

АНТИГИПОКСИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИС(N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНАТО) ЦИНК(II) СУЛЬФАТ ОКТАГИДРАТА В ДИНАМИКЕ ОСТРОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

А. В. Евсеев¹, М. А. Евсеева¹, Э. А. Парфенов¹,
В. А. Правдивцев¹, П. Д. Шабанов²

С целью оценки эффективности протекторных свойств нового аминотиолового антигипоксанта бис(N-ацетил-L-цистеинато) цинк(II) сульфат октагидрата (соединение π Q-1104) у кошек регистрировали импульсную активность корковых нейронов на разных стадиях развития острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией (ОНГ + Гк), а также острой нормобарической гипоксии без гиперкапнии (ОНГ – Гк). Показано, что исследуемое вещество в дозе 50 мг/кг стабилизирует фоновую и вызванную активность нейронов в процессе углубления ОНГ + Гк и ОНГ – Гк, пролонгируя время реактивного состояния корковых нейронов в 2 – 2,5 раза по сравнению с контролем.

Ключевые слова: гипоксия, кора большого мозга, нейроны, антигипоксанта

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что большинство антигипоксических веществ, используемых в качестве средств экстренной помощи, зачастую не обладают достаточной эффективностью [7]. Новые возможности открылись в связи с разработкой химических соединений, относящихся к категории физиологически совместимых антиоксидантов (ФСАО), представляющих комплексные соединения металлов с биоантиоксидантами [6].

В скрининге на мышах в условия острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией (ОНГ + Гк) и острой нормобарической гипоксии без гиперкапнии (ОНГ – Гк) показано, что некоторые ФСАО на основе N-ацетил-L-цистеина и цинка обладают отчетливым и быстро развивающимся ангигипоксическим эффектом [3].

Целью исследования явилось изучение эффективности протекторных свойств соединения π Q-1104, или бис(N-ацетил-L-цистеинато)цинк(II) сульфат октагидрата по показателям импульсной активности одиночных нейронов соматосенсорной коры в процессе развития острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией и острой нормобарической гипоксии без гиперкапнии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на 53 кошках массой 3,5 – 4 кг. В ходе подготовительного этапа в условиях этиминал-натриевого наркоза (30 – 35 мг/кг) животным рассекали мягкие ткани, в черепе делали трепанационные

отверстия. Края ран инфильтрировали 0,5 % раствором новокаина.

В последующем животных интубировали, обездвигивали миорелаксантами и переводили на управляемое дыхание. Фоновую активность (ФА) и вызванную активность (ВА) нейронов соматосенсорной коры большого мозга регистрировали в зоне проекции контралатерального лучевого нерва. Параметры стимуляции нерва — одиночные прямоугольные импульсы тока 5 – 7 В (0,2 мс). Перистимульные гистограммы нейронов оценивали в режиме *on line* с помощью лабораторной ЭВМ. Общее состояние кошек контролировали посредством непрерывной регистрации электроэнцефалограммы (ЭЭГ) [2]. Статус ОНГ + Гк и ОНГ – Гк моделировали по методикам, специально разработанным для решения поставленной задачи [6], для чего создавали замкнутый круг циркуляции воздуха, включающий животное и дыхательную емкость объемом 6 л. Из дыхательной емкости посредством аппарата искусственной вентиляции легких (АИВЛ) воздух через эластичную трубку порционно нагнетали в легкие кошки через трахеостому. Во время выхода отработанный воздух по отводящей трубке пассивно поступал из легких обратно в емкость. В результате каждый дыхательный цикл способствовал ухудшению качественных характеристик вдыхаемого воздуха (концентрация кислорода уменьшалась, концентрация углекислого газа увеличивалась), что формировало у кошки состояние ОНГ + Гк. В свою очередь состояние ОНГ – Гк у кошек создавали путем добавления в описанный выше дыхательный контур фильтра, содержащего натронную известь, который располагали перед входным отверстием АИВЛ. Для предупреждения возникновения состояния разряжения вдыхаемого воздуха дыхательную емкость дополнительно оборудовали специальным компенсатором давления, который представлял собой сообщающийся с дыхательной емкостью сосуд, заполненный водой. В результате по мере поступления

