

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Klinichna khirurgiia. 2020 May/June;87(5-6):71-78.
DOI: 10.26779/2522-1396.2020.5-6.71

Роль мітохондрій в ішемічно–реперфузійному пошкодженні головного мозку при операціях на дузі аорти в умовах експерименту

С. М. Граматюк¹, Ю. В. Іванова^{1,2}, В. І. Кравченко³, О. О. Логвіненко³

¹Інститут клітинної біореабілітації, м. Харків,

²Харківський національний медичний університет,

³Національний інститут серцево–судинної хірургії імені М. М. Амосова НАМН України, м. Київ

The role of mitochondria in the ischemic–reperfusion damage of the brain in operations on aortal arch in conditions of experiment

S. M. Gramatiuk¹, Yu. V. Ivanova^{1,2}, V. I. Kravchenko³, O. O. Lohvinenko³

¹Institute of Cellular Biorehabilitation, Kharkiv,

²Kharkiv National Medical University,

Amosov National Institute of Cardiovascular Surgery, Kyiv

Реферат

Мета. Дослідити в експерименті функціональний стан мітохондрій клітин головного мозку після його гострого ішемічного пошкодження і процеси, які відбуваються в головному мозку в умовах експериментальної ішемії/реперфузії; проаналізувати кореляцію досліджуваних станів з ішемічно–реперфузійними змінами в головному мозку хворих з аневризмою дуги аорти, оперованих в умовах гіпотермії й штучної церебральної перфузії.

Матеріали і методи. Першим етапом дослідження була оцінка стану мітохондрій клітин головного мозку в умовах ішемії/реперфузії первинної культури нейронів, отриманих з ембріонів щурів 17 – 18 діб гестації за допомогою механічної і ферментативної дисоціації кори головного мозку. Другий етап дослідження проведено на 14 білих щурах–самцях (*Rattus norvegicus*). У 7 тварин створювали ішемію/реперфузію головного мозку шляхом тимчасового механічного блокування кровоплину по судинах дуги аорти з наступним його відновленням, а саме: виконували торакотомію по нижньому краю III ребра для доступу до дуги аорти і магістральних судин та їх механічної оклюзії тривалістю 30 хв. Ще у 7 піддослідних тварин виконували лише торакотомію без впливу на церебральний кровоплин. Після виведення тварин з експерименту кров забирали з порожнини серця, головний мозок видаляли з черепної коробки за стандартною методикою. Після закінчення експерименту проводили МТТ–тест для оцінки життєздатності нейронів головного мозку. Оцінювали головні параметри функціонування мітохондрій, а також швидкість їх дихання у станах II і III за Чансом і дихальний контроль – відношення швидкості дихання у стані III до швидкості дихання у стані IV за Чансом. Оцінювали трансмембранний мітохондріальний потенціал у суспензії клітин головного мозку, визначали вміст лактату в головному мозку. Визначали активність лактатдегідрогенази в культуральному середовищі. Проводили імуноцитохімічне дослідження культур нейронів. Оцінювали мембранний мітохондріальний потенціал у культивованих нейронах. Вимірювали дихання ізольованих мітохондрій. Визначали енергетичний стан мітохондрій. Ступінь розвитку апоптотичних процесів визначали за ступенем фрагментації ДНК.

Результати. Встановлено, що показник дихального контролю мітохондрій ішемізованого мозку, виміряний при рН 7,4, був знижений більше ніж на 40% у порівнянні з відповідним показником мітохондрій контрольної культури. Швидкість повністю стимульованого дихання мітохондрій (стан III), які були виділені з головного мозку через 24 год після ішемії/реперфузії, була значно нижче, ніж швидкість дихання мітохондрій контрольних культур, що свідчить про пошкодження дихального ланцюга переносу електронів мітохондрій клітин при ішемії/реперфузії, а також про нездатність таких мітохондрій ефективно переносити електрони від субстратів окислення на кисень внаслідок пошкодження окремих комплексів електрон–транспортного ланцюга. Таким чином, в умовах ішемії відбувається одночасно декілька процесів, які впливають на функціонування мітохондрій та біоенергетику клітин. У результаті одночасної дії цих процесів функціонування мітохондрій порушується настільки виражено, що стає одним із ключових моментів дисфункції й загибелі клітин головного мозку. Статистично значущої різниці за результатами між обома досліджуваними групами тварин не було виявлено.

Висновки. В умовах ішемії/реперфузії головного мозку в його клітинах виникають значні порушення функції мітохондрій, які проявляються підвищенням генерації активних форм кисню, зниженням трансмембранного мітохондріального потенціалу й швидкості дихання мітохондрій на 40%, що супроводжується розвитком лактат–ацидозу. В комплексі лікувальних засобів при ішемії/реперфузії головного мозку доцільно використання мітохондріально–спрямованих антиоксидантів, а також роз'єднувачів дихання та окислювального фосфорилування.

Ключові слова: ішемія головного мозку; судини дуги аорти; аневризма дуги аорти; мітохондріальна дисфункція.

Abstract

Objective. To investigate in experiment a functional state of mitochondria from the brain cells after its acute ischemic injury and processes, which take place in the brain in conditions of experimental ischemia/reperfusion; to analyze a correlation of the states investigated with the ischemic–reperfusion changes in the brain of patients, having the aortal arch aneurism, operated in environment of hypothermia and artificial cerebral perfusion.

