

DOI: [https://doi.org/10.34287/MMT.3\(50\).2021.5](https://doi.org/10.34287/MMT.3(50).2021.5)**Н. М. Бучакчийська, І. Ф. Бєленічев, В. І. Марамуха***Державний заклад «Запорізька медична академія післядипломної освіти Міністерства охорони здоров'я України»
Запоріжжя, Україна***N. M. Buchakchyiiska, I. F. Belenichev, V. I. Maramukha***State Institution «Zaporizhzhia Medical Academy of post-graduate education Ministry of Health of Ukraine»
Zaporizhzhia, Ukraine*

МІТОХОНДРІАЛЬНА ДИСФУНКЦІЯ ТА ЕНЕРГЕТИЧНІ ЗМІНИ НЕЙРОНІВ ЧОРНОЇ СУБСТАНЦІЇ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ХВОРОБІ ПАРКІНСОНА У ЩУРІВ ТА МОЖЛИВОСТІ ЇХ ФАРМАКОКОРЕКЦІЇ

Mitochondrial dysfunction and energy changes
of black-substance neurons in experimental parkinson's
disease in rats and mothors

Реферат

Хвороба Паркінсона є прогресуючим захворюванням із середнім віком початку 55 років. Згодом симптоми погіршуються і хоча леводопа значно поліпшила якість життя пацієнтів з ХП, статистичні дані свідчать, що ці пацієнти продовжують демонструвати меншу тривалість життя в порівнянні з населенням в цілому. Крім того, більшість пацієнтів з ХП страждають значними руховими порушеннями після 5–10 років хвороби, навіть при кваліфікованому лікуванні доступними симптоматичними препаратами.

Ключові слова: Мітохондріальна дисфункція, енергодефіцит, енергетичний потенціал, нейропротективна терапія.

Abstract

Parkinson's disease is a progressive disease with moderate age of the beginning of 55 years. Over time, symptoms worsen, and although levodopa has significantly improved the quality of life of patients with PD, statistics show that these patients continue to show shorter life expectancies compared to the general population. In addition, most patients with PD suffer from significant movement disorders after 5–10 years of illness, even with qualified treatment with available symptomatic drugs.

Keywords: Mitochondrial dysfunction, energy deficiency, energy potential, neuroprotective therapy.

ВСТУП

Хвороба Паркінсона (ХП) – це прогресуюче захворювання із середнім віком початку 55 років, і захворюваність помітно збільшується з віком, з 20/100 000 в цілому до 120/100 000 в віці 70 років [1]. Приблизно в 95% випадків ХП не спостерігається явного генетичного зв'язку (так звана «спорадична» ХП), але в інших випадках захворювання передається у спадок. Згодом симптоми погіршуються, і до введення леводопи у терапевтичні схеми рівень смертності

серед пацієнтів з ХП був в три рази вище, ніж у звичайних людей того ж віку [2]. Хоча леводопа значно поліпшила якість життя пацієнтів з ХП, статистичні дані свідчать, що ці пацієнти продовжують демонструвати меншу тривалість життя в порівнянні з населенням в цілому. Крім того, більшість пацієнтів з ХП страждають значними руховими порушеннями після 5–10 років хвороби, навіть при кваліфікованому лікуванні доступними симптоматичними препаратами [3].

Клінічно будь-яке захворювання, що включає дефіцит дофаміну в смугастому тілі або

пряме пошкодження смугастого тіла, може призводити до «паркінсонізму», синдрому, що характеризується тремором в спокої, ригідністю, брадікінезією, постуральною нестабільністю і «замерзанням» (нерухомістю). ХП є найбільш частою причиною паркінсонізму, складаючи – 80% випадків [4].

На фоні розвитку ХП тремор виникає в спокої, але зменшується при довільних рухах, тому зазвичай не впливає на повсякденну активність. Під ригідністю розуміється підвищений опір (жорсткість) пасивному рухові кінцівок пацієнта. Брадікінезія (сповільненість рухів), гіпокінезія (зменшення амплітуди рухів) і акінезія (відсутність нормальних несвідомих рухів, таких як розгойдування руки при ходьбі) проявляються у вигляді безлічі симптомів, включаючи недостатність нормального виразу обличчя (гіпомімія), зниження сили голосу (гіпофонія), слинотеча (нездатність ковтати, не замислюючись), зменшення розміру (мікрографія) і швидкості письма, а також зменшення довжини кроку під час ходьби. Брадікінезія може значно погіршити якість життя, оскільки виконання повсякденних завдань, таких як одягання або прийом їжі, займає набагато більше часу [5]. Пацієнти з ХП також зазвичай приймають сутулу поставу і можуть втрачати нормальні постуральні рефлексії, що призводить до падіння і, іноді, прикованості до інвалідного візка. Завмирання, нездатність почати довільний рух, такий, як хода (пацієнти «прилипають» до землі, коли вони намагаються почати рух), є поширеним симптомом паркінсонізму. Також часто виникають аномалії афекту і пізнання; пацієнти можуть стати пасивними або замкнутими, без ініціативи; вони можуть поводити себе занадто тихо, якщо їх не заохочують до участі в діяльності. Відповіді на питання затримуються, когнітивні процеси сповільнюються (брадіфренія). Депресія є звичайним явищем, а деменція значно частіше зустрічається при ХП, особливо у літніх пацієнтів [6].

