хв.

Крім того диференційовано визначити СОД₁ і СОД₂ можна з допомогою імуноферментного набору, а також методом імуноблотингу або гель-електрофорезу.

Визначення активності ізоензимів СОД методом гелі-електрофорезу

Електрофорез проводять у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Поділ білкових фракцій проводять шляхом електрофорезу при напрузі 100 V (для ущільнення гелю), коли проби досягнуть границі поділу гелів — при напрузі 400 V і силі струму 4 мА, до того часу, поки проби не досягнуть закінчення гелю (7 годин). Фарбування гелів для виявлення СОД і спектрофотометричного визначення активності ізоензимів, проводили в тесті з нітросинім тетразолієм (НСТ) і феназинметансульфатом (ФМС). Після електрофорезу гелі інкубували 20 хв у 0,017 М пірофосфатному буфері рН 8,3, який містить 1,2 мМ НСТ і 28 мМ ФМС, потім відмивали водою і витримували в 150 мМ НАДН, розчиненому в 0,017М пірофосфатному буфері рН 8,3 для чіткого поділу світлих ему СОД (1,5 години). З незабарвлених гелів вирізали ділянки, відповіли до світлих смуг на забарвленому гелі. Кусочки гелю гомогенізували і 1,9 мл в 0,017М пірофосфатного буфера рН 8,3 (загальний об'єм 2,25 мл). Гомогенати витримували 12 год при 40 °С, потім центрифугували 30 хв при 800 g. Отриманий прозорий елюат використовували для визначення активності СОД. У 3,0 мл реакційної суміші (150 нМ НСТ 234 нМ НАДН, 0,7нМ ФМС і 0,017М пірофосфатний буфер, рН 8,3) вносили 0,2 мл елюату. Паралельно ставлять контрольну пробу без гомогенату тканини. Реакцію проводять при температурі 37 °С.

Нуль виставляють за 150 нМ ФМС у 0,017М пірофосфатному буфері, рН 8,3. Для розрахунку активності СОД обчислюють відсоток гальмування періоду відновлення НСТ за формулою:

$$T_1 = \frac{E_k - E_0}{E_k} \cdot 100 \%,$$

де: E_k – оптична щільність контрольної проби;

E_0 – оптична щільність дослідної проби.

Активність СОД розраховують за формулою:

$$A = \frac{T\%}{(100 - T\%)} \cdot \frac{2N}{a},$$

де: $T\%$ – процент гальмування відновлення НСТ;

N – фактор кінцевого розведення;

a – вміст білка у пробі.

Активність СОД відображають в у.о./мг білка/хв.

Визначення активності каталази

Каталаза – один із ключових ферментів антиоксидантного захисту організму з групи гідропероксидаз, що каталізує окислювально-відновну реакцію, у ході якої з 2 молекул перекису водню утворюються вода і кисень [1].

Визначення активності каталази

Методика 1. Принцип методу Каталаза у пробі розкладає пероксид водню, залишок перекису визначають за реакцією з молібдатом амонію. Активність ферменту оцінюється за ступенем розпаду перекису водню.

Реактиви:

– 4 % розчин амонію молібдату;

– 0,03 % розчин перекису водню на 0,05 М трисамінометан HCl буфері, рН 8,0.

Проведення дослідження.

Реакцію запускають додаванням 0,1 мл цитозолу до 2,0 мл 0,03 % розчину перекису водню. У холосту пробу замість біоматеріалу вносять 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняють через 10 хв додаванням 1,0мл 4 % розчину молібдату амонію.

Інтенсивність забарвлення вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм навпроти контрольної проби, у яку замість перекису водню вносять 2,0 мл води.

Активність каталази розраховують за формулою:

$$A = \frac{[(E_0 \cdot E_k) \cdot V \cdot T \cdot K]}{a},$$

де: E_0 і E_k екстинкції холостої і контрольної проби;

V – об'єм внесеної проби;

T – час інкубації;

K – коефіцієнт мілімолярної екстинкції перекису водню, $22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
 a – вміст білка у пробі.

Активність каталази відображають у мкат/мг білка/хв.

Методика 2. Принцип методу. Каталаза у пробі розкладає пероксид водню, залишок перекису визначають прямою спектрофотометрією при довжині хвилі 230 нм. Активність ферменту оцінюється за ступенем розпаду перекису водню.

Реактиви:

- трис-НС1- буфер, рН 8,0;
- розчин H_2O_2 (10 мМ/л)

Проведення дослідження.

Реакцію запускають додаванням 0,1 мл цитозолу до 1,0 мл розчину перекису водню і 1,0 мл трис-НС1 буфера. Спектрофотометрують при 230 нм відразу і через 10 хв.

Активність каталази розраховують за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \times 100}{2,22 \times a},$$

де:

A – активність каталази;

ΔE – зміна оптичної щільності;

2,22 – коефіцієнт екстинкції для H_2O_2 в $\text{cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, при довжик хвилі 230 нм;

a – концентрація білка у пробі.

Тіоредоксин-1 (Trx-1) (метод імуноблотингу) [5, 11, 16, 18, 26]

Тіоредоксин (Trx) був виявлений різними дослідниками як: ІЛ-1-подібний цитокін, що продукується лімфобластними В-клітинами, інфікованими вірусом Епштейна-Барр (EBV); фактор, продукований клітинами Т-клітинного лейкозу; ІЛ-2-рецептор індукуючий фактор, продукований Т-клітинами, які інфіковані Т-лімфотропним вірусом 1 типу; частина комплексу фактора ранньої вагітності, який виявляється у сироватці вагітних, і підвищує комплемент-залежне пригнічення зв'язування лімфоцитів з гетерологічними клітинами крові

(розеткоутворення). Тгх ссавців – це родина невеликих (м.м. ~ 12 кДа) окислювально-відновних білків, які піддаються NADPH-залежному відновленню тіоредоксинредуктазою, і, в свою чергу, відновлюють окислений цистеїн у складі білків. Основними Тгх є тіоредоксин-1 (Тгх1) – цитозольна і ядерна форма, та тіоредоксин-2 (Тгх2) — мітохондріальна форма.

Тгх-1 – це глобулярний білок, який складається зі 104 амінокислот з м.м. 12 кДа. Тгх-1 утворює ковалентно зв'язані гомодимери, особливо при високій його концентрації або в присутності сильного окислювача. Промотор гена Тгх містить багато регуляторних мотивів, сумісних як з конститутивною, так і з індукцією експресією, а також елемент, що відповідає на окислювальний стрес. Безліч стимулів підвищують експресію Тгх-1, у тому числі гіпоксія, *S. aureus*, ліпополі-сахариди, O_2 , H_2O_2 , форболовий ефір, вірусні інфекції, окисний стрес, рентгенівське й УФ-випромінювання, ретинол (вітамін А), естрадіол. Показано залежність експресії Тгх-1 від клітинного циклу. Тгх-1 є переважно цитоплазматичним білком, але виявляється також у ядрах різних типів клітин. Показано, що транслокація Тгх-1 з цитоплазми в ядро може відбуватися під дією таких факторів, як H_2O_2 , форболмірістатацетату (РМА), УФ-випромінювання, гіпоксії, цисплатину. Тгх проявляють свою активність поза клітинами (стимуляція клітинного росту і хемотаксису), у цитоплазмі (як антиоксидантний і відновлювальний кофактор), у ядрі (регуляція активності факторів транскрипції) та у мітохондріях. Продемонстровано взаємодію позаклітинного Тгх-1 з цитоплазматичними мембранами. Тгх-1 – це багатофункціональний білок. Він проявляє широкий спектр біологічних функцій. Тгх є постачальником відновлювальних субстратів для тіоредоксинпероксидаз і рибонуклеотидредуктаз. Він містить консервативний каталітичний сайт (-Trp-Cys-Cly-Pro-Cys-Lys-), який піддається оборотному окислюванню з утворенням дисульфідного зв'язку (Тгх-S₂) при переносі відновлювальних субстратів від цистеїнів, що містяться в цьому сайті, на субстрат-акцептор (X-S₂). Окислений Тгх після цього відновлюється назад до Cys-форми [Тгх -(SH)₂] тіоредоксинредуктазою у NADPH-залежній реакції. Тгх-1 діє як фактор росту. Механізм проліферативної дії Тгх-1 нетиповий для факторів росту. Припускають, що він сенсibiliзує клітини до факторів росту. В експериментах *in vitro* показано, що Тгх-1 перешкоджає

апоптозу. Trx-1 селективно активує зв'язування з ДНК багатьох транскрипційних факторів, одним із яких є NF-κB, що відіграє важливу роль у клітинній відповіді на окисний стрес, апоптоз. Trx-1 підвищує зв'язування NF-κB з ДНК сильніше, ніж L-цистеїн, відновлений глутатіон або нефосфорильовані відновлювальні агенти (N-ацетилцистеїн, 2-меркаптоетанол, дитіотріетол). Іншим транскрипційним фактором, чия активність регулює Trx-1, є глюкокортикоїдний рецептор (ГР). Окислення ГР веде до зниження його ліганд і ДНК-зв'язуючої активності. У ядрі Trx-1 взаємодіє з ДНК-зв'язуючим доменом ГР, що веде до підвищення взаємодії ГРДНК. Крім того, Trx-1 підсилює зв'язування з ДНК інших транскрипційних факторів – AP-2, рецептора естрогену і REBP2/CBF. В експериментах показано, що каскад подій під впливом Trx-1 і Ref-1, веде до посилення експресії таких білків, як еритропоетин. Таким чином *in vivo* Trx-1 сприяє і виживанню, і росту клітин, на відміну від Bcl-2, який сприяє тільки виживанню і потребує додаткових генетичних змін для стимуляції. **Безпосередньою антиоксидантною властивістю** Trx-1 є видалення перекису водню. Інший клітинний механізм видалення H₂O₂ за допомогою селеноцистеїн-вмісної глутатіонпероксидази використовує відновлений глутатіон як відновлювальний субстрат. Вважається, що окислювально-відновні системи глутатіону і Trx не пов'язані. Селен чинить різний вплив на них, підвищуючи активність тіоредоксинредуктази і не змінюючи активності тіоредоксинпероксидази. І, навпаки, він підвищує активність глутатіонпероксидази, але не підвищує активності глутатіонредуктази. Це означає, що в присутності великої кількості перекису збільшення доступного селену, приведе до підвищення рівня відновленої Trx у порівнянні з рівнем відновленого глутатіону. Trx-1 може безпосередньо ерактивувати білки, які втратили функцію в результаті окисного ушкодження, наприклад, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу та ін. Рівень Trx-1 від'ємно корелює ($p < 0,001$) з рівнем нейроапоптозу. Показано, що екзогенний Trx-1 захищає ендотеліальні клітини церебральних судин від реперфузійного ушкодження і від ураження сітківки, викликаного ішемією/реперфузією. Trx-1 перешкоджає NO-залежній нейродеструкції. Показано, що у пацієнтів із хворобою Альцгеймера, після ГПМК рівень Trx-1 у тканинах мозку (мигдалевидній залозі і гіпокампі) знижений, на фоні зниження активності тіоредоксинредуктази.

Припускають, що ці зміни можуть сприяти окисному стресу й розвитку иейродегенеративного процесу.

α -Токоферол [1, 5, 10, 11, 18]

α -Токоферол – найпоширеніший антиоксидант у природі – є ліпофільною молекулою, здатною інактивувати вільні радикали безпосередньо в гідрофобному шарі мембран і в такий спосіб запобігати розвитку перекисного окислювання. Розрізняють 8 типів токоферолів, проте α -токоферол має найвищу активність. α -Токоферол віддає атом водню вільному радикалові пероксиду ліпіда (ROO•), відновлюючи його до гідропероксиду (ROOH) і в такий спосіб зупиняє розвиток процесів ліпопероксидації. Вільний радикал α -токоферолу, що утворився в результаті реакції, стабільний і не здатний брати участь у розвитку ланцюга. Навпаки, радикал α -токоферолу безпосередньо взаємодіє з радикалами ліпідних перекисів, відновлюючи їх, а сам перетворюється в стабільну окислену форму – токоферолхінон. У численних дослідженнях показано, що зниження рівня α -токоферолу і токотрієнолів на фоні ішемії головного мозку приводять до активації оксидативного стресу і нейроапоптозу. На ішемічних моделях *in vitro* та *in vivo* показана протизапальна дія альфа- і дельта-токоферолів. До того ж, крім антиоксидантних властивостей α -токоферолу показана його модулююча дія на процеси активації внутрішньоклітинного кальцію і глутаматних рецепторів, а також його віддалений вплив, пов'язаний з роботою генного апарату. На моделі геморагічного інсульту *in vitro*, показано, що пригнічення активності глутаматних рецепторів при тривалій дії аутокрові супроводжується набуханням нервової тканини, якому можна було запобігти шляхом преїнкубації з α -токоферолом.

Визначення α -токоферолу

100 мг осаду, який залишився після виділення цитозольної фракції з гомогенату головного мозку заливають 2 мл суміші етанол : вода (1:1) і струшують 1 хв. Потім до суміші додають 5 мл н-гексану і струшують 30-40 хв. Після цього проби центрифугують 10 хв при 1500 об/хв. Відбирають гексановий шар.

