

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

АНТИГИПОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ИНТРАОРГАНОИДНОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО СРЕДСТВА МИТОХОНДРИНА

А. Н. Макаренко, Е. О. Клебанский, Л. П. Широбокова¹

С целью изучения антигипоксического и мембранопротекторного действия нового интраорганойдного средства М-1 проведено две серии экспериментов. В первой серии изучали антигипоксическое действие М-1 с использованием модели гипоксии-гиперкапнии, во второй — мембранопротекторное действие М-1 на модели гемической гипоксии при нейротоксическом поражении, которое было вызвано острым отравлением нитробензолом. Установлено, что М-1, полученный из мозга новорожденных крольчат обладает антигипоксической активностью, его эффект проявляется при гипоксическо-гиперкапнической и гемической формах гипоксии. Действие препарата более выражено через 3 ч, чем через сутки после применения. Антигипоксическая активность М-1 связана с его цитомембранным нейропротекторным действием.

Ключевые слова: митохондрия, гипоксия, интраорганойдный препарат, протекторное действие

ВВЕДЕНИЕ

Изучение гипоксических механизмов повреждения ультраструктур клеток и органов, высокочувствительных к недостатку кислорода, указывает на возможный путь поиска принципиально нового класса антиишемических средств. В частности, в условиях острой гипоксии или гипоксии, сочетающейся с гипогликемией, другими экстремальными факторами, отмечено ускоренное высвобождение в ЦНС возбуждающего нейромедиатора глутамата из пресинаптических аксонных окончаний с последующим поступлением ионов Ca^{2+} в цитоплазму и органоиды нейронов мозга [1]. Данный процесс сопровождается возникновением резких ультраструктурных повреждений органоидов и, прежде всего, митохондрий и системы дендритных микротрубочек [2, 3].

Известно, что митохондрии, гранулярный эндоплазматический ретикулум, цитомембраны нейронов эмбрионов новорожденных млекопитающих (в том числе человека) по сравнению с таковыми у половозрелых особей отличаются повышенной устойчивостью к воздействию острой и хронической кислородной недостаточности различного генеза, сохранностью функций нейронов, более эффективным восстановлением нарушений мозговых функций в постгипоксическом периоде.

Это дало возможность предположить наличие в ультраструктурах клеток эндогенных антигипоксических факторов, которые можно было бы использовать как средства для профилактики и лечения больных в

раннем и позднем периодах после перенесенной гипоксии.

Для проверки этого предположения впервые был выделен интраорганойдный препарат митохондрия (М-1) с использованием предложенного нами способа получения трофинотропинов [4].

С целью изучения антигипоксического и мембранопротекторного действия М-1 проведено две серии экспериментов. В первой серии изучали антигипоксическое действие М-1 с использованием модели гипоксии-гиперкапнии, а во второй — мембранопротекторное действие М-1 на модели гемической гипоксии при нейротоксическом поражении, которое было вызвано острым отравлением нитробензолом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на половозрелых лабораторных животных — самцах: беспородных белых крысах с начальной массой тела 250 – 300 г и мышах 17 – 20 г. Животных после карантина (2 нед) содержали на стандартном пищевом рационе вивария.

Для оценки защитного действия препарата М-1, как возможного мембраностабилизирующего средства, использован метод определения осмотической резистентности эритроцитов на модели гемической гипоксии, вызванной острым отравлением нитробензолом [5 – 8]. В экспериментах использовали 4 группы крыс. 1-я группа состояла из интактных животных, 2-ю составляли крысы, отравленные нитробензолом. В 3-й и 4-й группах для коррекции острого отравления нитробензолом применяли соответственно препарат сравнения церебрал [4] и средство М-1.

Гемическую гипоксию моделировали однократным введением водного раствора нитробензола, который

¹ Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины. Киев, 02057, ул. Эжена Потье, 14.

готовили с добавлением твин-85. Раствор вводили металлическим зондом в желудок в дозе 341 мг/кг массы животного. Растворы церебрала и М-1 готовили с использованием физиологического раствора и вводили животным внутривентриально однократно через 30 мин после отравления нитробензолом. Дозы препаратов одинаковы — 0,1 мг активного вещества на 1 кг массы крыс.

