

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ НАДФН-ГЕНЕРИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРОИЗВОДНЫХ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ И ХИТОЗАНА В РАЗЛИЧНЫХ ДОЗАХ НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ ИШЕМИИ/ РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

О. А. Сафонова¹, Т. Н. Попова¹, А. И. Сливкин²

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»,

¹биолого-почвенный факультет, кафедра медицинской биохимии и микробиологии;

²фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической химии
и фармацевтической технологии

Поступила в редакцию 11.11.2014 г.

Аннотация. Проведено исследование влияния производных янтарной кислоты и хитозана в различных дозах на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФ-изоцитратдегидрогеназы – поставщиков НАДФН для работы глутатионовой антиоксидантной системы, в тканях крыс на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга. Применение данных фармакологических средств приводило к дозозависимому снижению активности ферментов, возрастающей при патологии, в сторону контрольных значений. Полученные результаты могут быть объяснены с точки зрения участия тестируемых соединений в регуляции клеточного метаболизма при патологии, сопряженной с развитием окислительного стресса, вследствие проявления нейропротекторных, антигипоксантных и антиоксидантных свойств.

Ключевые слова: крысы, ишемия/реперфузия головного мозга, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, НАДФ-изоцитратдегидрогеназа, сукцинат хитозана, N-сукцинилхитозан.

Abstract. The influence of the succinic acid and chitosan derivatives at various doses on the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADP-isocitrate dehydrogenase - NADPH suppliers for glutathione antioxidant system, has been investigated in tissues of rats against the background of brain ischemia/ reperfusion. Application of these pharmacological products resulted in dose-dependent decrease of enzyme activity, increased under the pathology, towards control values. The results can be explained in terms of the participation of tested substances in the cell metabolism regulation under the pathology, accompanied by the oxidative stress development, due to the neuroprotective, antihypoxic and antioxidant properties expression.

Keywords: rats, brain ischemia/ reperfusion, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADP-isocitrate dehydrogenase, chitosan succinate, N-succinyl chitosan.

К одним из наиболее распространенных заболеваний, часто сопровождающихся инвалидизацией и смертностью населения, относят острые нарушения мозгового кровообращения. Доказано, что важную роль в гибели нервной ткани при ишемии играет интенсификация свободнорадикального окисления (СО) биомолекул [1]. Соответственно при патологиях подобного рода адаптивное

значение может иметь активация антиоксидантной системы (АОС) организма, одним из основных звеньев которой является глутатионовая система, отвечающая за обезвреживание H_2O_2 и продуктов СО биомолекул - органических пероксидов, в том числе пероксидов липидов. В роли лимитирующего фактора для функционирования данного компонента АОС выступает уровень НАДФН, в поставке которого могут участвовать глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) и

© Сафонова О. А., Попова Т. Н., Сливкин А. И., 2015

НАДФ-изоцитратдегидрогеназа (НАДФ-ИДГ, КФ 1.1.1.42) [2].

Важнейшую роль в терапии ишемических повреждений мозга играет применение ноотропных и нейропротекторных препаратов, повышающих резистентность мозга к различным повреждающим воздействиям (в первую очередь к гипоксии), и антиоксидантных средств. В связи с этим к актуальным биомедицинским проблемам относят поиск и тестирование новых фармакологических средств, обладающих подобным действием. В этом плане интерес вызывают производные янтарной кислоты и хитозана. Янтарная кислота – один из универсальных внутриклеточных метаболитов – обладает антигипоксическим действием вследствие способности интенсифицировать утилизацию кислорода тканями, восстановление НАД-зависимого клеточного дыхания, ресинтез АТФ клетками [3], а также проявляет антистрессорный, ноотропный [4,5] и антиоксидантный [6,7] эффекты. Хитозан – β -(1,4)-2-амино-2-дезоксид-глюкан, деацетилованный аналог хитина, – также способен проявлять широкий спектр активностей: антимутагенную и антиоксидантную, противолучевую, иммуномодулирующую, гиполипидемическую [8].

В связи с вышесказанным, целью данной работы явилось исследование влияния производных янтарной кислоты и хитозана – сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана – в различных дозах на активность Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ в тканях крыс при ишемии/реперфузии головного мозга (ИРГМ).

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали белых лабораторных крыс-самцов массой 150-200 г. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженных в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (ви-вариумов). ИРГМ у животных опытных групп воспроизводили под наркозом путем 30-минутной окклюзии общих сонных артерий и последующего снятия окклюдоров [9]. Восстановление кровотока контролировали визуально. Спустя 3 суток животных забивали. Кровь забирала из сердца, головной мозг извлекали из черепной коробки по стандартной методике.