Методика 1. 0,1 мл екстракту наносять на хроматографічну пластину «Мерк» або «Силуфол» розміром 10×10 см, сорбент – силікагель з величиною зерен 5-12 мкм, і поміщають у попередньо насичену елюентом октан : диетиловий ефір (7:1) хроматографічну камеру. Елюювання проводять протягом 15 хв і припиняють, коли елюент піднімається на висоту 9 см. Далі пластину виймають із камери і висушують на повітрі, після чого її обробляють концентрованою азотною кислотою і поміщають на 10 хв у термостат, нагрітий до температури 100°C. На білому фоні хроматографічні зони α -токоферолу, окислюючись до α -токоферилхінону, забарвлюються у червоний колір. Кількісне визначення α -токоферолу проводять відносно стандартних розчинів індивідуальних речовин шляхом побудови градуовальної кривої залежності площі хроматографічної зони від концентрації розчину. Відразу ж після проявлення хроматографічних зон пластини сканують. Детекцію α -токоферолу здійснюють за допомогою денситометрії у програмі Adobe Photoshop.

Методика 2. 3 мл екстракту поміщають у кювету спекторофлюориметра і визначають оптичну щільність зразків при довжині хвилі збудження 295 нм і довжині хвилі флуоресценції 320 нм. Ширина щілини 8 нм. Нуль виставляють навпроти н-гексану.

Концентрацію визначають за стандартом (калібрувальний розчин 20 мкМ/л).

γ -СЕНС (2, 7,8-триметил-2-(β -карбоксіетил)-6-гідроксихроман) (ВЕРХ, імуноблотинг) [5, 18]

γ -СЕНС (2, 7, 8-триметил-2-(β -карбоксіетил)-6-гідроксихроман), метаболіт вітаміну Е γ -токоферол – найпоширеніша форма вітаміну Е, що має АО властивості. Його метаболіт – γ -СЕНС (2,7,8-триметил-2-(β -карбоксіетил)-6-гідроксихроман), продукується печінкою під дією ферментів системи цитохрому P450 і виводиться із сечею. Уровень екскреції γ -СЕНС перевищує концентрацію всіх інших метаболітів токоферолу. У плазмі γ -токоферол здатний нейтралізувати RNS. Так само, як і токоферол, γ -СЕНС інгібує активність циклооксигеназ

макрофагів і епітеліальних клітин. Концентрація γ -СЕНС у плазмі може бути використана для оцінки ризику розвитку серцево-судинних і онкологічних захворювань.

5. ВИВЧЕННЯ ТІОЛ-ДИСУЛЬФІДНОЇ СИСТЕМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

За останнім даними співвідношення тіол-дисульфідної систем в умовах ішемії головного мозку виступає визначальним фактором розвитку каскаду патобіохімічних реакцій, формуванні мітохондріальної дисфункції і загибелі клітини. У зв'язку з вищевикладеним обов'язковим компонентом в оцінці потенційних нейропротекторів є їхня здатність в умовах моделювання ішемічних уражень головному мозку впливати на тіол-дисульфідну рівновагу [1-5, 11, 22, 40].

Визначення активності ключових ферментів, що регулюють тіол-дисульфідну рівновагу

Визначення активності глутатіонредуктази

Глутатіонредуктаза (ГР) відновлює дисульфідний зв'язок окисленого глутатіону GSSG до його сульфгідрильної форми GSH. Відновлення глутатіону відбувається за рахунок енергії НАДФ-Н, що утворюється у пентозному циклі. Є одним з основних ферментів тіол-дисульфідної системи.

Принцип методу: визначення активності ГР базується на вимірі ванні швидкості окислювання NADPH, яка реєструється спектрофотометрично за зменшенням оптичної щільності при довжині хвилі 340 нм.

Реактиви:

1. 50 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,0, що містить 1 мМ ЕДТА;
2. 0,1 мМ розчин NADPH;
3. 0,5 мМ розчину окисленого глутатіону (зберігають у замороженому вигляді).

Хід визначення:

У спектрофотометричну кювету з відстанню між робочими площинами 10 мм послідовно вносять 2,7 мл калій-фосфатного буфера, 0,1 мл розчину NADPH, 0,1 мл розчину GSSG. Реакція запускається додаванням у пробу 0,1-0,2 мл біологічного матеріалу. Суміш перемішують.

Зміну оптичної щільності реєструють через 5 хвилин проти проби, що містить всі компоненти, крім GSSG.

Активність ферменту відображають у мкмольх/г за хвилину. Розрахунок здійснюють за формулою:

$$A = \frac{3 \times \Delta E \times K}{6,22 \times a},$$

де:

A – активність глутатіонредуктази;

ΔE – зміна оптичної щільності;

K – коефіцієнт з урахуванням розведення (для крові);

6,22 – коефіцієнт екстинкції для NADPH в $\text{см}^{-1}/\text{мМ}^{-1}$, при довжині хвилі 340 нм;

a – концентрація білка у пробі.

Визначення активності глутатіон-S-трансферази

Глутатіон-S-трансфераза (Г-S-T) входить до родини ферментів, що нейтралізують токсичний вплив різних гідрофобних і електрофільних сполук шляхом їх кон'югації з відновленим глутатіоном. Г-S-T локалізована переважно у цитозолі клітин. Основна функція GST — захист клітини від цитотоксичних продуктів окисної модифікації білкових молекул, ліпідів шляхом їх відновлення, приєднання до субстрату скули глутатіону або нуклеофільного заміщення гідрофобних груп. Є одним із ключових ферментів як антиоксидантної, так і тіол-дисульфідної систем. Зміна активності даного ензиму відображає спрямованість, перебіг патологічного процесу, а також ефективність лікування.

Принцип методу: активність глутатіон-S-трансферази визначають за швидкістю утворення глутатіон-S-кон'югатів між GSH і 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ).

Збільшення концентрації кон'югатів у ході реакції реєструють спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм (максимум поглинання глутатіон-S-ХДНБ).

Реактиви:

1. 0,1 М калій-фосфатний буфер рН 6,5;
2. 0,015 М розчин GSH;
3. 0,015 М розчин ХДНБ.

Хід визначення:

У кювету з довжиною оптичного шляху 1,0 см, що містить 2,5 мл 0,1 М калій-фосфатного буфера рН6,5, додають 0,2 мл 0,015 М розчії відновленого глутатіону і 0,1-0,2 мл цитозолу або лізату мітохондрій мозку. Реакцію ініціюють внесенням у кювету 0,2 мл 0,015М ХДНБ (готують на абсолютному метанолі). Паралельно до дослідної, готують контрольну пробу, в яку замість гемолізату вносять дистильовану воду. Реєстрацію оптичної щільності проводять при t 25°C і довжині хвилі 340 нм проти води відразу після перемішування протягом трьох хвилин. Активність ферменту розраховують, застосовуючи коефіцієнт екстинкції для GS-ХДНБ, при довжині хвилі 340 нм, що дорівнює $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, і відображають у ммольях утворених глутатіон-S-кон'югатів за хвилину на грам білка.

Активність Г-S-T розраховують за наступною формулою:

$$A = \frac{\Delta E / \text{мин} \times f \times 1000}{\varepsilon \times V_{\text{проби}} \times a},$$

де:

A — активність ферменту, мМ/хв/мг;

ΔE — зміна оптичної щільності у хв;

d — товщина кювети (1см);

f — коефіцієнт розведення еритроцитів у пробі;

ε — коефіцієнт молярної екстинкції при $\lambda=340\text{нм}$ ($9600\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$);

a — концентрація білка у гомогенаті;

1000 — коефіцієнт для перерахунку активності GST від молярної до мілімолярної;

$V_{\text{пр.}}$ — об'єм проби, що використовується для визначення активності GST;

$V_{\text{р.с.}}$ — об'єм реакційної суміші.

Також визначається активність глутатіон-S-трансферази — ферменту, який каталізує приєднання глутатіону до ендогенно утвореного фенолу. Активність глутатіон-S-трансферази визначається фотометричним методом, заснованим на принципі твердофазного імуноферментного аналізу відповідно до інструкції тест-системи ІФА.

Визначення активності глутатіопероксидази

Глутатіонпероксидаза (ГПР) — один з основних ферментів руйнування активних форм кисню, домінуючий у фізіологічних умовах.

У наш час використовують методики визначення активності ГПР за інтенсивністю забарвленого комплексу відновленого глутатіону. ГПР відновлює за допомогою глутатіону відновленого (GSH) гідроперекис *трет*-бутилу. Залишок відновленого *трет*-бутилу визначається за інтенсивністю забарвлення з нітропрусидом (максимум поглинання 540 нм) або з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (максимум поглинання 412 нм). Крім того, використовується метод двох пов'язаних реакцій: ГПР відновлює за допомогою глутатіону відновленого (GSH) гідроперекис *трет*-бутилу, а потім глутатіонредуктаза (ГР) за допомогою НАДФН відновлює окислений глутатіон. Активність ГПР непрямо визначають за зменшенням НАДФН (максимум поглинання 340 нм). Також активність глутатіонпероксидази ГПР визначається фотометричним методом, заснованим на принципі "сендвіч" імуноферментного аналізу відповідно до інструкції тест-системи ІФА

Проведення дослідження методики 1

0,1 - 0,2 мл цитозольно фракції або лізату мітохондрій вносять у 0,5 мл 50 мМ фосфатного буфера, рН 7,4 у присутності 2,0 мл 0,6 мМ ЕДТА, 20,0 мМ GSH і 8,0 мМ гідроперекису *трет*-бутилу, яким запускають реакцію після попереднього прогрівання суміші. Реакцію проводять при температурі 37 °С і зупиняють через 10 хвилин денатурацією білка при струшуванні з 1,0 мл 5 % розчину трихлороцтової кислоти. Осад відділяють центрифугуванням при 3000 об/хв (при температурі 15 °С) протягом 15 хвилин. 0,2 мл надосадної рідини переносять у 4,0 мл насиченого розчину хлориду натрію. Після цього до зразка

додають мл 0,08 М нітропрусиду натрію і 0,5мл 1,8М карбонату натрію і фотометрують при довжині хвилі 540 нм.

У випадку використання 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти (4 г/л на абсолютному метанолі) 0,25 мл цього реактиву змішують із 0,2 мл надосадної рідини і додають 3,0 мл 0,1 М трис-НСІ-буфера, рН 8,4 і фотометрують при 412 нм. У серії дослідних проб ставлять контрольні стандартну проби, у яких відсутній біоматеріал, а в стандартній — ще й гідроперекис *трет*-бутилу, їх заміщають відповідним об'ємом дистильованої води. Фонове поглинання реагенту на відновлений глутатіон визначають у пробі, що не містить супернатанту.

Активність ГПР обчислюють за формулою:

$$A = \frac{[GSH_{ст}]}{t} \cdot a \cdot \frac{E_k - E_{дп}}{E_{ст} - E_{ф}} \cdot N,$$

де: [GSH_{ст}] — стандартна початкова концентрація глутатіону відновленого;
t — час реакції;

a — вміст білка у пробі;

N — фактор кінцевого розведення;

E_{дп} — екстинкція дослідної проби;

E_к — екстинкція контрольної проби;

E_{ст} — екстинкція стандартної проби;

E_ф — екстинкція фонові проби.

Активність ГПР відображали у в мкмоль GSH/мг білка/хв.

Проведення дослідження методики 2

Активність глутатіонпероксидази визначають за швидкістю зменшення вмісту НАДФН в інкубаційній пробі при 340 нм. Інкубаційну суміш в об'ємі 3,0 мл, попередньо прогріту при 25 °С, яка містить 20мМ фосфатний буфер (рН 7,0), 0,6 мМ УДТА, 0,15 мМ, глутатіонредуктазу (4 ед.), 2 мМ GSH, 1 мМ азид натрію вносять у кювету спектрофотометра. Потім додають 0,1 мл і 0,8 мМ гідроперекису трет-бутилу. Реакцію запускають внесенням 0,2 мл біологічного матеріалу (цитозоль, лізат мітохондрій). Оптичну щільність реєструють відразу і

через 10 хв. За одиницю активності приймають кількість ферменту, необхідну для відновлення 1 мкмоль GSSG за 1 хв. При розрахунках застосовують коефіцієнт молярної екстинкції для НАДФН, рівний 6,22.

Активність ферменту відображають у мкмоль/г за хвилину. Розміни проводять за формулою:

$$A = \frac{3 \times \Delta E \times K}{6,22 \times a},$$

де:

A — активність глутатіонпероксидази;

ΔE — зміна оптичної щільності;

K — коефіцієнт з урахуванням розведення (для крові);

6,22 — коефіцієнт екстинкції для NADPH у $\text{см}^{-1}/\text{мМ}^{-1}$, при довжині хвилі 340 нм;

t — час спостереження, хв;

a — концентрація білка у пробі.

При використанні цього методу варто враховувати, що НАДФН гальмує активність ГПР, що призводить до занижених результатів.

Визначення глутатіону

Дослідження системи глутатіону при доклінічному вивченні потенційних нейропротекторів у наш час доволі актуальне у зв'язку зі зв'язуванням ролі глутатіону в багатьох фізіологічних функціях нервової системи:

- антиоксидантна — пряма взаємодія з радикалами у неензиматичних реакціях;
- донор електронів у реакціях відновлення перекисів, що каталізуються глутатіонпероксидазами;
- забезпечує підтримання тіолового статусу клітини шляхом збереження сульфгідрильних груп у відновленому стані;
- учасник процесу детоксикації ксенобіотиків, кофактор у реакціях ізомеризації, форма зберігання і транспортування цистеїну;
- участь у регуляції апоптозу;
- виступає нейротрансмітером і нейромодулятором (у мікромольних

концентраціях є агоністом глутаматних рецепторів; в мілімолярних концентраціях модулює SH-групи NMDA-рецепторів) [5].