¹ Кафедра нормальной физиологии (зав. — проф. В. А. Правдивцев) Смоленской государственной медицинской академии, Смоленск, 214019, ул. Крупской, 28

² Кафедра фармакологии (зав. — проф. П. Д. Шабанов) Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, 194044, ул. Акад. Лебедева, 6. E-mail: shabanov@mail.rcm.ru

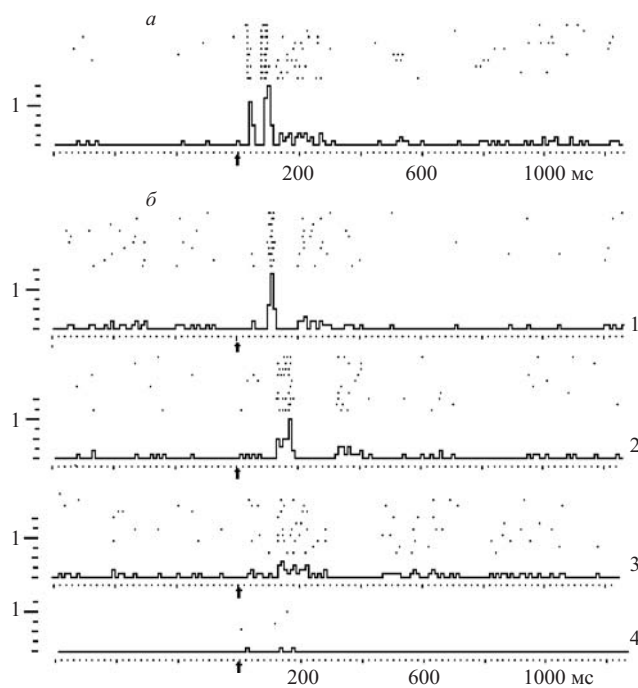


Рис. 1. Динамика вызванных реакций нейрона соматосенсорной коры кошки при развитии острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией (ОНГ + Гк).

а — исходное состояние, *б* — на фоне ОНГ + Гк: 1 — легкая стадия ОНГ + Гк (через 15 мин ОНГ + Гк); 2 — средняя стадия ОНГ + Гк (через 35 мин ОНГ + Гк); 3 — глубокая стадия ОНГ + Гк (через 50 мин ОНГ + Гк); 4 — терминальная стадия ОНГ + Гк (через 55 мин ОНГ + Гк). Здесь и на рис. 2–4 по вертикали — число импульсов в бине перистимульной гистограммы, по горизонтали — время, мс. Стрелкой обозначен момент нанесения раздражения на лучевой нерв.

в емкость соответствующего количества воды обеспечивался нормальный уровень внутриемкостного давления.

В качестве маркера функционального статуса головного мозга в ходе развивающейся ОНГ + Гк и ОНГ – Гк использовали амплитудные параметры первичной негативной волны (ПНВ) вызванного потенциала [5]. Было принято, что уменьшение ПНВ в пределах 90 – 55 % от исходного уровня характеризует легкую, 1-ю стадию гипоксии. Уменьшение ПНВ в пределах 50 – 30 % от исходного уровня характеризует среднюю стадию, уменьшение в пределах 25 – 10 % от исходного уровня характеризует глубокую стадию и, наконец, полное исчезновение ПНВ характеризует терминальную стадию гипоксии.

Соединение π Q-1104 в дозе 50 мг/кг кошкам 1-й ($n = 15$) и 2-й ($n = 14$) опытных групп вводили внутривенно в 3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Кошкам контрольных групп ($n = 11$, $n = 13$) вводили аналогичный объем раствора натрия хлорида. Инъекции выполняли за 90 мин до процедур моделирования гипоксических состояний.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t -критерия Стьюдента.

