

О. О. Гончар, О. О. Клименко, І. М. Маньковська

## **Хелатна сполука ГАМК покращує антиоксидантний захист мітохондрій мозку щурів за умов гіпоксії**

*Інститут фізіології імені О. О. Богомольця  
Національної академії наук України, м. Київ*

*Ключові слова: Мембратон, мітохондрії, гіпоксія, окисний стрес, антиоксидантна система*

Неадекватне забезпечення тканин та органів киснем відмічається за умов розвитку різних патологічних станів, найчутливішими до нестачі кисню виявляються клітини нервової системи. Центральне місце в регуляції відповіді на гіпоксичні впливи займають мітохондрії, які забезпечують клітину макроергічними сполуками за рахунок окиснювальних процесів, споживають до 90 % усього кисню в клітині та є місцем утворення основної кількості активних кисневих радикалів [1]. Відомо, що порушення функціонування мітохондрій за умов гіпоксії призводить до складних перебудов у клітинному гомеостазі, ініціюючи низку сигнальних і регуляторних шляхів, викликає енергетичний дефіцит у клітині й індукує розвиток окисного стресу [2]. На тлі гіпоксії концентрація АТФ у клітинах прогресивно зменшується протягом 30–60 с. Далі гальмуються практично всі біохімічні процеси і внаслідок зростання концентрації іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{Ca}^{2+}$  та зниження концентрації іонів  $\text{K}^+$  і  $\text{Mg}^{2+}$ , порушується іонний баланс і погіршуються електрофізіологічні параметри клітин [3].

Серед великого арсеналу лікарських засобів для корекції гіпоксичних станів одними з найактуальні-

ших є препарати, які здатні за допомогою різних механізмів нівелювати енергетичний дефіцит, захищати клітини від пошкодження й активувати процеси відновлення їхньої структури та функції, тобто, антигіпоксанти [4]. Таким антигіпоксантом метаболічної дії є сучасний вітчизняний препарат Мембратон® (ФАРКОС, Україна), до складу якого входить хелатна сполука магнію глюконату з гамма-аміномасляною кислотою (ГАМК) та вітамін В6 (піридоксину гідрохлорид).

Хелати були виділені в самостійний клас координаційних сполук завдяки їхнім унікальним фізико-хімічним і біологічним властивостям, обумовленим наявністю хелатного циклу. Структура хелатів практично ідентична природній структурі, завдяки чому хелати біологічно активні та відрізняються швидким засвоєнням. Як відомо, ГАМК є природним нейромедіатором, ключовою ланкою в реалізації процесів центрального гальмування шляхом взаємодії зі специфічними ГАМК-рецепторами в різних регіонах мозку [5]. Водночас ГАМК сприятливо впливає на енергетику нейрона, нейродинаміку, мозковий кровообіг тощо. Відбувається поєднання седативної та м'якої психостимулюючої дії, що спричиняє позитивний ефект щодо когнітивних і неврологічних функцій, мозкової гемодинаміки, а також у досягненні анксиолітичного ефекту [5, 6].

Доведено, що застосування ГАМК та її агоністів при порушеннях церебральної гемодинаміки попереджає руйнівну дію продуктів ліпопероксидації, сприяє нормалізації якісного та кількісного складу фосфоліпідів, тим самим здійснюючи протективний вплив на мембранні структури нервової тканини [7]. Встановлено також, що ГАМК-ергічні сполуки стимулюють швидкість утилізації глюкози, крім цього, при церебральній ішемії сама ГАМК може відігравати роль альтернативного субстрату в циклі трикарбонних кислот [8]. Ці факти вказують на здатність ГАМК-позитивних сполук нівелювати прояви енергодефіциту, викликаного порушенням доставки енергетичних субстратів за умов неадекватної гемодинаміки. Наведені дані роблять очевидним протективний вплив ГАМК-ергічних сполук практично на всі ланки патогенезу ішемії головного мозку [5–8]. Підтвердженням цьому є нормалізація під впливом Мембратону біохімічних маркерів (активності сукцинатдегірогенази, лактатдегірогенази, натрій-калієвої та кальцієвої АТФ-аз) в умовах моделювання ішемічного та реперфузійного пошкодження мозку тварин [5], а також встановлені ноотропні, анксиолітичні й антидепресантні ефекти в пацієнтів із хронічною ішемією мозку [10]. Однак вплив Мембратону на про- та антиоксидантну систему мітохондрій щурів за умов нестачі кисню ще остаточно не з'ясований.