Сьогодні існує флюорометричний метод визначення глутатіон, що дозволяє визначати не тільки загальний глутатіон, але й окислений (GSSGH), і відновлений (GSH).

Флюорометричне визначення відновленого і окисленого глутатіону

Принцип методу базується на взаємодії орто-фталієвого ангідриду з відновленим глутатіоном, внаслідок чого утворюється флуоресцентний комплекс, що реєструється фотометрично при $E_x/E_m = 340/420$ нм.

Реактиви:

1. орто-фталієвий ангідрид (ОФА) 1%;
2. 0,5М фосфатний буфер рН 8,0; рН 12,0; рН 7,4;
3. 0,5М карбанатний буфер;
4. Відновлююча суміш (глутатіонредуктаза 38 units, 7 мг НАДФН розчиняють у 20 мл 0,5 м фосфатного буфера рН 7,4);
5. 1-метил-4-вініл-піридин;
6. Осаджуючий розчин: 1,67 г льодяної ортофосфорної кислоти, 0,2 г ЕДТА і 30 г хлористого натрію розчиняли у дист. H_2O і доводили до мітки 100 мл.

Хід визначення

Готування зразків:

До цитозольної фракції гомогенату головного мозку для осадження білків до гемолізату додають 1 мл осаджуючого розчину. Проби ретельно перемішують и після 20-хвилинного стояння при кімнатній температурі фільтрують через крупнопористий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим і безбарвним.

Визначення відновленого глутатіону

У пробірку, що містить 2,0 мл 0,5М фосфатного буфера рН 8,0, додають 0,1-0,3 мл біологічного зразка і 0,5 мл 1 % ОФА. Реакційну суміш перемішують й інкубують 5 хвилин, після чого флюориметрують при $E_x/E_m = 340/420$ нм.

Визначення відновленого глутатіону

У пробірку, що містить 2,0 мл 0,5М фосфатного буфера рН 12,0, додають 0,1-0,3 мл біологічного зразка. З метою маскування відновленого додають 0,04 мл 0,5мМ 1-метил-4-вініл-піридину. Реакційну суміш інкубують 60 хв при кімнатній температурі. Для відновлення окисленого глутатіону до проби додають 0,1 мл відновної суміші. Відновлення проводять протягом 2 хвилин при температурі 37°C. Далі в пробу додають 0,5 мл ОФА і флюориметрують при $E_x/E_m = 340/420$ нм.

Розрахунок глутатіону проводять за калібрувальною кривою.

Визначення гомоцистеїну

Визначення гомоцистеїну в тканинах головного мозку ішемізованих тварин є надзвичайно актуальним при оцінці нейропротективних властивостей БАР. Останніми дослідженнями встановлено, що гіпергомоцистеїнемія є провідним чинником окисного стресу мозку. До молекулярних наслідків підвищення концентрації гомоцистеїну відносять: інтенсифікацію метилювання нуклеїнових кислот, білків і фосфоліпідів; підвищення внутрішньоклітинного рівня вільних радикалів; модифікацію глутаматних рецепторів [5, 11, 18, 22, 31].

Для ідентифікації гомоцистеїну використовують цитоімунохімічний аналіз тканин і ензиматичний метод (плазма крові, гомогенат тканин).

Перевагами *цитохімічного методу* є можливість ідентифікувати гомоцистеїн у різних структурах головного мозку, а також клітинних органелах. В основі більшості методів імуноцитохімічного визначення гомоцистеїну лежить використання моноклональних антитіл до S-аденозилгомоцистеїну. Для цього проводять наступні етапи:

- відновлення гомоцистеїну дитіотрейтолом;
- ензиматичне перетворення гомоцистеїну на S-аденозилгомоцистеїн;
- конкурентний ісунохімічний аналіз із використанням кон'югованого аденозилгомоцистеїну і антитіл, а також різних методів детекції.

Ензиматичний метод визначення гомоцистеїну простіший у застосуванні, дозволяє визначати гомоцистеїн у великій кількості проб. На сьогодні існують діагностичні набори різних виробників для визначення загального гомоцистеїну.

Принцип методу полягає в наступному:

- зв'язаний чи димеризований гомоцистеїн (Gcist) відновлюють до вільного гомоцистеїну (Gcist);

- вільний гомоцистеїн реагує із серином у результаті чого утворюється L-цистатіонін. Реакція каталізується цистіонін- β -синтазою. (Ц- β -С). L-цистіонін, у свою чергу, розщеплюється з утворенням гомоцистеїну, пірувату і аміаку. Реакція каталізується цистатіонін- β -ліазою. Згодом піруват, під дією лактатдегідрогенази перетворюється на лактат, коферментом у цій реакції є NADH. Відношення NADH до NAD⁺ прямо пропорційне до концентрації гомоцистеїну. Розрахунок — за калібрувальною кривою (мкмоль/л).

Визначення цистеїну й метіоніну

Для дослідження стану тіол-дисульфідної системи, доцільно вивчати не тільки вміст її окислених продуктів, але й концентрацію відновлених тіольних інтермедіатів (цистеїн, метіонін). Ці дослідження необхідно проводити з метою оцінки впливу потенційних нейропротекторів на дисфункцію тіол-дисульфідної системи головного мозку.

Хроматографічне визначення цистеїну й метіоніну.

Реактиви:

1. пропанол;
2. гідроксид амонію;
3. алоксан;
4. ДМФА.

Хід визначення:

На лінію старту пластинки для тонкошарової хроматографії наносять 0,1-0,04 гомогенату головного мозку і стандарт 10-5 М цистеїну (при визначенні цистеїну) і 10-5 М метіоніну (при визначенні метіоніну).

Пластинку поміщають у систему пропанол : гідроксид амонію (7:3). Після проходження розчинником 10 см пластину висушують і проявляють 1 % розчином алоксану в ДМФА з наступним нагріванням при 100 °С у сушильній шафі. Потім пляму, що відповідає стандарту цистеїну/метіоніну зішкрібають у пробірку з 5 мл ДМФА. Вміст пробірки нагрівають 3 хв на водяній бані (100 °С). Центрифугують 3 хв при 3000 об/хв. Проби спектрофотометрують при довжині хвилі 530 нм.

Формула розрахунку:

$$C = \frac{A \times V \times C_0 \times R}{A_0 \times L \times 1000},$$

де:

A — оптична щільність;

A₀ — оптична щільність стандарту;

V — об'єм аналізованого розчину;

C₀ — молярний вміст стандарту;

L — товщина шару кювети (1 см);

K — коефіцієнт перерахунку.

Також рекомендується визначення метіоніну і цистеїну методом капілярного електрофорезу. Метод вимірювання базується на поділі, ідентифікації й визначенні масової частки амінокислот методом капілярного електрофорезу. Реєстрацію компонентів проводять за власним поглинанням в області довжин хвиль 190-200 нм двічі: перший раз при температурі 20 °С для визначення цистеїну у зворотному ведучому електроліті, а другий раз для визначення метіоніну при температурі 40 °С у зворотному електроліті, що містить β-циклодекстрин.

6. ДОСЛІДЖЕННЯ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ

Значну увагу фармакологів привертає роль молекулярного месенджера монооксиду азоту (NO), що виступає поліфункціональним фізіологічним регулятором механізмів нейродегенерації та механізмів нейропротекції потенційних лікарських засобів (ЛЗ). Молекула NO синтезується у відповідь на фізіологічну потребу ферментом NO-синтазою (NOS) з його метаболічного попередника — амінокислоти L-аргініну. Властивість викликати біологічний ефект значною мірою визначається малою величиною його молекули, її високою реактивністю і здатністю до дифузії в тканинах, у тому числі нервовій [1, 5, 33]. Конститутивні NO-синтаза обумовлює посилення синтезу при наростанні рівня внутрішньоклітинних іонів кальцію. Тому будь-які процеси, що ведуть до нагромадження іонів кальцію в клітині (енергетичний дефіцит, зміни активного іонного транспорту, глутаматна ексайтотоксичність, оксидативний стрес), супроводжуються підвищенням рівня NO. Як міжклітинний, так і внутрішньоклітинний месенджер NO бере участь і регуляції різноманітних метаболічних реакцій, що забезпечують жити єздатність і функціональну активність клітин і всього організму в цілому, але за певних умов він бере участь у перебігу патологічних процесів. Такі подвійна дія NO визначається хімічними властивостями молекули й реалізується тим чи іншим способом залежно від його концентрації, часу впливу й умов обміну в різних типах клітин і тканинах організму. Оксид азоту NO являє собою нейтральний радикал з неспареним електроном. Він має найвищий у порівнянні з іншими молекулами організму коефіцієнт дифузії навіть більший, ніж у O_2 і CO_2 і безперешкодно проникає через клітинні мембрани. Численні дослідження показали, що при гострому порушенні мозкового кровообігу (ГПМК) NO покращує кровопостачання мозку за рахунок вазодилатації, зниження агрегації тромбоцитів і пристінкової адгезії нейтрофілів, пригнічує активність NMDA-рецепторів і зменшує ексайтотоксичний ефект глутамату. Однак при реперфузії переважає деструктивний ефект NO, який поглиблює процеси руйнування помираючих нервових клітин. Доведено, що NO здатний запускати програму загибелі нейрона завдяки унікальній хімічній природі і великій кількості мішеней у клітині, його фізіологічно активні окислювально-

відновні форми запускають уражаючу дію на нейрон в умовах ішемії. Численними дослідженнями показана безпосередня участь NO у деструкції нейрона при призначенні тваринам з ГПМК селективних інгібіторів нейрональної та індукцибельної лізоформ NO-синтази (NOS) і в дослідях на тваринах з дефіцитом гена, який кодує синтез індукцибельної NO-синтази (iNOS). Є дані про ріст концентрації NO у мозку тварин з фокусною і глобальною ішемією. Концентрація NO зростає з перших хвилин ішемії, досягаючи максимуму на 1-3-тю добу. Активність NOS різко збільшується в зоні ішемії та пенумбри, але однозначно говорити про певний тип ферменту не можна. Разом з тим, є дані, що саме нейрональна NOS утворює NO, який спричиняє й ускладнює ураження нейронів, у той час як ендотеліальна NOS покращує кровопостачання в зоні ішемічної півтіні. Це підтверджує роль NO в ушкодженні й загибелі нейрона і свідчить про специфіку ізоформ NOS. Крім того, необхідно враховувати вид і стадію інсульту. Доведено, що на початкових етапах ішемії превалює експресія конституційної кальційзалежної NOS, обумовлена трансмітерним аутокоідозом. Загибель нервової клітини, в умовах гіперпродукції NO, починається з механізмів активації фосфоліпаз, гіперпродукції гідроксил-радикала, модуляції роботи NMDA рецепторів. Але у віддаленому постішемичному періоді, з 7-14-ї доби при глобальній ішемії та з 1-3-ї доби при фокальній ішемії, реєструється гіперпродукція NO як наслідок активності індукцибельної NOS-активованої глії, макрофагів і нейрофілів [5]. Незалежність індукцибельної форми NOS від кальцію дає можливість підтримання високої активності цього ферменту тривалий час. Експресія даної форми при гіпоксії настає через 6 годин, на відміну від конституційної кальційзалежної NOS, що пов'язане з більш пізніми термінами появи активованої астроглії, макроглії, клітин запалення. При фокальній формі ішемії дані клітини-продуценти NO перебувають у пенумбрі, а при глобальній ішемії — в структурах, які найбільше потребують кисню. У зв'язку з цим, вивчення механізмів регуляції активності NOS перспективне для розробки стратегії лікування гострих порушень мозкового кровообігу. У літературі є описи з позитивними результатами по обмеженню гіперактивності NOS введенням інгібіторів і вказується, що при введенні останніх зменшується прогресування ішемії мозку [36].

Така багатогранна роль системи оксиду азоту в нейродеструктивних процесах нейрональної клітини пояснює необхідність вивчення здатності потенційних ЛЗ впливати на систему оксиду азоту.

Визначення стабільних метаболітів NO

У зв'язку з високою біологічною активністю час життя NO не перевищує декількох секунд, тому для проведення доклінічних досліджень необхідний метод, що дозволяє фіксувати навіть невеликі відхилення рівня NO від фонові концентрації. «Золотим стандартом» на сьогоднішній день є розроблений А. Ф. Ваніним (1984) прямий кількісний метод оцінки швидкості генерації NO в організмі за допомогою електронного парамагнітного резонансу (ЕПР). Його недоліками є технічна складність, дорожня необхідна апаратура, потреба введення в організм екзогенних субстратів, а також використання тканин для визначення даного інтермедіата тільки заморожених у рідкому азоті.

Найпопулярнішими стали методики визначення найближчих стабільних метаболітів — нітриту і нітрату.

Вони відзначаються достатньою простотою й відтворюваністю, а також дешевиною необхідних реагентів і швидкістю одержання результатів.

Визначення стабільних метаболітів монооксиду азоту в тканинах головного мозку за Гріссом.

Принцип методу. Стабільними метаболітами монооксиду азоту є нітрити, які, реагуючи з реактивом Грісса, утворюють стійкий забарвлений комплекс з максимумом поглинання при довжині хвилі 540 нм.

