

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-4-3-7

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА КОМЕНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЁ КАЛЬЦИЕВОЙ СОЛИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕССОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Л. В. Шурыгина, Э. И. Злищева, А. А. Кравцов¹

Проведено сравнительное исследование влияния коменовой кислоты и нового нейрорепротекторного фармакологического средства – кальциевой соли коменовой кислоты на окислительные процессы и антиоксидантную систему головного мозга в условиях иммобилизационного стрессового воздействия. Установлено, что применение коменовой кислоты и её кальциевой соли в дозе 4 мг/кг в условиях стрессового воздействия препятствует развитию окислительных процессов в головном мозге стрессированных мышей, способствует нормализации механизмов антиоксидантной защиты. При этом показатели антиоксидантной защиты (каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и GSH) у этих животных практически не отличаются от таковых в контроле. В норме кальциевая соль коменовой кислоты и коменовая кислота влияния на эти показатели практически не оказывают. В условиях стресса коменат кальция вызывает более выраженное, в сравнении с коменовой кислотой, снижение активации перекисного окисления липидов.

Ключевые слова: коменат кальция; коменовая кислота; свободнорадикальное окисление; малоновый диальдегид; антиоксидантная защита; глутатионовый обмен.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов поражения нейронов головного мозга при действии различных неблагоприятных факторов и поиск средств, предотвращающих их гибель, является одной из актуальных проблем экспериментальной нейробиологии. К настоящему времени доказано, что многие патологические изменения ЦНС, при которых наблюдается деструкция нейронов головного мозга, связаны с активацией перекисного окисления липидов [9, 4, 18]. Основные механизмы нейронального повреждения при ишемии/гипоксии включают истощение энергетических ресурсов в условиях ацидоза ткани мозга, нарушение ионного гомеостаза и гиперпродукцию активных форм кислорода (АФК). Последние индуцируют развитие окислительного стресса, который характеризуется повышенным образованием свободных радикалов и снижением активности антиоксидантной системы [21]. Образование свободных радикалов и пероксинитритов неизменно ведет к некрозу и ускорению апоптоза нейронов [1, 10, 19]. В этой связи разработка и исследование возможностей применения новых фармакологических средств, препятствующих чрезмерному накоплению радикалов и поддерживающих собственную антиоксидантную систему организма, являются весьма актуальными. Несомненный интерес для изучения представляют средства с антиоксидантным действием, по-

скольку они позволяют обеспечить защиту нейронов от действия универсальных повреждающих факторов на ЦНС [11, 12]. Одним из новых нейрорепротекторных средств с антиоксидантной активностью является кальциевая соль коменовой кислоты, синтезированная в отделе биологически активных веществ им. проф. А. Я. Шурыгина ФГБОУ ВО “КубГУ” [13]. Результаты изучения антиоксидантных свойств комената кальция показали его высокую стресс-протекторную активность [14].

Известно, что антиоксидантная система организма осуществляет детоксикацию потенциально опасных АФК – супероксидного анион-радикала и перекиси водорода с участием супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Важную адаптивную роль при окислительном стрессе играет также активация глутатионовой антиоксидантной системы организма, отвечающей за обезвреживание H_2O_2 и органических пероксидов, в том числе пероксидов липидов [4, 8].

Целью данной работы являлось сравнительное исследование антиоксидантных свойств коменовой кислоты (КК) [15] и нового нейрорепротекторного фармакологического вещества кальциевой соли коменовой кислоты (СаК) [13] в условиях экспериментального стрессового воздействия. КК (5-гидрокси- γ -пирон-2-карбоновая) – основной физиологически активный компонент высокоэффективного лекарственного препарата Бализ-2, имеет широкий диапазон биологического действия. Обладает антиоксидантным и седа-

¹ ФГБОУ ВО “Кубанский государственный университет”, Россия, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149.

