

# ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

## ВОЗДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ И ХИТОЗАНА НА ОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, А. И. Сливкин, А. С. Данковцева<sup>1</sup>

При введении сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана крысам с ишемией/реперфузией головного мозга отмечено снижение уровня маркерного показателя развития ишемии — лактата, параметров биофлуоресценции, отражающих интенсивность свободнорадикальных процессов, и содержания продуктов перекисидного окисления липидов в тканях животных относительно контрольных значений (при патологии). Полученные результаты свидетельствуют о способности тестируемых фармакологических средств снижать степень проявления окислительного стресса при ишемии/реперфузии головного мозга вследствие положительного регулирующего воздействия на свободнорадикальный гомеостаз.

**Ключевые слова:** сукцинат хитозана; N-сукцинилхитозан; ишемия/реперфузия головного мозга; крысы; свободнорадикальное окисление биомолекул

### ВВЕДЕНИЕ

К одним из наиболее распространенных заболеваний зрелого, пожилого, а в последние десятилетия и молодого возраста относят острые нарушения мозгового кровообращения. Известно, что гибель нервной ткани при ишемии происходит в результате каскада патофизиологических процессов, среди которых важное место принадлежит активации свободнорадикального окисления (СРО) биомолекул [1].

Основным направлением терапии ишемических повреждений мозга является применение ноотропных и нейротропных препаратов, повышающих резистентность мозга к различным повреждающим воздействиям (в первую очередь к гипоксии), а также антиоксидантных средств. Особую актуальность имеет поиск и тестирование новых фармакологических средств, обладающих подобным действием. В данном аспекте интерес вызывают производные янтарной кислоты и хитозана. Антигипоксическое действие янтарной кислоты сопряжено с ее способностью интенсифицировать утилизацию кислорода тканями, восстановление НАД-зависимого клеточного дыхания, ресинтез АТФ-клетками [9, 11]. Антистрессорный и ноотропный эффекты данного вещества обусловлены его влиянием на транспорт медиаторных аминокислот и увеличение содержания в мозге ГАМК путем активации шунта Робертса [4, 5]. При ряде патологических состояний описано антиоксидантное действие янтарной кислоты [3, 9]. Среди спектра активностей хитозана —  $\beta$ -(1,4)-2-амино-2-дезоксид-Д-глюкана, деацетилированного аналога хитина — могут быть названы анти-

мутагенная и антиоксидантная, противолучевая, иммуномодулирующая, гиполипидемическая [12].

Целью данной работы явилось исследование влияния производных янтарной кислоты и хитозана на уровень маркерного показателя степени развития ишемии — лактата, и интенсивность процессов СРО биомолекул в тканях крыс при ишемии/реперфузии головного мозга (ИРГМ).

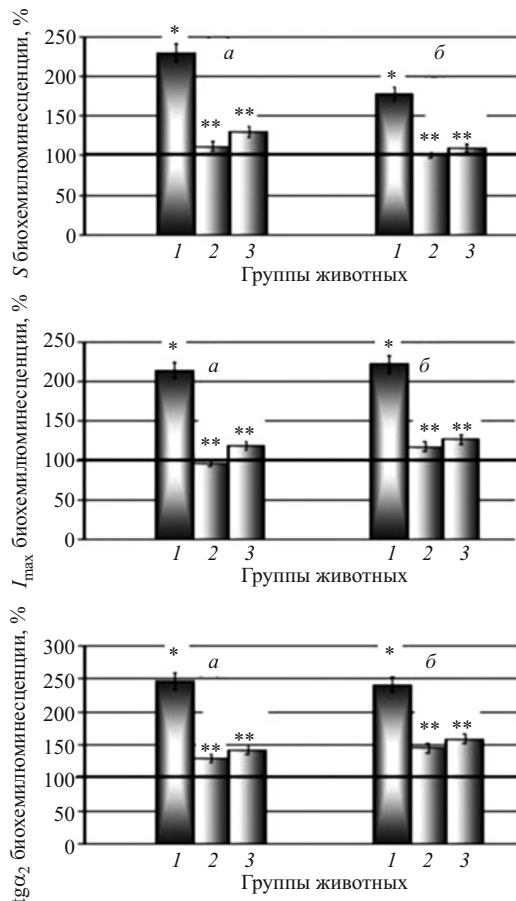
### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали 33 самца белых крыс массой 150–200 г. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным. ИРГМ у животных опытных групп воспроизводили под кетаминным наркозом путем 30-минутной окклюзии общих сонных артерий и последующего снятия окклюдоров [2]. Спустя 3 сут после процедуры животных умерщвляли. Кровь забирали из сердца, головной мозг извлекали по стандартной методике.

