

ВЛИЯНИЕ ЛИТИЕВОЙ СОЛИ КОМОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В МОЗГЕ СТРЕССИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ

Л. В. Шурыгина¹, Э. И. Злищева¹, А. А. Кравцов¹, Т. В. Андросова¹,
Л. А. Полещук², Н. О. Абрамова², Л. И. Злищева¹

Исследовано влияние нового соединения — литиевой соли комоновой кислоты на окислительные процессы в мозге в условиях острого и длительного комбинированного стрессирования животных. Установлено, что коменат лития (1 и 2 мг/кг) оказывает выраженное дозозависимое антиоксидантное стресспротекторное действие, проявляющееся в угнетении гиперпродукции свободных радикалов и снижении содержания вторичного продукта перекисного окисления липидов, малонового диальдегида в ткани мозга стрессированных животных. Наиболее высокий антиоксидантный стресспротекторный эффект в условиях острого и длительного комбинированного стрессирования животных литиевая соль комоновой кислоты оказывает в дозе 2 мг/кг массы тела.

Ключевые слова: стресс; коменат лития; свободнорадикальное окисление; малоновый диальдегид; антиоксидантное действие

ВВЕДЕНИЕ

Гиперпродукция свободных радикалов (СР), или так называемый окислительный стресс, в последние годы рассматривается как один из наиболее значимых факторов патогенеза нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз и прочие [3]. Окислительный стресс, ведущий к гиперпродукции СР и деструкции клеточных мембран, связанной с активацией фосфолипазного гидролиза, играет главную роль в патогенетических механизмах ишемии мозга. Увеличение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активных форм кислорода (АФК) сочетается со снижением активности антиоксидантных ферментов и нарушением функции физиологических систем защиты [2]. Профилактика и лечение заболеваний, связанных с окислительным повреждением мозга, являются актуальной медицинской проблемой, успешное решение которой позволит повысить эффективность фармакотерапии многих нейродегенеративных заболеваний человека. Потенциально действенными в фармакотерапии ишемии мозга являются препараты с антиоксидантными свойствами. В настоящее время ведется поиск новых эффективных антиоксидантных препаратов, способных защитить мозговую ткань от повреждения и изучение их молекулярных механизмов действия [8, 13].

В соответствии с этим, а также учитывая, что для лечения многих нейродегенеративных заболеваний используются различные препараты лития (хлористый литий, углекислый литий, оксидбутират лития) [4]. Нами получена литиевая соль комоновой кислоты [10]. Сравнительно простое по своему химическому строению вещество — коменат лития отличается тем, что катион лития и анион

комоновой кислоты сами по себе биологически весьма активны.

Известно, что литий подавляет симпатическую активность и ослабляет действие катехоламинов, активирует моноаминоксидазу и усиливает внутринеурональный метаболизм катехоламинов, уменьшает чувствительность адрено-эргических и дофаминовых рецепторов, обладает способностью предотвращать повышенную чувствительность дофаминовых рецепторов, возникающую при лечении нейролептиками. Значительное число работ посвящено антиоксидантным свойствам лития [4, 14, 15].

Комоновая (5-гидрокси-γ-пирон-2-карбоновая) кислота, имеющая широкий диапазон действия, обладает антиоксидантным свойством, мягким седативным действием, антиабстинентным, анксиолитическим и антидепрессантным свойствами, является высокоэффективным ненаркотическим анальгетическим средством, не имеющим негативных побочных эффектов, не вызывающих зависимости и привыкания, приводящим к долговременному снятию болевого синдрома [6].

Коменат лития продемонстрировал высокую антиоксидантную эффективность *in vitro* в модельной системе ЦФЛ (цитратно-фосфатный буфер с люминолом) и нейропротекторное действие на культуре нейронов мозга в условиях глутаматной цитотоксичности [11].

Целью настоящей работы является изучение антиоксидантных свойств литиевой соли комоновой кислоты в мозге грызунов на моделях иммобилизационного и длительного комбинированного стресса.

Влияние различных негативных факторов, в том числе физическая нагрузка, стресс, сопровождается увеличением образования СР, инициирующих повреждение клеток и ведущих к развитию различных патологических состояний. Для оценки состояния окислительных механизмов наиболее часто используется определение продуктов ПОЛ, вторичным продуктом которого является малоновый диальдегид (МДА), а также исследование хемилюминесценции биологических сред, интегрально отра-

¹ Отдел биологически активных веществ (зав. — Л. В. Шурыгина) ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет», 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149.