Materials and methods. First stage of the investigation consisted of estimation of the cerebral cells mitochondria state in conditions of ischemia/reperfusion of the neurons primary culture, obtained from embryos of rats of the 17 – 18 gestation days, using mechanical and the enzyme dissociation in the brain cortex. The second stage of the investigation was conducted on 14 white male rats (*Rattus norvegicus*). In 7 animals ischemia/reperfusion of the brain was simulated, using temporary mechanical blockade of blood flow along vessels of aortal arch with its subsequent restoration, as following: thoracotomy was performed along lower edge of the third rib, making surgical access to aortal arch and main vessels with their mechanical occlusion during 30 min. Additionally in 7 experimental animals thoracotomy only without impact on cerebral blood flow was performed. After extraction of animals from the experiment the blood was collected from the heart cavities, the brain was extirpated from the skull in accordance to standard method. After finishing of the experiment MTT–test was accomplished for estimation of vital capacity of the brain neurons. The principal parameters of the mitochondria functioning and velocity of their respiration in States II and III were estimated in accordance to Chance and in a respiratory control – a ratio of respiration velocity in a State III towards respiration velocity in a State IV in accordance to Chance. Transmembranous mitochondrial potential in cellular suspension, consisting of cells of the brain. Activity of lactate dehydrogenase in the culture environment was determined. Immunohistochemical investigation of the neurons culture was conducted. Membranous mitochondrial potential was estimated in the neurons cultivated. Respiration of isolated mitochondria was measured. Energetic state of mitochondria was determined. The development degree of apoptotic processes was determined in accordance to the DNA fragmentation degree.

Results. There was established, that index of respiratory control of mitochondria from the ischemized brain, measured in pH 7.4, was lowered more than by 40%, comparing with corresponding index of mitochondria, obtained from a control culture. Velocity of a completely stimulated respiration of mitochondria (State III), which were extracted from the brain in 24 h after ischemia/reperfusion, was significantly lower, than velocity of respiration in mitochondria of control cultures, witnessing presence of damage in respiratory chain and transition of electrons of cerebral cellular mitochondria in ischemia/reperfusion, as well as incapacity of such mitochondria to transit electrons effectively from oxidation substrate towards oxygen due to damage of some complexes of the electron–transporting chain. Thus, in conditions of ischemia several processes, impacting mitochondrial functioning and cellular bioenergetics, occur simultaneously. Due to simultaneous action of these processes the mitochondrial functioning fails so significantly, that becomes one of the key moments in cerebral cellular dysfunction and death. Statistically meaningful difference, taking into account the results, between two groups of investigated animals was not revealed.

Conclusion. In environment of ischemia/reperfusion of the brain in its cells a significant disorders of mitochondrial function occur, which are demonstrated by raising of generation of the oxygen active forms, and by lowering of transmembranous mitochondrial potential and velocity of mitochondrial respiration by 40%, what is accompanied by development of lactate–acidosis. It is expedient to apply a mitochondria–directed antioxidants in complex of the treatment measures in the brain ischemia/reperfusion, as well as desintegrators of respiration and oxidated phosphorylation.

Keywords: the brain ischemia; the aortal arch vessels; aortal arch aneurism; mitochondrial dysfunction.

Лікування захворювань аорти завжди було важливим й одночасно одним із найбільш важких завдань серцево–судинної хірургії. Обумовлено це не лише тим, що аорта виконує роль найбільшої та найважливішої артерії організму, а й тим, що захворювання аорти можуть мати найрізноманітніші форми з найрізноманітнішими наслідками – від повільно прогресуючої, безсимптомної хвороби до раптової смерті від розриву. Незважаючи на стрімкий розвиток хірургічної техніки, методик захисту головного мозку (ГМ) і внутрішніх органів, засобів моніторингу життєво важливих показників під час оперативного втручання, хірургічне лікування патології аорти дотепер пов'язане з високими ризиками і супроводжується значним рівнем операційної смертності [1 – 3].

Реконструктивну хірургію при розшаруваннях грудної частини аорти відносять до найскладніших операцій у кардіохірургії [4, 5]. Важливим аспектом хірургії розшарувань висхідної частини і дуги аорти є забезпечення екстракорпорального кровообігу, захисту ГМ та вісцеральних органів. Але й досі немає консенсусу у відношенні методів церебральної і вісцеральної протекції [6].

У зв'язку з цим необхідно вивчення фундаментальних патофізіологічних процесів, які є основою пошкодження

і механізмів захисту ГМ. Існує потреба в розробці нових підходів до терапії і профілактики гострих порушень ГМ.

У дослідженнях останніх років чітко визначено, що порушення редокс–гомеостазу в клітинах і тканинах та розвиток оксидативного стресу (ОС) є провідною причиною патогенетичних чинників розвитку захворювань ГМ. При цьому мітохондрії відіграють центральну роль у багатьох сигнальних шляхах, які беруть участь як у пошкодженні ГМ, так і в його захисті [7]. У пошуку і вивченні ефективності нових стратегій мітохондрії розглядають як центральну ланку патогенезу розладів, які відбуваються у ГМ.

Мета дослідження: вивчити в експерименті функціональний стан мітохондрій клітин ГМ після його гострого ішемічного пошкодження і процеси, які відбуваються в ГМ в умовах експериментальної ішемії/реперфузії.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконано в два етапи. На першому етапі (in vitro) на культурах клітин ГМ оцінювали стан мітохондрій в умовах ішемії/реперфузії. На другому етапі використано 14 білих щурів–самців (*Rattus norvegicus*) із масою тіла 200 – 280 г, які утримувались у віварії в умовах 12–годинного світлового дня, кімнатної температури повітря

(+20 – +22 °C), вологості не більше 50% і вільного доступу до води та їжі. Тварин в експерименті використовували згідно з правилами, регламентованими Європейською конвенцією з нагляду і захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директивою Ради 86/609/ЄЕС від 24 листопада 1986 р. та розпорядженням МОЗ УРСР №32 від 22 лютого 1988 р. Оперативні втручання виконували в умовах експериментальної операційної під кетаміновим наркозом (12,5 мг/100 г маси тіла внутрішньом'язово). З експерименту тварини виводили шляхом декапітації. Індукцію ішемії/реперфузії головного мозку (ІРГМ) здійснювали шляхом виконання торакотомії по нижньому краю III ребра, що забезпечувало доступ до дуги аорти і магістральних судин, які відходять від неї (плечоголовний ствол, ліва підключична артерія, ліва загальна сонна артерія). Під судини проводили турнікети, після зняття яких відновлювалась перфузія ГМ. Тривалість оклюзії судин – 30 хв. Торакотомну рану вшивали пошарово. Під час операції температура тіла тварин підтримувалась на рівні (37,0 ± 0,5) °C за рахунок зовнішнього джерела тепла. Тварин виводили з експерименту через 72 год після моделювання патологічного стану (в умовах кетамінового наркозу). Кров забирали з порожнини серця, ГМ видаляли з черепної коробки за стандартною методикою.

