

УДК 615.357.03:613.863].015.4.076.9  
©Коллектив авторов

## МЕМБРАННЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ВИНПОЦЕТИНА И ТОКОФЕРОЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ У КРЫС

*А.А. Вишневский\*, И.Г. Короткевич, Г.А. Джантаева, Ч.О. Жапаралиева*

Лаборатория клеточной физиологии Института горной физиологии  
Национальной Академии Наук Кыргызской Республики, 720048, Кыргызстан,  
Бишкек, ул. Горького 1/5; тел.: (0312) 44-97-27; эл. почта: polonis@bk.ru

Исследовали мембранотропные, антиоксидантные и функциональные эффекты винпоцетина и  $\alpha$ -токоферола при острой экспериментальной церебральной ишемии у крыс. Показаны особенности корригирующих влияний использованных биорегуляторов. Введение винпоцетина, в отличие от  $\alpha$ -токоферола, достоверно уменьшало индуцированное окислительным стрессом накопление лизоформ фосфолипидов (lyso-PL) в плазматических мембранах мозга. Этот препарат обладал значительной способностью блокировать накопление конечных продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов (ДК).

$\alpha$ -Токоферол, ингибируя повышение содержания ДК, не вызвал снижения уровня lyso-PL в плазматических мембранах мозга при острой церебральной ишемии. Сделан вывод о том, что острая церебральная ишемия индуцирует окислительный стресс, усиливает накопление lyso-PL и вызывает структурные перестройки в плазматических мембранах мозга. Функциональные последствия мембранных нарушений проявились в снижении физической работоспособности и показателей поведения крыс в “открытом поле”: ориентировочной реакции, исследовательского поведения, двигательной активности, груминга. Применение винпоцетина и  $\alpha$ -токоферола в значительной мере нивелировало изменения мембранных параметров и ухудшение функциональных характеристик, при этом для винпоцетина продемонстрирован больший корригирующий эффект.

**Ключевые слова:** винпоцетин, церебральная ишемия, лизоформы фосфолипидов, оксидативный статус, поведение крыс.

**ВВЕДЕНИЕ.** В настоящее время накоплен большой массив данных, касающихся механизмов реализации физиологического и фармакологического действия винпоцетина. Имеются указания на антиоксидантные свойства этого препарата [1, 2]. Поскольку повышение уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) считается важным показателем метаболических расстройств и дестабилизации мембран, представляется логичным выяснить мембранные эффекты винпоцетина, которые остаются малоизученными.

---

\* - адресат для переписки

Окислительный стресс является неотъемлемой частью метаболических нарушений, инициирующих ряд каскадов развития сосудистых осложнений в головном мозге [3, 4]. Развитие окислительного стресса сопровождается, наряду с активацией ПОЛ, повышением содержания лизоформ фосфолипидов (lyso-PL) в клеточных мембранах [5, 6]. Lyso-PL весьма токсичные продукты активности фосфолипазы  $A_2$ , обладающие значительным детергентным потенциалом; они могут трансформировать липидный бислой, разрыхляя его структуры. Отрицательный эффект накопления lyso-PL признается большинством исследователей, поскольку это явление наблюдается при развитии ряда патологических состояний [5, 7, 8].

В качестве модели функциональных расстройств в данном исследовании была выбрана острая экспериментальная церебральная ишемия. Для коррекции уровней ПОЛ и lyso-PL использованы винпоцетин и традиционный  $\alpha$ -токоферол, который применяли в качестве препарата сравнения.

Представленная статья посвящена рассмотрению корригирующих эффектов винпоцетина и  $\alpha$ -токоферола на уровень окислительного стресса и биохимическую организацию мембран. О влиянии препаратов на функциональное состояние и двигательную активность судили по показателям поведения крыс в тесте “открытое поле”, оценивалась также физическая работоспособность животных.