Экспериментальных животных разделили на 6 групп: 1-я группа (контроль; n=9) – ложнопериорированные животные; 2-я группа (n=10) – крысы с

ИРГМ; 3-я группа (n=9) – животные с ИРГМ, которым вводили внутривентрикулярно сукцинат низкомолекулярного хитозана (соль, молекулярная масса 5 кДа) в дозе 6 мг/кг веса в виде раствора в 0.5 мл 0.9 % NaCl дважды в день в течение 3-х суток; 4-я группа (n=9) – крысы с патологией, которым вводили сукцинат хитозана в дозе 12 мг/кг веса по той же схеме; 5-я группа (n=8) – животные с ИРГМ, которым вводили N-сукцинилхитозан (амид, молекулярная масса 10 кДа) в дозе 6 мг/кг по той же схеме; 6-я группа (n=9) – крысы с постишемической реперфузией, которым осуществляли введение N-сукцинилхитозана в дозе 12 мг/кг. Тестируемые соединения были получены на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета.

Гомогенат головного мозга крысы получали путем растирания навески ткани в 3-х кратном объеме охлажденной среды выделения (50 мМ трис-НСl-буфер (pH 7.8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β -меркаптоэтанол) и центрифугирования при 5000g в течение 10 мин. Полученный гомогенат и сыворотку крови использовали для дальнейших исследований. Активность ферментов оценивали спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Для измерения активности Г6ФДГ использовали 50 мМ трис-НСl-буфер (pH 7.8), содержащий 3.0 мМ глюкозо-6-фосфат, 0.25 мМ НАДФ, 1.0 мМ MnCl₂. Среда для определения активности НАДФ-ИДГ имела следующий состав: 50 мМ трис-НСl-буфер (pH 7.6-7.8), содержащий 1.5 мМ изоцитрат, 2 мМ MnCl₂, 0.25 мМ НАДФ, 0.1 мМ ЭДТА. Реакцию начинали добавлением ферментного препарата. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции или превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при температуре +25°C. В работе приведены результаты расчета активности фермента в виде Е/г сырой массы ткани мозга или Е/мл сыворотки крови. Данные, полученные при проведении опытов в 2-х кратной аналитической повторности, обрабатывали с использованием статистических критериев [10]. Обсуждаются статистически достоверные различия при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным ранее данным, на фоне нарушения кровоснабжения головного мозга у экспериментальных животных происходит увеличение активности Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ в ткани

мозга и сыворотке крови по сравнению с контрольными значениями [11,12]. Очевидно, увеличение активности данных НАДФН-генерирующих ферментов связано с необходимостью поставки восстановительных эквивалентов для работы глутатионовой АОС в условиях оксидативного стресса.

Введение животным сукцината хитозана в дозах 6 и 12 мг/кг на фоне развития патологии приводило к снижению активности исследуемых ферментов, т.е. к изменению в сторону контроля. Так, наблюдалось уменьшение активности Г6ФДГ в гомогенате мозга в 1.4 и 2.1 раза относительно животных с патологией (рис. 1(а)). При этом активность данного фермента в сыворотке крови снижалась в 1.4 и 1.7 раза соответственно (рис. 1(б)). Показано, что активность НАДФ-ИДГ в мозге крыс с ИРГМ снижалась под влиянием сукцината хитозана в различных дозах в 1.6 и 1.9 раза по сравнению с животными, подвергнутыми 30-и минутной окклюзии сонных артерий и последующей реперфузии мозгового кровотока (рис. 2(а)). При введении данного тестируемого средства в дозах 6 и 12 мг/кг крысам с ИРГМ в сыворотке крови было выявлено снижение активности НАДФ-ИДГ в 1.4 и 1.6 раза (рис. 2(б)).

Введение N-сукцинилхитозана в дозах 6 и 12 мг/кг животным на фоне развития ИРГМ сопровождалось уменьшением активности Г6ФДГ в мозге в 1.4 и 1.9 раза по сравнению со значениями при патологии (рис. 1(а)). При этом в сыворотке крови активность данного фермента снижалась в 1.3 и 1.6 раза (рис. 1(б)). Для активности НАДФ-ИДГ у животных данных экспериментальных групп были выявлены изменения в том же направлении: в ткани мозга данный параметр уменьшался в 1.4 и 1.8 раза (рис. 2(а)), в сыворотке крови – в 1.3 и

1.7 раза (рис. 2(б)) по сравнению с данными при ИРГМ.