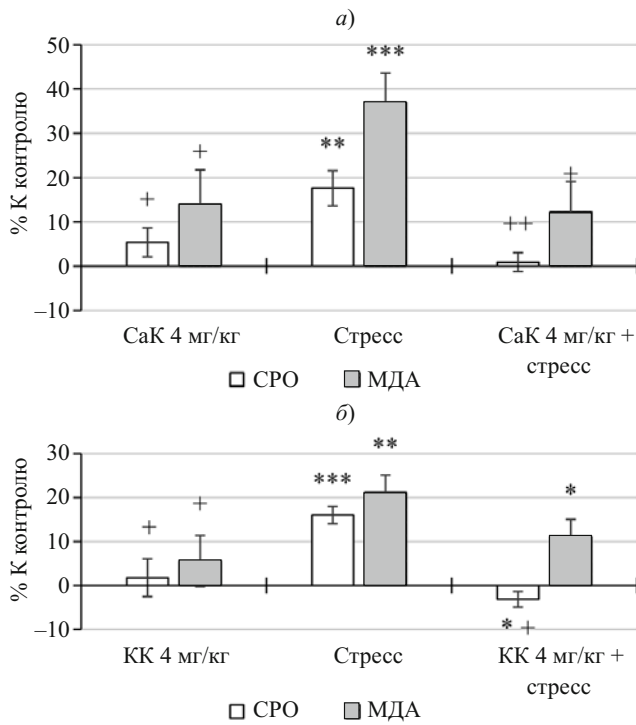


Рис. 1. Влияние СаК (а) и КК (б) на окислительные процессы в ткани головного мозга мышей при стрессовом воздействии ($M \pm m$).

Отличия от контроля: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; отличия от стресса + $-p < 0,05$.

тивным действием, а также анксиолитическими и антидепрессивными свойствами [7].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

СаК – кристаллический порошок желтого цвета, растворим в воде, молекулярная масса – 350,26 [13]. КК выделена из лекарственного препарата бализ-2 – белый кристаллический порошок, мало растворим в воде и спирте, молекулярная масса 156,09 [15].

Влияние СаК и КК на окислительные процессы *in vitro* оценивали в модельной системе ЦФЛ (цитратно-фосфатный буфер с люминолом). На данной модели окисление ионов железа в присутствии ортофосфата и цитрата сопровождается образованием АФК, при этом возникает хемилюминесценция (ХЛ), усиливаемая люминолом, которая подавляется в присутствии антиоксидантов. Регистрацию ХЛ осуществляли прибором SmartLum 5773 в течение 5 мин [16]. Влияние СаК и КК на генерацию АФК оценивали по угнетению ХЛ модельной системы при добавлении их водных растворов в концентрациях 0,1 и 0,01 мг/мл. Результаты экспериментов определяли по интенсивности ХЛ (в у.е.) и рассчитывали в процентах от контроля.

Исследование влияния СаК на антиоксидантную систему головного мозга выполнено на белых беспородных мышцах-самцах массой 20 – 22 г. Животных содержали в виварии при естественном освещении, свободном доступе к корму и воде в клетках размером