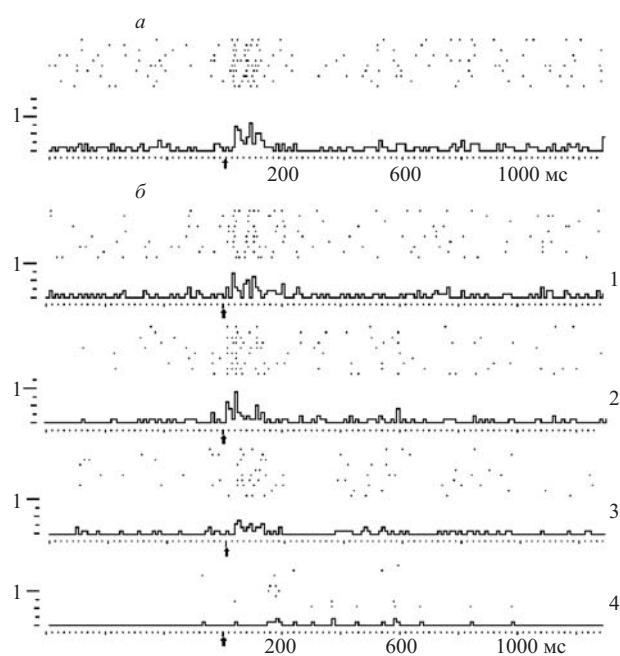


Рис. 2. Динамика вызванных реакций нейрона соматосенсорной коры большого мозга кошки при развитии острой нормобарической гипоксии (ОНГ) без гиперкапнии.

а — исходное состояние, *б* — на фоне ОНГ: 1 — легкая стадия ОНГ (через 15 мин ОНГ); 2 — средняя стадия ОНГ (через 28 мин ОНГ); 3 — глубокая стадия ОНГ (через 40 мин ОНГ); 4 — терминальная стадия ОНГ (через 44 мин ОНГ). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все зарегистрированные нейроны (357) обладали фоновой активностью (ФА) и реагировали на стимуляцию лучевого нерва. По мере становления у животных состояния ОНГ + Гк легкая стадия гипоксии развивалась через $7 \pm 1,2$ мин, средняя — через $34,1 \pm 3,3$ мин, глубокая — через $50,2 \pm 3,5$ мин. Терминальная стадия развивалась через $55 \pm 3,8$ мин.

В ходе изучения влияния ОНГ + Гк на реактивность нейронов (1-я контрольная группа животных) наблюдали, прежде всего, характерные изменения ФА. Так, исходный уровень ФА нейронов у кошек в наших экспериментах составил $5 \pm 0,4$ имп/с, на 1-й стадии развития ОНГ + Гк отмечали ее увеличение до $23,1 \pm 3$ имп/с.

В последующем на 2-й и 3-й стадиях развития ОНГ + Гк, повышенный уровень ФА обычно сохранялся, хотя частота ФА постепенно уменьшалась до 10 ± 2 имп/с. К моменту окончания 3-й или же в начале 4-й стадии развития ОНГ + Гк ФА нейронов обычно исчезала.

Столь же существенными были изменения ВА нейронов (рис. 1). На рис. 1, *а* демонстрируется исходный ответ нейрона на стимуляцию лучевого нерва. Рис. 1, *б* (1, 2, 3) — тот же нейрон у кошки на разных стадиях ОНГ + Гк. Видно, что под влиянием развивающейся гипоксии отмечается трансформация паттерна вызван-