Таким образом, при введении производных янтарной кислоты и хитозана животным с ИРГМ происходило изменение в сторону контроля активности НАДФН-генерирующих ферментов: Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ. Полученные результаты можно объяснить снижением необходимости в поставке восстановительных эквивалентов для работы глутатионовой АОС в условиях уменьшения степени ее мобилизации при торможении процессов СО биомолекул под действием компонентов тестируемых средств. Это соотносится с полученными ранее данными по торможению свободнорадикальных процессов при введении сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана животным с ишемическим повреждением головного мозга [13]. Необходимо отметить, что выявленные изменения носили дозозависимый характер. При сравнении действия производных сукцината и хитозана был обнаружен более выраженный эффект сукцината хитозана, по-видимому, вследствие более высокой скорости образования свободных ионогенных функциональных групп, а также меньшей молекулярной массы [13]. По всей видимости, полученные результаты свидетельствуют о способности тестируемых соединений участвовать в регуляции клеточного метаболизма при патологии, сопряженной с развитием окислительного стресса, вследствие проявления нейропротекторных, антигипоксантных и антиоксидантных свойств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, под действием производных янтарной кислоты и хитозана на фоне развития

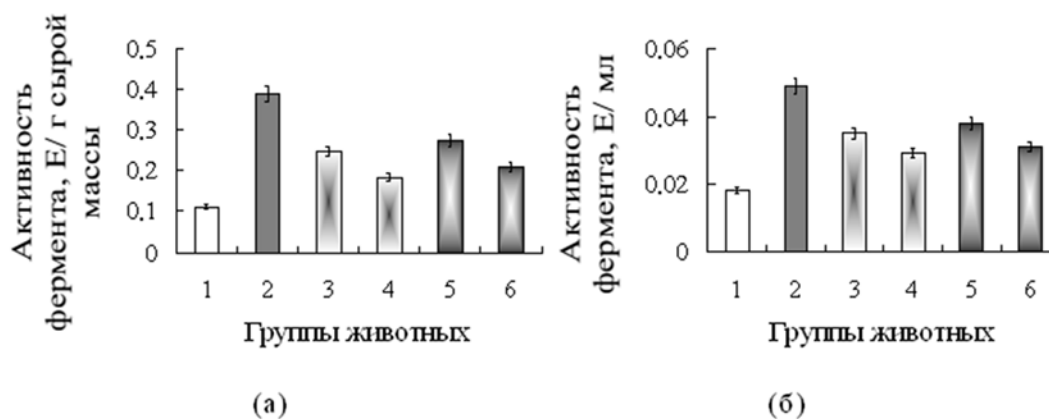


Рис. 1. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в головном мозге (а) и сыворотке крови (б) крыс: в контроле (1); при ИРГМ (2); при введении сукцината хитозана в дозах 6 мг/кг (3) и 12 мг/кг (4); при введении N-сукцинилхитозана в дозах 6 мг/кг (5) и 12 мг/кг (6) животным на фоне развития патологии

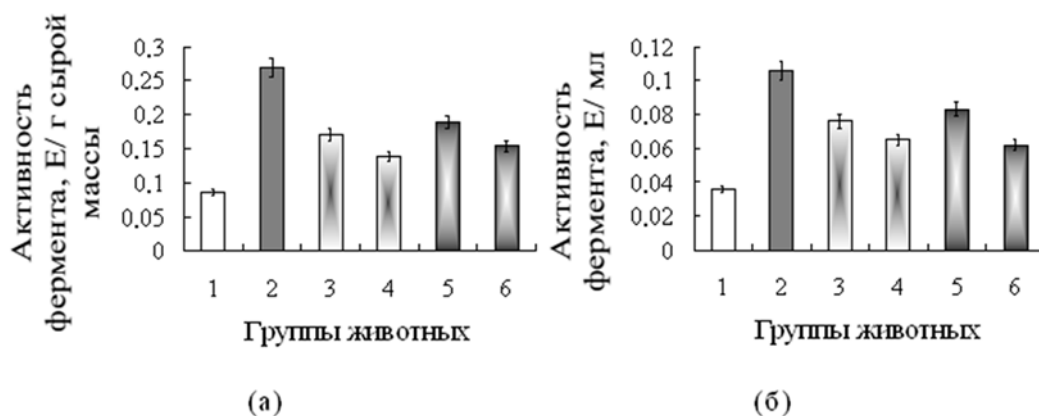


Рис. 2. Активность НАДФ-изоцитратдегидрогеназы в головном мозге (а) и сыворотке крови (б) крыс: в контроле (1); при ИРГМ (2); при введении сукцината хитозана в дозах 6 мг/кг (3) и 12 мг/кг (4); при введении N-сукцинилхитозана в дозах 6 мг/кг (5) и 12 мг/кг (6) животным на фоне развития патологии

ИРГМ происходило изменение активности исследуемых НАДФН-генерирующих ферментов в сторону контрольных значений, что, по-видимому, свидетельствует о позитивном действии компонентов тестируемых соединений на метаболические и свободнорадикальные процессы в нейронах в условиях развития окислительного стресса. Выявленные изменения носили дозозависимый характер. При сравнении действия производных сукцината и хитозана был обнаружен более выраженный эффект сукцината хитозана, по-видимому, вследствие более высокой скорости образования свободных ионогенных функциональных групп, а также меньшей молекулярной массы.