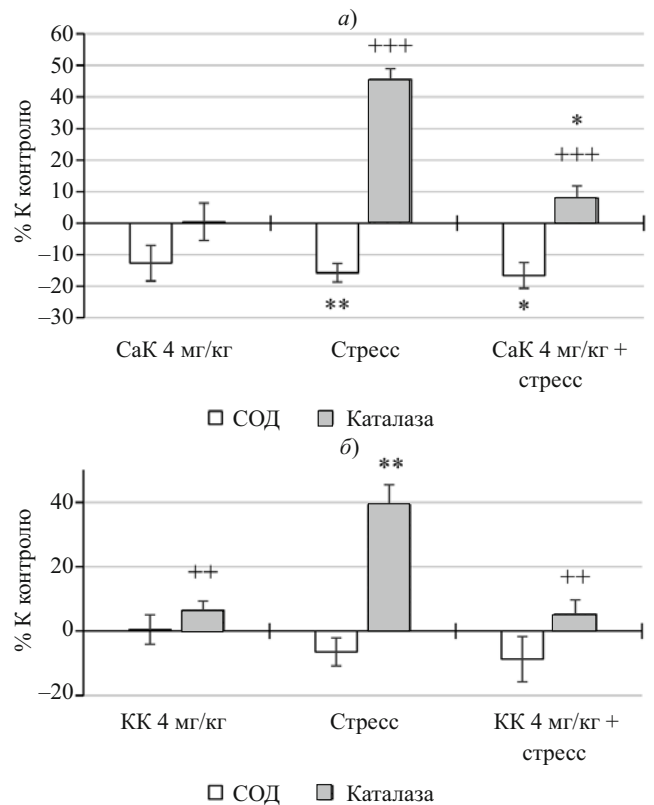


Рис. 2. Влияние СаК (а) и КК (б) на активность СОД и каталазы в ткани головного мозга мышей при стрессовом воздействии ($M \pm m$).

Отличия от контроля: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, отличия от стресса + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$.

30 × 20 × 15 см. Опыты проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с правилами лабораторной практики (Приказ МЗ и СР РФ от 23.08.2010 № 708н) и ГОСТ Р 53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”. Животные были разделены на группы: 1) контрольные; 2) получавшие СаК в дозе 4 мг/кг; 3) получавшие КК в дозе 4 мг/кг; 4) стрессированные; 5) стрессированные, получавшие СаК в дозе 4 мг/кг; 6) стрессированные, получавшие КК в дозе 4 мг/кг. Доза 4 мг/кг была определена в предыдущих исследованиях при изучении антиокислительных свойств препарата [14]. СаК и КК вводили мышам до стрессирования внутрь, натошак, в дозе 4 мг/кг в течение 3 сут. Стресс вызывали методом иммобилизации подвешиванием мышей за шейную складку в течение 5 ч. Через 5 ч мышей декапитировали, головной мозг помещали в жидкий азот и затем определяли действие СаК и КК на окислительные процессы (уровень свободнорадикального окисления (СРО) и содержание одного из продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА), а также влияние СаК на состояние антиоксидантной защиты в головном мозге мышей в норме и после стрессового воздействия).

Уровень СРО изучали хемилюминесцентным методом на приборе “SmartLum 5773”. Определяли светосумму хемилюминесценции в условных единицах. По интенсивности хемилюминесценции судили о содержании свободных радикалов [16]. Содержание МДА определяли по методу [2]. Антиоксидантные свойства СаК и КК оценивали по их влиянию на активность ферментов СОД, каталазы, на состояние глутатионовой системы (содержание GSH, активность глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР)). Активность СОД определяли по методу [3], активность каталазы – по методу [5]. Определение GSH проводили в супернатанте после осаждения белков по методу J. Sedlak [20]. Активность ГП определяли по скорости окисления GSH в присутствии гидроперекиси третичного бутила [6]. Активность ГР определяли по скорости окисления НАДФН в реакции с GSSG [17]. GSH, GSSG, НАДФН, 5,5'-дитиобис(2-нитробензоат) приобретены в Sigma (США).

Статистический анализ результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента в Statistica 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных, полученных *in vitro* в модельной системе ЦФЛ (таблица), показал, что СаК и КК оказывают выраженный и практически одинаковый антиоксидантный эффект. При этом эффективность веществ зависит от дозы, ее увеличение сопровождается значительным повышением их антирадикального действия.

Результаты исследования влияния СаК и КК на интенсивность СРО и содержание МДА в головном мозге мышей, подвергшихся иммобилизационному стрессовому воздействию (рис. 1), также указывают на выраженные антиоксидантные свойства этих препаратов. Так, установлено, что после стрессового воздействия в головном мозге мышей значительно (на 17,6 % (а) и 16,04 % (б), $p < 0,05$) повышается уровень свободных радикалов.

