

УДК 577.151.04; 577.152.313

©Коллектив авторов

## ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ ПРЕПАРАТЫ КАК БИОАНТИОКСИДАНТЫ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

*Г.Н. Богданов<sup>1\*</sup>, Д.В. Мищенко<sup>1</sup>, Р.А. Котельникова<sup>1</sup>, Е.С. Фроз<sup>1</sup>,  
И.И. Файнгольд<sup>1</sup>, Л.В. Татьянаенко<sup>1</sup>, О.В. Доброхотова<sup>1</sup>, Я.Р. Нарциссов<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт проблем химической физики РАН, г. Черноголовка, Московская область

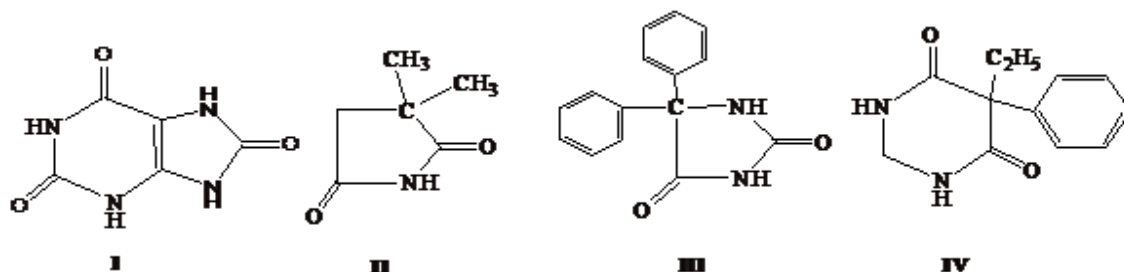
<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт цитологии и молекулярной биологии, Москва.

Изучено влияние противосудорожных препаратов ряда гетероциклических амидов (этосуксимид, фенитоин, примидон), близких структурных аналогов мочевой кислоты, на процесс пероксидного окисления липидов и активность мембраносвязанных моноаминоксидаз А и В (МАО-А и МАО-В) в условиях стресса.

Обнаружено, что интраперитонеальное введение крысам изученных препаратов приводит к увеличению содержания супероксиддисмутазы, снижению содержания малонового диальдегида (МДА) и активности ферментов окислительного дезаминирования биогенных аминов в митохондриях клеток головного мозга.

**Ключевые слова:** стресс, пероксидное окисление липидов, моноаминоксидазы, биоантиоксиданты.

**ВВЕДЕНИЕ** Класс противосудорожных лекарственных средств по механизмам их действия принято делить на две группы препаратов, одни из которых тормозят иррадиацию избыточного возбуждения по головному мозгу, другие избирательно блокируют холинорецепторы мозга или повышают содержание дофамина, являющегося медиатором тормозящего действия. Именно поэтому ингибиторы процесса окислительного дезаминирования биогенных аминов проявляют противосудорожный эффект при болезни Паркинсона, патогенетические механизмы которой включают образование свободных радикалов. В ряду новых препаратов такого типа можно выделить несколько близких по химическому строению гетероциклических амидов (этосуксимид (II), фенитоин (III), примидон (IV)). Все они являются близкими структурными аналогами мочевой кислоты (I) (продукта катаболизма пуриновых азотистых оснований нуклеиновых кислот), обладающей антиоксидантным действием.



Вот почему целью настоящей работы явилось изучение влияния указанных противосудорожных препаратов на удельное содержание продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран (МДА), а также на активность моноаминоксидаз (ферментов окислительного дезаминирования биогенных аминов)

\* - адресат для переписки

## ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ ПРЕПАРАТЫ КАК БИОАНТИОКСИДАНТЫ

в условиях стресса. Эта модель является адекватным объектом для изучения антиоксидантных свойств лекарственных средств, поскольку первичными медиаторами патогенетических процессов стресса являются супероксидные анион-радикалы и промежуточные продукты пероксидного окисления липидов биологических мембран.

**МЕТОДИКА.** Работа выполнена на крысах линии Вистар, стресс у которых вызывали длительным плаванием до утраты способности держаться на воде, т.е. до наступления фазы истощения. Затем интраперитонеально вводили препараты в эквимоллярных дозах ( $10^{-4}$  М), соответствующих 12,7, 25,2, 20,5 мк/кг, через час после чего животных забивали посредством дислокации шейных позвонков. Производили забор крови, извлекали печень и головной мозг. Ткани промывали физиологическим раствором (рН 7,4) и осушали марлевым тампоном. Из головного мозга готовили субклеточные гомогенаты с использованием гомогенизатора Поттера и определяли в них удельное содержание МДА.