Реактиви:

- Депротейнізатор: 750 мг $ZnSO_4$ + 100 мг NaOH до 100 мл H_2O ;
- Реактив Грісса (10 г в 90 мл 12,5% оцтової кислоти).

Проведення дослідження.

До 0,2 мл гомогенату головного мозку додавали 2,0 мл депротейнізатора та інкубували 15 хв при температурі 27-30 °С, потім центрифугували при 1500 об/хв

20 хв (при температурі 15 °С). Надосад кількісно переносили в пробірку і додавали 1 мл реактиву Грісса. Потім залишали на 15 хв при кімнатній температурі. Далі спектрофотометрували при 540 нм проти суміші 2 мл Н₂О + 1 мл Грісса. Концентрацію NO розраховували за калібрувальною кривою з перерахунком на загальним білок і відображали у мкмоль/ г /білка.

Дослідження NO-синтази (NOS)

Обов'язковим у дослідженні системи оксиду азоту є визначення активності/експресії NOS. На даний час відомі 3 ізоформи NOS (див. табл. 2).

Таблиця 2

Класифікація NOS

Назва	Ген(и)	Локалізація	Функції
Нейрональна NO-синтаза (nNOS або NOS1)	NOS1	• нервова тканина	• клітинна передача сигналу
Індуцибельна NO-синтаза (iNOS або NOS2)	NOS2A NOS2B NOS2C	• імунна система •серцево- судинна система	• імунний захист від патогенів
Ендотеліальна NO-синтаза (eNOS або NOS3 або cNOS)	NOS3	• ендотелій	• вазодилатація

Для визначення експресії різних ізоформ NOS найбільш придатний імуногістохімічний метод з використанням системи біопероксидази.

Після стандартної процедури депарафінізації та дегідратації зрізи (докладно методика описана в розділі морфологічних методів дослідження) обробляли 3 % перекисом водню, для блокування ендогенної пероксидази, з подальшою обробкою кожного зрізу первинними поліклональними антитілами кролика до iNOS, eNOS, nNOS. Після промивання фосфатним буфером на зрізи наносять вторинні антитіла. Інтенсивність експресії ізоформ NOS оцінюють за щільністю iNOS, eNOS, nNOS-позитивних клітин у досліджуваних зрізах.

Для визначення загальної активності NOS у гомогенаті головного мозку застосовують флюорометричний метод визначення її активності.

Визначення активності NO-синтази [7].

Обов'язковим у дослідженні системи оксиду азоту є визначення активності/експресії NOS. На сьогоднішній день відомі 3 ізоформи NOS. Для визначення загальної активності NOS у гомогенаті головного мозку використовують спектрофотометричний метод визначення її активності.

Вимірювання оптичної щільності проводили на спектрофотометрі.

Принцип методу.

В основі методу визначення загальної активності NO-синтази лежить стехіометричне окислення НАДФН у процесі реакції утворення NO з L-аргініну. Зменшення НАДФН, еквімоллярне кількості утвореного NO, яку реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм. Для доказу того, що швидкість окислювання NADPH може служити показником активності NOS, використовують додаткові проби, у які вносять інгібітор NOS-N-нітро-L-аргінін (1мМ).

Реактиви:

- інкубаційна суміш: 25 мМ трис-НСІ, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ НАДФН, 1 мМ L-аргініну, рН 7,4, доводять дистильованою водою до 1 літра.

Проведення дослідження.

2,9 мл інкубаційної суміші (37 °С) поміщають у кварцову кювету (1 см) реакцію запускають додаванням 0,1 мл цитозолу (0,1-1 мг/мл білка) і добре перемішують. Оптичну щільність вимірюють відразу, 1 потім через 4 хвилини при довжині хвилі 340 нм.

$$C = \frac{4 \times \Delta E \times 1000}{6,22 \times a},$$

де:

а — вміст протеїну в пробі;

6,22 — коефіцієнт мікромолярної екстинкції відновленої форми піридинових нуклеотидів при довжині хвилі 340 нм і ширині кювети 1 см;

ΔE — зміна оптичної щільності розчину за 4 хв.

Активність NO-синтази відображають у нмоль/мг/протеїну/хв.

Концентрацію протеїну у пробі визначали методом Лоурі

Гістохімічні методи визначення NOS

Для гістологічних досліджень досліджувану ділянку органів-мішеней на 24 години фіксували в рідині Карнуа і далі за стандартною схемою заливали в блоки парапластом X-100, з яких готували серійні фронтальні 14-мікронні гістологічні зрізи.

Для визначення інтенсивності експресії ендотеліальної (eNOS), нейрональної (nNOS) та індукцибельної (iNOS) NO-синтази гістологічні зрізи виділяють із парапласту і регідрують, тричі по 5 хвилин відмивають фосфатним буфером (pH 7,4) і протягом 30 хвилин інкубують з 2n соляною кислотою (t 37 °C). Потім двічі по 5 хвилин відмивають фосфатним буфером (pH 7,4), двічі по 5 хвилин відмивають боратним буфером по Холмсу (pH 8,4) і чотири рази по 5 хвилин — фосфатним буфером (pH 7,4), після чого протягом 30 хвилин інкубують з 0,1% розчином трипсину у фосфатному буфері (t 37 °C). Після інкубації зрізи чотири рази по 5 хвилин відмивають фосфатним буфером (pH 7,4) і потім протягом 24 годин інкубують у вологій камері (t 4-6°C) з первинними поліклональними антитілами кроликів IgC (1:500) eNOS або iNOS. Після інкубації зрізи чотири рази по 5 хвилин відмивають фосфатним буфером (pH 7,4). Потім протягом 1 години (t 37°C) інкубують із вторинними антитілами кози до фрагмента Ig миші, кон'югованими і флюоресцентним барвником (FITC). Після заключного чотириразового відмивання фосфатним буфером (pH 7,4) зрізи вміщують у суміш гліцерин-фосфатний буфер (9:1). На флюоресцентному мікроскопі визначають інтенсивність експресії ізоформ NOS за щільністю eNOS-позитивних клітин у зрізах за допомогою відеокамери і вводять у систему цифрового аналізу зображення.

Визначення NOS методом вестернблотингу

Концентрацію ендотеліальної (eNOS) нейрональної (nNOS) та індукцибельної (iNOS) також необхідно визначати методом Вестерн-блот аналізу. Білки ділять у 10% поліакриламідному гелі (ПААГ). Поділ білкових фракцій проводять шляхом електрофорезу при напрузі 100 V (для ущільнення гелю), коли проби досягнуть межі розподілу гелів — при напрузі 200 V, до того часу, поки

проби не досягнуть закінчення гелю. Білки з гелю переносять на нітроцелюлозну мембрану при напрузі 100 V і силі струму 0,35 A протягом 1 год. Після переносу мембрану поміщають у блокуючий буфер, що містить 1 % розчин бичачого сироваткового альбуміну на 20 год. Відмиту на шейкері протягом 5 хв у розчині 0,1 М фосфатного буфера мембрану поміщають у розчин первинних антитіл проти eNOS, pNOS, iNOS (1:500) та інкубують 2 год при кімнатній температурі. Відмивають на шейкері 4 рази по 5 хвилин у розчині 0,1 М фосфатному буфері. Поміщають мембрану в розчин вторинних антитіл (1:1000), (біотинільований анти-мишиний IgG) інкубують 2 год. Відмивають на шейкері 4 рази по 5 хв у розчині 0,1 М фосфатного буфера. Поміщають мембрану в розчин ExtrAvidin-пероксидази в 1 % розчині бичачого сироваткового альбуміну (1:1000). Інкубують 1 годину і промивають. Для візуалізації мембрану обробляють розчином АЕК (1 таблетка 3-аміно-9-етилкарбазолу розчинена у 2,5 мл ДМФА, що містить 47,5 мл 0,05М ацетатного буфера, рН 5,0, 25 мкл 30 % H₂O₂). Інкубують мембрану у субстратній суміші 5-10 хв. Червоний нерозчинний преципітат характеризує комплекс антиген-антитіло у блоті. Промивають мембрану в дистильованій воді кілька разів. Висушують смужки між аркушами фільтрувального паперу під потоком холодного повітря. Детекцію ізоензимів NOS здійснюють за допомогою денситометрії в програмі Adobe Photoshop.

Визначення вмісту L-аргініну [6]

Принцип методу:

Білки гомогенату тканини осаджуються хлорною кислотою, надлишок якої видаляється у вигляді калієвої солі. Безбілковий фільтрат хроматографується в тонкому шарі сорбенту на пластинках для тонкошарової хроматографії (типу «Silufol», «Merck»), амінокислоти розділяються в процесі просування розчинника по хроматографічній пластині.

Реактиви:

1. Пропанол;
2. Аміак;
3. Пластини для тонкошарової хроматографії;
4. Кислота хлорна, 0,8 н (8%-на HClO₄);

5. Калію карбонат, розчин 2 моль/л готують, розчиняючи 27,6 г карбонату калію (поташ, K_2CO_3) у воді, об'єм доводять до 100 мл. В разі необхідності препарат попередньо сушать при температурі 105-110 °С;

6. Диметилформамід;

7. 1 % розчин алоксану в диметилформаміді;

8. Стандартні розчини L-аргінін.

Хід визначення:

Рухома фаза для хроматографії — змішують 70 мл пропанолу, и 30мл концентрованого розчину аміаку. 0,05 мл безбілкового екстракту гомогенату головного мозку наносять у вигляді смужки на хроматографічну пластину і проводять висхідну хроматографію протягом 60-90 хв у суміші пропанолу й аміаку. Вийняті з камери пластини висушують на повітрі й обробляють 1 % розчином алоксану в диметилформаміді. Забарвлення плям амінокислот з'являється після нагрівання у термостаті (100 °С) протягом 1-2 хв. Пляму, яка відповідала L-аргініну, вирізали і елюювали у 3 мл диметилформаміду при нагріванні на водяній бані. Потім проби центрифугували при 3000g протягом 30 хв і спектрофотометрували при 530 нм. Концентрацію L-аргініну визначали за стандартними зразками амінокислоти.

7. ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЯКИХ ПОКАЗНИКІВ ГАМК-ЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Про стан ГАМК-ергічної системи головного мозку в умовах ішемії можна робити непрямі висновки за концентрацією гліцину, ГАМК, глутамату, а також активністю ключового ферменту – глутаматдекар-боксілази (ГДК) – ферменту, який відповідає за утворення ГАМК із глутамату.

Хроматографічне визначення концентрації гліцину, ГАМК, глутамату

Принцип методу. Метод базується на поділі гліцину, ГАМК і глутамату у системі н-бутанол : оцтова кислота : вода на тонкому шарі сорбенту з наступним кількісним визначенням за реакцією з алоксаном при 540 нм.

Реактиви:

- хроматографічні пластини;
- н-бутанол;
- оцтова кислота;
- 1 % розчин алоксану у ДМФА.

Проведення дослідження.

0,2 мл тканинного безбілкового екстракту наносять па стартову лінію пластини і хроматографують у системі н-бутанол : оцтова кислота: вода у співвідношенні 8 : 2: 1. Потім пластину висушують і проявляють 1% розчином алоксану в ДМФА при 100 оС. Плями, що відповідають ГАМК, гліцину, глутамату вирізають і елюють у 3 мл ДМФА протягом 3 годин. Потім проби центрифугують при 2500 об/хв протягом 30 хв (при температурі 15 °С). Після чого проби спектрофотометрують при довжині хвилі 540 нм.

Вміст ГАМК, гліцину і глутамату розраховують за калібрувальною кривою з перерахуванням на наважку тканини і відображають) у мкмоль/г тканини.

Визначення активності ГДК

Принцип методу. Про активність ферменту роблять висновки за зміною кількості НАДФ при 340 нм, що еквімолярна кількості субстрату, використаного в реакції.

Реактиви:

- 0,25 М трис-НСІ буфер (рН 8,2);
- 0,0018 М розчин НАДФ;
- 0,75 М розчин глютамінової кислоти;
- 10⁻³ М розчин ЕДТА.

Проведення дослідження.

Безпосередньо перед проведенням реакції готують інкубаційну суміш (в мл на 1 пробу) 0,25 М трис-НСІ буфер – 0,6; ЕДТА – 0,3; вода - 1,7; НАДФ – 0,1.