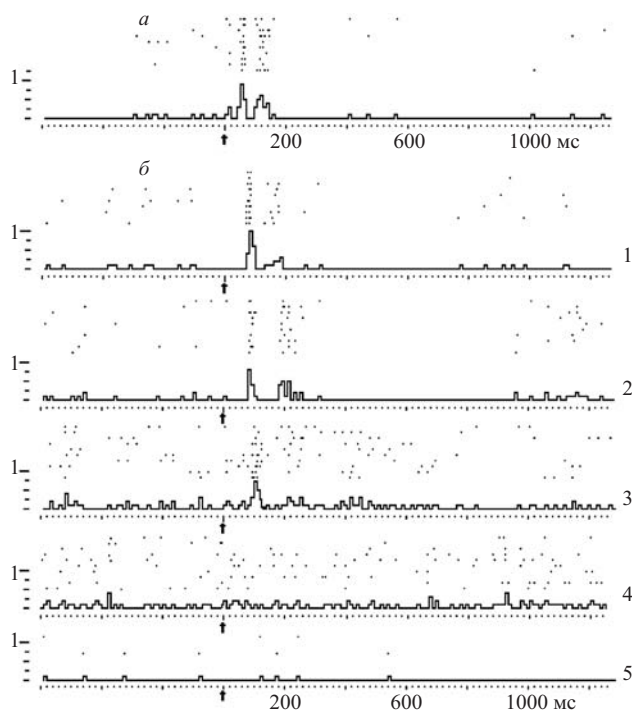


Рис. 3. Гистограммы вызванных ответов нейрона соматосенсорной области коры большого мозга кошки, получившей соединение π Q-1104, в динамике развития острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией (ОНГ + Гк).

а — исходное состояние. б: 1 — через 90 мин после введения вещества π Q-1104, 2 — легкая стадия ОНГ + Гк (через 35 мин ОНГ + Гк); 3 — средняя стадия ОНГ + Гк (через 70 мин ОНГ + Гк); 4 — тяжелая стадия ОНГ + Гк (через 130 мин ОНГ + Гк); 5 — терминальная стадия ОНГ + Гк (через 160 мин ОНГ + Гк). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

ного ответа нейрона, а также изменения характеристик его следовой реакции. К моменту становления терминальной стадии ОНГ + Гк нейрон (50-я минута) становится практически ареактивным (рис. 1, б, 4).

На модели ОНГ – Гк (2-я контрольная группа) легкая стадия гипоксии у животных наступала обычно через $10,1 \pm 1,2$ мин — на 3 мин позже, чем при развитии ОНГ + Гк. Однако средняя и глубокая стадии развивались быстрее, чем при ОНГ + Гк — через $28,2 \pm 3,3$ мин и $39,2 \pm 3,5$ мин соответственно. Терминальная стадия развивалась в среднем к 44-й минуте опыта.

При изучении импульсной реактивности нейронов животных 2-й контрольной группы констатировали полное соответствие исходных параметров ФА ($6 \pm 0,4$ имп/с) параметрам ФА животных 1-й группы. В процессе развития состояния ОНГ у животных не наблюдали фазы значительного увеличения частоты ФА нейронов. Последняя обычно плавно уменьшалась до величины порядка $1,2 \pm 0,5$ имп/с. К концу 4-й стадии ОНГ – Гк во всех опытах сопровождался исчезновением ФА нейронов.