Тварин розподілили на дві групи: 1-ша (контрольна) – 7 тварин, у яких виконували торакотомію і вшивання торакотомної рани без впливу на церебральний кровоплин; 2-га (експериментальна) – 7 тварин з ІРГМ.

Первинну культуру нейронів отримували з ембріонів щурів 17 – 18 днів гестації за допомогою механічної і ферментативної дисоціації кори ГМ відповідно до протоколу Бревера. Умови ішемії *in vitro* моделювали в такий спосіб: культивовані клітини двічі відмивали збалансованим сольовим розчином (NaCl 116 мМ, KCl 5,4 мМ, CaCl₂ 1,8 мМ, MgSO₄ 1 мМ, NaH₂PO₄ 1 мМ, рН 7,30), після чого утримували в камері з азотом при температурі 37 °C протягом 5 год. Метаболічні показники враховували через 2, 6, 12 і 24 год після моделювання патологічного стану. Для створення хімічної гіпоксії використовували первинну культуру нейронів кори ГМ (нейробласти), витриману протягом 7 днів. У моделі використовували розчини CaCl₂ з концентрацією 0,4, 0,8, 1,6 і 3,2 мМ у нейробазальному середовищі з 2% вмістом В-27 без антиоксидантів і 1% розчин глутаміну. Після закінчення експерименту проводили МТТ-тест для оцінки життєздатності нейронів. Для контрольних культур умови культивування в ході дослідження не змінювали.

Мітохондрії з клітин ГМ виділяли відповідно до протоколу, описаного Сімсом і співавторами.

Концентрацію лактату в культуральному середовищі вимірювали на біохімічному аналізаторі А25 (BioSystems, Іспанія) з використанням набору Hospitecs Diagnostics. Активність лактатдегідрогенази в культуральному середовищі виявляли за допомогою набору для визначення пірувату (Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцарія) на біохімічному аналізаторі А25 (BioSystems, Іспанія). Проводили імуноцитохі-

мічне дослідження культур нейронів. Внутрішньоклітинний рівень активних форм кисню (АФК) вимірювали з використанням флуоресцентного зонда 2,7-діхлородігідрофлуоресцеїну (2,7-DCF DA). Флуоресценцію DCF детектували за допомогою конфокального мікроскопа і планшетного флуориметра. Мембранний мітохондріальний потенціал у культивованих нейронах оцінювали за допомогою флуоресцентної мітки JC-1 1 мкМ, яка формує J-агрегати (червоний спектр флуоресценції) при високих значеннях мембранного потенціалу та світиться в зеленому діапазоні при низьких значеннях мембранного потенціалу. Мікроскопічне випромінювання клітин вимірювали на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 (Carl Zeiss, Німеччина). Цитофлуориметрію проводили за допомогою магнітного сепаратора клітин із магнітними мітками AutoMACS. Дихання ізольованих мітохондрій вимірювали кисневим електродом Кларка (Oroboros, Австрія) за допомогою стандартного полярографічного методу при температурі 25 °C з використанням програмного забезпечення DataLab Acquisition 1.2 (Oroboros, Австрія). Енергетичний стан мітохондрій визначали за методом Чанса.

Трансмембранний мітохондріальний потенціал у спенсії клітин ГМ оцінювали флуоресцентним методом.

Вміст лактату в ГМ щурів визначали з використанням діагностичного набору фірми «Вектор-Бест» (Україна).

Ферментативну активність у зразках тканин ГМ визначали спектрофотометричним методом в одиницях (Од.) ферментативної активності на грам маси тканини мозку, мілілітр сироватки та у вигляді відносної активності. Використовували спектрофотометр Hitachi U-1900 із програмним забезпеченням.

Ступінь розвитку апоптотичних процесів визначали за ступенем фрагментації ДНК. Тотальну ДНК виділяли за допомогою набору реагентів «К-Сорб» (Сінтол, Росія). Фрагментацію ДНК оцінювали за допомогою електрофорузу зразків в агарозному гелі з використанням тріс-ацетат-ЕДТА буфера.

Активність каспази-3 і каспази-8 аналізували колориметричним методом за допомогою набору реактивів Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric і Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric (BioVision, США) відповідно до інструкцій.

Для аналізу інтенсивності процесів вільного окислення (ВО) використовували метод хемілюмінесценції, індукований залізом і пероксидом водню. Вимірювали активність вільнорадикальних процесів із використанням біохемілюмінометра БХЛІ-07М з програмним забезпеченням. Кінетичну криву біохемілюмінесценції реєстрували протягом 30 с й аналізували такі показники: світлосуму хемілюмінесценції (S), інтенсивність спалаху (Imax), які характеризують інтенсивність ВО, а також тангенс кута нахилу дотичної до кривої (tgα2), який відображає загальну антиоксидантну активність.

Для оцінки вмісту дієнових кон'югатів (ДК) використовували спектрофотометричний метод.

Окислювальну модифікацію білків оцінювали за допомогою біуретового методу.

Результати

Оцінювали головні параметри функціонування мітохондрій, а також швидкість їх дихання у станах II і III за Чансом і дихальний контроль – відношення швидкості дихання у стані III до швидкості дихання у стані IV за Чансом.

Встановлено, що показник дихального контролю мітохондрій ішемізованого ГМ, виміряний при рН 7,4, був знижений більше ніж на 40% у порівнянні з відповідним показником мітохондрій контрольної культури (рис. 1).