Через 3 ч и на 7-е сутки после отравления у животных брали кровь из паховой вены для определения осмотической резистентности эритроцитов. В пробирки с раствором NaCl разных концентраций вносили по 0,1 мл крови и оставляли на 24 ч при температуре 22°C. Через сутки все пробы центрифугировали (3000 об/мин) на протяжении 30 мин с использованием центрифуги ЦЛК-1. Поглощение растворов определяли на фотоэлектроколориметре КФК-2МП при длине волны 450 нм в кювете (10 мм).

Во второй серии экспериментов изучали защитное действие М-1 на оригинальной модели гипоксии-гиперкапнии. Мышей помещали в одинаковые гермокамеры; учитывая массу животных, создавали одинаковые объемы воздуха в каждой камере. В ходе экспериментов регистрировали начало возникновения судорог и время гибели животных.

Препарат М-1 вводили внутривентриально в дозе 0,1 мг/кг. В 1-ю экспериментальную группу вошли животные, которым внутривентриально вводили 0,9% NaCl, мышам 2-й и 3-й групп вводили М-1 соответственно за 24 и 3 ч до размещения их в гермокамерах. Мышам 4-й группы в желудок однократно вводили препарат сравнения тазепам в дозе 10 мг/кг, через 3 ч их помещали в гермокамеры.

С целью определения влияния М-1 на метаболические процессы проводили регистрацию прироста массы тела и температурной депрессии экспериментальных животных.

Результаты обрабатывали статистически с помощью персонального компьютера, с определением критерия Стьюдента [9, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценивая протекторное действие М-1, как мембраностабилизирующего средства, при определении осмотической резистентности эритроцитов крови крыс получили следующие результаты. В крови интактных животных при концентрациях раствора NaCl 0,25, 0,3 и 0,35% наблюдали полный гемолиз эритроцитов. При увеличении концентрации NaCl до 0,5% количество гемолизированных эритроцитов уменьшалось и составляло 9,8% (табл. 1). В контрольной группе животных под влиянием нитробензола (1/2 ЛД₅₀) через 3 ч после отравления гемолиз 87,3% эритроцитов наблюдали в 0,35% растворе NaCl, который постепенно уменьшался с увеличением концентрации NaCl до 0,5%. При дальнейшем увеличении концентрации NaCl количество гемолизированных эритроцитов было небольшим и практически не отличалось от показателей у интактных животных. На фоне гемической гипоксии регистрировали незначительное позитивное влияние церебрала на организм крыс (см. табл. 1). При этом несколько повышалась осмотическая резистентность эритроцитов в сравнении с показателями контрольной группы отравленных животных. Так, в 0,4% растворе NaCl наблюдался гемолиз 50,5%, а в 0,5% растворе NaCl гемолиз 11,5% эритроцитов. Эти показатели не соответствовали таковым в интактной группе животных. Более ярко защитное действие церебрала проявилось на 7-е сутки наблюдения. Гемолиз уменьшился с 13,6% до 7,5% в 0,45% растворе NaCl и больше чем в два раза — с 38,7% до 17,8% — в 0,4% растворе NaCl по сравнению с показателями контрольной группы отравленных крыс. Это свидетельствует о том, что под влиянием церебрала в более поздний период отравления существенно повышается клеточная резистентность, а точкой приложения церебрала являются цитомембраны клеток, где происходит активация ферментных систем антиоксидантной защиты [11].

Анализ результатов по влиянию М-1 на осмотическую резистентность эритроцитов свидетельствует о позитивном действии препарата на их мембраны через 3 ч после отравления нитробензолом (см. табл. 1). Отмечено уменьшение гемолиза с 16% у контрольной группы отравленных животных и 11,5% в группе с

Таблица 1. Оценка влияния церебрала и М-1 на осмотическую резистентность эритроцитов крыс при отравлении нитробензолом (n = 6)

Серия	Концентрация NaCl, %	Гемолиз, % (3 часа)				Гемолиз, % (7 суток)		
		интактные животные (контроль)	нитробензол 1/2 ЛД ₅₀	церебрал	М-1	нитробензол 1/2 ЛД ₅₀	церебрал	М-1
1	0,25	100	100	100	100	100	100	100
2	0,3	100	100	100	100	100	100	100
3	0,35	100	87,3	100	81,3	76,6	78,5	76,9
4	0,4	59	62,8	50,5	51,9	38,7	17,8	53,3
5	0,45	12,2	32,0	22,7	14,7	13,6	7,5	25,6
6	0,5	9,8	16	11,5	5,6	7,7	5,8	9,2

применением церебрала до 5,6% с применением М-1 в 0,5% растворе NaCl, а также соответственно: с 32 и 22,7% до 14,7% с применением М-1 в 0,45% растворе NaCl. На 7-е сутки наблюдения уменьшение гемолиза эритроцитов в данной группе животных не зарегистрировано.

