УДК 616.8-005:615.03:577.334:577.15
©Коллектив авторов

# ОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ МЕЛАКСЕНА НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

***Т.Н. Попова, О.А. Сафонова, А.О. Столярова****

Воронежский государственный университет,
394006, Воронеж, Университетская пл., 1, эл. почта: stolyarova-anna@yandex.ru

В условиях введения мелаксена на фоне развития ишемии/ реперфузии головного мозга выявлено снижение уровня лактата – маркера развития ишемического состояния, параметров биохемилюминесценции, отражающих интенсивность свободнорадикальных процессов и общую антиоксидантную активность, содержания продуктов пероксидного окисления липидов, активности супероксиддисмутазы и каталазы, у крыс относительно значений при патологии. При этом наблюдалось также изменение активности аконитатгидратазы – чувствительной мишени действия свободных радикалов - и содержания цитрата в головном мозге и сыворотке крови животных в направлении контроля. По-видимому, действие исследуемого препарата сопряжено с реализацией антиоксидантных и протекторных свойств мелатонина, входящего в его состав, при постишемической реперфузии, сопровождающейся развитием окислительного стресса.

**Ключевые слова:** мелаксен, ишемия/реперфузия головного мозга, свободнорадикальное окисление, антиоксиданты, аконитатгидратаза, цитрат

**DOI** 10.18097/PBMC20166205561

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в развитии и течении патологий, вызванных нарушением мозгового кровообращения, особое значение имеет усиление процессов свободнорадикального окисления (СО) биомолекул, прежде всего, по причине высокой чувствительности головного мозга к повреждающему действию активных форм кислорода (АФК) [1]. В этих условиях важную адаптивную роль может играть активация антиоксидантной системы (АОС) организма, значительное место в которой отведено супероксиддисмутазе (СОД) и каталазе, поскольку именно эти ферменты нейтрализуют первичные АФК – $O_2^{\bullet-}$ и $H_2O_2$, способные участвовать в реакциях образования других, более реакционноспособных радикалов и реактивных молекул.

В качестве одной из наиболее чувствительных мишеней действия АФК в условиях окислительного стресса может выступать аконитатгидратаза (аконитаза, КФ 4.2.1.3; АГ), активность которой подавляется супероксидным анион-радикалом и другими свободными радикалами [2, 3]. В зависимости от величины и продолжительности окислительного стресса АГ может подвергаться обратимому ингибированию вследствие окисления остатков цистеина, а в дальнейшем необратимой инактивации через разборку $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ кластера, карбонилирование и АТР-зависимую деградацию. В связи с этим предполагается, что активность аконитазы может служить важным показателем для оценки уровня окислительного стресса [4]. Накапливающийся при ингибировании АГ субстрат фермента – цитрат, способен проявлять антиоксидантные свойства за счёт хелатирования прооксидантных ионов металлов переменной валентности, что, в частности, может способствовать ограничению образования гидроксильного радикала в реакции Фентона и защите АГ от инактивации [5].

В связи с распространённостью, тяжестью и серьёзными последствиями острых нарушений мозгового кровообращения к актуальным задачам биомедицины относят поиск новых способов их терапии, а также диагностики и контроля эффективности применения лекарственных средств. Поскольку применение препаратов с антиоксидантным действием обосновано при развитии ряда свободнорадикальных патологий, интерес представляет оценка протекторного действия мелаксена на фоне развития ишемического повреждения головного мозга. Данный препарат, действующим веществом которого является аналог гормона мелатонина, относится к группе адаптогенов и снотворных средств. В то же время имеются сведения, что мелатонин способен инактивировать свободные радикалы и стимулировать активность АОС организма [6]. При этом чрезвычайно важное значение может иметь амфифильность мелатонина и его способность проникать во все органы и ткани, в том числе преодолевать гематоэнцефалический барьер [6].

Целью данной работы явилось исследование влияния мелаксена на содержание лактата – маркера развития патологии, в головном мозге, параметры биохемилюминесценции (БХЛ), характеризующие интенсивность процессов СО биомолекул и общую антиоксидантную активность, уровень диеновых конъюгатов (ДК) – первичных продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ), активность СОД и каталазы, а также активность АГ и концентрацию цитрата в мозге и сыворотке крови крыс на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга (ИРГМ).