Швидкість повністю стимульованого дихання мітохондрій (стан III), які були виділені з ГМ через 24 год після ішемії/реперфузії, була значно нижче, ніж швидкість дихання мітохондрій контрольних культур (рис. 2). Це свідчить про пошкодження дихального ланцюга переносу електронів мітохондрій клітин при ішемії/реперфузії, а також про нездатність таких мітохондрій ефективно переносити електрони від субстратів окислення на кисень через пошкодження окремих комплексів електрон-транспортного ланцюга.

Таким чином, експериментальні дані, отримані на першому етапі дослідження, вказують на тяжке пошкодження мітохондрій клітин ГМ при ішемії/реперфузії, яке супроводжується накопиченням лактату, що спричиняє підвищення рН внутрішньо- і позаклітинного просторів. Ураховуючи той факт, що мітохондрії є не тільки генератором енергії, а й регуляторами багатьох сигнальних шляхів у клітинах, у тому числі клітинної загибелі, ми вивчили

ли можливість змін функції мітохондрій в умовах ішемії.

Нами були оцінені параметри дихання мітохондрій клітин ГМ при різних значеннях рН середовища для інкубації мітохондрій. Швидкість дихання у станах III і IV за Чансом і показники дихального контролю вимірювали при рН 7,4 і рН 6,8, що відповідало ацидозу *in vivo*.

При інкубації мітохондрій, які було виділено з контрольної культури нейронів при нейтральному рН (нормальний стан) та рН 7,4 (стан ішемії), було виявлено зміни в біоенергетиці мітохондрій – зниження показників дихального контролю, а також швидкості нестимульованого та максимально стимульованого дихання (рис. 3).

Таким чином, в умовах ішемії відбувається одночасно декілька процесів, які впливають на функціонування мітохондрій та біоенергетику клітин. З одного боку, значно порушується функціонування мітохондрій, знижується швидкість та ефективність переносу електронів по дихальному ланцюгу, а також внаслідок пошкодження мембран мітохондрій відбувається часткове роз'єднання дихання, у результаті чого знижується синтез аденозинтрифосфату (АТФ). З іншого боку, зниження рН знижує ефективність окислювального фосфорилування. У результаті одночасної дії цих процесів функціонування мітохондрій порушується настільки виражено, що це стає одним із ключових моментів дисфункції і загибелі клітин ГМ.

На другому етапі експериментального дослідження було встановлено, що ІРГМ сприяла підвищенню рівня лактату в тканині ГМ щурів до $(5,7 \pm 1,1)$ мМ. У щурів контрольної групи цей показник становив $(1,8 \pm 0,02)$ мМ.

Дослідження показало зростання інтенсивності процесів ВО у щурів з ІРГМ. Так, у цих тварин збільшувалися показники біохемілюмінесценції. Зокрема, показники S , I_{max} і $tg\alpha 2$ у ГМ тварин підвищувалися відносно контрольних значень у 2,3, 2,1 і 2,5 рази відповідно, а в сироватці крові – у 2,3, 2,2 і 2,4 рази відповідно (табл. 1). Поряд із цим ІРГМ була пов'язана із накопиченням первинних продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – ДК, концентрація яких у ГМ тварин зростала у 2,6 рази, а в сироватці крові – у 1,7 рази відносно контрольних значень (табл. 2). Інтенсифікація процесів ВО призводила також до накопичення білків, які зазнали окислювальної модифікації.

При ІРГМ зростали рівні мРНК факторів NF- κ B і HIF-1 у ГМ тварин відповідно у 1,7 і 3,5 рази відносно контрольних значень (табл. 3).

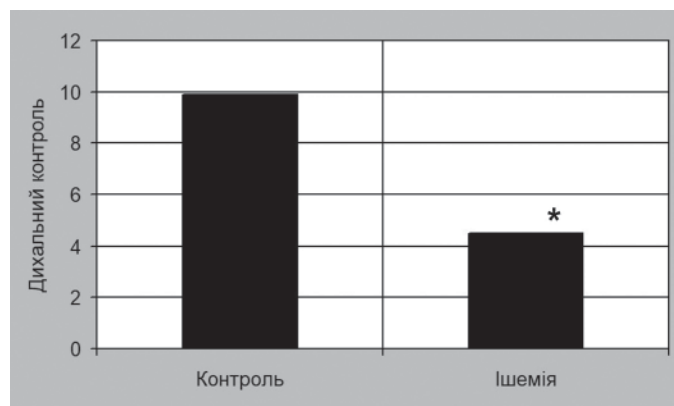


Рис. 1.

Показники дихального контролю мітохондрій контрольних культур і мітохондрій ішемізованого ГМ (* – $p < 0,05$, T-тест Ст'юдента. Те саме на рис. 3).

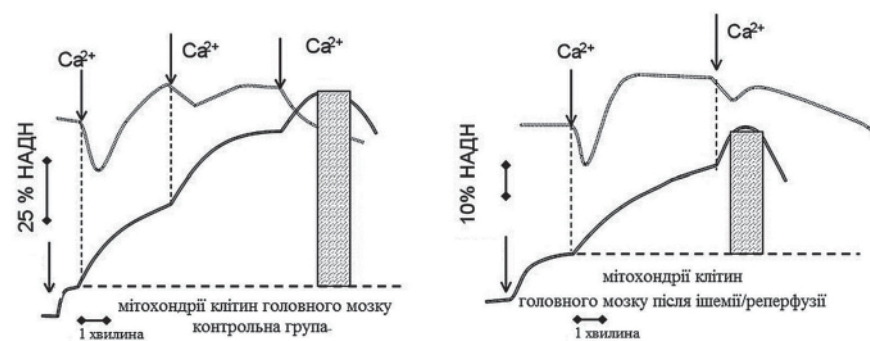


Рис. 2.

Полярографічні криві дихання мітохондрій.