Можливість того, що дефект окисного фосфорилування відіграє роль у патогенезі ХП, була викликана відкриттям, що МФТП (N-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин) блокує мітохондріальний ланцюг перенесення електронів, пригнічуючи комплекс I. Подальші дослідження виявили аномалії активності комплексу I при ХП. Дослідження *in vitro* показують, що такий дефект комплексу I може піддавати клітини окислювальному стресу і енергетичній недостатності [7]. Порушення окисного фосфорилування, виявлене при ХП, не обмежується мозком, оскільки знижена активність комплексу I була виявлена в тромбоцитах пацієнтів з ХП і в гібридних клітинах (клітинні лінії, сконструйовані для утримання мітохондрій, отриманих з тромбоцитів пацієнтів з ХП). Це відкриття передбачає, що дефіцит комплексу I успадкований

від мітохондріального геному або що деяка система токсичності призводить до мутацій в мітохондріальній ДНК. Однак мутації мітохондріальної ДНК у пацієнтів з ХП ще не виявлені [8].

Майже 100% молекулярного кисню споживається мітохондріальним диханням, а в якості побічних продуктів зазвичай утворюються потужні окислювачі, включаючи перекис водню і супероксидні радикали. Інгібування комплексу I збільшує продукцію супероксиду ROS, який може утворювати токсичні гідроксильні радикали або реагувати з оксидом азоту з утворенням пероксинітриту [9]. Ці молекули можуть викликати пошкодження клітин, вступаючи в реакцію з нуклеїновими кислотами, білками і ліпідами. Однією з мішеней цих реактивних частинок може бути сам ланцюг перенесення електронів, що призводить до пошкодження мітохондрій і подальшого утворення активних форм кисню. Елевація біологічних маркерів окисного пошкодження була виявлена в чорній субстанції головного мозку при ХП. Крім того, вміст антиоксидантного глутатіону був знижений в чорній субстанції головного мозку при ХП, що узгоджується зі збільшенням ROS, хоча це також може вказувати на первинне зниження захисних механізмів проти ROS [10].

Фактори, котрі потенційно викликають мітохондріальні ушкодження при ХП, до сих пір вивчені не достатньо добре. Численні дослідження, проведені з використанням різних генетичних порушень і моделей токсичного ушкодження при формуванні ХП, сприяли кращому розумінню патогенезу хвороби, багато цих досліджень вказують на дисфункцію мітохондрій як важливий момент розвитку ХП, і припускають, що вона може відігравати провідну роль в патофізіології захворювання, що і обумовлює актуальність даного дослідження.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідити особливості зміни показників енергетичного балансу та мітохондріальної дисфункції на основі експериментальних досліджень у щурів при моделюванні ХП та обґрунтувати розробку можливих схем лікування зі специфічною нейропротективною дією на дофамінергічну систему.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження було проведено у відповідності до Директиви 2010/63ЕУ Європейського парламенту і Ради від 22 вересня 2010 року про захист тварин, що використовуються для наукових цілей, а також з національними «Спільними етичними принципами експериментів на тваринах» (Україна, 2001) і вказівками, викладеними в «Основні засади вивчення токсичності потенційних

фармакологічних препаратів» (ДФЦ України, К., 2000). Проведення експерименту було схвалене Комісією з біоетики Запорізького державного медичного університету.

Дослідження проведено на 90 щурах лінії Wistar віком 6 місяців масою 220–290 грам. Тварини містилися в стандартних умовах віварію (12-годинний світловий цикл, температура 22 °С). Для проведення експериментів тварин піддавали харчовій депривації, особливості якої описані нижче. З метою приручення щурів перед початком експерименту тримали в руках по 2–3 хвилини протягом 5 днів, що полегшувало наступні експериментальні дослідження.

Паркінсонізм викликали введенням нейротоксину МФТП (N-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин) піддослідним щурам. Інтактна група отримувала одноразово внутрішньоочеревинно фізіологічний розчин 1 мл на 100 г ваги, а контрольна група після введення МФТП – одноразово внутрішньоочеревинно фізіологічний розчин в аналогічному дозуванні.

Нами застосована концепція лікування ХП, яка полягає в селективному впливі на провідні ланки-мішені нейродегенерації – нітрозативний стрес, депривація факторів ендогенної нейропротекції (HSP70), порушення тіол-дисульфідної системи, мітохондріальна дисфункція, пригнічення дофамінової трансмісії, нейроапоптоз, запуск IL-1b-шляхів нейродегенерації. Для підтвердження перспективності обраних ланок мішеней нами були відібрані препарати, механізм яких передбачає вплив саме на ці ланки-мішеней. Цереброкурин містить нейротрофічні фактори і білок рилін, зменшує ознаки первинної і вторинної мітохондріальної дисфункції, регулює транскрипційні процеси, ноофен може підвищувати рівень дофаміну, активує компенсаторний шунт Робертса, прамістар – ноотроп ряду рацетамів, проявляє властивості агоніста дофаміну, підвищує щільність нікотинових холінорецепторів, стимулює енергетичний метаболізм, проноран – має властивості агоніста дофаміну, мелатонін в терапевтичних дозах стимулює експресію HSP70, нормалізує тіол-дисульфідну систему, модулює мітохондріальну пору, активує компенсаторний малат-аспартатний шунт, регулює NO\SH-механізми траскрипції генів, гліатилін – нейропротектор, що має специфічну мітопротективну дію, проявляє холіноміметичний ефект.