Работа поддержана финансированием по грантам РФФИ р_центр_а №13-04-97536 и мол_а № 14-04-32174.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болдырев А.А. Окислительный стресс и мозг / А.А. Болдырев // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — Т.7, № 4. — С.21-28.
2. Свободнорадикальные процессы в биосистемах / Т.Н. Попова [и др.]. — Ст. Оскол: Кириллица, 2008. — 268 с.
3. Коваленко А.В. Янтарная кислота: фармакологическая активность и лекарственные формы / А.В. Коваленко, Н.В. Белякова // Фармация. — 2000. — № 5-6. — С. 40-43.
4. Кондрашова М.Н. Гормоноподобное действие янтарной кислоты / М.Н. Кондрашова // Вопр. биол., мед. и фарм. химии. — 2002. — № 1. — С. 7-12.
5. Терапевтическое действие янтарной кислоты / Под ред. М.Н. Кондрашовой. — Пушкино: Инст-т Биофизики АН СССР, 1976. — 234 с.

6. Ивницкий Ю.Ю. Янтарная кислота в системе средств метаболической коррекции функционального состояния и резистентности организма / Ю.Ю. Ивницкий, А.И. Головкин, Г.А. Софронов. — СПб.: Лань, 1998. — 82 с.

7. Румянцева С.А. Энергокоррекция цитофлавином в остром периоде инсульта / С.А. Румянцева // Вести Интенс. Терапии. — 2005. — № 3. — С. 23-26.

8. Biopolymers for medical and pharmaceutical applications / Ed. by A. Steinbeuchel and R.H. Marchessault. — Vol.1: Humic substances, polyisoprenoids, polyesters, and polysaccharides. — Weinheim: Wiley-VCH, 2005. — 1145 p.

9. Коррекция последствий постишемического реперфузного повреждения головного мозга цитофлавином / В.В. Бульон [и др.]. // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2000. — Т. 129, № 20. — С. 345 - 348.

10. Ллойд Э. Справочник по прикладной статистике / Э. Ллойд, У. Ледерман. — М.: Финансы и статистика, 1990. — 525 с.

11. Макеева А.В. Воздействие тиоктовой кислоты на функционирование глутатионового редокс-цикла при развитии ишемии-реперфузии головного мозга у крыс / А.В. Макеева, Т.Н. Попова // Нейрохимия. — 2009. — Т. 26, № 2. — С. 130-137.

12. Сафонова О.А. Влияние 2,4-диметоксифенилбигуанида на активность глутатионовой системы в тканях крыс при ишемии-реперфузии головного мозга / О.А. Сафонова, Т.Н. Попова, Л.Ф. Панченко // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2011. — Т. 151, № 5. — С. 488-491.

13. Влияние соединений на основе янтарной кислоты и хитозана на активность аконитатти-

дратазы и содержание цитрата в тканях крыс при ишемии/ реперфузии головного мозга / О.А. Са-

фонова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т.48, №12. – С. 73-76.

*Воронежский государственный университет
Ольга А. С., к.б.н., доцент кафедры медицин-
ской биохимии и микробиологии
Тел. : 8(473)228-11-60, номер абонента 1111;
E-mail: solya333@mail.ru.*

*Voronezh State University
Safonova O. A., PhD, An associate professor of
the Dept. of Medical Biochemistry and Microbiology
Ph.: 8(473)228-11-60, additional number 1111
E-mail: solya333@mail.ru.*

*Попова Т. Н., проф., д.б.н., зав. кафедрой ме-
дицинской биохимии и микробиологии
Тел.: 8(473)228-11-60, номер абонента 1110
E-mail: tpopova@bio.vsu.ru*

*Popova T. N., Dr. of Biology, Prof., the Head of
the Dept. of Medical Biochemistry and Microbiology
Ph.: 8(473)228-11-60, additional number 1110
E-mail: tpopova@bio.vsu.ru.*

*Сливкин А. И., д.фарм.н., проф., зав. кафедрой
фармацевтической химии и фармацевтической
технологии
Тел.: 8(4732)530789
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru.*

*Slivkin A. I., Dr. of Pharmacy, Prof., the Head
of the Dept. of Pharmaceutical Chemistry and
Pharmaceutical Technology
Ph.: 8(4732)530789
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru.*