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы: “0” группа (контроль;  $n = 8$ ) — ложнооперированные животные; 1-я группа ( $n = 8$ ) — крысы с ИРГМ; 2-я группа ( $n = 9$ ) — животные с ИРГМ, которым вводили внутривенно сукцинат низкомолекулярного хитозана (соль, молекулярная масса 5 кДа; содержание примесей не более 1,2 %) в дозе 6 мг/кг в виде раствора в 0,5 мл 0,9 % NaCl дважды в день в течение 3 сут (первое введение — через 15 мин после восстановления кровотока, последнее — за 12–16 ч до исследования); 3-я группа ( $n = 8$ ) — крысы с ИРГМ, которым вводили N-сукцинилхитозан (имид, молекулярная масса 10 кДа; содержание примесей не более 3 %) по той же схеме. Тестируемые средства были синтезированы на фармацевтическом факультете Воронежского государственного университета.

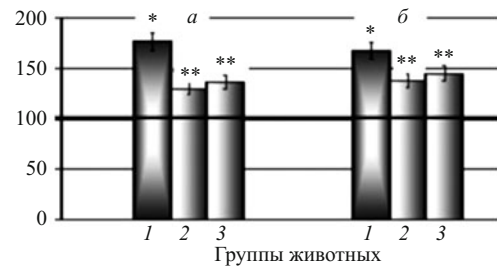
Гомогенат головного мозга крысы получали путем растирания навески ткани в 3-кратном объеме охлажден-

<sup>1</sup> Кафедра медицинской биохимии и микробиологии (зав. — проф. Т. Н. Попова), кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии (зав. — проф. А. И. Сливкин) ФГБОУ ВПО “Воронежский государственный университет”, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1.



**Рис. 1.** Параметры биомилюминесценции гомогената ткани головного мозга (а) и сыворотки крови (б) крыс экспериментальных групп. За 100 % принимали контрольные значения (для ткани головного мозга  $S = 11,66 \pm 0,46 \text{ mV} \cdot \text{с}$ ,  $I_{\text{max}} = 1,72 \pm 0,07 \text{ mV}$ ,  $tg\alpha_2 = 1,93 \pm 0,08$ ; для сыворотки крови  $S = 33,11 \pm 1,32 \text{ mV} \cdot \text{с}$ ,  $I_{\text{max}} = 6,12 \pm 0,24 \text{ mV}$ ,  $tg\alpha_2 = 1,09 \pm 0,04$ ). Здесь и на рис. 2: 1 — ишемия / реперфузия головного мозга, 2 — введение сукцината хитозана на фоне ИРГМ, 3 — введение N-сукцинилхитозана на фоне ИРГМ, \* — отличия от контроля (группа “0” — ложнооперированные) достоверны ( $p < 0,05$ ), \*\* — отличия от значений при ИРГМ достоверны ( $p < 0,05$ ).

ной среды выделения (50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,8, содержащий 1 мМ ЭДТА, 1 % β-меркаптоэтанол) и центрифугирования при 5000g в течение 10 мин. Полученный гомогенат и сыворотку крови сразу использовали для дальнейших исследований. Для определения содержания лактата использовали диагностический набор фирмы “Витал Диагностикс СПб” (Россия); принцип метода заключается в образовании из лактата окрашенного комплекса с  $\lambda_{\text{max}} 505 \text{ нм}$  под действием лактатоксидазы и пероксидазы. Уровень процессов СРО и общую антиоксидантную активность оценивали методом регистрации биомилюминесценции (БХЛ) образцов [6]. Определение содержания первичных продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов (ДК), проводили спектрофотометрически при 233 нм [10]. Аналитические определения для каждой пробы проводили в двухкратной повторности. Для статистической обработки использовали стандартные методы



**Рис. 2.** Содержание диеновых конъюгатов в гомогенате головного мозга (а) и сыворотке крови (б) крыс экспериментальных групп. За 100 % принимали контрольные значения (для ткани головного мозга  $7,89 \pm 0,32 \text{ мкмоль/л}$ , для сыворотки крови  $10,21 \pm 0,41 \text{ мкмоль/л}$ ). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