*Мета дослідження* – вивчення впливу профілактичного введення Мембратону на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у мітохондріях мозку щурів за умов гострої гіпоксичної гіпоксії.

**Матеріали та методи.** Експерименти проведено на щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 230–250 г, які знаходились на стандартному раціоні.

Перед дослідженням тварин розподілили на 4 групи по 8 щурів: 1 – інтактні (контроль); 2 – тварини, які піддавалися одноразовому гострому гіпоксичному впливу (дихання гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 7 % O<sub>2</sub> в азоті протягом 45 хв); 3 – гостра гіпоксія після профілактичного *per os* введення Мембратону у фізіологічному розчині (протягом 7 днів 1 раз на добу в дозі 7,16 мг/кг маси тіла); 4 – тварини, яким протягом 7 днів вводили фізіологічний розчин *per os* у тому самому об'ємі, що й тваринам 3-ї групи. Щурів утримували та маніпуляції з ними здійснювали відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментах та з іншою науковою метою (Страсбург, 1986 р.).

Після декапітації щурів під легким ефірним наркозом мозок швидко виділяли та промивали охолодженим розчином 0,9 % KCl, подрібнювали та гомогенізували в 5-разовому об'ємі середовища (250 ммоль/л сахарози, 20 ммоль/л трис-HCl буфера, 1 ммоль/л ЕДТА, 1 мг/мл БСА; рН 7,4). Мітохондрії з мозку щурів виділяли шляхом диференційного центрифугування за допомогою центрифуги Allegra X22R W/F24024 «Beckman Coulter, GMI Inc, UK» за температури 4 °С. Для виділення мітохондрій гомогенат центрифугували 7 хв, 1000 g (I етап), потім супернатант центрифугували 15 хв, 12 000 g (II етап). Осад суспендували в невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА і БСА та зберігали на льоду. Вміст білка визначали за методом Бредфорда.

Ступінь окисного пошкодження мітохондрій оцінювали за вмістом активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [11] та перекису водню [12], антиоксидантний захист – за активністю Mn-супероксиддисмутази

(Mn-SOD) [13], глутатіонпероксидази (ГП) [14], глутатіонредуктази (ГР) [15]. Вміст відновленого глутатіону вивчали в безбілковій суспензії мітохондрій, яку виготовляли на основі 5 % 5-сульфосаліцилової кислоти. Концентрацію відновленого глутатіону (GSH) визначали за реакцією з реактивом Елмана [16].

Результати досліджень оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики за програмою «Origin 7.0». Вірогідність розходжень між групами порівняння була визначена методом дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test).

**Результати та їх обговорення.** Результати, отримані в тварин 4-ї групи, не відрізнялися вірогідно від значень у щурів 1-ї групи, тому вони не були включені до рисунків. Відомо, що нестача кисню призводить до значних змін у прооксидантно-антиоксидантному балансі мітохондрій [2]. У нашому дослідженні гостра тяжка гіпоксична гіпоксія викликала підвищення вмісту ТБК-АП і перекису водню в мітохондріях мозку щурів на 39 і 60 %, відповідно, порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). Така інтенсифікація процесів ПОЛ свідчить про надмірне утворення активних форм кисню, можливо, за рахунок неповного відновлення кисню в дихальному ланцюзі мітохондрій і некомпенсованості пероксидних процесів з боку антиоксидантних систем. Ступінь деструктивно-метаболических порушень клітин за умов надмірної генерації активних кисневих метаболітів залежить від стану ферментних і неферментних антиоксидантних систем, які в нормоксичних умовах регулюють рівень вільнорадикальних процесів. Важлива роль у цих системах належить Mn-SOD та глутатіон-залежним ферментам ГП і ГР, що діють у взаємозв'язку [1, 2, 17].