Таблиця 1. Показники біохемілюмінесценції у ГМ та сироватці крові щурів з ІРГМ ($\bar{x} \pm m$)

Група тварин	ГМ			Сироватка крові		
	S, мВ/с	I _{max} , мВ	tga2	S, мВ/с	I _{max} , мВ	tga2
1-ша (n=7)	11,66 ± 0,46	1,72 ± 0,06	1,93 ± 0,07	33,10 ± 1,35	6,12 ± 0,21	1,09 ± 0,04
2-га (n=7)	26,85 ± 0,71*	3,68 ± 0,12*	4,75 ± 0,14*	58,99 ± 2,80*	13,61 ± 0,45*	2,63 ± 0,09*
<i>Примітка.</i>	* - відмінності від контрольної групи достовірні (p<0,05). Те саме в табл. 2 – 8.					

Таблиця 2. Показники ОС у щурів з ІРГМ ($\bar{x} \pm m$)

Групи тварин	Досліджувані об'єкти	Показники			
		Концентрація ДК, мМ	Концентрація окислених амінокислотних залишків, нМ/мг білка	Активність аконітатгідрогенази, Од./мл	Концентрація цитрату, мМ
1-ша (n=7)	Мозок	5,5±0,3	0,08±0,004	2,25±0,71	0,25±0,12
	Сироватка крові	10,1±1,6	0,1±0,05	1,1±0,3	0,42±0,006
2-га (n=7)	Мозок	14,4±2,3*	0,041±0,003*	0,71±0,22*	0,75±0,11*
	Сироватка крові	16,8±1,8*	0,16±0,1*	0,51±0,15*	1,3±0,6*

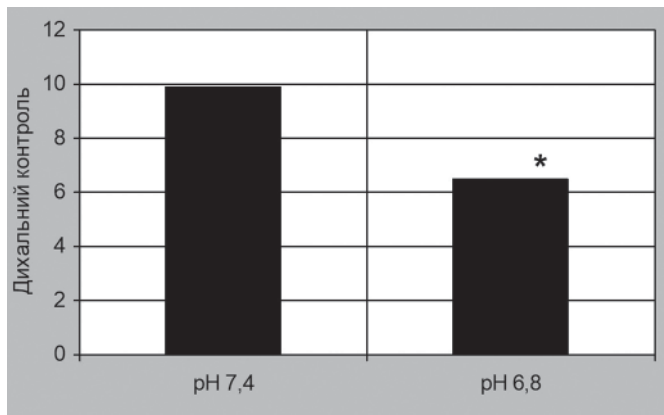


Рис. 3.
Показники дихального контролю мітохондрій, інкубованих при pH 7,4 і pH 6,8.

Відомо, що після ішемії відбуваються фосфорилування та активація ІККβ – регулятора фактора NF-κB. ІККβ у свою чергу фосфорилує фактор ІκBα і сприяє його протеолізу, результатом чого є вивільнення та транслокація в ядро фактора NF-κB, де він підсилює експресію прозапальних цитокинів [7]. Оприлюднені дані про взаємозв'язок шляхів, контрольованих факторами NF-κB і HIF. Субодиниці NF-κB p50 і p65 можуть безпосередньо взаємодіяти з консенсусним сайтом NF-κB на промоторі HIF-1α і сприяти зростанню базальних рівнів мРНК та білка HIF-1 у деяких моделях патологій [8]. Крім цього, експресія гена HIF-1α на рівні трансляції може активуватися в умовах гіпоксичних станів NF-κB незалежним шляхом [9]. Як показали наші дослідження, у тварин з ІРГМ збільшувалася кількість мРНК HIF-1α. HIF-1 функціонує як головний регулятор гомеостазу кисню, контролюючи як його доставку, так і споживання. HIF-1 є гетеродимером, який складається з O₂-регульованої субодиниці HIF-1α і конститутивно експресованої субодиниці HIF-1β. Альфа-су-

Таблиця 3. Рівні транскриптів генів у щурів з ІРГМ ($\bar{x} \pm m$)

Групи тварин	Транскрипти генів (од.)	
	HIF-1	NF-κB
1-ша (n=7)	1,0±0,06	1,0±0,04
2-га (n=7)	3,54±0,2*	1,7±0,4*

бодиниці деградують під час нормоксії головним чином через протеазно-залежний шлях після гідроксилювання двох залишків проліну пролін-гідроксилазами. Під час гіпоксії ці ферменти зазнають інгібування, субодиниця HIF-1α накопичується, димеризується з HIF-1β і активує експресію генів-мішеней HIF. Транскрипція активується шляхом зв'язування цього фактора з основною ДНК-послідовністю 5'-RCGTG-3' (R = A або G), яка вбудована в елемент, відповідальний за гіпоксію (hypoxia response element – HRE) [9, 10].

Серед мішеней HIF представлені гени, які беруть участь у ангиогенезі і відновленні тканин, такі як фактор росту

Таблиця 4. Активність каспаз у щурів з ІРГМ ($\bar{x} \pm m$)

Групи тварин	Активність фермента (пМ рНА/хв/мг білка)	
	каспаза-3	каспаза-8
1-ша (n=7)	0,19±0,04	0,21±0,07
2-га (n=7)	0,33±0,05* (до ВІПК)	0,34±0,03*
	0,22±0,09** (після ВІПК)	0,21±0,05**
<i>Примітка.</i>	** - відмінності від показників до ВІПК достовірні (p < 0,05).	