В то время как в группах мышей, получавших до стрессирования СаК (СаК, стресс) и КК (КК, стресс), этот показатель остаётся на уровне интактного контроля. Не выявлено каких-либо изменений в уровне СРО и у животных, получавших СаК и КК в условиях нормы. Резко увеличивается (на 36,95 % (а) и 21,7 % (б), $p < 0,001$, соответственно) в головном мозге стрессированных мышей содержание МДА. Дострессовое применение СаК и КК способствует снижению этого показателя. Так, под влиянием СаК у стрессированных животных содержание МДА в головном мозге снижается на 24,1 % ($p < 0,001$), а под влиянием КК – на 10 %. В норме СаК и КК способствуют небольшому повышению содержания МДА.

Таким образом, установлено, что СаК и КК проявляют антиокислительные свойства как *in vitro* в модельной системе ЦФЛ, так и *in vivo* в ткани головного мозга стрессированных животных. При этом СаК вызывает более выраженное снижение активации ПОЛ.

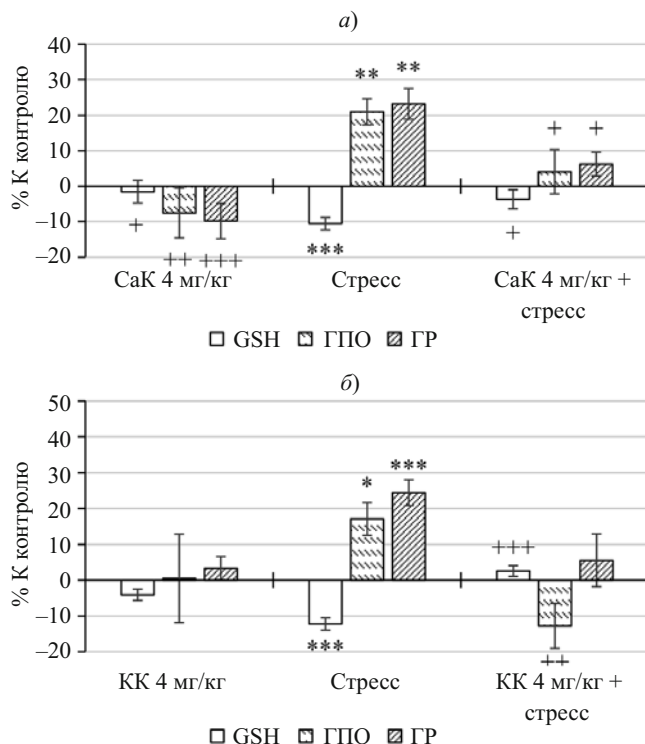


Рис. 3. Влияние СаК (а) и КК (б) на глутатионовый обмен в ткани головного мозга мышей при стрессовом воздействии ($M \pm m$).

Отличия от контроля: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, отличия от стресса + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$.

Результаты изучения антиоксидантной защиты головного мозга (рис. 2) показали, что в условиях стрессового воздействия ферментативная активность СОД снижается на 15,7 % (а) и 6,4 % (б), $p < 0,05$. Применение СаК и КК до стрессового воздействия практически не влияет на активность этого фермента. Показатели СОД остаются на уровне стресса. Резко увеличивается (на 45,5 % (а) и 39,0 % (б), $p < 0,001$) в головном мозге стрессированных животных активность каталазы. Введение СаК и КК до стрессирования животных способствует значительному снижению этого показателя (на 37,5 % – СаК и 34,0 % – КК, $p < 0,001$). Не изменилась активность каталазы в головном мозге мышей групп СаК и КК, её показатели остаются на уровне контроля.

Уровень снижения свободных радикалов (% от контроля) в модельной системе с люминолом в присутствии КК и СаК, ($M \pm m$)

Препарат	Концентрация, мг/мл	
	0,01	0,1
СаК, $n = 14$	29,4 ± 1,1*	64,6 ± 1,3 [#]
КК, $n = 11$	33,3 ± 1,4*	69,4 ± 1,2 [#]

Примечание: n – число опытов;
* $p < 0,001$ в сравнении с контролем;
[#] $p < 0,001$ в сравнении с 0,01 мг/кг.