² ООО «Бализ Фарм», 350910, Краснодар, ул. Мира, 4/1.

жающей баланс про- и антиоксидантных процессов в организме [3].

Исходя из вышеизложенного, влияние коената лития на окислительные процессы в мозге мы оценивали по содержанию вторичного продукта ПОЛ — МДА и состоянию свободнорадикального окисления (СРО).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использована монокристаллическая соль коеновой кислоты (коенат лития), синтезированная в отделе биологически активных веществ ФГБОУ ВПО “Кубанский государственный университет”, г. Краснодар [10]. Для получения коената лития использовали коеновую кислоту, выделенную из препарата Бализ-2 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Altex 112 с колонкой UltrasphertODS и дифференциальным рефрактометрическим детектором ОрtilabMultref 902 D. Синтезированные кристаллы комплекса коената лития с коеновой кислотой анализировали на содержание лития атомно-абсорбционным методом на приборе ICP-AESiCAP 6500, а на содержание С и Н на СНN-анализаторе CarloErba. Уточнение брутто-формулы проводили термогравиметрическим анализом на приборе NETZSCHSTA 409 PC/PG. Результаты анализов показали, что монозамещенная соль коеновой кислоты имеет брутто-формулу $Li(NA) \cdot H_2O$. Для выяснения строения соединения был записан ИК спектр на спектрофотометре InfracLUMFT-02 (рисунок). Синтезирован коенат лития при взаимодействии эквивалентных количеств ионов лития и карбоксильной группы коеновой кислоты. Реакция необратима, протекает до конца. Продукт реакции не содержит примесей коеновой кислоты или литий-реагента.

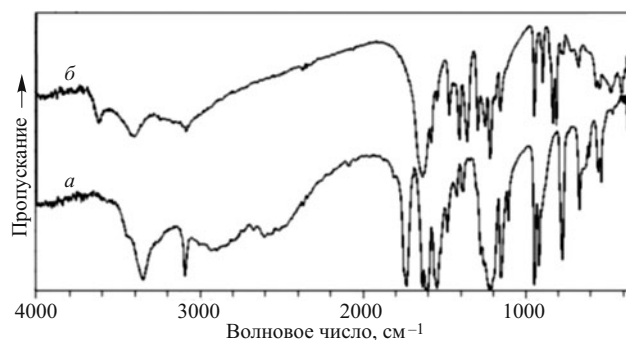
Коенат лития представляет собой кристаллический порошок желтоватого цвета, со слабым специфическим запахом, легко растворим в воде, слабо растворим в спирте, молекулярная масса — 162,02 [7, 10].

Хорошо известно, что в условиях продолжительного воздействия, в силу материальной кумуляции лития, в тканях и органах могут создаваться его токсические концентрации [4]. В этой связи для исключения возможного риска интоксикации литием нами для проведения исследований эмпирически подобраны максимально эффективные и не токсичные дозы коената лития.

Эксперименты проведены на 72 белых беспородных мышках-самцах массой 23 – 25 г и 35 крысах-самцах линии Вистар массой 240 – 250 г.

Животных содержали в виварии при свободном доступе к пище и воде. Опыты проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755).

Антиоксидантную активность коената лития исследовали на моделях иммобилизационного стрессирования мышей и длительного иммобилизационно-холодового (комбинированного) воздействия на крыс. Коенат лития вводили животным в дозах 1, 2 и 3 мг/кг массы тела.



Инфракрасные спектры коеновой кислоты (а) и монокристаллической соли коеновой кислоты — коената лития (б).

Иммобилизационный стресс у мышей вызывали путем подвешивания их за шейную складку в течение пяти часов. Через 5 ч мышей декапитировали, головной мозг помещали в жидкий азот, и затем в мозге определяли уровень СРО и МДА. Коенат лития вводили мышам до стрессирования, внутрь, натошак, в течение трех суток, один раз в сутки. Были сформированы следующие группы самцов белых беспородных мышей: 1-я группа — контроль, интактные; 2-я — коенат лития 1 мг/кг; 3-я — коенат лития 2 мг/кг; 4-я — коенат лития 3 мг/кг; 5-я — стресс; 6-я — стресс, коенат лития 1 мг/кг; 7-я — стресс, коенат лития 2 мг/кг; 8-я — стресс, коенат лития 3 мг/кг.