Таблиця 5. Функціонування СОД і каталази в тканині ГМ щурів з ІРГМ ($\bar{x} \pm m$)

Групи тварин	Показники			
	активність СОД		активність каталази	
	ум.од./г маси тканини	ум.од./мл сироватки крові	ум.од./г маси тканини	ум.од./мл сироватки крові
1-ша (n=7)	3,5±0,06	0,62±0,07	0,15±0,07	0,11±0,06
2-га (n=7)	11,8±0,12*	1,38±0,05*	0,36±0,05*	0,28±0,04*

ендотелію судин, еритропоетин, пропілгідроксілази [11]. NIF-1 також активує транскрипцію генів, що кодують ферменти, транспортери та мітохондріальні білки, які зменшують споживання кисню, функціонуючи як основний індуктор перемикання клітин з окислювального метаболізму на гліколітичний метаболізм. Активність NIF-1 регулюється за допомогою зміни рівнів мРНК та білка NIF-1 α в мозку, серці, нирках, легенях і скелетних м'язах [11, 12]. Опубліковані дані, що однією з адаптивних відповідей на сублетальний стрес є аутофагія, яка регулюється також фактором транскрипції NIF. Процес мітохондріальної аутофагії індукується гіпоксією і вимагає NIF-залежної експресії аутофагічних генів, що вказує на важливу роль цього фактора в метаболічній адаптації гіпоксичних або ішемізованих тканин в умовах дефіциту кисню [9, 12].

У ГМ тварин експериментальної групи активність каспази-3 та каспази-8 (ключових протеолітичних ферментів, які реалізують програму апоптозу) збільшувалася відносно контрольних значень на 67 і 66% відповідно. Проведення віддаленого ішемічного прекодиціонування (ВІПК) сприяло зниженню активності каспази-3 на 32%, а активності каспази-8 на 37% відносно відповідних показників до проведення ВІПК (табл. 4).

Таким чином, індукція ІРГМ пов'язана із зростанням активності каспази-3 і каспази-8. В основі такого явища може лежати ряд процесів. Зв'язування лігандів, таких як Fas, TRAIL і TNF- α , із прозапальними рецепторами призводить до їх тримеризації, що сприяє рекрутуванню

адаптивних білків, які містять домени смерті (наприклад, FADD і TRADD), для формування комплексу сигналізації, викликає клітинну смерть. Цей рецепторний комплекс запускає каспазу-8 – протеазу, яка активує каспазу-3 обмеженим протеолізом. Каспаза-3 гідролізує багато клітинних білків, викликаючи апоптоз [11]. Відомі також дані про те, що FOXO1, рівень якого в РНК був підвищений у тварин 2-ї групи, запускає у відповідь на окислювальний стрес експресію генів, пов'язаних з апоптозом, включаючи Vim, FasL, Puma та TRAIL, і викликає загибель нейронів при нейродегенеративних захворюваннях [13].

Моделювання ІРГМ у щурів супроводжувалося зростанням активності антиоксидантних ферментів. Так, активність супероксиддисмутази (СОД) і каталази зростала відносно контрольних значень у 3,4 і 2,4 разу відповідно. У перерахунку на мілілітр сироватки крові активність даних ферментів також зростала відносно показників контрольних тварин у 2,2 і 2,6 разу відповідно. Подібно змінювалася і питома активність СОД і каталази в умовах розвитку патології (табл. 5).

Поряд із зростанням активності ферментів у щурів з ІРГМ накопичувалися транскрипти генів SOD1 і CAT. У ГМ тварин експериментальної групи дані показники зростали щодо контролю у 2,2 і 1,8 разу відповідно (табл. 6). Прекодиціонування на тлі ішемії/реперфузії знижувало досліджувані параметри у 1,2 і 1,5 разу відповідно. Використання як протекторів ВІПК і фармакологічного прекодиціонування, а також пропофолу у тварин 2-ї групи сприяло у свою чергу зниженню рівнів транскриптів генів SOD1 і CAT у 1,2 і 1,4 разу відповідно щодо їх попередніх значень.

Таким чином, активізація досліджуваних компонентів антиоксидантного захисту мала адаптивний характер і відбувалася внаслідок розвитку однієї з важливих ланок патогенезу ішемії та реперфузії – ОС. В умовах зниження рН середовища відбуваються інтенсивна генерація продуктів ПОЛ і активація ОС.

Таблиця 6. Рівні транскриптів генів СОД1 і САТ у тканині ГМ щурів з ІРГМ ($\bar{x} \pm m$)

Групи тварин	Рівень транскриптів генів (відн. од.)	
	SOD1	CAT
1-ша (n=7)	1,0±0,07	1,0±0,07
2-га (n=7)	2,2±0,05*	1,55±0,03*

Таблиця 7. Показники глутатионової АОС щурів з ІРГМ ($\bar{x} \pm m$)

Групи тварин	Досліджувані об'єкти	Показники			
		активність			концентрація глутатиону відновленого, мМ
		ГП, Од./г маси; Од./мл	ГР, Од./г маси; Од./мл	ГТ, Од./г маси; Од./мл	
1-ша (n=7)	Тканина мозку	0,067±0,004	0,035±0,009	0,078±0,006	0,21±0,06
	Сироватка крові	0,055±0,003	0,021±0,004	0,025±0,003	0,27±0,02
2-га (n=7)	Тканина мозку	0,24±0,006*	0,145±0,004*	0,43±0,005*	0,45±0,08*
	Сироватка крові	0,011±0,007*	0,079±0,006*	0,087±0,004*	0,61±0,04*

Разом з тим певний вплив на зростання активності аналізованих ферментів у сироватці крові експериментальних тварин могло мати порушення бар'єрних властивостей клітинних мембран тканин ГМ при ішемії та реперфузії. Активність та рівні мРНК генів ферментів СОД і каталази зменшувалися, судячи з усього, внаслідок зниження навантаження на відповідні ланки антиоксидантної системи (АОС).

Проведені експериментальні дослідження показали, що у щурів з ІРГМ зростала активність глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР) та глутатіонтрансферази (ГТ) у ГМ відповідно у 3,3, 4,2 і 5,8 разу відносно контрольних показників (табл. 7), а також зростала концентрація глутатіону відновленого у ГМ та сироватці крові відповідно у 2 і 2,2 разу відносно контрольних показників.