Содержание МДА в гомогенатах головного мозга определяли по его реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) - одного из общепринятых диагностических тестов на оксидативный стресс [1]. Данная реакция при высокой температуре ( $95^{\circ}\text{C}$ ) и кислом значении рН протекает с образованием триметинового аддукта, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы ТБК. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord M-40" Максимум поглощения аддукта приходится на 535 нм.

Метод определения суммарного содержания Cu/Zn- и Mn-СОД основан на способности нитросинего тетразолия (НСТ) конкурировать с ферментом за супероксидные анион-радикалы, образующиеся в системе тетраметилэтилендиамин-рибофлавин. В ходе реакции НСТ восстанавливается с образованием гидразинтетразолия [2]. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм. Полученные таким образом значения относительной активности СОД выражали в единицах удельного содержания фермента по построенной нами калибровочной кривой (рисунок) зависимости величины оптической плотности от содержания фермента. Для этого использовали препарат СОД из печени быка ("Sigma", США).

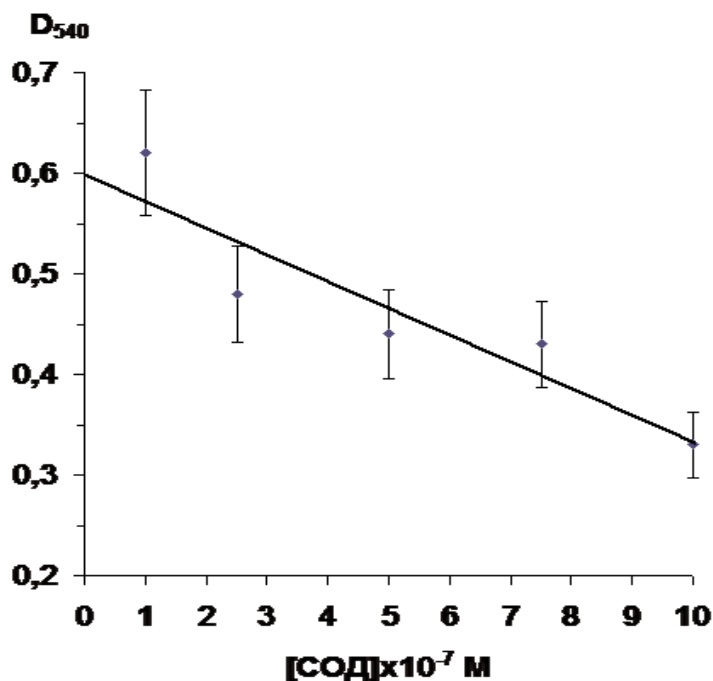


Рисунок.  
Калибровочная кривая зависимости оптической плотности (D) НСТ в максимуме поглощения при  $\lambda=540$  нм и удельного содержания СОД.

Митохондрии мозга выделяли методом дифференциального центрифугирования [3]. Для этого ткань головного мозга крыс промывали 0,9% физиологическим раствором (рН 7,2), затем гомогенизировали в 0,1 М К-Na-фосфатном буфере, рН 7,15 при 4°C (1:5 масса/объем), используя гомогенизатор Поттера. К полученному гомогенату добавляли 0,25 М раствор сахарозы для получения 10% гомогената, который сначала центрифугировали 10 мин при 750 g на центрифуге К-23. К полученной надосадочной жидкости вновь добавляли 0,25 М раствор сахарозы до первоначального объема и центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин в центрифуге К-24. Полученный осадок митохондриальной фракции суспензировали в стеклянном гомогенизаторе в 0,1 М К-Na-фосфатном буфере с добавлением 0,25 М сахарозы, этим же буфером доводили объем суспензии до 10% (1 г осадка – 9 мл буфера) и центрифугировали в течение 15 мин при 12000 g. Суспензировали полученный осадок и доводили 0,01 М К-Na-фосфатным буфером (рН 7,15) с 0,25 М сахарозой до объема, равного половине исходного веса мозга. Суспензию из шприца по каплям добавляли в жидкий азот, получая замороженные шарики митохондрий, которые хранили в жидком азоте [3]. Каталитическую активность МАО-А и МАО-В определяли по методике [4], используя в качестве субстратов серотонин и бензиламин и определяя количество аммиака, образующегося при дезаминировании биогенных аминов [5].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ** Терминальной стадией развития общего адаптационного синдрома после длительного воздействия стрессорного фактора является фаза истощения. Она характеризуется угнетением жизненно важных функций организма. При этом сопротивляемость организма падает ниже его изначального уровня, когда подавлены процессы базового метаболизма, исчерпаны резервы антиоксидантов, иммунная система угнетена, мышечный тонус запредельно увеличен [6].

Известно, что первичными медиаторами стресса являются полупродукты свободнорадикального цепного процесса ПОЛ, включая  $\text{HO}^\bullet$  и  $\text{LO}_2^\bullet$  радикалы зарождения и продолжения цепей соответственно [7].