У кювету спектрофотометра вносять 2,7 мл інкубаційної суміші й додають 0,1 мл цитозолу або лізату мітохондрій. Реакцію запускають додаванням до інкубаційної суміші 0,2 мл 0,75 М розчину глютамінової кислоти. Оптичну щільність вимірюють протягом 2 хв при 340 нм. Активність ГДК (мкмоль/мг білка/хв) розраховують за формулою:

$$C = \frac{\Delta E \cdot V \cdot 1000}{6.22 \cdot a}, \quad (2.16)$$

де: а – концентрація білка у пробі, мг;

ΔE – зміна оптичної щільності розчину за 2 хв;

V – кінцевий об'єм проби (3 мл)

8. ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ОКИСНОГО МЕТАБОЛІЗМУ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ

Окклюзія судин, що живлять головний мозок, є початковою ланкою в ланцюгу несприятливих змін, які приводять до грубих порушень метаболізму нейронів, структурно-функціональних змін і нерідко закінчуються загибеллю нервових клітин. Гостра або хронічна ішемія мозкової тканини обумовлює цілий каскад патобіохімічних реакцій, які в кінцевому результаті приводять до розвитку вогнищового неврологічного дефіциту, дисциркуляторної енцефалопатії або загибелі хворого. Тісний взаємозв'язок порушень енергетичного і пластичного обміну, їхній вплив на перебіг і прогноз захворювання, нерідко не враховуються при розробці схем лікування, а основою патогенетичної терапії вважається відновлення гемодинаміки. Останнім часом порушенням енергетичного метаболізму й можливостям його корекції приділяється велика увага. Багато вчених вважають, що корекція енергетичного метаболізму головного мозку, як у гострий період інсульту, так й у відновний, є потужним превентивним фактором повторних інсультів, інвалідизації хворих та їхньої загибелі. В зв'язку з чим виправданим при оцінці нейропротективної дії потенційних ЛЗ є визначення основних показників енергетичного метаболізму головного мозку – АТФ, АДФ, АМФ, глюкози, глікогену, глюкозо-6-фосфату. Необхідним також є визначення інтермедіатів циклу Кребса (малат, ізоцитрат), пірувату, лактату, малату. Враховуючи, що уявлення про домінуючу роль сукцинатаоксидазного механізму сформовані на узагальненні результатів дослідів з ізольованими органами, культурами тканин при ішемії та гіпоксії різного ступеня, вважається за доцільне вивчити стан лімітуючих ланок енергетичного обміну і компенсаторних метаболічних шунтів, механізмів їхньої молекулярної регуляції при ішемії головного мозку. Причому, одночасне дослідження різних метаболічних процесів і рівень білків теплового шоку (HSP70), а також фактора індукованого гіпоксією (HIF-1a) надає інформацію про спрямованість і ступінь змін цих процесів [5, 11, 18-23].

Визначення аденілових нуклеотидів

У сучасній біохімії широко застосовується метод біоломінесценції з використанням ферменту люциферази (чутливість до 10-14М). Чутливими вважаються хроматографічні методи поділу (іонообмінні, тонкошарові та високоефективної рідинної хроматографії) з наступною флюоресценцією спектрофотометрією, електрохімією. Так, для найбільш точного визначення використовується метод високоефективної рідинної хроматографії з флюоресцентною детекцією (чутливість 0,08 пМ).

Для доклінічних досліджень можна запропонувати простим і чутливий метод визначення аденілових нуклеотидів за допомогою тонкошарової хроматографії.

Визначення аденілових нуклеотидів методом тонкошарової хроматографії

Принцип методу. Метод базується на поділі АТФ, АДФ і АМФ у системі діоксан-ізопропанол-вода-аміак на тонкому шарі сорбенту з наступним кількісним визначенням прямою спектрофотометрією при 260 нм.

Реактиви:

- ізопропанол;
- діоксан;
- аміак;
- пластини для тонкошарової хроматографії на алюмінієвій підкладці з нанесеним робочим шаром мікрофракціонованого сорбенту силікагелю марки.

Проведення дослідження.

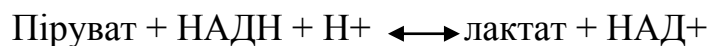
0,2 мл безбілкового тканинного екстракту наносять на стартову лінію пластини і хроматографують у системі діоксан-ізопропанол-вода-аміак (4:2:4:1). АТФ, АДФ, АМФ ідентифікують в ультрафіолеті при довжині хвилі 365 нм. Проби елюють в 4,0 мл 0,1 н НСІ і спектрофотометрують при 260 нм. Вміст АТФ, АДФ і АМФ (мкмоль/г тканини) розраховують за калібрувальною кривою з

перерахунком на наважку тканини. На основі отриманих даних необхідно розрахувати комплекс показників, що характеризують стан енергетичного обміну в умовах експерименту. Розраховується:

1. Енергетичний заряд (ЕЗ) за формулою $EЗ = (АТФ + 1 / 2АДФ) / (АТФ + АДФ + АМФ)$;
2. Енергетичний потенціал (ЕП) за співвідношенням $ЕП = АТФ / АДФ$;
3. Порівняльний коефіцієнт (Кпорівн) за формулою $Кпорівн = (АТФ + АМФ) / АДФ$;
4. Індекс фосфорилування (ІФ) за співвідношенням $ІФ = АТФ / (АДФ + АМФ)$;
5. Термодинамічний контроль дихання (ТКД) $ТКД = АДФ / АМФ$, степе́нь фосфорилування (УФ) $УФ = АТФ / (АДФ \times \text{Фосфор неорг})$.

Кількісне визначення вмісту пірувату методом Цоха-Лампрехта

Принцип методу. У присутності лактатдегідрогенази (ЛДГ) піруват відновлюється до лактату:



Кількість використаного у реакції пірувату еквімолярна кількості НАДН, зменшення якого визначається при довжині хвилі 340 нм.

Реактиви:

- 0,5 М трис-НСІ-амінометановий буфер, рН 7,6;
- 0,06 М розчин НАДН;
- лактатдегідрогеназа (активність 700 од/мг).

Проведення дослідження.

0,8 мл безбілкового екстракту додають до 1,2 мл трис-НСІ буфера. Реакцію запускають додаванням 0,05 мл розчину ЛДГ. Оптичну щільність вимірюють до запуску реакції (Е1) і через 4 хв (Е2).

Кількість пірувату розраховують за формулою:

$$C = \frac{\Delta E \cdot K \cdot V}{6.22},$$

де: ΔE (E2-E1);

V – кінцевий об'єм проби у кюветі;

K – коефіцієнт розведення проби відносно тканини.

Важливою складовою у вивченні окисного метаболізму ішемізованого мозку є дослідження реакцій циклу Кребса, за такими показниками як малат, ізоцитрат, активність сукцинатдегідрогенази (СДГ), цитохром-С-оксидази (Ц-С-О).

Кількісне визначення малату за методом Хохорста

Принцип методу. У присутності малатдегідрогенази (МДГ) малат перетворюється на щавлевооцтову кислоту. Зв'язування щавлевооцтової кислоти гідразин-гліциновим буфером забезпечує повне окислення малату.



Утворення відновленої форми НАДН еквімолярне кількості окисленого малату, збільшення якого реєструють при 340 нм.

Реактиви:

- 0,4 М гідразин-гліциновий буфер, рН 9,5;

- 0,05 М розчин НАД⁺;

- малатдегідрогеназа (активність 700 од/мг).

Проведення дослідження.

0,2 мл безбілкового екстракту мозку поміщають до 2,2 мл гідразин-гліцинового буфера. Реакцію запускають додаванням 0,2 мл розчину НАД⁺. Оптичну щільність вимірюють до запуску реакції (E1) і через 4 хв (E2).

Кількість малату розраховують за формулою:

$$C = \frac{\Delta E \cdot K \cdot V}{6.22},$$

де: ΔE – (E2-E1);

V – кінцевий об'єм проби у кюветі;

K – коефіцієнт розведення проби відносно тканини.

Визначення концентрації ізоцитрату в тканинах методом Зібера

Принцип методу. Під дією НАДФ-ізоцитратдегідрогенази в пробі ізоцитрат перетворюється на α -кетоглутарат.



Кількість ізоцитрату, який прореагував еквімолярпа кількості утвореного НАДФН, про приріст якого роблять висновки за зміно оптичної щільності проби при довжині хвилі 340 нм.

Реактиви:

- 6 % розчин хлорної кислоти;
- 24 % розчин K_2CO_3 ;
- буфер трис-НСІ (0,1 М), що містить 1 мМ ЕДТА, рН 7,4;
- 0,02 М рзчин MnCl_2 ;
- НАДФ-ізоцитратдегідрогеназа (КФ. 1.1.1.42)

Проведення дослідження.

Для осадження білків до гомогенату тканини додають 6 % хлорну кислоту в кількості, щоб співвідношення тканина: кислота складало 1:4. Пробу перемішують і центрифугують протягом 15 хв при 3000g (при температурі 15 °С).

Безбілковий екстракт переносять у центрифужну пробірку і видаляють надлишок хлорної кислоти додаванням по краплях 24% розчину K_2CO_3 . Осад перхлорату калію відділяють центрифугуванням протягом 5 хв при 3000g (при температурі 15°С). Нейтралізований безбілковий екстракт нагрівають до кімнатної температури й використовують для ферментативної реакції.

Перед проведенням реакції компоненти інкубаційної суміші змішують у наступних об'ємах (у мл): буфер трис-НСІ - 2,0; MnCl_2 – 0,43; НАДФ - 0,1; бідистильована вода - 0,55. Інкубаційну суміш (3,05 мл) поміщають у кювету спектрофотометра шириною 1 см. У кювету додають 0,05 мл розведеного розчину НАДФ-ізоцитратдегідрогенази, перемішують і вимірюють початкову величину оптичної щільності (Е1). Ферментативну реакцію запускають додаванням 0,2 мл нейтралізованого тканинного екстракту, пробу перемішують і після припинення

реакції записують кінцеві показники приладу (E2).

Кількість ізоцитрату відображають у мкмоль/г тканини і розраховують за формулою:

$$X = \Delta E \cdot V \cdot K / 6,22,$$

де: ΔE – зміна оптичної щільності в ході ферментативної реакції;

V — кінцевий об'єм реакційної суміші;

K — коефіцієнт розведення відносно 1 г тканини;

6,22 — коефіцієнт мікромольної екстинкції відновлених форм піридинових нуклеотидів при довжині хвилі 340 нм.

Спектрофотометрическое визначення рівня активності сукцинатдегідрогенази (СДГ) у головному мозку

Принцип методу.

Під дією СДГ бурштинова кислота відновлює гексаціаноферат (III) калію $K_3[Fe(CN)_6]$, що має жовте забарвлення, до безбарвного гексаціаноферату (II) калію $K_4[Fe(CN)_6]$. Активність ферменту пропорційна кількості відновленого гексаціаноферату (III).

Реактиви:

- 0,1 М бурштинова кислота;
- 25 мМ гексаціаноферат (III) калію;
- 150 мМ азид натрію;
- 25 мМ ЕДТА (рН 7,8);
- 0,1 М фосфатний буфер (рН 7,8);
- 20% трихлороцтова кислота (ТХО).

Проведення дослідження.

У центрифужні пробірки наливають 1 мл 0,1 М фосфатного буфера і по 0,1 мл розчинів бурштинової кислоти, ЕДТА, азиду натрію і дистильованої води. Після цього в реакційне середовище вносять 0,5 мл досиджуваної тканини і інкубують 5 хв для інгібування цитохром оксидази азидом натрію. Реакцію

починають додаванням 0,1 мл розчину гексаціаноферату (III) калію. Проби інкубують протягом 10-15 хв при 30°C. Після інкубації реакцію зупиняють, занурюючи проби в лід і додаючи 2 мл 20% ТХО. У контрольні проби, що містять всі компоненти інкубаційної суміші, ТХО додають перед внесенням гомогенату тканини. Таким чином, СДГ у контрольних пробах з початку інкубації повністю денатурована, і специфічного відновлення не відбувається. Після зупинки реакції та охолодження проби центрифугують при 2000 об/хв. (при температурі 15 °С) протягом 15 хв для осадження денатурованого білка. Надосадну рідину фотометрують при 420 нм. Оптичним контролем служить суміш 20 % ТХО і 0,1 М фосфатного буфера (1 : 1).

Для визначення вмісту гексаціаноферату (III) калію в пробах за результатами фотометрування проб, що містять від 100 до 1000 мкг гексаціаноферату (III) калію в 4 мл розчину будують калібрувальну криву. За різницею екстинкцій (Ек - Епр) розраховують кількість гексаціаноферату (III) калію, відновленого за час інкубації.

Активність ферменту (в нмолях сукцинату / хв на 1 мг білка) обчислюють за формулою:

$$A = 1000 \cdot T / 2M \cdot a \cdot t, \quad (2.14)$$

де: m – кількість відновленого гексаціаноферату (III) калію у пробі;

a — вміст білка у пробі, мг;

M — молекулярна маса гексаціаноферату (III) калію;

t — час інкубації, хв.

Визначення активності цитохром-С-оксидази

Принцип методу. Активність цитохром-С-оксидази (ЦХО) визначається спектрофотометрично за інтенсивністю окислення відновленого цитохрому ферментом, що міститься у досліджуваному розчині.

Реактиви:

— 0,5 М фосфатний буфер (рН 7,4);

— розчин цитохрому С (8,0 мг цитохрому С розчиняли в 1,0 М'л Ф°с фатного буфера);

— 3,2 % розчин гідросульфїту натрію у фосфатному буфері (готують безпосередньо перед використанням).

Проведення дослідження.

Попередньо проводять відновлення цитохрому С. Із цією метою до 1 мл цитохрому С додають 20 мкл розчину гідросульфїту натрію. 180 мкл приготованого в такий спосіб розчину додають у кювету з 2 мл фосфатного буфера і вимірюють швидкість окислення цитохрому при довжині хвилі 550 нм. Потім для вивчення швидкості ферментативної реакції у вміст кювети вносять 40 мкл досліджуваного матеріалу і секундоміром відзначають початок реакції. Оптичну щільність вимірюють кожні 30 секунд протягом 3 хвилин.