с применением *t*-критерия Стьюдента [7]. Обсуждаются статистически достоверные различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевыми звеньями патогенеза ишемического повреждения головного мозга являются нарушения энергетического обмена и интенсификация СРО биомолекул [1, 2]. Ранее нами было показано, что при окклюзии обеих общих сонных артерий с последующей реперфузией в головном мозге крыс значительно увеличивается содержание лактата (с  $1,76 \pm 0,07 \text{ мкмоль/г}$  сырой массы ткани в контроле до  $5,84 \pm 0,23 \text{ мкмоль/г}$ ,  $p < 0,05$ ), то есть интенсифицируется анаэробный гликолиз вследствие нарушения оксигенации ткани [8]. Введение сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана животным с ИРГМ приводило к снижению уровня данного метаболита в 1,6 и 1,5 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (до  $3,56 \pm 0,16$  и  $3,89 \pm 0,19 \text{ мкмоль/г}$  сырой массы ткани,  $p < 0,05$ ), что свидетельствует о наличии церебропротекторных и нейрометаболических свойств у тестируемых соединений.

Нами было обнаружено также увеличение параметров БХЛ и содержания продуктов ПОЛ в тканях крыс с ИРГМ относительно контроля, что свидетельствует об усилении свободнорадикальных процессов [8]. При введении сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана животным с ИРГМ происходит изменение параметров биомилюминесценции:  $S$  (светосуммы медленной вспышки) и  $I_{\text{max}}$  (интенсивности максимальной вспышки), в сторону контрольных значений. Так, в экспериментальных группах 2 и 3 было выявлено снижение значений  $S$  в 2,1 и 1,8 раза в гомогенате мозга, в 1,7 и 1,6 раза в сыворотке крови экспериментальных животных, по сравнению с неоперированными животными (рис. 1). Значения  $I_{\text{max}}$  при этом уменьшались в головном мозге в 2,2 и 1,8 раза, в сыворотке крови — в 1,9 и 1,7 раза соответственно (рис. 1).

При введении животным на фоне постишемической реперфузии сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана содержание ДК, возрастающее при патологии, снижалось в головном мозге в 1,4 и 1,3 раза, в сыворотке крови — в 1,2 и 1,1 раза, по сравнению со значениями при ИРГМ (рис. 2).

Наряду с этим при действии сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана было зарегистрировано снижение

тангенса угла наклона кинетической кривой БХЛ —  $tg\alpha_2$  — в гомогенате мозга в 1,9 и 1,7 раза, в сыворотке крови — в 1,7 и 1,5 раза, по сравнению с животными с ИРГМ (рис. 1). Данный параметр БХЛ характеризует скорость снижения интенсивности свечения и, следовательно, общий антиоксидантный потенциал биопробы. Увеличение  $tg\alpha_2$  при ИРГМ может быть объяснено тем, что в условиях ишемии/реперфузии начинают действовать компенсаторные механизмы, направленные на снижение уровня СРО в клетке, включающие, например, активацию ферментов антиоксидантной защиты. Соответственно уменьшение данного параметра в результате введения сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана, по всей видимости, связано с торможением свободнорадикальных процессов и последующим снижением степени мобилизации антиоксидантной системы.

Таким образом, можно сделать заключение о реализации антиоксидантного, антигипоксического и нейропротекторного эффектов производных янтарной кислоты и хитозана, их участия в нормализации клеточного метаболизма при патологии, сопряженной с развитием окислительного стресса, что согласуется с литературными данными [3, 4, 9, 11, 12]. Применение производных янтарной кислоты и хитозана на фоне развития ИРГМ приводило к изменению в сторону контрольных значений уровня лактата — показателя степени развития ишемии, параметров, отражающих скорость СРО биомолекул ( $S$  и  $I_{max}$  БХЛ, содержание ДК) и интегральную антиоксидантную активность ( $tg\alpha_2$  БХЛ), что, очевидно, свидетельствует о торможении свободнорадикальных процессов и нормализации работы антиоксидантной системы.

## ВЫВОДЫ

1. Сукцинат хитозана и N-сукцинилхитозана у крыс с постишемической реперфузией вызывают снижение в головном мозге уровня лактата — показателя степени развития ишемии — в 1,6 и 1,5 раза.