Свободнорадикальные продукты неполного восстановления молекулярного кислорода - активные формы кислорода (АФК) - лежат в основе патогенеза многих заболеваний и патологических состояний, некоторые стадии которых связаны с образованием реакционноспособных свободных радикалов  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{NO}^\bullet$  и  $\text{ONOO}^-$ . Это возможно только при условии низкого содержания ингибиторов свободнорадикальных реакций, т.е. сниженного антиоксидантного статуса организма, который обеспечивают ферменты антиоксидантной защиты, а также эндо- или экзогенные биоантиоксиданты.

Полученные нами результаты (таблица) наглядно показывают что в условиях стресса существенно (немногим более 40%) возрастает удельное содержание МДА, свидетельствующее об интенсификации процесса ПОЛ. Одновременно с этим удельное содержание СОД в фазе истощения снижено в 6,5 раз по сравнению с нормой. Эти данные в полной мере соответствуют общепризнанным реципрокным закономерностям процессов клеточного оксидативного стресса, изложенным в статье [8]. Согласно результатам, полученным в статье [9], в процессы окисления может быть вовлечено и ферментативное окислительное дезаминирование биогенных аминов. В предлагаемой работе изучалось изменение каталитической активности ферментов окислительного дезаминирования биогенных аминов: моноаминоксидаз А и В в условиях стресса и общего адаптационного синдрома. Как известно, биогенные амины являются важнейшими нейромедиаторами, с истощением которых в рецепторах головного мозга связаны многие психопатические явления, в частности, депрессивное состояние [10].

Таблица. Влияние препаратов противосудорожного действия на активность моноаминоксидаз, интенсивность ПОЛ и содержание СОД.

	Удельное содержание МДА в головном мозге, мкмоль/мг белка в мин	Удельное содержание СОД в головном мозге крыс, мкмоль/мг белка в мин	Удельная активность MAO головного мозга крыс, мкмоль аммиака /мг белка в мин			
			MAO-A <sup>н</sup>	MAO-A <sup>н</sup> в vivo	MAO-B <sup>н</sup>	MAO-B <sup>н</sup> в vivo
Норма	8,12±0,20	75,2±8,00	0,72±0,05	0,58±0,05	0,65±0,05	0,53±0,05
Контроль (стресс-реакция)	11,40±0,80	11,6±1,01	-	1,06±0,09	-	0,35±0,03
Этосуксимид	9,1±0,95**	48,0±4,82**	0,83±0,04	1,00±0,09*	0,47±0,06	0,49±0,04*
Примидон	7,88±0,70*	40,1±4,14**	0,69±0,03	1,04±0,09*	0,61±0,07	0,61±0,06*
Фенитоин	7,42±1,00**	35,0±3,80**	1,15±0,07	1,02±0,09*	0,44±0,05	0,39±0,04*

Мембранная локализация моноаминоксидаз определяет особую чувствительность этих ферментов к различным стрессорным факторам. При этом если активность МАО-А определяется типом и содержанием аминного субстрата, то активность МАО-В – также во многом зависит от парциального давления кислорода [11]. В условиях стресса происходит частичное окисление сульфгидрильных групп и каталитическая активность МАО-А существенно изменяется. Так снижение ее каталитической активности отмечено как при кислородной интоксикации, когда замедлялось развитие судорог, так и в судорожной стадии гипоксии [12].

По нашим данным, многие патологические состояния (стресс, атеросклероз, черепно-мозговая травма, нарушение нейромедиаторных процессов в ЦНС, грануляционно-фиброзная стадия заживления ран и др.) сопровождаются изменениями активности МАО-В [13]. При этом биоантиоксиданты существенно улучшают состояние организма в целом [12]. По этой причине наличие свойств биоантиоксидантов у противосудорожных препаратов ряда гетероциклических аминов, по нашему мнению, может быть связано со снижением активности ферментов окислительного дезаминирования биогенных аминов.

Изученные в работе противосудорожные препараты в разной степени влияют на исследованные биохимические характеристики. Даже при беглом анализе данных (см. таблицу), видно, что после интраперитонеального введения препаратов нормализуются показатели удельного содержания МДА и активности МАО-В, за исключением действия фенитоина, введение которого не ослабляет влияние стрессорного фактора на фермент. Этот эффект наблюдается на фоне увеличения удельного содержания СОД, тогда как активность МАО-А (*in vitro*) остается на уровне контроля. Возможно, отсутствие эффекта действия препарата на МАО-А в условиях стресс-реакции объясняется тем, что *in vitro* эти препараты (кроме примидона) сами вызывают увеличение активности фермента головного мозга крыс в отсутствие стресса. При этом, как видно из таблицы, при стресс-реакции каталитическая активность МАО-А при увеличении концентрации МДА растет, а не падает, как показано в [9]. Как известно, МАО-А и МАО-В чувствительны к любому изменению внешней и внутренней сред организма. В частности, в работах [14, 15] показано, что в условиях гипероксии наблюдается повышение активности МАО-А при увеличении содержания МДА.