Крыс подвергали длительному комбинированному стрессированию путем многократного воздействия голода и иммобилизации в пенале при температуре 6 – 8 °С в течение 5 ч. Стрессирование осуществляли по схеме: 1-е сутки — 24 ч голод, 2-е сутки голод, пенал, кормление,

Таблица 1. Влияние коената лития на свободнорадикальное окисление (СРО) и содержание малонового диальдегида (МДА) в ткани мозга стрессированных мышей ($M \pm m$)

№ п/п	Группа животных (n = 9)	СРО, светосумма, у. е.	МДА, нМ/1 мг белка
1	Контроль (интактные)	259,86 ± 6,04	3,59 ± 0,15
2	Коенат лития 1 мг/кг	261,56 ± 8,54	3,77 ± 0,17
3	Коенат лития 2 мг/кг	254,99 ± 7,25	3,64 ± 0,10
4	Коенат лития 3 мг/кг	275,53 ± 9,1	4,3 ± 0,17
5	Стресс	293,87 ± 4,34**	4,7 ± 0,16***
6	Стресс, коенат лития 1 мг/кг	250,62 ± 9,07##	3,9 ± 0,28#
7	Стресс, коенат лития 2 мг/кг	237,43 ± 16,92#	3,64 ± 0,10###
8	Стресс, коенат лития 3 мг/кг	285,19 ± 5,94	4,83 ± 0,18

Примечания:

- * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$ — по сравнению с интактным контролем;
- # — $p \leq 0,05$; ## — $p \leq 0,01$; ### — $p \leq 0,001$ - по сравнению с группой стресс.

голод — 16 ч, 3-и сутки — голод, пенал, декапитация, определение СРО и МДА.

Коенат лития вводили внутрь, натошак, в течение 3-х дней в период комбинированного стрессирования.

Сформированы следующие группы крыс: 1-я группа — контроль, интактные; 2-я — комбинированный стресс; 3-я — комбинированный стресс, коенат лития 1 мг/кг; 4-я — комбинированный стресс, коенат лития 2 мг/кг; 5-я — комбинированный стресс, коенат лития 3 мг/кг.

Состояние СРО определяли хемилюминесцентным методом [9] на приборе SmartLum 5773 по интенсивности хемилюминесценции (светосумма хемилюминесценции в у. е.).

Содержание МДА определяли по методу Б. В. Гаврилова и соавт. [1].

Статистическую обработку данных проводили параметрическим методом. Характер распределения значений, определенный по показателям “асимметрия” и “эксцесс”, удовлетворял требованиям нормального распределения. Для оценки достоверности различий выборок применяли *t*-критерий Стьюдента [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований (табл. 1) показали, что имобилизационное стрессовое воздействие способствует активизации окислительных процессов в мозге мышей, что проявляется в повышении уровня СРО и МДА.

Существенное и статистически значимое снижение уровня этих показателей в сравнении с группой “стресс” отмечается при дострессовом применении коената лития в дозах 1 и 2 мг/кг. При этом наиболее выраженное снижение уровня СРО и МДА наблюдается в мозге мышей, получавших коенат лития в дозе 2 мг/кг. У мышей, принимавших коенат лития в дозе 3 мг/кг массы тела, интенсивность ПОЛ в мозге практически не отличалась от группы “стресс”. Не выявлено влияния коената лития в дозах 1 и 2 мг/кг на показатели СРО и МДА в мозге интактных мышей. При введении интактным животным коената лития в дозе 3 мг/кг наблюдается тенденция к активации ПОЛ.

Судя по вышеприведенным данным коенат лития в указанных дозах не влияет на показатели СРО и МДА у интактных животных. В этой связи считаем нецелесообразным исследовать коенат лития в дозах 1, 2 и 3 мг/кг в опытах на интактных крысах.

При комбинированном стрессовом воздействии у крыс, как и при иммобилизации мышей, отмечается зна-

чительное и достоверное ($p \leq 0,05$), в сравнении с интактным контролем, повышение в мозге уровня СРО и МДА (табл. 2).