**МЕТОДИКА.** Эксперименты выполнены на крысах линии Вистар обоего пола, весом 100-140 г, у которых предварительно моделировали ишемическое повреждение головного мозга путем двусторонней перевязки общих сонных артерий [9]. В первой – интактной группе крыс (контроль) не проводили перевязку сонных артерий и не применяли биорегуляторы. Вторая группа оперированных животных подвергалась инъекциям физиологического раствора (плацебо), третьей группе крыс в течение 14 суток после операции вводили винпоцетин® (Гедеон Рихтер) внутривентрикулярно в дозе 1,6 мг/кг в сутки, четвертой –  $\alpha$ -токоферол в дозе 1,5 мг/кг в сутки.

О мембранотропных эффектах биорегуляторов судили по характеру накопления lyso-PL и конечных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) в плазматических мембранах мозга. Плазматические мембраны из гомогената мозга выделяли методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [10]. После декапитации животных быстро извлекали головной мозг, отмывали его от крови охлажденным 0,14 М раствором NaCl, обсушивали фильтровальной бумагой и удаляли мягкую мозговую оболочку с кровеносными сосудами. Из 3 г ткани мозга готовили кашицу, которую гомогенизировали в гомогенизаторе типа тефлон-стекло. Гомогенат разводили 0,32 М сахарозой до соотношения 1:10, фильтровали через марлю и центрифугировали 15 мин. при 1000 g. Надосадочную жидкость собирали в пробирку и центрифугировали 20 мин при 12000 g. Осадок суспендировали в 0,32 М сахарозы (1:10) и центрифугировали 30 мин при 12000 g. В осадке получали “неочищенную митохондриальную фракцию”, которая помимо митохондрий включала в себя миелин и синаптические плазматические мембраны. “Неочищенную митохондриальную фракцию” суспендировали в 0,32 М сахарозы из расчета 2,1 мл сахарозы на 1 г ткани, наслаивали на ступенчатый градиент сахарозы (12,6 мл 1,2 М сахарозы; 12,6 мл 0,8 М сахарозы) и центрифугировали в течение 2 ч при 53000 g (ультрацентрифуга “МOM 3170” Венгрия). Слой плазматических мембран глиальных клеток образовывался между 0,32 М и 0,8 М сахарозой, а между 0,8 М и 1,2 М сахарозой – слой синаптических плазматических мембран, на дне пробирки – осадок митохондрий [11]. Плазматические слои отбирали с помощью пипетки, объединяли для извлечения фосфолипидов и для ИК-спектрального анализа.

Уровень накопления ДК оценивали по методу, основанному на измерении интенсивности поглощения светового излучения конъюгированными диенами в области 232-234 нм [4]. Lyso-PL в плазматических мембранах определяли после экстракции липидов из бислоя.

Для выделения липидов из плазматических мембран в пробирку с притертой пробкой помещали 1,5 мл суспензии, полученной после дифференциального центрифугирования и прибавляли 5 мл смеси хлороформ – метанол (в соотношении 1:2 по объему). Смесь гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе тefлоновым пестиком и выдерживали в течение 1-2 ч, периодически встряхивая, после чего центрифугировали 10 мин при 1000 g. Надосадочную жидкость переносили с помощью пастеровской пипетки в другую пробирку с притертой пробкой и еще раз экстрагировали в 6 мл смеси хлороформа, метанола и воды (1:2:0,8 по объему). В объединенные экстракты добавляли 3,5 мл хлороформа и 3,5 мл воды. Хлороформный и водно-метаноловый слои разделяли центрифугированием. Нижняя фаза состояла главным образом из хлороформа и содержала все липиды, за исключением ганглиозидов. Удаление растворителя (хлороформа) проводили под вакуумом.

Качественный и количественный состав мембранных фосфолипидов из полушарий мозга определяли методом одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля на пластинах “Silufol UV254” (Чехия) в системе хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (60:50:1:4 по объему). Лизофосфолипиды при этом оставались вблизи старта. Фракцию лизоформ элюировали и определяли фосфолипидный фосфор [10].

Молекулярно-структурный статус бислоя оценивали методом инфракрасной (ИК) спектроскопии на спектрофотометре “Specord M80” (Германия) в диапазоне частот от 4000 см<sup>-1</sup> до 900 см<sup>-1</sup> на стеклах из фторида кальция. Метод основан на анализе спектров трансмиссии электромагнитных волн инфракрасного диапазона химическими связями фосфолипидных компонентов мембран и позволяет получать интегральную количественную информацию о состоянии липидного бислоя [12, 13].