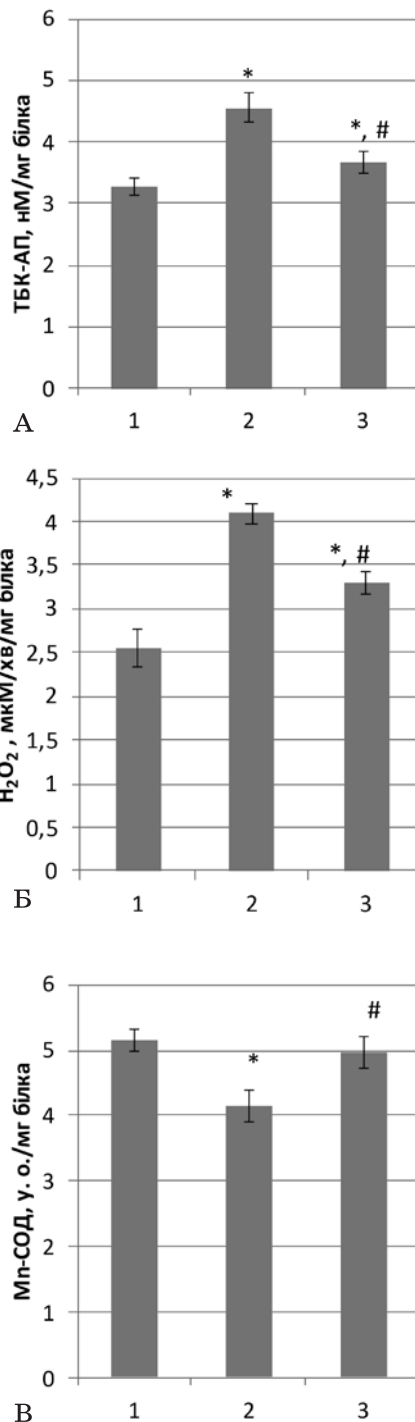
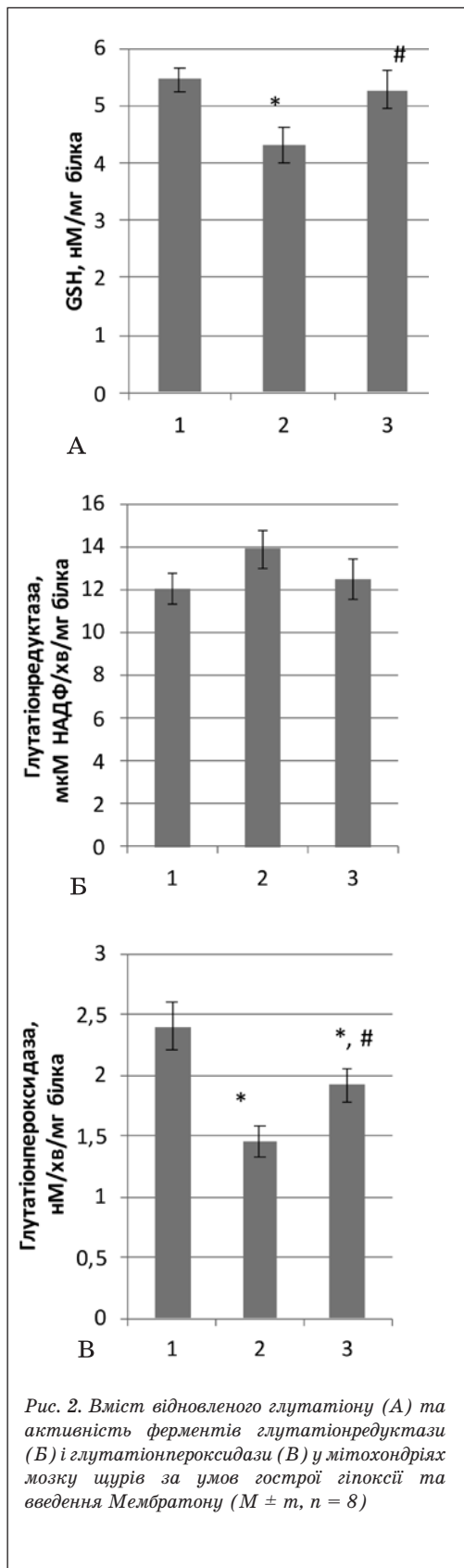