2. Действие тестируемых производных янтарной кислоты и хитозана на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга сопровождалось снижением параметров биохемилюминесценции, отражающей скорость свободнорадикальных процессов, и содержания продуктов липопероксидации в тканях. Так, значения  $S$  (светосуммы медленной вспышки) уменьшались в 2,1 и 1,8 раза в гомогенате мозга, в 1,7 и 1,6 раза — в сыворотке крови;  $I_{max}$

(интенсивности максимальной вспышки) — в головном мозге в 2,2 и 1,8 раза, в сыворотке крови — в 1,9 и 1,7 раза; уровня диеновых конъюгатов — в головном мозге в 1,4 и 1,3 раза, в сыворотке крови — в 1,2 и 1,1 раза.

3. В результате введения сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана отмечено снижение значений  $tg\alpha_2$  хемилюминесценции, характеризующего общую антиоксидантную активность, в головном мозге в 1,9 и 1,7 раза, в сыворотке крови — в 1,7 и 1,5 раза относительно параметров в контрольной группе.

4. Полученные результаты свидетельствуют о способности сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана снижать степень проявления окислительного стресса при ишемии/реперфузии вследствие позитивного регулирующего воздействия на свободнорадикальный гомеостаз.

Работа поддержана Программой стратегического развития ВГУ и финансированием по гранту РФФИ р\_центр\_а №13-04-97536.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Болдырев, *Сорос. образов. журн.*, 7(4), 21 – 28 (2001).
2. В. В. Бульон, Л. К. Хныченко, Н. С. Сапронов и др., *Бюл. экспер. биол.*, 129(2), 149 – 151 (2000).
3. Ю. Ю. Ивницкий, А. И. Головкин, Г. А. Софронов, *Янтарная кислота в системе средств метаболической коррекции функционального состояния и резистентности организма*, Лань, СПб. (1998).
4. А. В. Коваленко, Н. В. Белякова, *Фармация*, № 5 – 6, 40 – 43 (2000).
5. М. Н. Кондрашова, Ю. Г. Каминский, Е. И. Маевский, *Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве*, ИТЭБФ РАН, Пушкино (1997).
6. А. И. Кузьменко, Р. П. Морозова, И. А. Николенко и др., *Биохимия*, 62(6), 712 – 715 (1997).
7. Э. Ллойд, У. Ледерман, *Справочник по прикладной статистике*, Финансы и статистика, Москва (1990).
8. Л. Ф. Панченко, Т. Н. Попова, О. А. Сафонова, А. В. Макеева, *Нейрохимия*, № 4, 328 – 332 (2009).
9. С. А. Румянцев, В. Н. Евсеев, А. А. Кравчук и др., *Вестн. интенс. тер.*, № 3, 23 – 26 (2005).
10. И. Д. Стальная, *Современные методы в биохимии*, Наука, Москва (1972), сс. 63 – 64.
11. В. В. Яснецов, Е. П. Просвирина, Е. Г. Цублова, *Экспер. и клин. фармакол.*, 75(7), 8 – 10 (2012).
12. *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*, A. Steinbeuchel and R. H. Marchessault (eds.), Vol. 1, Wiley-VCH, Weinheim (2005).

Поступила 13.07.13

## EFFECT OF SUCCINIC ACID DERIVATIVES AND CHITOSAN ON THE OXIDATION STATUS OF TISSUES IN RATS WITH CEREBRAL ISCHEMIA/REPERFUSION MODEL

O. A. Safonova, T. N. Popova, A. I. Slivkin, and A. S. Dankovtseva

Voronezh State University, Univesitetskaya ploshch.1, Voronezh, 394006 Russia

The administration of chitosan succinate and N-succinylchitosan to rats with cerebral ischemia/reperfusion model damage leads to a decrease in the level of lactate (marker of ischemic injury development), parameters of biochemiluminescence (measure of free-radical oxidation intensity), and lipid peroxidation products in animal tissues as compared to untreated (pathologic) control. The obtained results show evidence of the ability of tested drugs to decrease the degree of oxidative stress manifestation under cerebral ischemia/reperfusion conditions, which is related to the positive control effect of chitosan-based drugs on the free-radical homeostasis.

**Keywords:** chitosan succinate; N-succinylchitosan; brain ischemia/reperfusion; rats; free-radical oxidation of biomolecules