* - адресат для переписки

## МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 150-200 г. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). ИРГМ у животных опытных групп воспроизводили под наркозом путём 30-минутной окклюзии общих сонных артерий и последующего снятия окклюзоров [7]. Восстановление кровотока контролировали визуально. Спустя 3-е суток животных забивали. Кровь забирали из сердца, головной мозг извлекали из черепной коробки по стандартной методике. Экспериментальные животные были разделены на 3 группы. В качестве контроля (1-ая группа) использовали ложнооперированных животных. 2-ую группу составили крысы с ИРГМ. В 3-ей группе животным с постишемической реперфузией ежедневно в течение 3-х дней в утренние часы вводили внутрибрюшинно мелаксен (“Юнифарм”, США) в дозе 5 мг/кг веса в виде раствора в 0,5 мл 0,9 % NaCl.

Для получения гомогената головного мозга крысы навеску ткани растирали в трёхкратном объёме охлаждённой среды выделения (50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,8)), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол) и центрифугировали при 5000 *g* в течение 10 мин. Полученный гомогенат и сыворотку крови использовали для дальнейших исследований. Для определения содержания лактата использовали диагностический набор фирмы “Витал” (Россия). Уровень процессов СО и общую антиоксидантную активность оценивали методом БХЛ [8]. Определение содержания ДК проводили на спектрофотометре Hitachi U-1900 (“Hitachi”, Япония) при 233 нм [9]. Активность СОД определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в неэнзиматической системе феназинметасульфата и NADH при 540 нм. За единицу активности (Е) СОД принимали количество фермента, необходимого для 50%-ого ингибирования восстановления НСТ [10]. Активность каталазы определяли по образованию окрашенного комплекса с максимумом поглощения при 410 нм в результате взаимодействия $H_2O_2$ с молибдатом аммония [11]. Активность АГ определяли спектрофотометрически при 240 нм в среде, содержащей 50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,8), 4 мМ цитрат. За единицу активности (Е) каталазы и аконитазы принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоля субстрата в 1 мин при 25°С. Для определения содержания белка использовали метод Лоури. Активность ферментов выражали в виде удельной активности (Е/мг белка). Концентрацию цитрата определяли по методу Нательсона [12]. Эксперименты проводили как минимум в 2-х кратной аналитической и 8-кратной биологической повторностях. Результаты опытов сравнивали с контролем. Для статистической обработки использовали стандартные методы с применением t-критерия Стьюдента [13]. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p<0,05$.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, к ключевым звеньям повреждения и гибели клеток при развитии ишемических заболеваний относят нарушение метаболических процессов и интенсификацию СО [14, 15]. Так, одной из первых реакций ткани мозга на снижение мозгового кровотока является развитие лактат-ацидоза. Снижение содержания АТР в ишемизированной зоне приводит к активации анаэробного гликолиза и усилению образования лактата и ионов $H^+$, что обусловливает формирование метаболического ацидоза. Ранее нами было выявлено накопление лактата в головном мозге крыс с ИРГМ по сравнению с контролем (с 1,76±0,07 до 5,84±0,23 мкмоль/г сырой массы ткани) [16]. В данной работе в группе животных с патологией, которым вводили мелаксен, наблюдалось уменьшение этого параметра в 3,1 раза по сравнению со значениями в патологическом состоянии (до 1,87±0,16 мкмоль/г сырой массы ткани). Частичная компенсация постгипоксического метаболического ацидоза свидетельствует о наличии церебропротекторных и нейрометаболических свойств у мелаксена.

Также ранее нами было показано увеличение параметров БХЛ и содержания продуктов ПОЛ в тканях крыс с ИРГМ относительно контроля, что свидетельствует об усилении свободнорадикальных процессов [17, 18]. В группе животных с патологией головного мозга, которым вводили мелаксен, было отмечено изменение данных показателей в сторону нормы. Так, при его введении происходило уменьшение светосуммы БХЛ (S) в гомогенате мозга в 2,2 раза, сыворотке крови – в 1,7 раза относительно данных при ИРГМ. При этом интенсивность максимальной вспышки хемилюминесценции ($I_{max}$) снижалась в 1,6 и 1,5 раза соответственно (рис. 1). При введении животным на фоне постишемической реперфузии мелаксена содержание ДК снижалось в головном мозге в 1,7 раза, в сыворотке крови – в 1,5 раза по сравнению со значениями при патологии (рис. 2). Полученные результаты могут быть объяснены с точки зрения реализации антиоксидантных свойств аналога мелатонина. Согласно литературным данным, мелатонин способен участвовать в ингибировании свободнорадикальных процессов различными путями: напрямую, выступая в качестве ловушки свободных радикалов, стимулируя ферменты АОС, активируя синтез одного из важнейших антиоксидантов – глутатиона, снижая утечку электронов при работе электрон-транспортной цепи митохондрий, выступая синергистом при функционировании других антиоксидантов [19, 20]. В качестве активных ловушек свободных радикалов может выступать не только сам гормон, но и продукты его взаимодействия с АФК, что многократно повышает его эффективность как антиоксиданта [20, 21]. Например, в процессе формирования N′-ацетил-N2-формил-5-метоксикинурамина из мелатонина нейтрализуется до четырёх различных типов свободных радикалов [22].