Рис. 1. Вміст ТБК-АП (А), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Б) та активність Mn-SOD (В) у мітохондріях мозку щурів за умов гострої гіпоксії та введення Мелбратону ( $M \pm t$ ,  $n = 8$ )

Примітка. Тут і на рис. 2: 1 – контроль, 2 – гостра гіпоксія, 3 – гостра гіпоксія + Мелбратон, \* $p < 0,05$  порівняно з контролем; # $p < 0,05$  порівняно з гострою гіпоксією.



За умов гострої гіпоксії відмічалось зниження активності Mn-SOD на 21 % ( $p < 0,05$ ) відносно контролю (рис. 1). Як показано рядом дослідників, інгібування активності Mn-SOD призводить до порушень у функціонуванні мітохондрій, зокрема процесів окиснювального фосфорилування, накопичення окисних пошкоджень, підвищення чутливості до гіпоксії та інших стресорних проявів, що веде до активації апоптичних процесів, дистрофічних змін у тканинах і загибелі тварин [18–20]. Одночасно в мітохондріях мозку щурів спостерігалось зниження вмісту GSH, а також активності антипероксидного ферменту ГП на 21 і 39 %, відповідно відносно контролю ( $p < 0,05$ ) (рис. 2). Активність ГР мала тенденцію до зниження. Дисбаланс глутатіонового рециклу, який був показаний у нашому дослідженні, додатково свідчить про наявність окисного стресу в цих субклітинних структурах за умов гострої гіпоксії. Відомо, що інактивація пероксидних сполук глутатіонпероксидазою суттєво залежить від вмісту супероксидрадикалу, який у надмірній кількості може бути її інгібітором, зниження рН середовища внаслідок розвитку викликаного гострою гіпоксією ацидозу, а також вичерпання пулу відновленого глутатіону [17]. Подібні зміни в глутатіоновому пулі мітохондрій за умов гострої гіпоксії відмічались також і в інших роботах [18–20].

Таким чином, окисний стрес, який викликаний тяжкою гострою гіпоксією, призводить до дисбалансу про- та антиоксидантної системи мітохондрій і, імовірно, до мітохондріальної дисфункції.

Превентивне застосування Мембратону викликало уповільнення прооксидантних процесів у мітохондріях мозку щурів, які піддавалися дії

тяжкої гострої гіпоксії. Так, у тварин 3-ї групи вміст ТБК-АП та  $H_2O_2$  знижувався на 19 і 20 % відповідно, у той самий час як активність Мп-СОД зростала на 20 %, на відміну від тварин 2-ї групи ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). Ці дані свідчать про здатність комплексу ГАМК-Mg гальмувати вільнорадикальні реакції на стадії їхньої ініціації та запобігати надмірному утворенню активних кисневих радикалів у дихальному ланцюзі мітохондрій, що забезпечує його більш ефективне функціонування в умовах нестачі кисню та може бути однією зі складових механізмів адаптації до гіпоксичної гіпоксії [20].