Обґрунтування стратегії раціональної терапії при ХП базувалося на вивченні активності препаратів у таких групах тварин: I – інтактні (пасивний контроль); II – тварини з експериментальною хворобою Паркінсона (ХП, активний контроль); III – ХП + Амантадин (АМ); IV – ХП + АМ + Цереброкурин; V – ХП + АМ + Прамістар; VI – ХП + АМ + Гліатилін; VII – ХП + АМ + Ноофен; VIII – ХП + АМ + Проноран; IX – ХП + АМ + Мелатонін.

Всі препарати вводили тваринам інтрагастралью за допомогою металевого зонду. Середньоєфективну дозу (ЕД50) препаратів визначали на моделі ХП за здатністю препаратів впливати на рівень глутатіона відновленого, глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази та нітритрозинову в цитозольній фракції головного мозку експериментальних тварин. Курсове застосування досліджуваних препаратів в експериментально обґрунтованих дозах було наступним: амантадин – 1 мг/кг, цереброкурин – 150 мкл/кг, прамістар – 10 мг/кг, гліатилін – 250 мг/кг, ноофен – 100 мг/кг, проноран – 2 мг/кг, мелатонін – 10 мкг/кг тваринам з експериментальною ХП.

Для біохімічних досліджень з головного мозку швидко видаляли кров, відокремлювали від мозкової оболонки і досліджувані шматочки поміщали в рідкий азот. Потім подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану і гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища, як зазначено вище. Для тривалого зберігання матеріал заморожували і зберігали при –80 °С. Для визначення швидкості відкриття мітохондріальної пори використовували суспензію 0,5–1,0 мг білка/мл. Безбілковий екстракт отримували додаванням точного навішування гомогенату тканини мозку в хлорній кислоті (0,6) з наступною нейтралізацією 5 М калію карбонатом.

Стан енергетичного обміну визначали за рівнем найбільш значущих інтермедіатів – АТФ, АДФ, АМФ, лактату, пірувату, малату.

Вміст піровиноградної кислоти, в пробах тканин мозку, визначали спектрофотометрично методом Умбрайта. Піровиноградна кислота взаємодіє з 2,4-дінітрофенілгідразоном з утворенням гідразону, розчин якого в лужному середовищі має коричнево-червоне забарвлення, інтенсивність його прямо пропорційна вмісту пірувату в пробі. Розрахунок вмісту пірувату проводили за калібрувальним графіком. Вміст пірувату виражали в мкмоль/г тканини.

Вміст молочної кислоти визначали за методом Хохорста. У присутності лактатдегідрогенази лактат переходить в піруват, причому зв'язування, яке утворюється в ході реакції пірувату з гідразин-гліциновим буфером, сприяє повному окисненню лактату. Кількість НАДН, яка утворюється в ході реакції еквімолярно кількості лактату, реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм. Вміст лактату виражали в мкмольях на 1 г тканини.

Кількість малата визначали за методом Хохорста за зменшенням НАДН при 340 нм. Метод полягає в тому, що в присутності малатдегідрогенази (МДГ), малат перетворюється в щавлевооцтову кислоту. Зв'язування щавелевооцтової кислоти гідразин-гліциновим буфером забезпечує повне окиснення малату. Утворення відновленої форми НАДН еквівалентно кількості окисненого малату, наростання якого реєстрували при 340 нм

спектрофотометрично. Вміст малату виражали в мкмольх/г тканини.

Аденілові нуклеотиди визначали методом тонкошарової хроматографії. Метод заснований на поділі АТФ, АДФ і АМФ в системі діоксан-ізопропанол-вода-аміак на тонкому шарі сорбенту з подальшим кількісним визначенням прямою спектрофотометрією при 260 нм. Нуклеотиди розташовуються в порядку знизу вгору: АТФ, АДФ, АМФ. Вміст нуклеотидів розраховують за калібрувальними графіками, складеними для кожного нуклеотиду. На підставі отриманих даних вмісту АТФ, АДФ та АМФ були розраховані додаткові показники: енергетичний заряд (ЕЗ), енергетичний потенціал (ЕП), індекс фосфорилування (ІФ), термодинамічний контроль дихання (ТДК).

З метою встановлення можливості досліджуваних препаратів впливати на явища мітохондріальної дисфункції, нами було вивчено ступінь відкриття мітохондріальної пори і мітохондріальний трансмембранний потенціал ($\Delta\psi_m$). Відкриття мітохондріальної пори ініціювали внесенням циклоспорину-А (0,5 мл) і визначали спектрофотометрично при $\lambda = 540$ нм і при 25 °С при постійному перемішуванні протягом 25 хв. Дослідження мітохондріального трансмембранного потенціалу ($\Delta\psi_m$) проводили шляхом внесення в середовище 9 мкМ сафроніну О. Спектрофотометрію проводили при довжині хвилі 515 нм і 525 нм, $\Delta\psi_m$ визначали по різниці світлопоглинання при 515 нм і 525 нм ($\Delta A_{515-525}$ нм).