Изменение интенсивности трансмиссии при 1655 см<sup>-1</sup> – признак появления в бислое участков с измененной упорядоченностью – кластеров [12]. Изменение интенсивности трансмиссии при 2836-2856 см<sup>-1</sup> может быть использовано как параметр для определения относительной микровязкости (“жидкостности”) мембраны [13].

Функциональное состояние животных и степень выраженности у них кислородного голодания мозга оценивали на основании результатов тестов на физическую работоспособность (способность крыс к поднятию груза), локомоторную активность, поисково-исследовательское поведение и эмоциональное состояние (тест “открытое поле”). Использованное в работе “открытое поле” представляло собой манеж (размером 80×80 см), разделенный на квадраты со стороной 10 см. В центре каждого квадрата находилось отверстие диаметром 3,8 см, высота боковых стенок актографа составляла 47 см. Поведение животного в “открытом поле” изучали в течение 10 мин. Проводили регистрацию двигательной активности (смена квадратов), ориентировочной реакции (вертикальные стойки), исследовательского поведения (выглядывание через отверстия), груминга и анксиогенной дефекации [14].

Данные для экспериментальных точек в каждом независимом определении получали в 9-15-кратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики, применяя t-критерий Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Экспериментальная церебральная ишемия на 14-е сутки после операции вызывала сдвиги в поведенческой активности крыс. Это проявилось статистически достоверным снижением показателей локомоции, ориентировочной реакции и исследовательского поведения животных при тестировании в “открытом поле”. В то же время не обнаружено значительных различий в показателях анксиогенной дефекации и груминга (таблица). Данный тип поведенческих расстройств рассматривается как следствие локальных нарушений кровообращения в виде комбинации гипоксии, гипогликемии и ацидоза, сопровождающих ишемию мозга [1, 4].

## ДЕЙСТВИЕ ВИНПОЦЕТИНА И ТОКОФЕРОЛА ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

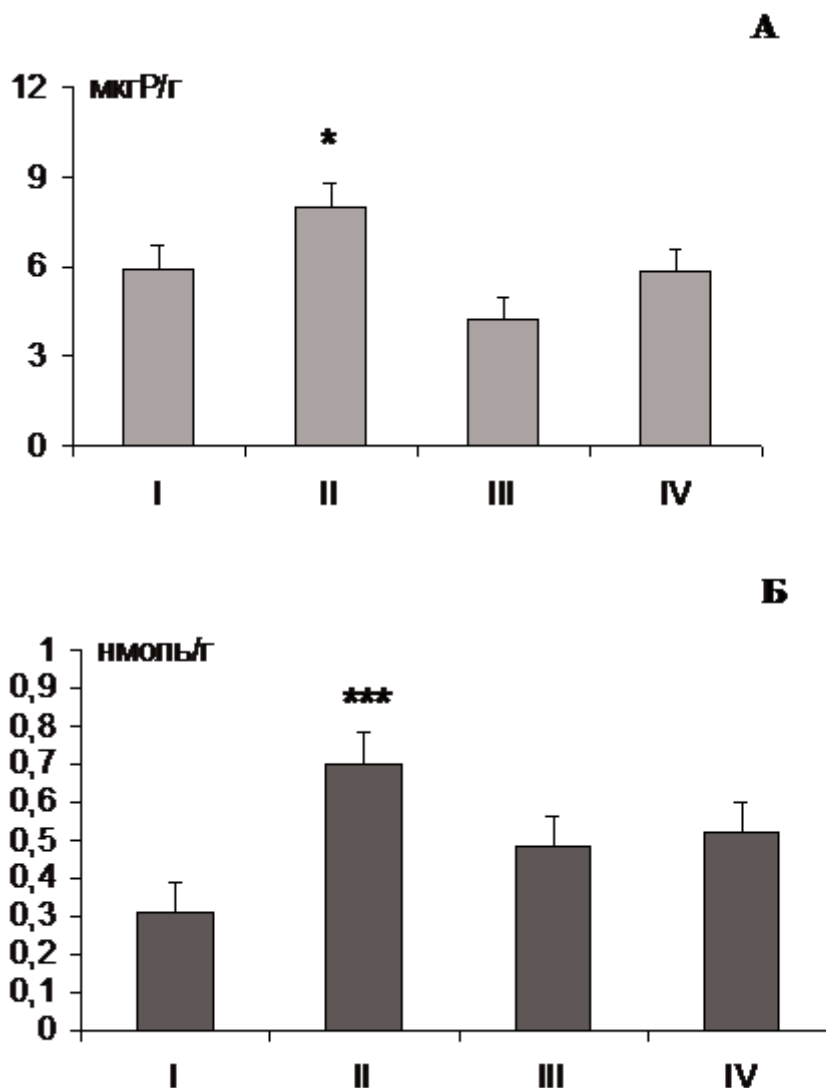
*Таблица. Влияние острой церебральной ишемии на поведение крыс в "открытом поле" и физическую работоспособность при 14-дневном введении винпоцетина и  $\alpha$ -токоферола.*