Ми вважаємо, що встановлена в наших дослідженнях антигіпоксична й антиоксидантна активність хелатного комплексу ГАМК-Mg пов'язана з його здатністю позитивно впливати на енергетичний обмін і збільшувати ступінь енергізації клітини. Це відбувається за рахунок доставки в клітину (за участю ГАМК) додаткової кількості сукцинату, який здатен за екстремальних умов використовуватися як енергетичний субстрат для дихального ланцюга, відновлюючи синтез і накопичення АТФ у мітохондріях [21, 22]. Інтенсифікація шляхів утворення сукцинату в тканині мозку при гіпоксії може відбуватися за різних реакцій, зокрема й при активації циклу Робертса або ГАМК-шунту [6, 8, 23]. Останній є важливим компенсаторним механізмом енергопродукції, який активується в мозку за умов гіпоксії шляхом послідовного окиснення глутамату в ГАМК, бурштиновий напівальдегід і сукцинат, що забезпечує поставку сукцинату в цикл Кребса та дихальний ланцюг мітохондрій [8]. Додаткове введення ГАМК у формі хелатної сполуки, імовірно, призводить до більш ефективного

окиснення субстрату та збалансованості між процесами окиснення та фосфорилування в мітохондріях за умов гострої гіпоксії.

У нашому дослідженні в антиоксидантній системі мітохондрій мозку при застосуванні Мембратону відзначалося зростання вмісту відновленого глутатіону, а також активності ГП на 22 та 32 % ( $p < 0,05$ ) відповідно, водночас активність ГР мала лише тенденцію до підвищення (рис. 2). Приріст активності ГП, імовірно, був пов'язаний зі зменшенням продукції супероксидрадикалу та послабленням викликаного гострою гіпоксією ацидозу, оскільки сукцинат, виконуючи каталітичну функцію щодо циклу трикарбонових кислот, знижує концентрацію інших інтермедіатів даного циклу: лактату, пірувату та цитрату, що продукуються на ранніх стадіях гіпоксії [21].

І на додаток, застосування Мембратону сприяє додатковому входу іонів магнію в клітину. За умов гіпоксії це має свій позитивний ефект, оскільки останні беруть участь у багатьох ферментативних реакціях і тому відіграють важливу роль у регуляції метаболізму, включаючи синтез АТФ. Вони також здатні модулювати роботу рецепторів і цим впливати на клітинний метаболізм. Магній діє як вазодилатор, розширюючи периферичні судини та судини головного мозку, тим самим послаблюючи наслідки ішемії [24]. Крім того, магній підтримує цілісність гематоенцефалічного бар'єра, обмежує розвиток набряку головного мозку та чинить центральну антиконвульсивну дію за екстремальних умов [25].

## Висновки

1. Профілактичне пероральне введення Мембратону протягом 7 днів у дозі 7,16 мг/кг мало коригуючий вплив

на процесі ПОЛ, вміст перекису водню, нормалізувало активність антиоксидантних ферментів і стан глутатіонової системи мітохондрій мозку щурів за умов окисного стресу,

викликаного дією гострої гіпоксії.

2. Мембратон може застосовуватися як ефективний адаптоген для підвищення стійкості організму до вільнорадикальних процесів гіпоксичного генезу.