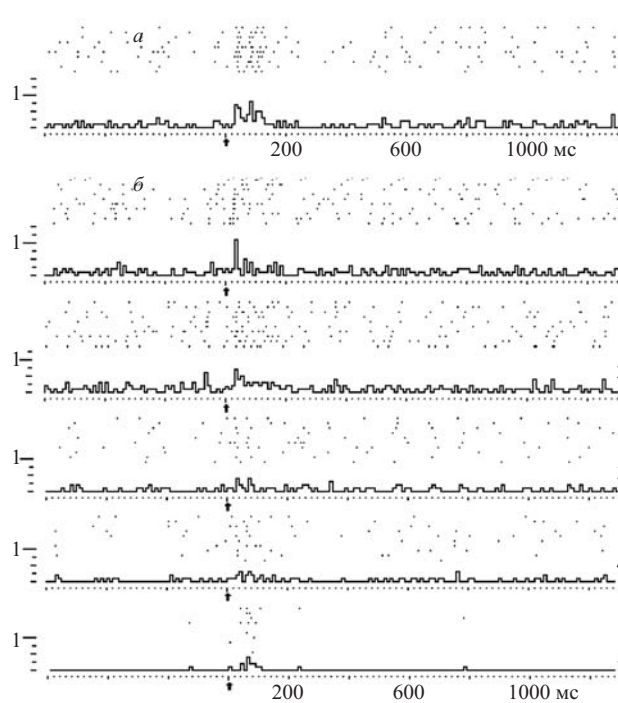


Рис. 4. Гистограммы вызванных ответов нейрона соматосенсорной области коры большого мозга кошки, получившей соединение π Q-1104, в динамике развития острой нормобарической гипоксии (ОНГ) без гиперкапнии.

а — исходное состояние. б: 1 — через 90 мин после введения π Q-1104, 2 — легкая стадия ОНГ (через 40 мин ОНГ); 3 — средняя стадия ОНГ (через 65 мин ОНГ); 4 — тяжелая стадия ОНГ (через 110 мин ОНГ); 5 — терминальная стадия ОНГ (через 125 мин ОНГ). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Вызванные ответы нейронов в условиях ОНГ – Гк изменялись параллельно динамике ФА (рис. 2, а, 2, б — 2, 3,4).

На обеих моделях гипоксии действие соединения π Q-1104 обеспечивало значительное пролонгирование периода реактивного состояния коры большого мозга. Так, легкая стадия гипоксии развивалась через $12 \pm 2,3$ и $17,1 \pm 3,1$ мин соответственно после помещения животных в модельные условия. Среднюю стадию ОНГ + Гк регистрировали через $40,2 \pm 3,9$ и $43,3 \pm 3,5$ мин, а глубокую — через $85,9 \pm 6,3$ и $73,1 \pm 5,4$ мин. Переход в терминальную стадию отмечали значительно позже в сравнении с контрольными группами — как правило, спустя $154,4 \pm 13,6$ и $121 \pm 10,7$ мин от начала эксперимента. Продолжительность активного состояния мозга животных, помещенных в условия ОНГ + Гк и ОНГ – Гк на фоне действия соединения π Q-1104, в наших экспериментах увеличивалась в 2,4 и 2,8 раза соответственно двум группам контрольных животных.

Отмечено, что у животных, помещенных в условия ОНГ + Гк, на фоне действия π Q-1104 ФА нервных клеток достоверно не изменялась на протяжении всей 1-й (легкой) стадии ОНГ + Гк и составила в среднем $6,1 \pm 0,5$ имп/с. ФА нейронов во время средней и глу-

бокой стадий гипоксии достигала уровня $15,2 \pm 3,7$ имп/с. К концу глубокой стадии выявлялась тенденция к снижению величины ФА. С наступлением терминальной стадии ФА нейронов не определялась.

На рис. 3 представлен ответ нейрона на стимуляцию лучевого нерва, зарегистрированный через 90 мин после введения изучаемого вещества (рис. 3, б — 1). На рис. 3, б — 2 — та же клетка при развитии легкой стадии ОНГ + Гк через 35 мин после помещения животного в модельные условия. Обращает на себя внимание отсутствие заметных различий в уровне ФА нервной клетки в сравнении с ее исходным состоянием при наличии явных изменений в структуре паттерна вызванного ответа.