Статистична обробка даних наукових досліджень проводилась з використанням пакету програм «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc, № АХХR712D833214FAN5). Описова статистика включала розрахунки середніх арифметичних значень (M), медіан (Me), стандартних похибок середнього ($\pm m$) та інтерквартильний розмах (інтервал) – значення 25-го і 75-го процентилей. Перед застосуванням статистичних критеріїв проводилася перевірка гіпотези про нормальний закон розподілу випадкових величин (за критерієм Shapiro-Wilk). За умов нормального розподілу встановлення достовірності міжгрупових відмінностей за отриманими даними експериментів проводилося за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента. У випадку, коли дані не відповідали законам нормального розподілу, порівняльний аналіз проводили за допомогою непараметричного U-критерію Мана-Уїтні. Для порівняння незалежних змінних в більш ніж двох вибірках застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі або критерій Kruskal-Wallis для розподілу, відмінного від нормального. Порівняння груп за якісною ознакою проводили за допомогою критерію χ^2 з аналізом таблиць спряженості. Для аналізу закономірностей зв'язку між окремими показниками проведений

кореляційний аналіз за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона або Спірмена. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності $p < 0,05$ (95%).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В результаті формування у щурів експериментальної ХП відбулося зниження рівнів АТФ та АДФ у групі контролю на 33,59 та 47,27% відповідно відносно інтактної групи, а рівень АМФ виріс у головному мозку на 22,73% як результат формування енергодефіту нейрональних клітин і порушення функціонування циклу Кребса із домінуванням анаеробного окиснення субстрату. Також у контрольній групі відмічається зниження активності ферменту м-КФК на 59,09%, та пригнічення АТФ-азної активності на 30,11% порівняно зі здоровими щурами (табл. 1).

Після введення препарату амантадин відзначається певна позитивна динаміка у енергетичній системі нейронів щурів із ХП. Так, Рівень АТФ та АДФ збільшився на 8,54 та 17,14% відповідно, ензиматична активність м-КФК та АТФ-ази зросла на 29,57 та 13,93% відповідно.

При комбінованому введенні амантадину із нейропротекторними препаратами різного механізму дії були зафіксовані наступні результати: статистично достовірна елевация АТФ та АДФ на 26,36 та 34,09 в групі цереброкуруну ($p \leq 0,05$); на 19,44 та 27,50% відповідно в групі прамістару; на 24,19 та 36,96% в групі гліатиліну ($p \leq 0,05$); на 11,07 та 25,64% в групі ноофену; на 27,20 та 38,30% в групі пронорану ($p \leq 0,05$); на 32,37 та 43,14% відповідно в групі мелатотіну ($p \leq 0,05$). Також в кожній із зазначених груп після призначення терапії відбулося синхронне зниження рівнів АМФ у головному мозку щурів із ХП.

Досліджувана активність м-КФК та АТФ-ази статистично достовірно зросла в групі цереброкуруну на 54,49 та 26,32% відповідно ($p \leq 0,05$), в групі прамістару на 42,94 та 17,84%, в групі гліатиліну на 55,25 та 20,73% ($p \leq 0,05$), в групі ноофену на 40,00 та 8,89%, в групі пронорану на 56,22 та 24,84% ($p \leq 0,05$), а в групі мелатоніну на 57,60 та 27,24% відповідно ($p \leq 0,05$).

Отже, призначені нейропротективні препарати значно покращували енергетичний обмін у головному мозку щурів із ХП в межах статистичної значимості, особливо виражену дію мали препарати мелатонін, цереброкурун, гліатилін та проноран.

Також ми дослідили вплив ХП та нейропротективної терапії на концентрацію пірувату, малату, лактату, ізоцитрату та активність ферментів СДГ та МДГ у нейронах щурів (табл. 2).

Таблиця 1

**Вплив досліджуваних препаратів на продукцію, транспорт і утилізацію енергії
в головному мозку щурів із експериментальним паркінсонізмом
($M \pm m$; Q50, (Q25; Q75), $n = 10$)**

Показник	АТФ, мкМ/г тканини	АДФ, мкМ/г тканини	АМФ, мкМ/г тканини	м-КФК, мкМ/мг білка/хв	АТФ-азна активність, мкМ/мг білка/хв
Інтакт	3,87 ± 0,21	0,55 ± 0,06	0,17 ± 0,02	1,98 ± 0,19	25,11 ± 2,06
Контроль (ХП)	2,57 ± 0,23	0,29 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,81 ± 0,07	17,55 ± 2,48
ХП + АМ	2,81 ± 0,33	0,35 ± 0,03	0,21 ± 0,02	1,15 ± 0,21	20,39 ± 1,98
ХП + Цереброкурин + АМ	3,49 ± 0,27*	0,44 ± 0,05*	0,15 ± 0,02*	1,78 ± 0,21*	23,82 ± 2,95*
ХП + Прамістар + АМ	3,19 ± 0,41	0,40 ± 0,05	0,19 ± 0,02	1,42 ± 0,18	21,36 ± 1,57
ХП + Гліатилін + АМ	3,39 ± 0,29*	0,46 ± 0,04*	0,20 ± 0,01*	1,81 ± 0,19*	22,14 ± 3,05*
ХП + Ноофен + АМ	2,89 ± 0,31	0,39 ± 0,05	0,21 ± 0,03	1,35 ± 0,21	19,26 ± 2,18
ХП + Проноран + АМ	3,53 ± 0,26*	0,47 ± 0,32*	0,19 ± 0,01*	1,85 ± 0,19*	23,35 ± 3,76*
ХП + Мелатонін + АМ	3,80 ± 0,42*	0,51 ± 0,04*	0,18 ± 0,01*	1,91 ± 0,22*	24,12 ± 3,48*