Каждый из препаратов также влиял и на активность МАО-В. С понижением каталитической активности МАО-В относительно контроля под влиянием фенитоина и этосуксимида ее значения достигают уровня нормы.

Вопрос о возможных антиоксидантных свойствах противосудорожных препаратов, по-видимому, взаимосвязан с понятием антиоксидантного статуса организма. Поскольку супероксидные радикалы играют важную роль в стресс-реакциях, то в такой же степени первостепенная роль принадлежит супероксиддисмутазе. Действительно, как видно из данных, представленных в таблице, при стрессе в терминальной фазе истощения активность СОД составляет менее 15% от нормального уровня. Под влиянием противосудорожных препаратов активность СОД возрастает в 3-4 раза по сравнению с концентрацией СОД при стресс-реакции, причем в наибольшей степени после введения этосуксимида, хотя до нормы не увеличивается.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Отмеченные эффекты коррекции процессов ПОЛ и окислительного дезаминирования биогенных аминов под влиянием противосудорожных препаратов из группы структурных аналогов мочево́й кислоты позволяют аргументировано отнести их к классу биоантиоксидантов.

В целом полученные результаты позволяют предположить, что молекулярные механизмы противосудорожного действия этосуксимида, фенитоина и примидона могут быть связаны с их антиоксидантными свойствами.

Работы были выполнены при поддержке РФФИ (грант 06-03-32381).

# ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А. (1998) Биол. мембраны, **15**, 517-528.
2. Beauchamp C., Fridovich I. (1971) Anal. Biochem., **44**, 276-287.
3. Spach P.I., Bottenus R.E., Cunningham C.C. (1982) Biochem., **202**, 445-452.
4. Gorkin V.Z. (1972) Adv. Biochem. Pharmacol., **5**, 55-65.
5. Patel M.N. (2002) Free Radical Res., **36**(11), 1139-1146.
6. Тодоров И.Н., Тодоров Г.И. (2003) Стресс, старение и их биохимическая коррекция, Наука, М. 473.
7. Барбой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. (1992) Пероксидное окисление и стресс, Наука, СПб, 148.
8. Hauptman N., Grimsby J., Shih J., Gradenas E. (1996) Arch. Biochem. Biophys., **335**, 295-304.
9. Медведев А.Е., Тунтон К.Ф. (1997) Вопр. мед. химии, **43**, 471-481
10. Горкин В.З. (1981) Аминоксидазы и их значение в медицине, Медицина, Москва
11. Squires R.F., Saiderup E. (1996) Prog. Brain Res., **441**, 15-22.
12. Matsubara K., Collins M.A., Akane A., Ikebuchi J., Neafsey E.J., Kagawa M., Shiono G.H. (1993) Brain Res., **610**, 90-96.
13. Богданов Г.Н., Мищенко Д.В., Котельникова Р.А., Фрог Е.С., Варфоломеев В.Н., Богатыренко Т.Н., Штолоко В.Н. (2007) Шестой Всероссийский симпозиум по проблемам боевого стресса "Боевой стресс: механизмы стресса в экстремальных условиях деятельности", М, с. 44-45.
14. Ramsay R.R., Kerber S.C., Singer T.P. (1987) Biochemistry, **26**, 3045-3050.
15. Горкин В.З. (1976) Ж. Всесоюзн. хим. о-ва. им. Д.И. Менделеева, **22**, №2, 181-186.

Поступила: 19. 12. 2007.

## ANTICONVULSANTS ACTION AS BIOANTIOXIDANTS UNDER STRESS CONDITIONS

G.N. Bogdanov<sup>1</sup>, D.V. Mishchenko<sup>1</sup>, R.A. Kotelnikova<sup>1</sup>, E.S. Frog<sup>1</sup>, I.I. Fajngold<sup>1</sup>, L.V. Tatjanenko<sup>1</sup>,  
O.V. Dobrohotova<sup>1</sup>, J.R. Nartsissov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Science, Chernogolovka,  
Moscow region, Russia

<sup>2</sup>Research Institute of Cytology and Molecular Biology, Moscow, Russia

The action of heterocyclic amides series (ethosuximide, phenytoin, primidone) on lipid peroxidation and membrane bound monoamine oxidases A and B under stress condition has been studied.

The intraperitoneal injection of the drugs resulted in enhancement of SOD, decrease of brain malondialdehyde content and mitochondrial activity of monoamine oxidases A and B.

**Key words:** stress, lipid peroxidation, monoamine oxidases, bioantioxidants.