В группе крыс, получавшей в течение всего периода стрессирования литиевую соль коеновой кислоты в дозе 2 мг/кг, изученные показатели оставались на уровне интактного контроля. При введении коената лития в дозе 2 мг/кг происходит стабилизация равновесия ПОЛ — АОС (антиокислительная система) на уровне близком к исходному. Менее выраженное антиокислительное действие коената лития проявил в дозе 1 мг/кг. Существенного влияния на показатели СРО и МДА в мозге стрессированных крыс коенат лития в дозе 3 мг/кг не оказывал.

Таким образом, установлено, что острое и длительное комбинированное стрессовое воздействие на организм экспериментальных животных сопровождается усилением окислительных процессов в головном мозге: повышением уровня СРО и увеличением содержания в мозге одного из вторичных продуктов ПОЛ — МДА. Применение коената лития в дозах 1 и 2 мг/кг оказывает антиоксидантное, стресспротекторное действие, проявляющееся в интенсивном угнетении гиперпродукции СР и снижении содержания продуктов ПОЛ в мозге стрессированных животных. При этом наиболее выраженное антиоксидантное, стресспротекторное действие литиевая соль коеновой кислоты оказывает в дозе 2 мг/кг. Защитное дозозависимое действие коената лития отмечается как при применении его до однократного стрессового воздействия на организм, т.е. в качестве профилактического средства, так и при использовании его как лечебного средства в период длительного комбинированного стрессирования животных. Отсутствие стресспротекторного эффекта коената лития в концентрации 3 мг/кг, возможно, является результатом более интенсивного ослабления мобилизации симпато-адреналовой системы, что препятствует стабилизации окислительного гомеостаза.

Основу окислительного стресса составляет СРО жирных кислот, или так называемое перекисное окисление липидов (ПОЛ). Активация ПОЛ, будучи прямым следствием воздействия экстремального раздражителя, в свою очередь, мобилизует нейтрализующие стресс системы, в частности, за счет поступления в кровь, обладающих АО-активностью катехоламинов и глюкокортикоидов [3]. Катехоламины в организме выполняют, наряду с прочими, функцию стабилизации прооксидантно-антиоксидантного равновесия, противодействуя в определенных пределах развитию окислительного стресса. При этом, если на первых стадиях стресса катехоламины, наряду с

Таблица 2. Влияние коената лития на свободнорадикальное окисление (СРО) и содержание малонового диальдегида (МДА) при длительном — комбинированном стрессировании крыс ($M \pm m$)

№ п/п	Группа животных ($n = 7$)	СРО (светосумма, у. е.)	МДА (нМ/1 г белка)
1	Контроль (интактные)	173,16 ± 5,19	3,80 ± 0,14
2	Комбинированный стресс	210,76 ± 4,34*	4,72 ± 0,20*
3	Комбинированный стресс, коенат лития 1 мг/кг	181,62 ± 5,07 [#]	4,05 ± 0,18 [#]
4	Комбинированный стресс, коенат лития 2 мг/кг	166,74 ± 4,89 [#]	3,82 ± 0,13 [#]
5	Комбинированный стресс, коенат лития 3 мг/кг	188,19 ± 6,94	4,67 ± 0,28

Примечание. * — $p \leq 0,05$ — по сравнению с интактным контролем; [#] — $p \leq 0,05$ — по сравнению с группой комбинированный стресс.

другими системами крови, играют роль факторов стабилизации окислительного гомеостаза, способствуют подавлению первичной вспышки ПОЛ, то по мере увеличения длительности и тяжести стресса, катехоламины из факторов защиты и стабилизации все больше превращаются в факторы патогенеза, вследствие истощения эндогенных АО-резервов, как результат высокой гиперкатехоламинемии, продуцирующей все новые массы окислительных радикалов по мере хиноидной метаболизации норадреналина [3].

Важным в биологическом отношении эффектом лития является подавление им симпатической активности и ослабление действия катехоламинов [4]. Некоторые авторы отмечают антиоксидантный эффект лития. Вместе с тем приводятся данные, свидетельствующие о том, что хлорид лития не предотвращает гибель культивируемых нейронов, вызванную перекисью водорода [12, 14, 15]. Не было обнаружено заметного антиоксидантного эффекта хлорида лития и нами при исследовании его антиокислительных свойств *in vitro* в модельной системе ЦФЛ [11]. То есть литий, по-видимому, не оказывает прямого антиоксидантного действия на процессы СРО. Его антиоксидантный эффект, скорее всего, проявляется за счет ослабления стрессорной гиперкатехоламинемии.