Оценивая влияние М-1 на общие метаболические процессы в организме крыс следует отметить, что, как в начале (3 ч), так и в конце исследования (7 сут) у животных, которым вводили М-1, зафиксирована стабильная температура тела в пределах нормы. На 7-е сутки наблюдения отмечено незначительное уменьшение массы тела (табл. 2). В то же время у отравленных нитробензолом животных зафиксировано уменьшение массы тела по сравнению с исходными данными, тогда как у крыс с применением церебрала наблюдался прирост массы тела (на 6,5 г; $p < 0,05$) по сравнению с исходными данными. Что касается температурной депрессии в этой группе животных, то через 3 ч после отравления зафиксировано падение температуры до $(35,05 \pm 0,24)^\circ\text{C}$. На 7-е сутки наблюдения температура крыс нормализовалась.

Все сказанное свидетельствует о том, что при гемической форме гипоксии, вызванной введением нитро-

бензола, защитное действие церебрала проявляется в более поздний период, что отражалось в повышении осмотической резистентности эритроцитов крови, увеличении массы тела животных и нормализации температурного гомеостаза на 7-е сутки наблюдений. Защитные свойства М-1 проявлялись в ранний период после отравления, что сопровождалось повышением осмотической резистентности эритроцитов крови, стабильной нормальной температурой тела и незначительным снижением массы животных.

Изучение защитного действия М-1 на модели гипоксии — гиперкапнии показало, то препарат увеличивает продолжительность жизни мышей в гермокамерах (табл. 3). При профилактическом однократном введении М-1 за 3 ч до размещения их в камерах наблюдалось увеличение продолжительности жизни животных на 19% по сравнению с контролем, а у животных, которым М-1 вводили за сутки до размещения в камерах, регистрировали увеличение продолжительности жизни на 5,3% по сравнению с контролем. Это свидетельствует об активации компенсаторных антигипоксических механизмов мышей в первые часы после введения препарата. В связи с этим, М-1 можно охарактеризовать как антигипоксиксисант эндогенного про-

Таблица 2. Влияние церебрала и М-1 на температуру тела и массу крыс при однократном введении на фоне гемической гипоксии, вызванной отравлением нитробензолом ($M \pm m$, $n = 6$)

Условия эксперимента	Масса тела, г		Температура тела, °C					
	исходная	7 сут	исходная	1 ч	2 ч	3 ч	1 сут	7 сут
Контроль-животные, отравленные нитробензолом	261 ± 1,78	259 ± 0,44	37,85 ± 0,11	35,85 ± 0,29**	34,85 ± 0,15**	34,55 ± 0,20**	35,8 ± 0,08**	36,1 ± 0,04**
Животные, которым вводили церебрал через 30 мин после отравления нитробензолом	292,5 ± 3,35*	299 ± 2,68*	38,05 ± 0,06	35,9 ± 0,22**	35,2 ± 0,26**	35,05 ± 0,24**	36,5 ± 0,22*, **	38,7 ± 0,13*, **
Животные, которым вводили М-1 через 30 мин после отравления нитробензолом	258,5 ± 2,45	256,5 ± 2,01	37,3 ± 0,04*	37,1 ± 0,31*	37 ± 0,44*	37,1 ± 0,31*	36,6 ± 0,08***	36,3 ± 0,04***

Примечание. Различия достоверны относительно: * — контроля, ** — исходных данных ($p < 0,05$).