Примітки: p – рівень статистичної значущості при порівнянні виборок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA (критерій Краскела-Уолліса), * – $p \leq 0,05$ відповідно до контрольної групи

Таблиця 2

**Вплив досліджуваних препаратів на показники вуглеводно-енергетичного обміну
в головному мозку щурів із експериментальним паркінсонізмом
($M \pm m$; Q50, (Q25; Q75), $n = 10$)**

Показник	Піруват, мкМ/г тканини	Лактат, мкМ/г тканини	Малат, мкМ/г тканини	Ізоцитрат, мкМ/г тканини	СДГ, нМ/ мг білка/хв	МДГ, мкМ/ мг білка/хв
Інтакт	0,49 ± 0,05	2,27 ± 0,28	0,47 ± 0,03	0,60 ± 0,09	6,46 ± 0,80	12,45 ± 2,06
Контроль (ХП)	0,32 ± 0,04	4,89 ± 0,52	0,30 ± 0,05	0,39 ± 0,06	2,95 ± 0,34	6,28 ± 0,70
ХП + АМ	0,39 ± 0,04	4,02 ± 0,55	0,36 ± 0,03	0,48 ± 0,05	3,94 ± 0,51	7,81 ± 0,88
ХП + Цереброкурин + АМ	0,42 ± 0,06	3,17 ± 0,41*	0,44 ± 0,07*	0,55 ± 0,41*	5,15 ± 0,62*	11,02 ± 1,45*
ХП + Прамістар + АМ	0,40 ± 0,05	3,89 ± 0,37	0,42 ± 0,05*	0,51 ± 0,41*	4,39 ± 0,46*	9,84 ± 1,07*
ХП + Гліатилін + АМ	0,41 ± 0,04	3,27 ± 0,25	0,43 ± 0,06	0,53 ± 0,50*	5,48 ± 0,41*	10,92 ± 1,15*
ХП + Ноофен + АМ	0,40 ± 0,06	3,72 ± 0,39*	0,36 ± 0,05	0,52 ± 0,07	3,98 ± 0,41*	8,36 ± 0,91
ХП + Проноран + АМ	0,42 ± 0,04	3,41 ± 0,32	0,44 ± 0,03	0,54 ± 0,04*	5,31 ± 0,47*	10,42 ± 0,99*
ХП + Мелатонін + АМ	0,45 ± 0,04*	2,98 ± 0,19*	0,45 ± 0,04*	0,56 ± 0,06*	5,62 ± 0,60*	11,48 ± 1,15*

Примітки: p – рівень статистичної значущості при порівнянні виборок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA (критерій Краскела-Уолліса), * – $p \leq 0,05$ відповідно до контрольної групи

Падіння рівнів пірувату, малату та ріст лактатоацидозу на фоні ХП в контрольній групі становило 34,69; 36,17 та 53,58% відповідно відносно інтактної групи, із одночасною депресією активності СДГ та МДГ на 54,33 та 49,56% відповідно.

Введення піддослідним тваринам препарату цереброкурин у комбінації із амантадином сприяло статистично достовірному підвищенню значень пірувату, малату, СДГ та МДГ на 23,81; 31,82; 42,72 та 43,01% відповідно ($p \leq 0,05$), а також призводило до зниження значень лактату на 35,17% ($p \leq 0,05$).

Препарат прамістар у комбінації з амантадином статистично достовірно підвищував пірува-

ту, малату, СДГ та МДГ на 20,00; 28,57; 32,80 та 36,18% відповідно ($p \leq 0,05$), а також інгібував лактоацидоз мозку на 20,45%.

Гліатилін статистично достовірно підвищував пірувату, малату, СДГ та МДГ на 21,95; 30,23; 46,17 та 42,49% відповідно ($p \leq 0,05$), а також інгібував лактоацидоз мозку на 33,13%.

Введення піддослідним тваринам препарату ноофен у комбінації із амантадином сприяло статистично достовірному підвищенню значень пірувату, малату, СДГ та МДГ на 20,00; 16,67; 25,88 та 24,88% відповідно ($p \leq 0,05$), а також призводило до зниження значень лактату на 23,93% ($p \leq 0,05$).

Препарат проноран у комбінації з амантади-

ном статистично достовірно підвищував пірувату, малату, СДГ та МДГ на 23,81; 31,82; 44,44 та 39,73% відповідно ($p \leq 0,05$), а також інгібував лактоацидоз мозку на 30,27%.

Мелатонін статистично достовірно підвищував пірувату, малату, СДГ та МДГ на 28,89; 33,33;

47,51 та 45,30% відповідно ($p \leq 0,05$), а також інгібував лактоацидоз мозку на 39,06% ($p \leq 0,05$).

Вплив досліджуваних препаратів на ключові ланки патогенезу мітохондріальної дисфункції у тварин із експериментальним паркінсонізмом представлено в таблиці 3.