<b>Показатель</b>	<b>контроль n=15</b>	<b>ишемия n=9</b>	<b>+ винпоцетин n=12</b>	<b>+ <math>\alpha</math>-токоферол n=12</b>
<b>Локомоция (смена квадратов)</b>	63,6 $\pm$ 7,4	39,6 $\pm$ 6,9*	56,0 $\pm$ 5,0	58,0 $\pm$ 12,0
<b>Ориентировочная реакция (верти- кальные стойки)</b>	20,2 $\pm$ 4,0	11,5 $\pm$ 1,8*	9,5 $\pm$ 0,8**	4,5 $\pm$ 1,3***
<b>Исследовательское поведение (выглядывание через отверстия)</b>	10,0 $\pm$ 1,7	4,5 $\pm$ 0,9***	7,0 $\pm$ 1,4	4,2 $\pm$ 1,0***
<b>Груминг</b>	6,5 $\pm$ 1,8	6,1 $\pm$ 1,7	2,4 $\pm$ 3,4***	3,0 $\pm$ 1,0**
<b>Дефекация</b>	1,3 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,7	3,1 $\pm$ 1,3***	1,5 $\pm$ 0,9
<b>Физическая работоспособность (поднятие груза в г)</b>	307 $\pm$ 40	-	317 $\pm$ 33	262 $\pm$ 35*

Примечание: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,02$ ; \*\*\* -  $p < 0,01$  (по сравнению с контролем).

Введение винпоцетина оперированным крысам в течение 14-ти суток снизило выраженность поведенческих сдвигов в отношении таких показателей как локомоция и исследовательское поведение. Скорее всего, данный факт отражал корригирующее действие фармакологических доз винпоцетина в отношении стресс-индуцированных механизмов. При этом отмечено достоверное уменьшение груминга и нарастание анксиогенной дефекации по сравнению как с контрольной (интактной), так и с группой оперированных животных, не подвергавшейся лечению. Выраженность поведенческих сдвигов в группе оперированных крыс с введением  $\alpha$ -токоферола носила достоверный характер и значительно уступало в интенсивности практически всех показателей поведения по сравнению с контрольной группой.

При ишемическом повреждении головного мозга в плазматических мембранах происходило существенное повышение уровня конечных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов и накопление лизоформ фосфолипидов (рис. 1А,Б). Вероятно, что окислительный стресс приводит к активации мембранной фосфолипазы  $A_2$ , превращающей обычный фосфолипид в его лизоформу. В результате, содержание lyso-PL в бислое мембран повышается. Подобный механизм описан в литературе [5, 6, 15]. При этом, возможно, активация фосфолипазы  $A_2$  является своеобразным ответом клетки на усиление ПОЛ, поскольку фосфолипазы подавляют этот процесс путем высвобождения непредельных жирных кислот [6, 16].