По мере углубления ОНГ + Гк (рис. 3, б — 3, 4, 5) установлено, что нейроны соматосенсорной коры кошек на фоне действия соединения π Q-1104 в целом оказываются менее чувствительными к развитию состояния гипоксии в сравнении с нейронами животных 1-й контрольной группы. Это подтверждается отсутствием существенных изменений их фоновой частоты и более устойчивыми паттернами вызванных ответов. Так, на рис. 3, б — 4 видно, что высокий уровень ФА нейрона сохраняется через 130 мин эксперимента, при этом состояние ареактивности развивалось к 150 мин.

При анализе характеристик ФА нейронов кошек, помещенных в условия ОНГ, было установлено, что, как и в условиях ОНГ + Гк, на фоне действия π Q-1104 ФА нервных клеток оставалась стабильной на протяжении всей 1-й стадии ОНГ. По мере дальнейшего углубления ОНГ к моменту достижения 2-й стадии гипоксии ФА нейронов начинала плавно уменьшаться с $6 \pm 0,5$ имп/с до $2,1 \pm 0,5$ имп/с и оставалась в этих пределах на протяжении всей 3-й и 10 мин 4-й стадии ОНГ, после чего внезапно исчезала.

На рис. 4 продемонстрирована реакция нейрона на раздражение лучевого нерва спустя 90 мин после введения π Q-1104 (рис. 4, б — 1). На рис. 4, б — 2 представлен тот же нейрон в легкой стадии ОНГ через 40 мин после помещения животного в условия ОНГ. Как видно из рис. 4, ФА нервной клетки не изменилась. По мере нарастания состояния ОНГ (рис. 4, б — 3, 4, 5) было замечено, что ФА и паттерны вызванных ответов нейронов соматосенсорной коры на фоне действия π Q-1104 остаются стабильными на протяжении более чем 60 мин эксперимента. При этом достаточно высокий уровень ФА нейрона сохраняется даже спустя 100 мин эксперимента. Состояние ареактивности развивалось обычно к 120-й минуте.

Известно, что лекарственная защита организма при развитии состояния гипоксии может быть в той или иной мере обеспечена своевременным введением химических веществ, являющихся представителями разных фармакологических групп [8]. Однако, согласно мнению большинства исследователей, наиболее перспективна разработка антигипоксантов в ряду веществ,

способных сочетать энергостабилизирующие и антиоксидантные свойства [4, 5]. При возникновении ситуаций, сопровождающихся развитием гипоксии, такие средства могут эффективно использоваться для обеспечения успешного “переживания” подобных состояний [5], увеличивая период пассивного выживания. Это может быть обеспечено только при условии существенного снижения потребностей организма в энергетических субстратах.

Установлено, что развитие состояния ОНГ + Гк на первых этапах сопровождается резким увеличением интенсивности метаболизма, что сопровождается накоплением CO_2 в тканях и последующей активацией обменных процессов [8]. В связи с этим для обеспечения эффективной защиты тканей от воздействия ОНГ + Гк требуются вещества, не только повышающие резистентность организма к гипоксии, но способные понизить чувствительность нервных клеток и центральных хеморецепторов к высокой концентрации CO_2 .

Следует отметить, что гиперкапния как осложнение гипоксии исключается в случае возникновения состояния ОНГ – Гк. Напротив, в подобной ситуации гибель организма нередко обусловлена развитием прямо противоположного нарушения — гипокапнии (дыхательного алкалоза), что связано с адаптивно возникающей компенсаторной гипервентиляцией легких. В связи с этим при осуществлении поиска новых антигипоксантов желательно наличие у них неких “универсальных” свойств, обеспечивающих их должную эффективность при развитии как гипер-, так и гипокапнии.