Таблиця 3

Вплив досліджуваних препаратів на параметри енергообміну в цитозольній фракції головного мозку щурів із експериментальним паркінсонізмом (M ± m; Q50, (Q25; Q75), n = 10)

Група тварин	Енергетичний заряд	Енергетичний потенціал	Індекс фосфорилування	Термодинамічний контроль дихання
Інтакт	0,89 ± 0,07	5,86 ± 0,52	4,54 ± 0,50	3,48 ± 0,29
Контроль (ХП)	0,71 ± 0,11	3,78 ± 0,28	1,90 ± 0,13	1,25 ± 0,11
ХП + АМ	0,79 ± 0,08	4,56 ± 0,50	2,76 ± 0,19	2,19 ± 0,20*
ХП + Цереброкурин + АМ	0,86 ± 0,10*	4,88 ± 0,36*	3,65 ± 0,48*	3,11 ± 0,26*
ХП + Прамістар + АМ	0,81 ± 0,07*	4,70 ± 0,35*	2,89 ± 0,31*	2,35 ± 0,23*
ХП + Гліатилін + АМ	0,87 ± 0,10*	4,95 ± 0,47*	3,80 ± 0,30*	3,27 ± 0,26*
ХП + Ноофен + АМ	0,84 ± 0,11*	4,20 ± 0,31	3,04 ± 0,51*	2,50 ± 0,53*
ХП + Проноран + АМ	0,86 ± 0,09	4,61 ± 0,55	3,81 ± 0,31	3,31 ± 0,22*
ХП + Мелатонін + АМ	0,87 ± 0,88*	5,02 ± 0,49*	3,93 ± 0,41*	3,37 ± 0,28*

Примітки: p – рівень статистичної значущості при порівнянні виборок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA (критерій Краскела-Уолліса), * – $p \leq 0,05$ відповідно до контрольної групи

В умовах формування мітохондріальної дисфункції при ХП в контрольній групі в нейронах відзначається зниження енергетичного заряду і енергетичного потенціалу на 20,23 та 35,50% відповідно порівняно з інтактною групою, а також зниження індексу фосфорилування та термодинамічного контролю дихання на 58,15 та 64,08% відповідно.

Призначення нейропротективної терапії у вигляді препарату цереброкурин із базовою терапією амантадином призводило до підвищення енергетичного заряду, енергетичного потенціалу, індексу фосфорилування та термодинамічного контролю дихання на 17,44; 22,54; 47,95 та 59,81% відповідно статистично достовірно відносно контролю ($p \leq 0,05$).

Прамістар мав подібну тенденцію впливу, як і цереброкурин, але менш виражену. Так, підвищення енергетичного заряду, енергетичного потенціалу, індексу фосфорилування та термодинамічного контролю дихання становило 12,35; 19,58; 34,26 та 46,81% відповідно статистично достовірно відносно контролю ($p \leq 0,05$).

Гліатилін підвищував енергетичний заряд, енергетичний потенціал, індекс фосфорилування та термодинамічний контроль дихання на 18,39; 23,64; 50,00 та 61,77% відповідно статистично достовірно відносно контролю ($p \leq 0,05$).

Ноофен також мав позитивний вплив на процесі нормалізації мітохондріальної дисфункції, але не такий виражений. Препарат підвищував

енергетичний заряд, енергетичний потенціал, індекс фосфорилування та термодинамічний контроль дихання на 15,48; 10,00; 37,50 та 50,00% відповідно статистично достовірно відносно контролю ($p \leq 0,05$).

Проноран значно підвищував енергетичний заряд, енергетичний потенціал, індекс фосфорилування та термодинамічний контроль дихання на 17,44; 18,00; 50,13 та 62,24% відповідно статистично достовірно відносно контролю ($p \leq 0,05$).

Призначення нейропротективної терапії у вигляді препарату мелатонін із базовою терапією амантадином призводило до підвищення енергетичного заряду, енергетичного потенціалу, індексу фосфорилування та термодинамічного контролю дихання на 18,39; 24,70; 51,65 та 62,91% відповідно статистично достовірно відносно контролю ($p \leq 0,05$).

ОБГОВОРЕННЯ

Зростаюча кількість літературних даних свідчить про те, що мітохондрії є основним джерелом активних форм кисню (АФК), які можуть сприяти розвитку внутрішньоклітинного оксидативного стресу. В процесі окисного фосфорилування комплекс I (НАДН-хінон оксидоредуктаза) діє як точка входу для електронів з мітохондріального матриксу в ланцюг транспорту електронів (Electron transport chain, ЕТС), каталізує перенесення електронів від НАДН до субо-

диниць ЕТС. Комплекс I та III в ЕТС вважаються основними ділянками продукції АФК у мітохондріях [11]. Супероксидний радикал – це первинні АФК, що утворюються в мітохондріях в результаті перенесення одного електрона на кисень в дихальному ланцюзі. Супероксиддисмутаза 2 або MnSOD перетворює супероксидний радикал в перекис водню, який надалі детоксикується ферментом каталазою. Однак у присутності іонів металів, таких як Fe^{2+} перекис водню може перетворюватися в високо реакційно спроможний гідроксильний радикал в результаті реакції Фентона, яка викликає серйозне окисне пошкодження клітинних компонентів. Вважається, що виробництво супероксиду залежить від таких факторів, як концентрація донорів електронів, локальна концентрація кисню і кінетика швидкості другого порядку між ними [12].