У процесі функціонування глутатіонової АОС відбувається окислення глутатіону відновленого у ДП-реакції і подальше відновлення глутатіону окисленого під дією ГР. Як відновний еквівалент для регенерації глутатіону окисленого виступає НАДФН, основними постачальниками якого є ферменти глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (Г6ФДГ) і НАДФ-залежна ізоцитратдегідрогеназа (НАДФ-ІДГ). Як показали проведені експериментальні дослідження, індукція ІРГМ була пов'язана з активізацією цих ферментів: активність Г6ФДГ у тканині ГМ збільшувалась з $(0,11 \pm 0,04)$ до $(0,39 \pm 0,07)$ Од./г, у сироватці крові – з $(0,018 \pm 0,006)$ до $(0,049 \pm 0,002)$ Од./мл, а активність НАДФ-ІДГ – відповідно з $(0,08 \pm 0,04)$ до $(0,27 \pm 0,05)$ Од./г і з $(0,04 \pm 0,09)$ до $(0,11 \pm 0,05)$ Од./мл.

У регуляції функціонування АОС важливе місце відводять транскрипційному фактору Nrf2, який координує експресію ARE (antioxidant response element) місткових генів, включаючи СОД, ГП, НАДФН-хіноноксидоредуктазу, гем-оксигеназу-1, і багатьох ферментів, що беруть участь у продукуванні глутатіону, які можуть швидко реагувати на ОС і підтримувати окислювально-відновний баланс у клітинах. Істотну роль у багатьох фізіологічних процесах у нормі і при патології відіграють також редокс-чутливі транскрипційні фактори FOXO, що контролюють проліферацію та споживання клітин, прогресування клітинного циклу, відновлення ДНК, резистентність до ОС, енергетичний метаболізм і диференціювання клітин. Проведені дослідження показали, що у щурів з ІРГМ зростали у ГМ рівні транскриптів генів NRF2 і FOXO1 у 3,4 і 2,6 разу відповідно відносно контрольних значень (табл. 8).

Обговорення

Одним із завдань експерименту було дослідження мітохондріальної дисфункції, що виникає при ІРГМ. Дослідження проведені на первинних культурах, ізольованих мітохондріях і вітальних зрізах ГМ. На виділених мітохондріях було показано, що в результаті ІРГМ знижується швидкість й ефективність переносу електронів по дихальному ланцюгу мітохондрій, а також пошкоджуються мітохондріальні мембрани, відбувається часткове роз'єднання дихання, що може приводити до зниження синтезу

Таблиця 8. Рівні транскриптів генів NRF2 і FOXO1 у ГМ щурів з ІРГМ ($\bar{x} \pm m$)

Групи тварин	Рівні транскриптів генів, відн. од.	
	NRF2	FOXO1
1-ша (n=7)	1,0±0,06	1,0±0,04
2-га (n=7)	3,4±0,04*	2,6±0,037*

АТФ. Крім того, при ІРГМ знижується внутрішньоклітинний рН, що також впливає на функцію мітохондрій, знижуючи ефективність окислювального фосфорилування.

На експериментальній моделі ІРГМ in vivo нами показано підвищення рівня лактату, утворення якого в тканині ГМ свідчить про значну нестачу кисню в ГМ і, як наслідок, перехід клітин мозку на гліколітичний спосіб отримання енергії. Таким чином, підвищення рівня лактату може бути непрямим маркером процесу ішемії тканини ГМ і зміни шляху отримання енергії його клітинами. Зниження рН у клітинах ГМ у процесі гіпоксії/ішемії як патогенетичного механізму пошкодження клітин ГМ добре вивчено [8]. Однак питання походження іонів водню у процесі ішемії залишається дискусійним. Традиційна точка зору полягає в тому, що протони вивільнюються в процесі дисоціації молочної кислоти, утвореної в результаті гліколізу, даний процес отримав термін «лактат-ацидоз» [9]. Втім, якщо розглянути біохімічні шляхи отримання енергії в умовах гіпоксії та порівняти з паралельними процесами в клітині у відповідь на гіпоксію, то роль лактату як джерела протонів водню стає менш очевидною.

Тканина ГМ, яка зазнала ішемії, має досить складну біоенергетику. Брак кисню і субстратів окислювання змушує клітину використовувати наявні енергетичні (АТФ, С-реактивний білок, пірофосфат і поліфосфати) і поживні (глюкозу, амінокислоти, глікоген, жир) запаси, які в умовах гіпоксії здатні тільки до неокислювальних перетворень. З цієї точки зору, мітохондрії втрачають свою функціональність і єдиними джерелами енергії стають гліколіз і деякі неповні реакції з утворенням АТФ. Оскільки енергетична цінність гліколізу на порядок менше цінності окислювального фосфорилування, підтримання стабільного споживання енергії призводить до зниження рівня АТФ і підвищення рівня аденозиндифосфату (АДФ).

З точки зору хімічного механізму реакції, гідроліз АТФ пов'язаний із вивільненням одного атома водню, тобто ацидозом, а при синтезі АТФ на одну молекулу витраченого АДФ захоплюється один атом водню (відбувається залучення). Таким чином, зниження рівня АТФ у клітині автоматично супроводжується закисленням цитозолу. При гліколітичному перетворенні однієї молекули глюкози утворюються дві молекули молочної кислоти і дві молекули АТФ, цей процес пов'язаний з витратою двох протонів.

Також необхідно врахувати, що відновлення НАД+ супроводжується споживанням одного протона (при перетворенні глюкози в молочну кислоту утворюються дві молекули НАДН, що еквівалентно споживанню двох прото-

нів на одну молекулу спожитої глюкози). Протоногенні властивості молочної кислоти, можливо, не відіграють істотної ролі, оскільки це слабка кислота, не повністю дисоціюється з вивільненням протона. У зв'язку з цим існує думка, що не сам гліколіз, а зменшення рівня АТФ і збільшення рівня АДФ, що супроводжується закисненням, є причиною закиснення середовища в ураженій ішемією тканині. Зокрема, ацидоз може бути обумовлений тим, що у разі нестачі кисню внутрішньоклітинний АТФ бере участь в обігу реакції мітохондріальної АТФ-синтази для підтримки мембранного потенціалу мітохондрій [10].