**Рисунок 1.**

Содержание лизоформ фосфолипидов (lyso-PL) в плазматических мембранах и диеновых конъюгатов (ДК) в ткани мозга крыс при острой церебральной ишемии при лечении винпоцетином и  $\alpha$ -токоферолом.

Обозначения: А - содержание lyso-PL; по оси ординат - микрограмм фосфолипидного фосфора на грамм ткани мозга крыс (мкгР/г ткани); Б - содержание ДК; по оси ординат - нмоль на грамм липидов мозга; по оси абсцисс (А и Б части)- группы животных: I - контроль; II -острая церебральная ишемия; III - применение винпоцетина при церебральной ишемии (14 суток); IV - применение  $\alpha$ -токоферола при церебральной ишемии (14 суток); \* -  $p<0,05$ ; \*\*\* -  $p<0,01$ ;  $n=9$ .

ИК-спектральный анализ плазматических мембран мозга крыс через 14 суток после операции выявил достоверное усиление интенсивности трансмиссии на частоте  $1655\text{ см}^{-1}$  на  $18,7\pm 4,1\%$  ( $p<0,05$ ) (рис. 2). Отмечено также некоторое усиление интенсивности трансмиссии в полосе  $2836\text{--}2856\text{ см}^{-1}$  на  $13,5\pm 2,9\%$ , что является косвенным (интегральным) показателем снижения относительной микровязкости мембран.

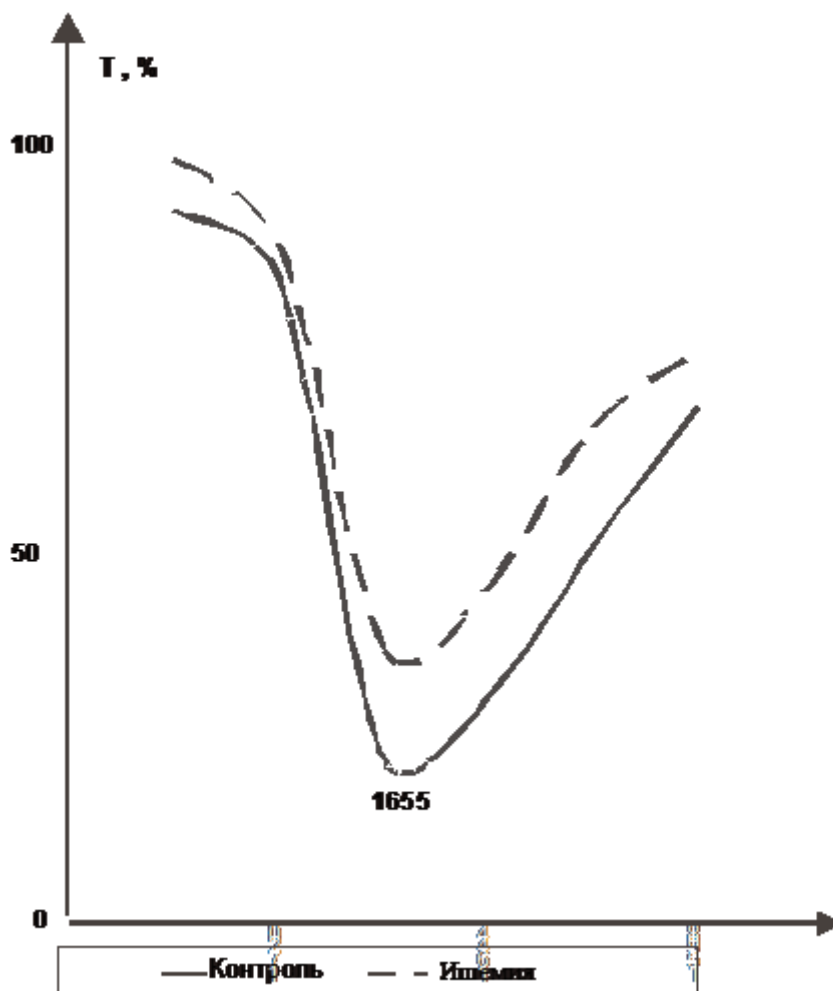


Рисунок 2.