1. Lukyanova L. D. Novel approach to the understanding of molecular mechanisms of adaptation to hypoxia, In: Hargens A., Takeda N., Singal P. (Eds.). *Adaptation Biology and Medicine, Current Concepts*, New Delhi : Narosa, 2005.
2. Gonchar O., Mankovskaya I. Antioxidant system in adaptation to intermittent hypoxia. *J. Biol. Sci.* 2010. V. 10. P. 545–554.
3. Bell E., Emerling B., Chandel N. Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Mitochondrion*. 2005. V. 5. P. 322–332.
4. Антигіпоксанти метаболіческого действия – перспективные средства коррекции окислительных и репаративных процессов в тканях. В. А. Костенко, Л. Ю. Глебова, Н. Н. Мельник и др. *Вісник Української медичної стомат. академії*. 2003. Т. 3. № 1 (5). С. 4–8.
5. Ноотропы в комплексной терапии хронической ишемии мозга. И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, А. В. Демченко и др. *Наука та інновації*. 2014. Т. 10. № 4. С. 61–75.
6. Ellergast J. P. Gamma-aminobutyric acid – mediated neurophysiological effects in the central nervous system. *Brain neurophysiology*. Chicago : Illinois Univ. Press, 2000. P. 497–530.
7. Хайтович М. В. ГАМК-ергічна нейропротекція: клінічне застосування. *Ліки України*. 2016. № 1–2 (197–198). С. 33–37.
8. Kim K., Yoon H. Gamma-aminobutyric acid signaling in damage response, metabolism, and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 4584.
9. Goddard A. W. Cortical and subcortical gamma amino butyric acid deficits in anxiety and stress disorders: Clinical implications. *World J. Psychiatry*. 2016. V. 6 (1). P. 43–53.
10. Шкробот С. І., Мілевська-Вовчук Л. С. Хелатні сполуки у лікуванні хронічної ішемічної хвороби мозку (огляд літератури та власні спостереження). *The journal of neuroscience named after V. M. Mankovskyi*. 2016. Т. 4, № 1. С. 23–27.
11. Buege J., Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978. V. LII. P. 302–308.
12. Wolff S. P. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology*. 1994. V. 233. P. 182–189.
13. Misra H., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of Epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972. V. 247. P. 3170–3175.
14. Flohé L., Gunzler W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. 1984. V. 105. P. 114–121.
15. Carlberg I., Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 1985. V. 113. P. 484–490.
16. Sedlak J., Lindsay R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*. 1968. V. 25. P. 192–205.
17. Jezek P., Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. V. 37. P. 2478–2503.
18. Gonchar O., Mankovskaya I. Effect of moderate hypoxia/reoxygenation on mitochondrial adaptation to acute severe hypoxia. *Acta Biologica Hungarica*. 2009. V. 60 (2). P. 185–194.
19. Gonchar O., Mankovska I. Hypoxia/reoxygenation modulates oxidative stress level and antioxidative potential in lung mitochondria: possible participation of P53 and NF-KB target proteins. *Archives of Pulmonology and Respiratory Care*. 2017. V. 3. P. 035–043.
20. Lukyanova L. D. Mitochondria signaling in adaptation to hypoxia. *Int. J. Physiol. Pathophys.* 2014. V. 5 (4). P. 363–381.
21. Orlov Yu. P., Govorova N. V. Role of Succinates in Critical Conditions. *General reanimatology*. 2014. V. 10 (6). P. 65–78.
22. Вплив мексидолу на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз та процесі окисного фосфорилування в мітохондріях міокарда щурів за умов гострої гіпоксії. М. Стешенко, О. Гончар, В. Носарь та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2010. № 4 (17). С. 64–69.
23. Bak L. K., Schousboe A., Waagepetersen H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*. 2006. V. 98. P. 641–653.
24. Чекман И. С. Биохимическая фармакодинамика. Киев : Здоров'я. 1991. 200 с.
25. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. N. E. L. Saris, E. Mervaala, H. Karppanen et al. *Clin. Chim. Acta*. 2000. V. 249. P. 1–26.

---

**О. О. Гончар, О. О. Клименко, І. М. Маньковська**

## **Хелатна сполука ГАМК покращує антиоксидантний захист мітохондрій мозку щурів за умов гіпоксії**

У наш час постійно збільшується кількість і вірогідність розвитку патологічних станів, пов'язаних з нестачею кисню. Окисний стрес мітохондріального походження вважається одним із провідних патогенетичних механізмів тканинних пошкоджень при різних типах гіпоксії. Тому пошук препаратів з антигіпоксичною й антиоксидантною дією залишається актуальним.

*Мета дослідження* – вивчення впливу профілактичного введення Мембратону на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у мітохондріях мозку щурів за умов гострої гіпоксичної гіпоксії.