Активність ферменту відображають у зміні екстинкції за 1 хв на 1,0 г тканини за формулою:

$$A = \Delta E / \text{хв} \cdot V,$$

де: V — кінцеве розведення розчину;

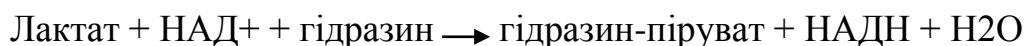
ΔE , ΔE_0 , ΔE_k — різниця зміни екстинкцій дослідного і контрольного розчинів.

Про активацію гліколізу в ішемізованому мозку роблять висновки за вмістом лактату, який визначають спектрофотометрично.

Також у доклінічних дослідженнях застосовують методику, засновану на принципі полімеразної ланцюгової реакції, в основі якої лежить ампліфікація і детекція продуктів цієї реакції в режимі реального часу за допомогою флюоресцентних міток, якими попередньо позначають застосовувані для реакції ампліфікації праймери відповідно до інструкції тест-системи.

Визначення вмісту лактату за методом Хохорста

Принцип методу. У присутності лактатдегідрогенази (ЛДГ) лактат переходить у піруват, причому зв'язування, утвореного в ході реакції пірувату гідразин-гліциновим буфером сприяє повному окисленню лактату:



Утворення відновленої форми НАД, еквімолярне кількості окисленого

лактату, наростання якого реєструють при 340 нм.

Реактиви:

- 0,4 М гідразин-гліциновий буфер рН 9,5;
- 0,05 М розчин НАД;
- лактатдегідрогеназа (активність 700 од/мг).

Проведення дослідження.

0,2 мг безбілкового тканинного екстракту додають в іц суміш, що містить 2,0 мл гідразин-гліцинового буфера і 0,2 мл розчину НАД. Оптичну щільність вимірюють до запуску реакції (E1) і через 4 зв (E2).

Кількість лактату розраховують за формулою:

$$C = \frac{\Delta E \cdot K \cdot V}{6.22}, \quad (2.12)$$

де: ΔE (E2-E1);

V – кінцевий об'єм проби у кюветі;

K – коефіцієнт розведення проби відносно тканини.

Останнім часом у біохімії підвищили чутливість цих методів шляхом збільшення поглинання НАД, кон'югуванням останнього флуоресцентним реагентом ресоруфіном (Ф. Шапіро, 2012). Така модифікація у 100 разів підвищила чутливість методів.

9. ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МІТОХОНДРІЙ ІШЕМІЗОВАНОГО ГОЛОВНОГО МОЗКУ З МЕТОЮ ПІДТВЕРДЖЕННЯ «МІТОПРОТЕКТИВНОЇ АКТИВНОСТІ» ПОТЕНЦІЙНИХ НЕЙРОПРОТЕКТОРІВ

Останніми дослідженнями встановлена провідна роль мітохондрій при ішемічному ураженні головного мозку в запуску каскаду патобіохімічних, морфофункціональних порушень нейронів. Сьогодні існує узагальнене поняття «мітохондріальна дисфункція». Розвиток мітохондріальної дисфункції приводить до порушення зворотного захоплення медіаторів (катехоламінів, дофаміну, серотоніну); порушення іонного транспорту, генерації та проведення імпульсу; порушення синтезу білка *de novo*; порушення процесів трансляції й транскрипції; активізуються «паразитарні» енергопродукуючі реакції, що приводить до істотного зниження енергетичних запасів і загибелі нейрональних клітин [3, 5, 11, 18, 19]. Крім того, під дією гідроксил-радикала відбудеться відкриття мітохондріальних пор, експресія і вихід у цитозоль проапоптотичних білків, які ініціюють процеси клітинної загибелі (апоптоз/некроз). Виходячи з викладеного, необхідною ланкою нейропротективного механізму дії сучасних лікарських засобів є їхня мітопротективна дія.

На сьогодні оцінку мітопротективної дії БАР можна проводити за наступними показниками:

- окисне фосфорилування у мітохондріях;
- розкриття мітохондріальної пори;
- збереженість заряду.

Дослідження окисного фосфорилування полярографічним методом

Виділення мітохондріальної фракції з ішемізованого головного мозку тварин проводять за методикою, описаною вище в розділі «дослідження *in vitro*».

У суспензії мітохондрій полярографічно за допомогою закритого електрода Кларка, визначали стан окисного фосфорилування. В якості субстрату окислювання використовують глютамат натрію, визначають наступні показники:

- швидкість дихання мітохондрій у різних метаболічних станах:
- V_0 — швидкість поглинання O_2 при окисненні екзогенного субстрату;

V_3 — швидкість споживання O_2 після додавання АДФ (акцептора фосфору), тобто швидкість фосфорилуючого окислення; V_4 — швидкість дихання за умови виснаження АДФ у системі — окислення після фосфорилування; $V_{\text{днф}}$ — швидкість дихання після додавання роз'єднувача протонифора — 2,4-динітрофенолу.

- показники, що характеризують сполучення процесів окислення і фосфорилування у мітохондріях: дихальний контроль за Ларді (ДКЛ = V_3/V_0); дихальний контроль за Чансом (ДКЧ = V_3/V_4); коефіцієнт АДФ/ ΔO ; стимуляцію дихання 2,4-динітрофенолом (ДНФ $V_{\text{днф}}/V_4$); швидкість фосфорилування доданого АДФ ($\text{АДФ}/\Delta t$); здатність мембран мітохондрій зберігати власний енергетичний потенціал (V_0/V_4).

Хід визначення:

У комірку електрода із середовищем інкубації загальним обсягом 1 мл вносять мікропіпеткою з вигнутим капіляром 0,015 мл глютамату натрію до кінцевої концентрації 3 мл. На стрічці самописця реєструють нульову лінію і, розмикаючи електричний ланцюг, виписують шкалу вмісту O_2 у середовищі. Вся довжина шкали при постійній температурі середовища 270 °С і об'ємі 1 мл відповідає 240 нмолям O_2 . Відразу після додавання в середовище інкубації 0,12 мл суспензії мітохондрій реєструють початкову швидкість дихання мітохондрій V_0 . Потім додають 0,004 мл розчину АДФ до кінцевої концентрації 174 мкМ і послідовно реєструють швидкості V_3 і V_4 . Після додавання у середовище інкубації 0,021 мл розчину роз'єднувача (2,4-динітрофенолу) до кінцевої концентрації 20 мкМ реєструють швидкість роз'єданого дихання — $V_{\text{днф}}$. Швидкість дихання мітохондрій відображають у нанограм-атомах O_2 за хв у розрахунку на 1 мг білка мітохондрій. АДФ/ Δt відображають у нмолях АДФ за 1 хв на 1 мг білка. Кількісне визначення білка проводять за Lowry et al.

Відкриття мітохондріальної пори (МП)

Хід визначення:

В інкубаційне середовище (70 мМ сахарози, 5 мМ HEPES, 70 мМ KCl, 0,5 - 1 мМ K_2HPO_4 , рН 7,4) вносять суспензію мітохондрій (1 мг білка у пробі). Розкриття МП визначають при $\lambda = 540$ нм при 25 °С при постійному перемішуванні протягом 25 хв.

Мембранний потенціал (МПЗМ) (ψ) заряду мітохондрій вимірюють у присутності сафроніну-О.

Хід визначення:

В інкубаційне середовище (70 мМ сахарози, 5 мМ HEPES, 70 мМ KCl, 0,5 - 1 мМ K_2HPO_4 , рН 7,4) вносять суспензію мітохондрій (1 мг білка в пробі) і 9 мкМ сафроніну-О. Спектрофотометрію проводять при довжині хвилі 515 нм і 525 нм. МПЗП визначають за різницею світлопоглинання при 515 нм і 525 нм ($\Delta A_{515-525 \text{ нм}}$).

10. МОРФОЛОГІЧНІ ТА ГІСТОІМУНОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Для морфологічних і гістоімунохімічних досліджень тканину головного мозку експериментальних тварин поміщають на добу у фіксатор Буена й після стандартної гістологічної проводки тканину поміщають у парапласт X-TRA.

Для вивчення морфології нейронів на ротаційному мікроскопі виготовляють зрізи досліджуваних відділів головного мозку товщиною 5 мікрон. Зрізи депарафінують і фарбують для визначення нуклеїнових кислот галлоціанін-хромовими галунами за Ейнарсеном.

З метою дослідження нейротропної активності потенційних нейропротекторів найбільш інформативним є проведення морфометричних і денситометричних досліджень у ділянці IV-V шарів кори і САІ-зоні кори гіпокампа.

За даними ряду літературних джерел доцільно визначати наступні показники:

- щільність нейронів, гліальних клітин, апоптотичних і деструктивно змінених нейронів як кількість клітин на 1мм^2 площі зрізу,

- клітинний склад у ділянці IV-V шарів кори і САІ-зони кори гіпокампа у процентах,

- площу тіл нейронів, гліальних клітин, апоптотичних і деструктивно змінених нейронів (мкм^2),

- концентрацію РНК у нейронах, гліальних клітинах, апоптотичних і деструктивно змінених нейронах (одиниці оптичної щільності, Еоп), які розраховують як логарифм відношення оптичної щільності тіла клітини до оптичної щільності міжклітинної речовини,

- вміст РНК у нейронах, гліальних клітинах, апоптотичних і деструктивно змінених нейронах (одиниці оптичної щільності, Еоп), які розраховують як добуток концентрації РНК і площі клітин,

- індекс виживання нейронів, який оцінюють як відношення кількості нейронів в експериментальних тварин до кількості нейронів в інтактних щурів.

Для ендотеліальних клітин судин головного мозку визначають наступні показники:

- площу ядра,

- середній діаметр ядра, який, враховуючи, що ядро ендотеліальної клітини судин у поперечному розрізі має форму сильно витягнутого еліпса, мінімальний еліптичний діаметр,

- концентрацію РНК у ядрі (одиниці оптичної щільності, Eop), яку розраховують як логарифм відношення оптичної щільності ядра до оптичної щільності міжклітинної речовини,

- щільність ядер ендотеліоцитів як кількість клітин на 1мм^2 площі ірізу кори мозку у ділянці IV-V шарів кори, САІ-зони кори гіпокампа і стінки судин судинної оболонки мозку, судинного сплетіння шлуночки пмозку, віток центральної мозкової і очної артерій.

Для проведення гістоімунохімічних досліджень головний мозок тварин поміщають на добу у фіксатор Буена і після стандартної гістологічної проводки тканину вміщують у парафін. На ротаційному мікротомі виготовляють 15-мікронні зрізи, які депарафінувалися за стандартною методикою.

Для імуногістохімічного дослідження в більшості випадків використовують метод непрямой імунофлуоресценції. На першому етапі на зрізи наносять первинні антитіла до досліджуваного білка й інкубують при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 24 години. Після інкубації зрізи тричі промивають 0,1М фосфатним буфером, після чого на зразки наносять вторинні антитіла (флюоресцент кон'югований козячий IgG, Sigma Chemical, USA) і інкубують при кімнатній температурі 60 хв. Після інкубації зрізи промивають 0,1М фосфатним буфером. На флюоресцентному мікроскопі досліджують імунопозитивні клітини.

11. ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЯКИХ МАРКЕРІВ, ЩО МАЮТЬ ДІАГНОСТИЧНУ ЦІННІСТЬ ПРИ ВИВЧЕННІ ПАТОЛОГІЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ

Маркери порушень нервової системи

Важливою ідеєю, що розвивається в останнє десятиліття, є припущення про існування при нейродеструктивних захворюваннях так званої "нейроваскулярної ланки", яка включає кровоносні судини, нервові клітини і міжклітинну речовину, що функціонують спільно, використовуючи різні біохімічні сигнали. Зниження кровотоку в тканинах головного мозку приводить до браку кисню, ініціюючи ішемічний каскад, що включає приплив кальцію, гіперстимуляцію нейромедіаторів і посилену продукцію вільних радикалів. Ішемія ініціює запальну відповідь у тканинах мозку, приводить до біохімічних порушень, що проявляються в зміні рівня різних маркерів у кровотоку. На початковому етапі розвитку запалення залучені молекули адгезії (селектини і молекули адгезії ендотелію), які експресуються ендотеліоцитами і зв'язуються з глікопротеїновими рецепторами на поверхні нейтрофілів [5]. Активовані клітини мікроглії, макрофаги і лейкоцити разом з нейронами й астроцитами виділяють медіатори запалення, такі як синтаза оксиду азоту, циклооксигеназа-2, IL-1 і моноцитарний хемоаттрактний білок-1. Внаслідок подвійної природи продуктів активованої мікроглії - деструктивної (вільні радикали) і протективної (фактори росту) - роль мікроглії у церебральній ішемії носить комплексний характер. Транзиторна активація генів, що кодують фактори транскрипції (c-fos, c-jun), виникає в перші кілька хвилин від початку інсульту і запускає другу хвилю експресії генів білків теплового шоку HSP 70, що наростає у перші 1-2 години хвороби і спадає через 1-2 дні. Протягом 6-24 год від початку інсульту вивільняється IL-1, -6, -8 і TNF- α . Зростає рівень нейротрофічного фактора мозку BDNF і циліарного нейротрофічного фактора (CNTF) з олігодендроцитів. Судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF) підсилює набряк тканин мозку в гострій фазі інсульту й відповідає за судинне ремоделювання на пізній стадії. Крім локального дисбалансу імунної системи інсульт вражає, насамперед, нейроваскулярну ланку. Важливим фактором є порушення базальних мембран, які підтримують нейроваскулярний гомеостаз.