По нашему мнению цинксодержащие ФСАО — производные N-ацетил-L-цистеина — могут быть отнесены именно к такой категории веществ. Изученное соединение π Q-1104, подобно известным “универсальным” антигипоксантам гутимину и амтизолу [4], также является серусодержащим аминотиолом. Как оказалось, введение цинка в молекулу N-ацетил-L-цистеина, существенно повышает фармакологическую активность биоантиоксиданта. Ранее в наших исследованиях было показано, что родственное π Q-1104 вещество π Q-901 значительно снижает интенсивность окислительных процессов в митохондриях клеток головного мозга [3]. Снижение интенсивности протекания метаболических реакций способно существенно замедлить скорость развития нарушений кислотно-основного состояния в организме [9]. Частичная обратимая блокада клеточного дыхания в тканях организма предоставляет возможность использовать дополнительные ресурсы организма, обеспечивая минимально-достаточный уровень энергетических потребностей в первую очередь для жизненно важных органов — головного мозга и миокарда. Стоит отметить, что при введении антигипоксантов метаболического типа действия не исключается, но, напротив, допускается возможность их угнетающего влияния на кору большого мозга [1], что косвенно подтверждается настоящим исследованием в

его части, где анализируется влияние соединения π Q-1104 на ФА и ВА нейронов.

ВЫВОД

Соединение π Q-1104 при развитии острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией и острой нормобарической гипоксии без гиперкапнии у кошек оказывает защитное (протекторное) действие в отношении коры большого мозга животных, обеспечивая удлинение времени реактивного состояния нейронов в 2 – 2,5 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. П. В. Васильев, Г. Д. Глод, С. И. Сытник, *Воен. мед. ж.*, № 8, 45 – 47 (1992).
2. А. В. Евсеев, М. А. Евсева, Патент РФ 2251158 (2005).

3. А. В. Евсеев, В. А. Правдивцев, В. В. Яснецов, М. А. Евсева, *Новые медицинские технологии и квантовая медицина*, Москва (2005), сс. 199 – 200.
4. И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов, *Молекулярная фармакология антигипоксантов*, Санкт-Петербург (2004), сс. 1 – 368.
5. В. С. Новиков, Е. Б. Шустов, В. В. Гаранчук, *Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях*, Санкт-Петербург (1998), сс. 1 – 520.
6. Э. А. Парфенов, А. И. Володин, Е. Н. Стратиенко и др., *Гипоксия: механизм, коррекция, адаптация*, Москва (1999), с. 56.
7. А. В. Смирнов, *Патофизиология экстремальных состояний*, Санкт-Петербург (1993), сс. 114 – 119.
8. Ю. Л. Шевченко, *Гипоксия. Адаптация, патогенез, клиника*, Санкт-Петербург (2000), сс. 1 – 324.
9. J. R. Sutton, G. Coates, J. Remmers, *Hypoxia*, Ed. by B. C. Deccker, Philadelphia (1990), pp. 1 – 124.

Поступила 14.12.06

ANTIHYPOXANT EFFECT OF ZINC(II) BIS(N-ACETYL-L-CYSTEINATO)SULFATE OXOHYDRATE UNDER ACUTE NORMOBARIC HYPOXIA CONDITIONS

A. V. Evseev¹, M. A. Evseeva¹, E. A. Parfenov¹, V. A. Pravdivtsev¹, and P. D. Shabanov²

¹ Smolensk State Medical Academy, ul. Krupskoi 28, Smolensk, 214019, Russia;

² St. Petersburg State Military Medical Academy, ul. Akademika Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044, Russia
e-mail: shabanov@mail.rcom.ru

Using two models of the acute normobaric hypercapnic hypoxia (ANHH) and acute normobaric hypoxia without hypercapnia (ANWH), some parameters of the impulse activity of somatosensory cortex neurons were studied in experiments on cats. A new antihypoxant drug – aminothiols complex substance composed of zinc(II) and N-acetyl-L-cysteine (π Q-1104, 50 mg/kg) – was used for the brain protection. The substance studied showed a high antihypoxant activity in the brain neurons during all stages of both ANHH and ANWH. The average active survival time during hypoxic state was increased 2 – 2.5 times in comparison to the control group. The neuron activity dynamics under ANHH and ANWH conditions and after π Q-1104 injection was observed.