Установлено также, что при стрессовом воздействии в тканях головного мозга отмечаются выраженные изменения глутатионового обмена (рис. 3). Так, в головном мозге стрессированных мышей наблюдается снижение содержания GSH на 11 % (а) – 12 % (б), увеличение ферментативной активности ГП на 20,9 % (а) и 17,0 % (б), $p < 0,05$ и ГР на 23,2 % (а) и 24,4 % (б), $p < 0,05$. Дострессовое применение СаК и КК способствует нормализации глутатионового обмена.

При этом, если при применении СаК все показатели глутатионового обмена (GSH, ГП и ГР) практически не отличаются от контрольных значений, то при применении КК отмечается некоторое снижение (на 13 %) активности ГП в сравнении с контролем ($p < 0,05$). То есть наиболее оптимальная стабилизация глутатионового обмена наблюдается при введении СаК.

Как известно, активация свободнорадикального окисления является составной частью общего синдрома адаптации – стресса. Начальная активация ПОЛ наблюдается при воздействии на биологические системы любой степени сложности самых разнообразных экстремальных агентов [4]. Она способствует мобилизации защитных реакций организма. Последние включают реактивное усиление механизмов антиоксидантной защиты. Результаты наших исследований показали, что при стрессовом воздействии отмечается усиление окислительных процессов в головном мозге животных, небольшое снижение активности СОД, статистически значимое повышение активности ферментов каталазы, ГП и ГР, снижение содержания GSH. Применение КК и её кальциевой соли в условиях стрессового воздействия препятствует развитию окислительных процессов в головном мозге стрессированных мышей, способствует нормализации механизмов антиоксидантной защиты. При этом показатели антиоксидантной защиты – каталаза, ГП, ГР и GSH – у этих животных практически не отличаются от таковых в контроле. В норме СаК и КК влияния на эти показатели практически не оказывают. Несколько иначе влияют эти препараты на показатели окислительных процессов. Так, КК и СаК в норме влияния на уровень СРО не оказывают, однако способствуют незначительному повышению содержания МДА. При этом в условиях стресса СаК оказывает более выраженное в сравнении с КК снижение активации ПОЛ.

Таким образом, СаК и КК способствуют стабилизации прооксидантно-антиоксидантного равновесия, противодействуя в определенных пределах развитию окислительного стресса в связи с активацией ПОЛ. При этом СаК оказывает более выраженное снижение активации ПОЛ.

Приведенные данные указывают на перспективность дальнейших исследований СаК как стресс-протекторного, антиоксидантного, нейропротекторного фармакологического вещества.

ВЫВОДЫ

1. При иммобилизационном стрессовом воздействии отмечается усиление окислительных процессов в головном мозге животных. Так, уровень МДА и СРО повышается в 1,37 и 1,2 раза, соответственно ($p < 0,05$). Наблюдается небольшое снижение активности СОД, статистически значимое повышение активности ферментов каталазы (в 1,47 раза), ГП и ГР в 1,2 и 1,3 раза, соответственно ($p < 0,05$).

2. Дострессовое применение СаК и КК препятствует развитию окислительных процессов в головном мозге мышей, способствует нормализации механизмов антиоксидантной защиты. При этом показатели антиоксидантной защиты – каталаза, ГП, ГР и GSH – у этих животных практически не отличаются от таковых в контроле. В норме СаК и КК влияния на эти показатели не оказывают.