Таблица 3. Влияние профилактического применения тазепама и М-1 на продолжительность жизни и время возникновения судорог у мышей в условиях гипоксии-гиперкапнии ($M \pm m$, $n = 10$)

Препарат	Доза, мг/кг	Время помещения в гермокамеры	Путь введения препарата	Время возникновения судорог, мин	Время гибели, мин
Физиологический раствор		через 3 ч после введения	внутрибрюшинно	17,8 ± 0,56	18,8 ± 0,56
Тазепам	10	через 3 ч после введения	в желудок	34,9 ± 2,01*	35,7 ± 2,07*
М-1	0,1 активного вещества	через 3 ч после введения	внутрибрюшинно	21,4 ± 0,43*	22,4 ± 0,43*
М-1	0,1 активного вещества	через 1 сутки после введения	внутрибрюшинно	18,8 ± 1,4	19,8 ± 1,4

Примечание. * — различия достоверны относительно контроля ($p < 0,05$).

Таблица 4. Влияние М-1 на температуру тела и массу мышей при однократном введении (внутрибрюшинно 0,1 мг активного вещества на 1 кг массы тела), $n = 10$

Группа	Масса тела, г		Температура тела, °С						
	исходная	24 ч	исходная	1 ч	2 ч	3 ч	22 ч	23 ч	24 ч
Контроль	18,64 ± 0,28	18,77 ± 0,20	37,58 ± 0,09	37,68 ± 0,09	37,62 ± 0,09	37,64 ± 0,10	37,78 ± 0,09	37,72 ± 0,09	37,52 ± 0,10
М-1	18,56 ± 0,18	19,65 ± 0,41*	37,56 ± 0,18	36,92 ± 0,16***	37,26 ± 0,17	36,52 ± 0,07***	38,0 ± 0,17	37,4 ± 0,13	36,68 ± 0,24***

Примечание. Различия достоверны относительно: * — исходных данных, ** — контроля ($p < 0,05$).

исхождения с малым латентным периодом действия, что является его наиболее характерной фармакологической особенностью.

При различных вариантах интоксикации организма, сопровождающихся выраженными гипоксическими эффектами, характерными и информативными показателями являются время возникновения судорог и время гибели экспериментальных животных. В ходе наших исследований установлено, что М-1 увеличивает время до возникновения судорог у мышей на 20% при его введении за 3 ч до размещения животных в гермокамерах и на 5,6% — при введении за сутки по сравнению с показателями контрольной группы.

Защитное действие тазепама (см. табл. 3) в этой серии исследований было ярко выражено и проявилось в том, что время до наступления судорог у экспериментальных мышей, помещенных в гермокамеры, при его профилактическом введении увеличивалось на 96%, а продолжительность жизни мышей в условиях гипоксии — гиперкапнии увеличивалась на 89,8% по сравнению с контрольными животными и на 59,3% по сравнению с группой животных, которым вводили М-1 за 3 ч до размещения в гермокамерах.

Анализируя влияние М-1 на метаболические процессы у мышей, следует отметить, что от начала (1 ч) и до конца наблюдений (1 сут) у животных, которым вводили М-1, фиксировалась стабильная температура тела в пределах видовой нормы, не наблюдалось уменьшения массы животных через 2 ч после введения М-1, особенно в первые часы после его введения (табл. 4).

Анализ данных литературы свидетельствует о разности существенных или необратимых нарушениях церебрального метаболизма в ЦНС в условиях гипоксии, что сопровождается вовлечением в реакцию ряда нейромедиаторных систем, обеспечивающих суммарный нейропротекторный эффект. Таким свойством обладают ГАМК, глицин и особенно аденозин, которые обеспечивают данный эффект, угнетая, в частности, аспартат- и глутаматергическую синаптическую передачу, и являются эндогенными цитопротекторами [12, 13]. Существуют, по-видимому, не только синаптические, но и внутриклеточные факторы защиты органоидов и ультраструктур нейронов, которые индуцируются в условиях гипоксически-ишемического повреждения. К числу этих эндогенных нейрохимических протекторов относятся вещества, входящие в со-

став предложенного митохондриального средства М-1, полученного из матрикса данных органоидов.

На ранних этапах онтогенеза в разных отделах мозга отмечена слаборазвитая система аксосоматических и особенно аксодендритических синапсов, незрелая ультраструктурная организация митохондрий, что в свою очередь также является предпосылкой высокой степени обратимости нарушенных процессов после воздействия гипоксии [14 – 16]. Приведенные факты свидетельствуют о наличии эндогенных антигипоксических факторов, накапливающихся, по-видимому, в некоторых нейрональных ультраструктурах мозга на ранних (в том числе критических — родовой период и др.) этапах онтогенеза, которые можно использовать для профилактики и лечения больных в период воздействия и после перенесенной гипоксической травмы. С этой целью может быть использовано средство М-1, полученное из митохондриальной фракции коры головного мозга новорожденных крольчат в первые часы после рождения.