В то же время коленовая кислота проявила выраженную антиоксидантную активность *in vitro* (в модельной системе ЦФЛ) [11].

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что высокий антиоксидантный стресспротекторный эффект комената лития, возможно, является результатом взаимного потенцирования эффекта катиона лития и аниона коленовой кислоты. Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности использования комената лития в качестве антиоксидантного стресспротекторного фармакологического средства.

ВЫВОДЫ

1. Коменат лития (1 и 2 мг/кг) оказывает выраженное дозозависимое антиоксидантное стресспротекторное действие, проявляющееся в интенсивном угнетении гиперпродукции свободных радикалов и снижении содержания одного из продуктов перекисного окисления липи-

дов — малоновый диальдегид в мозге стрессированных животных.

2. Наиболее высокий антиоксидантный стресспротекторный эффект в условиях острого и длительного стрессирования животных оказывает литиевая соль коленовой кислоты в дозе 2 мг/кг.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Л. М. Мажуль, *Вопр. мед. химии*, № 1, 19 – 21 (1987).
2. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, Москва (2001).
3. Ю. А. Зозуля, В. А. Барабой, Д. А. Сутковой, *Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга*, Знание, Москва (2000), сс. 221 – 226.
4. Г. Н. Крыжановский, *Новые данные по фармакологии и клиническому применению солей лития*, Б. И. Любимов (ред.), Москва (1984), сс. 49 – 57.
5. Г. Ф. Лакин, *Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов. — 4-е изд. перераб. и доп.*, Высшая школа, Москва (1990).
6. Т. И. Панова, *Теоретическая экспериментальная медицина. Медицина сегодня и завтра*, № 1, 28 – 33 (2005).
7. А. Н. Пирогова, *Автореф. дис. канд. хим. наук*, Краснодар (2011).
8. О. В. Поварова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(3), 69 – 73 (2003).
9. У. Р. Фархутдинов, Р. Р. Фархутдинов, *Бюл. exper. биол.*, **129**(3), 260 – 264 (2000).
10. А. Я. Шурыгин, Э. И. Злищева, А. А. Кравцов, и др., Патент РФ 2477722 (2011); Бюл. № 8 (2013).
11. А. Я. Шурыгин, А. А. Кравцов, Е. А. Немчинова и др., *Изв. ВУЗов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*, № 3, 77 – 79 (2012).
12. M. S. Allaqi, R. Nciri, M. F. Rouhaudetal., *Neurochem. Res.*, **34**(3), 453 – 462 (2009).
13. Y. Gilgun-Sherki, Z. Rosenbaum, E. Melame, *Pharmacological Reviews*, **54**(2), 271 – 284 (2002).
14. Sh. Nonaka, N. Katsube, D.-M. Chuang, *JPET*, **286**(1), 539 – 547 (1998b).
15. A. P. de Vasconcellos, F. B. Nieto, L. M. Crema, et al., *Neurochem. Res.* **31**(9), 1141 – 1151 (2006).

Поступила 24.04.13

INFLUENCE OF LITHIUM SALT OF COMENIC ACID ON THE STATE OF OXIDATIVE PROCESSES IN BRAIN OF STRESSED ANIMALS

L. V. Shurygina¹, E. I. Zlishcheva¹, A. A. Kravtsov¹, T. V. Androsova¹, L. A. Poleshchuk², N. O. Abramova², and L. I. Zlishcheva¹

¹ Kuban State Medical University, ul. Stavropol'skaya 149, Krasnodar, 350040, Russia

² Baliz Farm Company, ul. Mira 4/1, Krasnodar, 350910, Russia

The influence of a new substance, lithium salt of comenic acid, on the oxidative processes in the brain of animals under the conditions of acute and long combined stress has been investigated. It is established that lithium comenate (1 and 2 mg/kg) exhibits pronounced dose-dependent antioxidative stress-protective effect, which is manifested in suppression of the hyperproduction of free radicals and depression of the content of malonic dialdehyde (a secondary product of lipid peroxidation) in the brain of stressed animals. The maximum antioxidative stress protection effect under the conditions of acute and long combined stress has been observed for lithium salt of comenic acid in a dose of 2 mg/kg.

Keywords: stress; lithium comenate; free-radical oxidation; malonic dialdehyde; antioxidant action