У мітохондріальному комплексі I гіперпродукцію супероксидних радикалів викликають низьке виробництво АТФ, як наслідок, висока протон-рушійна сила (ΔpH і $\Delta \psi$) і знижений пул коферменту Q; високий НАДН/НАД⁺ співвідношення в мітохондріальному матриксі. На додаток до вищевказаних умов, утворення АФК в комплексі I також значно збільшується під час процесу зворотного транспорту електронів. Зворотний транспорт електронів має місце, коли відбувається зменшення пулу убіхінону, який змушує електрони підніматися вгору від убіхінону в комплекс I в умовах високої протон-рушійної сили [13].

Розвиток оксидативного стресу в результаті гіперпродукції АФК є одним з передбачуваних механізмів загибелі дофамінергічних нейронів при ХП, а мітохондріальний комплекс I вважається одним з основних джерел АФК. Специфічне для ХП зниження активності мітохондріального комплексу I або рівня білка в чорній субстанції пацієнтів виявлене давно. Дослідження з використанням очищених мітохондрій також показало дефіцит мітохондріального комплексу I в лобовій корі головного мозку пацієнтів з ХП. Невеликий дефіцит активності комплексу I був також виявлений в смугастому тілі, корковій тканині головного мозку, фіброблестах, тромбоцитах, в скелетних м'язах і лімфоцитах пацієнтів з ХП [14]. Каталітичні субодиниці комплексу I, як було виявлено, містять окислені білки, і у пацієнтів з ХП спостерігалася кореляція між підвищеним окисненням білків та зниженням здатності до перенесення електронів, це вказує на те, що окисне пошкодження даних субодиниць може призводити до порушення комплексу I. Нещодавнє дослідження показує, що рівні окисненого коферменту Q-10 і 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозину в спинномозковій рідині пацієнтів з ХП були значно збільшені, що вказує на роль мітохондріального окисного пошкодження і окисного пошкодження ДНК в патології

ХП. Крім того, зниження активності комплексу I спостерігалася в цитоплазматичних гібридних клітинних лініях, які містять мітохондріальну ДНК від пацієнтів з ХП [15].

Наступне дослідження також показало, що специфічний нокаут у мишей гена *Ndufs4* в дофамінергічних нейронах середнього мозку не викликає явну нейродегенерацію, втрату стріальної іннервації або симптомів паркінсонізму, хоча у цих мишей спостерігалися порушення гомеостазу дофаміну і збільшення метаболітів розпаду дофаміну. Нокаути дофамінергічних нейронів *Ndufs4* не призводили до втрати нігостріального нейрона, проте вони були більш уразливі до нейротоксичності, індукованої мітохондріальним комплексом I і токсином МФТП. Ці дані дозволяють припустити, що дефіцит комплексу I може сприяти загибелі дофамінергічних нейронів у присутності інших токсичних факторів [16].

Ротенон, мітохондріальний токсин, може також викликати втрату дофамінергічних нейронів, і ця токсичність була значно ослаблена метиленовим синім, з'єднанням, яке функціонує в якості альтернативного транспортера електронів, який обходить блокаду комплексу I/III, підкреслюючи роль дефіциту комплексу I в результаті токсичності ротенону. Відомо, що втрата гомеостазу дофаміну може вплинути на функцію мітохондрій, і відповідно до цього інше дослідження показує, що окислювально-відновні модифікації дофаміну можуть пригнічувати комплекси мітохондріального дихального ланцюга [17].

Окиснений дофамін і 3,4-дигідрофенілоцтова кислота (ДГФОК) інгібували активність комплексу I і комплексу II дозозалежним чином, тоді як знижений дофамін, але не ДГФОК, інгібували активність комплексу II. Ці дані показують можливі мішені метаболітів дофаміну, які потенційно можуть сприяти високій чутливості дофамінергічних нейронів до розвитку мітохондріальної дисфункції при ХП [18]. Вважається, що чорна субстанція більш вразлива для дисфункції комплексу I в порівнянні з іншими областями мозку через генерацію АФК нігостріальними дофамінергічними нейронами під час метаболізму дофаміну. Крім того, дофамінергічні нейрони чорної субстанції мишей також показали зниження мітохондріальної маси в порівнянні з недофамінергічними нейронами і нейронами вентральної тегментальної області, це вказує на те, що цей дефіцит може сприяти вибірковій уразливості цих нейронів в моделях мишей з ХП [19].

В цілому, всі ці перераховані дані дозволяють припустити, що порушення мітохондріального дихального ланцюга, зокрема дефіцит комплексу I і подальше збільшення продукції АФК, може побічно або прямо сприяти прогресу патології при ХП.

ВИСНОВКИ

1. В умовах формування експериментальної ХП у щурів розвивається енергодефіт нейрональних клітин і порушення функціонування циклу Кребса із домінуванням анаеробного окиснення субстрату, а також розвиток мітохондріальної дисфункції.

2. Призначені нейропротективні препарати значно покращували енергетичний обмін у головному мозку щурів із ХП в межах статистичної значимості, а саме підвищували рівні АТФ та АДФ, ензиматичну активність м-КФК та АТФ-ази, знижували рівні АМФ, особливо виражену дію мали препарати мелатонін, цереброкурин, гліатилін та проноран.