Відомо, що підтримка трансмембранного потенціалу мітохондрій життєво необхідна для клітини і зниження його рівня призводить до деградації мітохондрій шляхом мітофагії, а при глобальній деполяризації мітохондрій клітина гине. Втім, ацидоз, пов'язаний з ішемією, значно уповільнює процес швидкого гідролізу АТФ АТФ-азою мітохондрій за рахунок міцного зв'язування природного пригнічувального білка ІF1 з каталітичними субодинами АТФ-ази [11, 12], перешкоджаючи розвитку несумісного з життям ацидозу. Таким чином, процес закиснення клітини є більш складним, що слід врахувати при аналізі патологічних каскадів пошкодження клітин ГМ і розробці способів терапії наслідків ІРГМ.

Механізм, що лежить в основі розвитку стійкості тканини ГМ до ішемії в експериментальних умовах киснево-глюкозної депривації був частково показаний К. Ruscher і співавторами, які виявили, що під дією гіпоксії відбувається активація HIF-1 α в астроцитах, а внаслідок активації HIF-1 α збільшуються експресія і секреція еритропоетину астроцитами [13]. При фосфорилуванні кіназа Akt активується, а активність GSK-3 β знижується. P13K-кіназа інактивує BAD за допомогою Akt-опосередкованого фосфорилування і в такий спосіб пригнічує апоптоз нейрональних клітин, викликаний гіпоксією / ішемією. Таким чином, варто підкреслити, що кінцевим елементом сигнального шляху еритропоетину є GSK-3 β [14].

Висновки

1. В умовах ІРГМ у клітинах ГМ виникають значні порушення функції мітохондрій, що проявляється підвищенням генерації АФК, зниженням трансмембранного мітохондріального потенціалу і швидкості дихання на 40%, що супроводжується розвитком лактат-ацидозу.

2. У комплексі лікувальних засобів при ІРГМ доцільно використовувати мітохондріально спрямовані антиоксиданти, а також роз'єднувачі дихання та окислювального фосфорилування.

Підтвердження

Фінансування. Стаття підготовлена на підставі результатів НДР «Розробити та удосконалити методики діагностики і лікування гострих аортальних станів». Фінансування за рахунок державного бюджету.

Внесок авторів. Граматюк С. М. – концепція та дизайн дослідження, редагування статті; Іванова Ю. В. – концеп-

ція дослідження, написання тексту, аналіз та інтерпретація даних; Кравченко В.І. – збір та опрацювання матеріалів, аналіз даних, остаточна підготовка статті до публікації; Логвіненко О. О. – збір та опрацювання матеріалів, написання статті, підготовка статті до публікації.

Конфлікт інтересів. Автори не мають конфлікту інтересів.

References

1. Gordeev ML, Uspenskiy VE, Bakanov AY, Volkov VV, Ibragimov AN, Shcherbinin TS, et al. Aortic arch reconstruction in surgical treatment of ascending aortic aneurysms and dissections. *Patologiya krovoobrascheniya i kardiokirurgiya* 2016 20(4): 45–57. doi: 10.21688/1681–3472–2016–4–45–57. [In Russian].
2. Ischenko VN, Sorokin VA. Evolution of diagnostics and surgical tactics of the treatment of the aorta aneurysms. The review of the literature. Part I. *Pacific Medical Journal*. 2007;(2): 23–7. [In Russian].
3. Abe T, Usui A. The cannulation strategy in surgery for acute type A dissection. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;65(1):1–9. doi: 10.1007/s11748–016–0711–7.
4. Bekkers JA, Raap GB, Takkenberg JJ, Bogers AdJJC. Acute type A aortic dissection: long-term results and reoperations. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012;43(2):389–96. doi: 10.1093/ejcts/ezs342.
5. Braverman AC. Acute aortic dissection: clinician update. *Circulation*. 2010;122(2):184–8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.958975.
6. Kozlov BN, Panfilov DS, Ponomarenko IV, Miroshnichenko AG, Gorokhov AS, Kuznetsov MS, et al. The new technique of unilateral antegrade cerebral perfusion during aortic arch surgery. *Russian Journal of Cardiology and Cardiovascular Surgery*. 2015;8(1):30–4. doi: 10.17116/kardio20158130–34. [In Russian].
7. Chaturvedi RK, Beal MF. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:395–412. doi: 10.1196/annals.1427.027.
8. Chang S, Jiang X, Zhao C, Lee C, Ferriero DM. Exogenous low dose hydrogen peroxide increases hypoxia-inducible factor-1 α protein expression and induces preconditioning protection against ischemia in primary cortical neurons. *Neurosci Lett*. 2008;441(1):134–8. doi: 10.1016/j.neulet.2008.06.005.
9. Chrissobolis S, Miller AA, Drummond GR, Kemp-Harper BK, Sobey CG. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:1733–45. doi: 10.2741/3816. PMID: 21196259.
10. Lisa FDi, Blank PS, Colonna R, Gambassi G, Silverman HS, Stern MD, Hansford RG. Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition. *J Physiol*. 1995;486 (Pt 1):1–13. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020786.
11. Dobrek L, Thor P. Glutamate NMDA receptors in pathophysiology and pharmacotherapy of selected nervous system diseases. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2011;65:338–46. doi: 10.5604/17322693.946637. PMID: 21677358.
12. Edge R, Truscott TG. Singlet Oxygen and Free Radical Reactions of Retinoids and Carotenoids—A Review. *Antioxidants (Basel)*. 2018;7(1):5. doi: 10.3390/antiox7010005. PMID: 29301252; PMCID: PMC5789315.
13. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci*. 2002;22(23):10291–301. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22–23–10291.2002. PMID: 12451129; PMCID: PMC6758760.
14. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785–9. doi: 10.1038/378785a0. PMID: 8524413.

Надійшла 15.01.2020