Мембратон® (ФАРКОС, Україна) є препаратом метаболічної дії, до складу якого входить хелатна сполука магнію глюконату з гамма-аміномасляною кислотою та вітамін В6 (піридоксину гідрохлорид). Перевагою цього препарату серед існуючих з подібним складом є те, що хелатні сполуки мають природну структуру, завдяки чому вони біологічно активні та швидко засвоюються.

Було показано, що профілактичне введення Мембратону (7,16 мг/кг) щодня впродовж 7 днів зменшувало вміст вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів і перекису водню, підвищувало активність антирадикального ферменту Mn-супероксиддисмутази, що свідчить про послаблення окисних процесів за умов гострої тяжкої гіпоксичної гіпоксії. Це відбувалося на тлі підвищення вмісту відновленого глутатіону, зростання активності антиперекисного ферменту глутатіонпероксидази та тенденції до зростання активності глутатіонредуктази в мітохондріях мозку тварин.

Таким чином, профілактичне введення Мембратону мало коригуючий вплив на прооксидантні процеси, нормалізувало активність антиоксидантних ферментів і стан глутатіонової системи мітохондрій мозку щурів, що зменшувало вираженість окисного стресу, викликаного дією гострої гіпоксії. Мембратон показав себе як ефективний адаптоген для підвищення стійкості організму до вільнорадикальних процесів гіпоксичного генезу.

*Ключові слова:* Мембратон, мітохондрії, гіпоксія, окисний стрес, антиоксидантна система

**О. О. Gonchar, O. O. Klymenko, I. M. Mankovska**

## **GABA chelating compound improves antioxidant protection of rat's brain mitochondria under hypoxia**

Nowadays, the number and probability of the associated with a lack of oxygen pathological conditions is constantly increasing. Oxidative stress of mitochondrial origin is considered one of the leading pathogenetic mechanisms of tissue damage in various types of hypoxia. Therefore, the search for drugs with antihypoxic and antioxidant effects remains relevant.

The study investigated the effect of the modern Ukrainian drug Membraton on the intensity of lipid peroxidation processes, the content of hydrogen peroxide, as well as reduced glutathione, the activity of the antioxidant enzymes Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in the mitochondria of the rat brain under conditions of acute severe hypoxic hypoxia (the animals breathed a hypoxic gas mixture, which contained 7% O<sub>2</sub> in nitrogen for 45 min). Membraton® (FARKOS, Ukraine) is a drug of metabolic action, which includes a chelated compound of magnesium gluconate with gamma-aminobutyric acid and vitamin B6 (pyridoxine hydrochloride). The advantage of this drug among existing ones with a similar composition is that the chelated compounds have a natural structure, due to which they are biologically active and quickly absorbed.

It was shown that prophylactic administration of Membraton (7.16 mg/kg) daily for 7 days reduced the content of secondary products of lipid peroxidation and hydrogen peroxide, increased the activity of the antiradical enzyme Mn-superoxide dismutase, which indicates a weakening of oxidative processes under conditions of acute severe hypoxic hypoxia. This occurred against the background of an increase in the contents of reduced glutathione, the anti-peroxide enzyme glutathione peroxidase, and a tendency to increase the activity of glutathione reductase in the mitochondria of animal brains.

Thus, prophylactic administration of Membraton showed a corrective effect on pro-oxidant processes, normalized the activity of antioxidant enzymes and the state of the glutathione system of rat brain mitochondria, which reduced the severity of oxidative stress caused by acute hypoxia. Membraton proved to be an effective adaptogen for increasing the body's resistance to free radical processes of hypoxic genesis.

*Key words:* Membraton, mitochondria, hypoxia, oxidative stress, antioxidant system

---

Надійшла: 22 липня 2024 р.

Прийнята до друку: 21 серпня 2024 р.

**Контактна особа:** Гончар Ольга Олександрівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, відділ з вивчення гіпоксичних станів, Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, буд. 4, вул. Богомольця, м. Київ, 01024. Тел.: + 38 0 44 256 24 92.