3. Нейропротективна терапія експериментальної ХП у щурів сприяла статистично достовірному підвищенню значень пірувату, малату, СДГ та МДГ, а також призводила до зниження значень лактату і лактоацидозу в тканинах головного мозку.

4. Призначення нейропротективної терапії із базовою терапією амантадином призвело до підвищення енергетичного заряду, енергетичного потенціалу, індексу фосфорильовання та термодинамічного контролю дихання в мітохондріях нейронів, особливо в групах мелатоніну, цереброкуруину, гліатиліну та пронорану.

ЛІТЕРАТУРА

- Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2016 Oct; 139 Suppl 1:318-324. doi: 10.1111/jnc.13691. Epub 2016 Jul 11. PMID: 27401947.
- Opara J, Malecki A, Malecka E, Socha T. Motor assessment in Parkinson's disease. *Ann Agric Environ Med.* 2017 Sep 21; 24 (3): 411 – 415. doi: 10.5604/12321966.1232774. Epub 2017 May 11. PMID: 28954481.
- Lotankar S, Prabhavalkar KS, Bhatt LK. Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neurosci Bull.* 2017 Oct; 33 (5): 585–597. doi: 10.1007/s12264-017-0183-5. Epub 2017 Sep 21. PMID: 28936761; PMCID: PMC5636742.
- Cabreira V, Massano J. Doença de Parkinson: Revisão Clínica e Atualização [Parkinson's Disease: Clinical Review and Update]. *Acta Med Port.* 2019 Oct 1; 32 (10): 661–670. Portuguese. doi: 10.20344/amp.11978. PMID: 31625879.
- Cacabelos R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 4; 18(3):551. doi:10.3390/ijms18030551. PMID: 28273839; PMCID: PMC5372567.
- Falkenburger BH, Saridaki T, Dinter E. Cellular models for Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2016 Oct; 139 Suppl 1: 121–130. doi: 10.1111/jnc.13618. Epub 2016 Apr 18. PMID: 27091001.
- Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2016 Oct; 139 Suppl 1: 216–231. doi: 10.1111/jnc.13731. Epub 2016 Aug 21. PMID: 27546335.
- Nguyen M, Wong YC, Ysselstein D, Severino A, Krainc D. Synaptic, Mitochondrial, and Lysosomal Dysfunction in Parkinson's Disease. *Trends Neurosci.* 2019 Feb; 42 (2): 140–149. doi: 10.1016/j.tins.2018.11.001. Epub 2018 Nov 30. PMID: 30509690; PMCID: PMC6452863.
- Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2018 Jan; 109(Pt B): 249–257. doi: 10.1016/j.nbd.2017.04.004. Epub 2017 Apr 8. PMID: 28400134.
- Burbulla LF, Song P, Mazzulli JR, Zampese E, Wong YC, Jeon S, Santos DP, Blanz J, Obermaier CD, Strojny C, Savas JN, Kiskinis E, Zhuang X, Krüger R, Surmeier DJ, Krainc D. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science.* 2017 Sep 22; 357 (6357): 1255–1261. doi: 10.1126/science.aam9080. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28882997; PMCID: PMC6021018.
- Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2013 Jul-Aug; 106–107: 17–32. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.004. Epub 2013 Apr 30. PMID: 23643800; PMCID: PMC3742021.
- Li H, Ham A, Ma TC, Kuo SH, Kanter E, Kim D, Ko HS, Quan Y, Sardi SP, Li A, Arancio O, Kang UJ, Sulzer D, Tang G. Mitochondrial dysfunction and mitophagy defect triggered by heterozygous GBA mutations. *Autophagy.* 2019 Jan; 15 (1): 113–130. doi: 10.1080/15548627.2018.1509818. Epub 2018 Oct 12. PMID: 30160596; PMCID: PMC6287702.
- Larsen SB, Hanss Z, Krüger R. The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* 2018 Jul; 373 (1): 21–37. doi: 10.1007/s00441-017-2768-8. Epub 2018 Jan 25. PMID: 29372317; PMCID: PMC6015629.
- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Mar 23; 3: 17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13. PMID: 28332488.

15. Park JS, Davis RL, Sue CM. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2018 Apr 3; 18(5): 21. doi: 10.1007/s11910-018-0829-3. PMID: 29616350; PMCID: PMC5882770.
16. Macdonald R, Barnes K, Hastings C, Mortiboys H. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? *Biochem Soc Trans.* 2018 Aug 20;46(4):891-909. doi: 10.1042/BST20170501. Epub 2018 Jul 19. PMID: 30026371.
17. Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci.* 2015 Apr; 40 (4): 200–10. doi: 10.1016/j.tibs.2015.02.003. Epub 2015 Mar 8. PMID: 25757399.
18. Raza C, Anjum R, Shakeel NUA. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci.* 2019 Jun 1; 226: 77–90. doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.057. Epub 2019 Apr 10. PMID: 30980848.
19. Pozo Devoto VM, Falzone TL. Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: a role for α -synuclein? *Dis Model Mech.* 2017 Sep 1; 10 (9): 1075–1087. doi: 10.1242/dmm.026294. PMID: 28883016; PMCID: PMC5611962.

Стаття надійшла до редакції 19.05.2021