Маркери, пов'язані з ішемічним каскадом і наступною запальною відповіддю, є сильними прогностичними факторами. Ці маркери асоційовані з ознаками ранніх неврологічних порушень, обсягом ушкоджень, раннім і пізнім клінічним результатом [3, 5, 11, 14, 16-29].

Gold Dot (визначення антитіл до NR2) надлишкова секреція глутамату, викликана церебральною ішемією, приводить до гіперреактивності рецепторів NMDA. Надлишкові кількості рецепторів NMDA (особливо субодиниці NR2) відщеплюються сериновими протеазами, що приводить до утворення пептидних фрагментів NR2 [5,38].

Ефективність визначення антитіл до NR2:

- Рівень антитіл до NR2 є незалежним сироватковим маркером, що визначає церебральну ішемічну подію.
- Антитіла до NR2 є маркером нейротоксичності.
- Моніторинг рівня антитіл до NR2 дозволяє контролювати ефективність фармакокорекції ішемічного ураження головного мозку.

Нейронспецифічна енолаза (NSE) (імуноферментний аналіз, імуноблот) NSE є нейроспецифічним маркером. Належить до внутрішньоклітинних ферментів ЦНС, що дозволяє використовувати NSE для визначення постішемічних ушкоджень мозку [18, 30].

Основний білок мієліну (MBP) (імуноферментний аналіз, імуноблот) MBP виділяється при будь-якому ушкодженні нервової тканини. Також рівень MBP підвищується протягом декількох днів після моделювання ішемії й відображає деструкцію мієлінових оболонок [2, 12, 18, 38].

Білок S-100 (імуноферментний аналіз) S-100 є специфічним білком астроцитарної глії, здатним зв'язувати кальцій, у високих концентраціях присутній у нервовій тканині. Зростання концентрації S-100 ($\alpha\beta$) і S-100 ($\beta\beta$) у плазмі є маркером ураження головного мозку. Визначення вмісту S-100В відображає ступінь ураження мозку. Дослідження S-100 корисне як для моніторингу, так і для визначення прогнозу перебігу патології. Підвищення S-100

у сироватці крові при порушеннях мозкового кровообігу обумовлене активацією мікроглії. Було показано, що в ранній термін моделювання ішемічних ушкоджень головного мозку мікрогліальні клітини у перинфарктній зоні експресують S-100 і активно проліферують, причому білки експресуються не більше трьох днів після моделювання ішемії. Це говорить про те, що активація постійної популяції мікроглії є ранньою відповіддю мозкової тканини на ішемію і може бути використана як ранній маркер ураження [27].

Галанін (імуногістохімія, імуноферментний аналіз, імуноблот) — пептид, що містить 30 амінокислотних залишків, є нейропептидом, маркером функціональної активності нервової тканини. Синтезується в центральній і периферичній нервовій системі, інгібує секрецію трансмітерів з нейронів, відіграє трофічну роль у нервовій системі, поліпшуючи виживання нейронів після ураження, є нейропротектором [5, 18, 38].

Фосфорильований нейрофіламент Н (pNF-H) (імуноферментний аналіз, імуноблот) pNF-H — чутливий маркер ураження аксонів. Нейрофіламенти становлять основну частину цитоскелету нейронів. Трьома основними білками нейрофіламентів є NF-L, -М і -Н. Особливо висока їхня концентрація в аксонах. Білок NF-H має деякі унікальні властивості. В аксональних нейрофіламентах серинові залишки цього білка, що містяться у повторах лізин-серино-пролін, сильно фосфорильовані. Ці форми NF-H (pNF-H) стійкі до дії протеаз після виходу з ушкоджених аксонів. Відповідно, визначення цього білка в плазмі може надавати інформацію про ступінь аксонального ушкодження [18].

Гліальний фібрилярний кислий протеїн (GFAP)N(імуноферментний аналіз). GFAP є членом родини білків цитоскелету і являє собою основний 8-9 нм проміжний філамент у зрілих астроцитах ЦНС. Це високо специфічний білок мозку, що не виявляється за межами ЦНС. Було показано, що GFAP дуже швидко вивільняється в кров після ішемічного ураження головного мозку (може бути маркером тяжкості ураження і прогностичним фактором). У ЦНС після ураження астроцити в результаті типового поведіння відповідають астрогліозом. Астрогліоз характеризується швидким синтезом GFAP. Завдяки ішсокій специфічності і ранньому вивільненню з ЦНС після ішемічного ураження мозку,

GFAP може виявитися дуже корисним раннім маркером деструкції [12, 18, 31].

Маркери нейропластичності

Нейротропін-3 (NT3) і нейротропін-4/5 (NT4/5) NEW (імуногістохімія, імуноферментний аналіз, імуноблот)

Родина нейротропінів включає: фактор росту нервів (ИСР), нейротрофічний фактор головного мозку (ВБОТ), NT3 і NT4/5. Вони підтримують різні популяції нейронів. NT — це секретовані білки, які виявляються у кровотоку і здатні подавати окремим клітинам сигнали на виживання, диференціювання або ріст. NT діють, запобігаючи ініціації апоптозу у нейроні. Вони також індукують диференціювання клітин-попередників, утворення нейронів. NT відіграють важливу роль у функціонуванні нервової системи, у регенерації ушкоджених нейрональних структур. Хоча в мозку ссавців переважна більшість нейронів формується у процесі ембріонального розвитку, мозок дорослих частково зберігає здатність до нейрогенезу — утворення нових нейронів з нейрональних стовбурових клітин. NT контролюють і стимулюють цей процес. Трофні (забезпечення виживання) і тропні (регуляція росту аксонів) властивості NT є підставою для можливого їх використання у лікуванні різних типів нейродегенеративних захворювань, таких як хвороби Альцгеймера, Паркінсона й Гентінгтона, а також периферичних нейропатій різного генезу. NT3 — це фактор росту з м.м. 13,6 кДа (м.м. активної форми димеру — 27.2 кДа). NT3 відіграє роль у розвитку симпатичної нервової системи. У мишей підвищені рівні NT3 виявлені у симпатичних гангліях і органах при гіперіннервації та при спонтанній гіпертензії. NT3 здатний стимулювати найбільшу кількість популяцій нейронів, оскільки він активує два із трьох тирозинкіназних рецепторів NT (TrkC і TrkB). NT4/5 запобігає загибелі рухових нейронів у перинатальному і постнатальному періодах. Дія NT4/5 реалізується в основному через TrkB тирозинкіназний рецептор [5, 12, 18].

Експресія білка c-fos, c-jun у головному мозку (гістоімунохімічний метод, імуноблотинг) належить до так званих генів раннього реагування. Вони активуються у перші години ішемії. Гіперекспресія вказаних генів — одна з перших реакцій геному. Білки c-fos і c-jun як прямо, так і опосередковано приймають у частку у процесі фрагментації ДНК та ініціюванні процесів апоптотичної загибелі клітини. Рядом експериментальних досліджень виявлено прямий зв'язок експресії генів c-fos, c-jun з індукцією механізмів апоптозу нейрональної клітини, за рахунок впливу даних факторів транскрипції на експресію індукцибельної NO-синтази, і як результат — гіперекспресію NO. NO, у свою чергу, стимулює процеси апоптозу, за рахунок свого активуючого впливу на фактори p53, Вах, каспази і кінази JNK. Крім того, c-fos був одним із перших генів, для продукту якого була показана участь у регуляції транскрипції. Цей ядерний ген являє собою одну з основних ядерних мішеней для передачі сигналів регуляції клітинного росту і трансформації, залучений у безліч клітинних функцій, у тому числі — в процесі клітинної проліферації та диференціювання. Визначення даних факторів транскрипції дозволяє прогнозувати перебіг патологічного процесу, а також оцінити дію потенційних нейропротекторів [3, 5, 11, 18, 40].

Експресія/концентрація білків теплового шоку у головному мозку (імуногістохімія, імуноблот, імуноферментний аналіз)

В еволюційному відношенні Hsp відносяться до висококонсервативних білків і виявляються в усіх організмах — від бактерій до людини. Це свідчить про те, що вони виконують фундаментальні клітинні функції. Як цитопротекторні властивості стрес-білків, так і їхня роль у процесах нормальної життєдіяльності клітини багато в чому визначається тим, що ці білки є шаперонами. Шаперони — це білки, які полегшують формування вторинної і третинної структури інших білків. Hsp також беруть участь у процесах репарації або елімінації неправильно згорнутих чи денатурованих білків. Відповідно до сучасної класифікації виділяють сім (останнім часом мова йде навіть про вісім) типів sHsp, які розділяють або за м.м., або за їхніми функціями у клітині. Розрізняють малі Hsp (small Hsp, sHsp) з м.м. 25/27 кДа, 22 і 20 кДа, а також нисокомолекулярні Hsp

110, 100, 90, 70, 60, 40. За характером синтезу Hsp (як і NO-синтаза) поділяються на конститутивні та індукцйбельні. Конститутивні Hsp синтезуються у клітині постійно, і для їхньої активації не потрібен вплив на клітину пошкоджуючого фактора, тобто, їхній синтез при стресі не збільшується. Синтез індукцйбельних Hsp починається незадовго після впливу на клітину ушкоджуючого агента [5, 11, 18-23/36].

Індукцйбельний Hsp70 (імуногістохімія, імуноблот, імуноферментний аналіз) — це білок, експресія якого активується при потраплянні клітини або організму в умови стресу. Hsp70 необхідний нейрональним клітинам для клітинного відновлення, виживання і забезпечення нормальних клітинних функцій. Він також є молекулярним шапероном, що запобігає агрегації білків і відновлює ушкоджені білки у відповідь на клітинний стрес, викликаний несприятливими впливами навколишнього середовища, ішемією. Зараз проводиться пошук потенційних нейропротекторів, здатних підсилювати експресію HSP з метою застосування їхніх нейропротективних можливостей для терапевтичних цілей [5, 15, 36].

Гіпоксія-індукцйбельний фактор 1 α (HIF-1 α) (імуногістохімія, імуноблот, імуноферментний аналіз) — є транскрипційним фактором. Вперше був ідентифікований як регулятор експресії еритропое-тину. HIF вважається провідним транскрипційним регулятором генів ссавців, відповідальним за реакцію на брак кисню, і активується у фізіологічно важливих місцях регуляції кисневих шляхів, забезпечуючи швидкі й адекватні відповіді на гіпоскічний стрес [5, 32, 34, 36].

Нейротрофічний фактор головного мозку (BDNF) (імуногістохімія, імуноферментний аналіз, імуноблот) зріла молекула BDNF ссавців має молекулярну масу 13 кДа і складається зі 119 амінокислотних залишків. Ідентичність структури BDNF у різних ссавців потенційно дозволяє використовувати як імуноферментне, так і імуногістохімічне визначення для різних видів тварин. Функціональна активність BDNF досить велика. У період розвитку він бере участь у диференціюванні нейронів, дозріванні, виживанні та формуванні синапсів. У дорослому організмі основна функція BDNF —

нейропротекція, захист нейронів головного мозку від ішемічних атак і мотонейронів від загибелі, індукованої видаленням аксонів [2, 5, 11, 12, 13, 18, 31].

Циліарний нейротрофічний фактор (CNTF) (імуногістохімія, імуноферментний аналіз, імуноблот) CNTF відноситься до обмеженої родини нейропоетичних цитокінів, що включає інгібуючий фактор лейкемії (LIF) та онкостатин М (OSM). CNTF розглядається як ключовий фактор диференціювання для нейронів, що розвиваються, і гліальних клітин. CNTF забезпечує трофіку і бере участь у захисті ушкоджених або аксонотомованих нейронів. Інтерес до вивчення CNTF викликаний його властивістю сприяти виживанню нейронів [2, 5, 18, 24,25].

Пігментний фактор епітеліального походження (РЕБР)N(імуногістохімія, імуноблот) PEDF — це глікопротеїн з м.м. - 50 кДа, що має безліч біологічних функцій. Це нейропротективний і нейротрофічний фактор, що впливає на різні типи нейронів. Показано, що PEDF виступає сильним активатором нейронального диференціювання клітин ретинобластоми. На птахів і мишах показано, що він забезпечує виживання і диференціювання рухових нейронів спинного мозку, які розвиваються, підтримує нормальний розвиток фоторецепторного нейрона земноводних і експресію опсину за відсутності клітин пігментного епітелію сітківки (RPE). У щурів PEDF є чинником виживання зернистих нейронів мозочка, захищаючи їх від апоптозу і нейротоксичності глутамату. Він також захищає рухові нейрони і нейрони гіпокампа, що розвиваються, від дегенерації, індукованої глутаматом. На культурах клітин було показано, що він охороняє нейрони сітківки ока від загибелі, індукованої перекисом [2, 12, 17, 18, 38].

Маркери апоптозу

Анексин V (імуногістохімія, імуноблот) — відомий як плацентарний антикоагулянтний протеїн (PAF I), не тільки належить до родини Ca-залежних білків, що зв'язують фосфоліпіди, але також є можливим судинним антикоагулянтним протеїном. Біохімічні зміни при апоптозі включають транслокацію фосфатидилсерину (PS) з внутрішньої сторони плазматичної

мембрани. Локалізація PS на поверхні мембрани спостерігається, починаючи з ранньої стадії апоптозу до повної деградації клітини. Анексин V з високою афінністю зв'язується з експонованим на поверхні апоптотичних клітин PS та інгібує прокоагулянтну і прозапальну активності клітин, які гинуть [5, 18].