Интенсивность трансмиссии на частоте  $1655\text{ см}^{-1}$  плазматических мембран мозга крыс при 14-суточной острой церебральной ишемии.

Обозначения: по оси ординат - интенсивность трансмиссии в %; по оси абсцисс - частота  $1655\text{ см}^{-1}$  (интегральный признак появления в бислое участков с измененной упорядоченностью - кластеров [12]).

Указанные структурные перестройки бислоя, а именно, кластеризацию и снижение микровязкости, в первую очередь можно связать с детергентным эффектом накопления lyso-PL и влиянием активации ПОЛ. Эти события способны опосредовать цереброповреждающие эффекты ишемии [5, 9]. Справедливость данного утверждения подтверждается отрицательной корреляцией между уровнем lyso-PL в мозге крыс с церебральной ишемией и показателями локомоции ( $r=-0,60$ ;  $p<0,05$ ), ориентировочной реакции ( $r=-0,68$ ;  $p<0,05$ ) и исследовательского поведения ( $r=-0,74$ ;  $p<0,02$ ) во время тестирования в “открытом поле”.

На мембранном уровне инъекции винпоцетина нивелировали повышение уровня lyso-PL в плазматических мембранах мозга крыс с  $10,6\pm 2,1$  мкг Р/г ткани до  $6,6\pm 2,3$  мкг Р/г. Снижение накопления lyso-PL при острой церебральной ишемии под влиянием винпоцетина было статистически достоверным ( $p<0,05$ ).

Этот эффект винпоцетина может быть следствием прямого или опосредованного ингибирования активности фосфолипазы  $A_2$ , по-видимому, оказавшейся одной из молекулярных мишеней препарата. Помимо этого, выяснилось, что препарат обладал значительной способностью блокировать накопление конечных продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов. В то же время  $\alpha$ -токоферол, ингибируя накопление конечных продуктов ПОЛ, не оказывал существенного влияния на динамику уровня lyso-PL в плазматических мембранах при церебральной ишемии.

Спектральные характеристики плазматических мембран мозга крыс с церебральной ишемией после фармакологической коррекции винпоцетином указывали на изменение структуры бислоя. Отмечены изменения в интенсивности трансмиссии частоты  $1655\text{ см}^{-1}$  (уровень кластеризации бислоя). Здесь уровень различий в интенсивности трансмиссии по сравнению с контролем имел тенденцию к восстановлению исходных значений – различия с контролем составляли уже  $15,1 \pm 2,9\%$ . Для полосы  $2836\text{--}2856\text{ см}^{-1}$ , характеризующей относительную микровязкость бислоя различия с контролем составили  $11,8 \pm 1,7\%$ . При введении  $\alpha$ -токоферола отмечены аналогичные процессы в сдвигах спектральных характеристик ( $16,4 \pm 4,0\%$  и  $12,2 \pm 2,6\%$  соответственно по частотам  $1655\text{ см}^{-1}$  и  $2836\text{--}2856\text{ см}^{-1}$ ), не достигшие однако, уровня статистической значимости. Следует отметить, что ИК-спектральный анализ мембран проводили на 14-е сутки после курса терапии, что не исключает вероятность более полной стабилизации бислоя в поздние сроки.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Патофизиологическая модель, использованная в настоящей работе, выявила, что острая церебральная ишемия сопровождается усилением ПОЛ, которое, по-видимому, приводит к повышению активности фосфолипазы  $A_2$  и соответственно - накоплению lyso-PL в плазматических мембранах мозга. Эти события отразились на структуре мембран в виде кластеризации и снижения микровязкости. Функциональным проявлением указанных молекулярных модификаций стали сдвиги в показателях поведения и физической работоспособности. Приведенные данные позволяют сделать заключение о том, что уровень lyso-PL может служить своеобразным универсальным инициатором интенсивности структурных изменений биологических мембран, по которому можно судить о степени риска предпатологических состояний.

Обнаруженная способность винпоцетина нивелировать повышение уровня lyso-PL в мембранах, в существенной мере определяет механизм защитного эффекта данного биорегулятора, поскольку значительный детергентный потенциал лизоформ фосфолипидов, наряду с активацией ПОЛ, может служить причиной нарушения молекулярной структуры мембран и даже гибели клеток при повреждающих воздействиях.