3. СаК в условиях стресса оказывает более выраженное в сравнении с КК (на 14 %, $p < 0,05$) снижение активности ПОЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований РФФИ в рамках проекта № 16-44-230337 р_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. О. А. Водопьянова, И. Я. Моисеева, О. П. Родина и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **77**(6), 27 – 29 (2014).
2. В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Л. М. Мажуль, *Вопр. мед. химии*, **33**(1), 118 – 122 (1987).
3. Е. Е. Дубинина, Л. Ф. Ефимова, Л. И. Софронова, А. Л. Геронимус, *Лаб. дело*, № 8, 10 – 19 (1988).
4. Ю. А. Зозуля, В. А. Барабой, Д. А. Сутковой, *Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга*, Знание, Москва (2000).
5. М. А. Корольюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев, *Лаб. дело*, № 1, 16 – 19 (1988).
6. В. М. Моин, *Лаб. дело*, № 12, 724 – 727 (1986).
7. Т. И. Панова, *Теоретическая экспериментальная медицина. Медицина сегодня и завтра*, № 1, 28 – 33 (2005).
8. О. В. Поварова, Е. И. Каленикова, Е. И. Городецкая, О. С. Медведев, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **66**(3), 69 – 73 (2003).
9. М. С. Попова, М. Ю. Степанчиков, *Нейрохимия*, **25**(3), 170 – 178 (2008).
10. З. А. Суслина, М. Ю. Максимова, *Нервные болезни*, № 3, 4 – 7 (2004).
11. И. А. Трегубова, В. А. Косолапов, А. А. Спасов, *Успехи физиол. наук*, **43**(1), 75 – 94 (2012).
12. И. Н. Тюренков, Е. В. Волотова, Д. В. Куркин и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **159**(3), 344 – 347 (2015).
13. Л. В. Шурыгина, Э. И. Злищева, А. А. Кравцов и др., Патент РФ RU 2561045, *Бюл. изобрет.*, № 23 (2015).
14. Л. В. Шурыгина, Э. И. Злищева, А. А. Кравцов, *VII Международная научно-практическая конференция. Перспективы развития науки и образования*, Изд. Центр перспективных научных исследований, Москва (2016), сс. 85 – 89.
15. А. Я. Шурыгин, Л. В. Шурыгина, Н. Н. Лобова, Патент РФ RU 2459623, *Бюл. изобрет.*, № 24 (2012).
16. Р. Р. Фархутдинов, В. А. Лиховских, *Хемиллюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине*, БГМИ, Уфа (1995).
17. Л. Б. Юсупов, *Лаб. дело*, № 4, 100 – 101 (1989).

18. B. Halliwell and S. Chiricol, *Am. J. Clin. Nutr.*, **57**(5), 715 – 725 (1993).
19. Y. Nishizawa, *Life Sci.*, **69**, 369 – 381 (2001).
20. J. Sedlak, R. H. Lindsay, *Analyt. Biochem.*, **25**, 192 – 205 (1968).
21. B. Thomas, M. F. Beal, *Human Molecular Genetics*, Review Issue 2, **16**(spec. No. 2), R183 – R194 (2007).

Поступила 12.08.17

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF COMENIC ACID AND ITS CALCIUM SALT UNDER EXPERIMENTAL STRESS CONDITIONS

L. V. Shurygina, E. I. Zlishcheva, and A. A. Kravtsov

Kuban State University, ul. Stavropolskaya 149, Krasnodar, 350040 Russia;

A comparative study of the effects of comenic acid (CA) and a new neuroprotective pharmacological agent – calcium salt of comenic acid (calcium comenate, CaC) – on oxidative processes and the antioxidant system of the brain was performed under conditions of immobilization stress in mice. It is established that the administration of CA and CaC at a dose of 4 mg/kg under model stress conditions hinders the development of oxidative processes in the brain of stressed mice and contributes to normalization of the mechanisms of antioxidant protection. At the same time, the antioxidant protection indices, including the levels of catalase, GP, GR and GSH in animals, almost did not differ from those in the control. In the norm, both CaC and CA do not influence these parameters. Under stress, CaC produces a more pronounced decrease in the activation of lipid peroxidation in comparison to the action of CA.

Keywords: calcium comenate; comenic acid; free radical oxidation; malonic dialdehyde; antioxidant protection; glutathione metabolism.