Каспаза-3 (імуногістохімія, імуноблот, імуноферментний аналіз) розщеплює субстрат на карбоксильному кінці по залишках аспартату. Активна каспаза-3 має два активних сайти і складається з двох однакових великих (~20 кДа) і двох однакових малих (~10 кДа) субодиниць, що походять з двох поліпептидів-попередників. Каспаза-3 протеолітично активується іншими каспазами. Вона, разом з каспазами -8 і -9, належить до центрального комплексу шляхів апоптозу [5].

Катепсини (імуногістохімія, імуноблот, імуноферментний аналіз) - група протеаз, представлена як мінімум 15 білками. Більшість цих протеаз виявлена у лізосомах різних типів клітин, вони активуються при низьких значеннях рН і відповідають за деградацію білкових молекул [38].

Прокатепсин-В N (імуногістохімія, імуноблот, імуноферментний аналіз) Прокатепсин В складається з 339 АК залишків: сигнального пептиду (1-17), ділянки ланцюга попередника (18-79) і основного ланцюга (80-333). Активна форма катепсину В активує каспази, проренін, інакти-вує секреторний інгібітор лейкоцитарних протеаз (SLPI). До найважливіших біологічних функцій катепсину-В відносять активацію апоптозу, регуляцію ангіотензин-ренінової системи. Катепсином-В і -L відводиться ключова роль у формуванні ЦНС; так, миші з комбінованим дефіцитом цих протеаз характеризуються нейрональною недостатністю, атрофією головного мозку і гинуть у 2-4 тижневому віці [18, 31, 38].

DR5 (Death Receptor) (імуногістохімія, імуноблот) «Рецептори смерті» (DR) містять цитоплазматичні домени смерті DD (death domain), які, зв'язуючись з лігандом смерті, залучають адапторні білки, що містять домени DD і домен виконавця смерті — DED (death eff ector domain). Взаємодія DED доменів адаптора і прокаспази приводить до аутопротеолітичної активації та включення

каспазного каскаду [28, 29].

Родина Bcl-2 (імуногістохімія, імуноблот). Родина клітинних білків Bcl-2 налічує 17 членів. Білки родини Bcl-2 проявляють широкий спектр активності від інгібування апоптозу до його індукції. Родина включає в себе субродини, які відрізняються структурно і функціонально: субродина найближчих гомологів Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w та ін.) — інгібіторів апоптозу; білки субродин Bax і BH3, промотори апоптозу. Апоптоз асоціюється з різними змінами в мітохондріях, включаючи вивільнення цитохрому-С у цитоплазму. Bcl-2-спорідне-ні білки включені у регуляцію цих змін шляхом формування каналів у мембрані, через які цитохром-С поступає у цитоплазму. При цьому Bcl-2 і Bcl-XL інгібують викид цитохрому-С, а Bax — стимулює. Однак Bcl-2 може інгібувати здатність Bax формувати канали. Крім того, Bcl-2 і Bcl-XL можуть зв'язувати цитохром-С безпосередньо і витіснити його з апоптосом, запобігаючи цим активації каспаз [2, 5, 11, 12,18, 40].

Цитохром-С (імуноферментний аналіз, імуногістохімія, імуноблот)
Цитохром-С — білок з м.м. 15 кДа, синтезується як апо-цитохром-С і надходить у мітохондрію, де зв'язується із внутрішньою поверхнею мембрани. Потім він виходить у цитоплазму через канали, які для нього відкривають білки родини Bcl. Цитохром-С необхідний для утворення апоптосом, де й відбувається активація каспази-9, яка потім активує каспазу-3. Так завершується сигнальний шлях апоптозу, викликаний ушкодженням ДНК [2, 5, 11, 18, 26].

Література

1. Чекман И. С. Антиоксиданты: клинико-фармакологический аспект / И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Н. А. Горчакова, Н. В. Бухтиярова // Украинский медицинский часопис. — 2014. — № 1 (99) — С. 22-28.
2. Гомазков О. А. Старение мозга и нейротрофины. — М.: Издательство ИКАР, 2011. — 93 с.
3. Медицина неотложных состояний/ Никонов В. В., Беленичев И. Ф., Бухтиярова Н. В., Феськив А. Э. — Донецк: Издатель Заславський, 2012. — 512 с.
4. Метаболитотропные препараты/Мазур И. А.,Чекман И. С, Беленичев И. Ф., Горчакова Н. А. — АМЛ /Ассоциация Медицинская Литература ЗАО : Москва, 2007. — 304 с.
5. Нейропротекция и нейропластичность// Беленичев И. Ф., Черний В. И. Бухтиярова Н. В., Павлов С. В., Горчакова Н. А. — Киев: Логос. — 2015. — 512 с.
6. Патент № 13165 України Спосіб визначення вмісту амінокислоти L-аргініну в біологічному матеріалі/ І. Ф. Беленічев, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтіярова . — МПК JOIN 33/48. — (UA). — № 200509264. -Заявл. 03.10.2005.
7. Патент № 13132 України Спосіб визначення активності ферменту NO-синтази в гомогенатах тканин/ І. Ф. Беленічев, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтіярова , МПК JOIN 33/48. — (UA). — № 200509119. — Заявл. 27.09.2005.
8. Патент № 17279 Спосіб визначення вмісту 8-гидроксигуаніну в сечі як маркера оксидативного пошкодження нуклеїнових кислот/ І. Ф. Беленічев, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтіярова. — МПК JOIN 33/52. — (UA). — № 200603501. — Заявл. 31.03.2006.
9. Патент № 37238 України Спосіб первинної нейропротекції в умовах моделювання ішемічних пошкоджень головного мозку/ І. Ф. Беленічев, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтіярова . — МПК 2006 С2 А61 К 31/55 А61К31/4196 № и 2008 06226 Заявл. 12.05.2008.
10. Продукты свободнорадикального перекисного окисления и методы их идентификации /Губский Ю. И., Беленичев И. Ф., Левицкий Е. Л.// Совр. пробл. токсикол. — 2002. — №4. — С. 9-14.
11. Рациональная нейропротекция / Беленичев И. Ф., Черний В. И.

Бухтиярова Н. В., Павлов С. В. — Донецк: Издательский Дом За-славского, 2008. — 264 с.

12. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты) / Семченко В. В., Степанов С. С., Боголепов Н. Н. — М.; Директ-Медиа, 2014. — 499 с.
13. Чекман И. С., Беленичев И. Ф., Бухтиярова Н. В., Горчакова Н. А. Ноотропы в комплексной терапии хронической ишемии мозга // Наука та інновації. — 2014. — №4. — С.61-74.
14. Чекман И. С., Беленичев И. Ф., Колесник Ю. М. Тиол-дисульфидное равновесие — определяющий фактор резистентности нейронов к нитрозирующему стрессу в условиях ишемии мозга // Журнал НАМИ України. — 2013, т. 19, № 1. — С. 3-11.
15. Эффективность нейропротекции при ишемическом инсульте. Нейропротекция при острой и хронической недостаточности мозгового кровообращения / Под редакцией А. А. Скоромца, М. М. Дьяконова. — Санкт-Петербург, 2007. — 312 с.
16. Arshad Majid Neuroprotection in Stroke: Past, Present, and Future // ISRN Neurology — 2014. — Vol. 14. — P. 1 — 18.
17. Anzilotti C., Vinciguerra A., Cuomo O. Ischemic tolerance modulates TRAIL expression and its receptors and generates a neuroprotected phenotype // Cell Death Dis. — 2014. — Vol. 5, № 7. — P. 1331-1339.
18. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects/ Mary C. McKenna, Rolf Gruetter, Ursula Sonnewald, Helle S. Waagepetersen, Arne Schousboe. — Elsevier, Inc., 2008. — 757 p.
19. Belenichev I. F, Pavlov S. V., Buchtiarova N. V. Disturbance of HSP70 Chaperone Activity is a possible mechanism of Mitochondrial Dysfunction // Neurochem. Journal. — 2011. — Vol. 5, № 4. — P. 251-256.
20. Belenichev I. F, Pavlov S. V., Buchtiarova N. V. Malate-aspartate shunt in neuronal adaptation to ischemic conditions: molecular-biochemical mechanisms of activation and regulation // Neurochemical Journal 2012. — №1, Vol. 29. — P. 28-34.
21. Belenichev I. F Reduction of apoptotic death of neurons CA-1 zone of hippocampus of rats in the condition of prenatal chronic alcoholisation by cerebrocurin and tiocetam // Elixir International Journal Elixir Pharmacy. — 2013. — № 65A. — P. 205-

208.

22. Belenichev I. F S. V, Bukhtiyarova N. V. The Thiol-Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow: The Therapeutic Effects of Nootropic Drugs// *Neurochemical Journal*. — 2014. — Vol. 8, No. 1. — P.24-27.
23. Belenichev I. F, Pavlov S. V, Buchtiarova N. V. Molecular and Biochemical Aspects of the Neuroprotective Effects of the Selective Estrogen Recertor Modulator Tamoxifen in a Model of Acute Ctrebral Ischemia// *Neurochemical Journal*. — 2014. — Vol. 8, № 1. — P. 28-32.
24. Carrillo-de Sauvage Maria-Angeles The neuroprotective agent CNTF decreases neuronal metabolites in the rat striatum: an in vivo multimodal magnetic resonance imaging study// *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism/2015/*. — Vol. 35. — P. 917-921.
25. CNTF gene therapy confers liflong neurpprotection in a mouse model of human retinits pigmentosa / Daniel M. Lipinski, Alun R. Barnard, Mandeep S. Singh// *Molecular Therapy* . — 2015. — Vol. 10. — P. 1038-1044.
26. Cytochrome C is Tyrosine 97 Phosphorylated by Neuroprotective Insulin Treatment/ Thomas H. Sanderson, Gargi Mahapatra, Petr Pecina, Qinqin Ji// *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8, № 11. — P. 78-86.
27. Dmytriyeva O., Pankratova S., Owczarek S. The metastasis-promoting S100A4 protein confers neuroprotection in brain injury// *Nat. Commun.* — 2012. — Vol. 12. — 2-1121.
28. Death Receptor Regulation and Celecoxib-Induced Apoptosis in Human Lung Cancer Cells/ Xiangguo Liu, Zhongmei Zhou, Fadlo R. Khuri // *JNCIJ Natl Cancer Inst.* — 2004. — Vol. 96, № 23. — P.1769-1780.
29. Death receptor 6 (DR6) antagonist antibody is neuroprotective in the mouse SOD1G93A model of amyotrophic lateral sclerosis/ G. Huang, X. Lee, Y. Bian , Z. Shao, G. Sheng// *Cell Death and Disease*. — 2013. — Vol. 4. — P. 841-852.
30. Halliwell B. *Molecular Biology of Free Radicals in Human*. - St. Lucia London: OICA Int., 1999. — 352 p.
31. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition/ Roger L. Lundblad, Fiona Macdonald*. — CRC Press, 2010. — 1098 p.
32. HIF-1 α is necessary for exercise-induced neuroprotection while HIF-2 α is needed

- for dopaminergic neuron survival in the substantia nigra pars compacta/ M. Smeyne, P. Sladen, Y. Jiao, I. Dragatsis, R. J. Smeyne// *Neuroscience*. — 2015. — Vol. 295. — P. 23-38.
33. Holvoet P. Endothelial dysfunction, oxidation of low-density lipoprotein, and cardiovascular disease// *Thromb. Haemostasis*. 1999. — Vol.3.— № 4. — P. 287-293.
34. Hypoxic preconditioning protection is eliminated in HIF-1 α knockout mice subjected to neonatal hypoxia-ischemia/ R. Ann Sheldon, Christina L. Lee, Xiangning Jiang, Renatta N. Knox// *Pediatric Research*. — 2014. — Vol. 76, № 10. — P. 46-53.
35. Methazolamide and Melatonin Inhibit Mitochondrial Cytochrome C Release and Are Neuroprotective in Experimental Models of Ischemic Injury/ Irina G. Stavrovskaya, Xin Wang// *Stroke*. — 2009. — Vol. 40, № 5. — P. 1877-1885.
- Kelly S., Yenari M.A. Neuroprotection: heat shock proteins// *Curr. Med. Res. Opin.* — 2012. — Vol. 18, № 12. — P. 55—60.
36. TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlates with angiogenesis/ Matsubara T., Kanto T., Kuroda S., Yoshio S.// *Hepatology*. — 2013. — Vol. 57, № 4. — P. 1416-1425.
37. Johnstone A. P. *Immunocytochemistry*. — Oxford: Oxford University Press, 1997.— 286 p.
38. VEGF-A165b Is an Endogenous Neuroprotective Splice Isoform of Vascular Endothelial Growth Factor A in Vivo and in Vitro/ Nicholas Beazley-Long, Jing Hua, Thomas Jehle, Richard P., Hulse, Rick Dersch, Christina Iehrling// *Am. J. Pathol.* — 2013. — Vol. 183, № 3. — P. 918-929.
39. Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K. Neurorescue effects of VEGF on a rat model of Parkinson s disease// *Brain Res*. — 2005. — Vol. 1053. — P. 10-18.
40. McGraw C. P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils / McGraw C. P.// *Arch. Neurol.* — 1977. — Vol. 34, N 6 . — P. 334-336.