Таким образом, мембранопротективное действие винпоцетина связано с его lyso-PL-ограничивающим эффектом. Применение данного препарата в качестве средства коррекции при острой церебральной ишемии у крыс способствует улучшению функциональных показателей поведения в “открытом поле” и повышению физической работоспособности животных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Хорват Ш. (2004) Неврологический журн., **9**(4), 41-47.
2. Bagoly E., Feher G., Szapary L. (2007) Hungarian Medical J., **1**(4), 1-9.
3. Мищенко И.В. (2003) Архив клинич. и экспериментал. мед., **12**(2), 162-164.
4. Cherubini A., Polidori M.C., Pezzuto S., Cecchetti R. (2000) Stroke, **10**, 2296-2300.
5. Карагезян К.Г., Сеноян Э.С., Караган А.Т., Погосян Г.Г. (1998) Биохимия, **63**, 1439-1447

## ДЕЙСТВИЕ ВИНПОЦЕТИНА И ТОКОФЕРОЛА ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

6. Кармалита Е.Г., Серебров В.Ю., Новицкий С.В., Новицкая Т.В., Вавилкин Д.А. (2004) Бюлл. экспер. биол. мед., **134** (9), 291-294.
7. Sutphen R., Xu Y., Wilbanks J.D. (2004) Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, **13**(8), 1185-1191.
8. Verheij M., Ruiter G.A., Zerp S.F. (2000) Clinic Canc. res., **111**(6), 1078-1082.
9. Амелин А.В., Карнов О.И. (2004) Качественная клинич. практика, №2, 67-71.
10. Финдлей Дж., Званз У. (1990) Биологические мембраны, методы (пер. с англ.), Мир, М.
11. Медди Э. (1979) Биохимическое исследование мембран, Мир, М.
12. Рыскулова С.Т. (1986) Радиационная биология плазматических мембран, Энергоатомиздат, М.
13. Hidetoshi S., Douglas B., Yukihiro O., Lamba O.P. (1996) Exper. eye res., **62**, 47-53.
14. Волчегорский И.А., Цейликман В.Э., Смирнов Д.С., Шип С.А., Борисенков А.В. (2003) Пробл. эндокринолог., **49**(5), 48-51.
15. Вишневский А.А., Яковлев В.М., Хабибуллова З.И., Мукамбетова Б. (2002) Физиол. человека, **28** (6), 40-44.
16. Балаболкин М.И., Креминская В.М., Клебанова Е.М. (2005) Пробл. эндокринолог., **51**(3), 22-31.

Поступила: 22. 04. 2008.

## MEMBRANE AND FUNCTIONAL EFFECTS OF VINPOCETINE AND TOCOPHEROL IN RATS WITH EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA

*A.A. Vishnevskii, I.G. Korotkevich, G.A. Zhanayeva, Ch.O. Zhaparaliev*

Institute of Mountain Physiology, National Academy of Kyrgyzstan, Gorky str., 1/5, Bishkek, 720048  
Kyrgyzstan; tel.: (0312) 44-97-27; e-mail: polonis@bk.ru

The membrane, antioxidant and functional effects of vinpocetine and  $\alpha$ -tocopherol have been investigated under conditions of acute experimental cerebral ischemia in rats. Vinpocetine administration decreased accumulation of lysophospholipids in brain plasma membranes. Vinpocetine also blocked accumulation of conjugated dienes (CD).  $\alpha$ -Tocopherol inhibited augmentation in CD content and did not reduce the level of lysophospholipids in brain plasma membranes. Functional consequences of membrane impairments were also detected in some behavioral tests and physical capabilities. Administration of both vinpocetine and  $\alpha$ -tocopherol decreased manifestations of the altered parameters induced by cerebral ischemia and vinpocetine was more effective than  $\alpha$ -tocopherol.

**Key words:** vinpocetine, cerebral ischemia, lysophospholipids, oxidative state, rat's behaviour.