ВЫВОДЫ

1. Интраорганоидное биологически активное средство митондрин (М-1), полученное из мозга новорожденных крольчат, обладает антигипоксической активностью.
2. Фармакологический эффект М-1 проявляется на гипоксическо-гиперкапнической и гемической моделях гипоксии.
3. Его действие более выражено через 3 ч, чем через сутки после применения.
4. Антигипоксическая активность М-1 связана с его цитомембранным нейропротекторным действием.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. C. Lamar, *Protective effect of the Vinpocetin. Pharmacological brain ischemic models. Int. Symp. on Pharmacology of Cerebral Ischemia*, 21 – 23 march, 120 (1986).
2. Н. Н. Боголепов, *Ультраструктурная патология нейрона*, Медицина, Москва, сс. 216 (1975).
3. D. W. Choi, *Trend. Neurosci.*, **18**, 58 – 62 (1995).
4. А. Н. Макаренко, Ю. Н. Королев, Патент Украины № 24299А от 07.07.1998 г. и № 24299 от 01.03.2000 г.
5. С. Е. Хипко, Н. М. Василенко, Л. Н. Яшина, Ю. А. Колиевская, И. Д. Перец, *Гигиена труда и профессиональные заболевания*, № 4, 48 – 49 (1987).
6. *Руководство по клинической лабораторной диагностике*, М. А. Базарновой (ред.), Вища школа, Киев (1982), сс. 48 – 51.

7. В. С. Ронин, Г. М. Старобинец, Н. Л. Утевский, *Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований*, Медицина, Москва (1977), сс. 218 – 220.
8. Справочник по клиническим функциональным исследованиям, А. Гиттера (ред.), Медгиз, Москва (1960), сс. 534 – 535.
9. Ю. И. Иванов, О. Н. Погорелюк, *Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам*, Медицина, Москва (1990), сс. 224.
10. С. Г. Григорьева, В. В. Левандовский, А. М. Перфилов и др., *Пакет прикладных программ STATGRAPHICS на персональном компьютере*, Наука, Санкт-Петербург (1992), сс. 104.
11. Т. О. Дев'яткина, О. М. Важнича, О. М. Макаренко, *Ліки*, № 5 – 6, 66 – 70 (1999).
12. A. Nagaoka, T. Imai, E. Otamo, *J. Japan Pharm.*, **12**(7), 209 – 213 (1984).
13. H. Xiong, A. Baskys, J. M. Woitowicz. *Brain Res.*, **737**(7), 188 – 194 (1996).
14. G. S. Barolin, S. Koppi, E. Kapeller, *Eur. Rehab.*, No. 3, 135 – 143 (1996).
15. Ю. И. Барашнев, О. Е. Озерова, М. Г. Вьяскова, З. Х. Сорокина, *Акуш. и гинекол.*, № 11, 49 – 53 (1990).
16. B. S. Richardson, *Fetal adaptive responses to hypoxemia. Pediatrics and Perinatology. The scientific basis*, M. A. Gluckman (ed.), Heymann – Arnold, London (1996), pp. 228 – 233.

Поступила 23.04.2001

THE ANTIHYPOXANT ACTIVITY OF THE NEW INTRAORGANOID PHARMACOLOGICAL PREPARATION MITOCHONDRIN

A. N. Makarenko, E. O. Klebanskii, and L. P. Shirobokova

Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Medical Sciences of Ukraine,
ul. Ezhena Pot'e 14, Kiev, 02057 Ukraine

The antihypoxant and membranoprotector properties of the new intraorganoid pharmacological preparation mitochondrin (M-1) were studied in two series of experiments. In the first series, the drug activity was studied on a model of hypoxia with hypercapny; in the second series, the drug was tested on a model of hemic hypoxia caused by neurotoxic damage (acute nitrobenzene intoxication). It was established that M-1 (obtained from the brain tissue of newborn rabbits) possesses antihypoxant activity, which is manifested in both hypoxia – hypercapnia and hemic hypoxia. The drug effect was more pronounced 3 h after administration than on the next day. The antihypoxant action of M-1 is related to the cytomembrane neuroprotector activity.