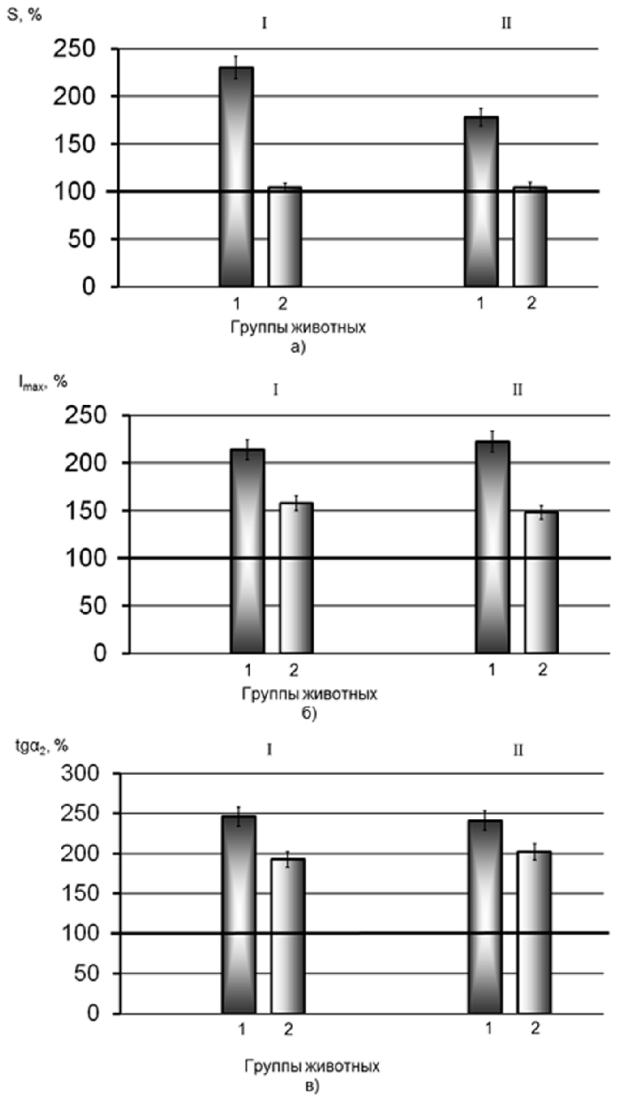


**Рисунок 1.** Параметры биохемилюминесценции: S (а), $I_{max}$ (б), $tg\alpha_2$ (в) в ткани головного мозга (I) и сыворотке крови (II) крыс экспериментальных групп: 1 - животные с ИРГМ, 2 - крысы с патологией, которым вводили мелаксен. За 100% принимали контрольные значения (для ткани головного мозга S=11,66±0,46 mV×c, $I_{max}$=1,72±0,07 mV, $tg\alpha_2$=1,93±0,08; для сыворотки крови S=33,11±1,32 mV×c, $I_{max}$=6,12±0,24 mV, $tg\alpha_2$=1,09±0,04).

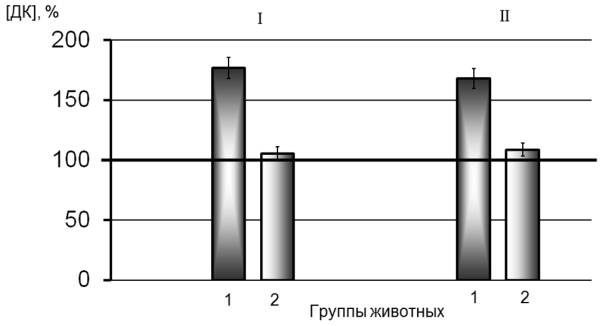


**Рисунок 2.** Содержание диеновых конъюгатов в головном мозге (I) и сыворотке крови (II) крыс экспериментальных групп: 1 - животные с ИРГМ, 2 - крысы с патологией, которым вводили мелаксен. За 100% принимали контрольные значения (для ткани головного мозга 7,89±0,32 мкмоль/л, для сыворотки крови 10,21±0,41 мкмоль/л).

В группе крыс с патологией, которым вводили мелаксен, наблюдалось также уменьшение тангенса угла падения кинетической кривой хемилюминесценции – $tg\alpha_2$, в мозге животных в 1,3 раза, в сыворотке крови – в 1,2 раза по сравнению со значениями при ИРГМ (рис. 1). Очевидно, снижение $tg\alpha_2$ было связано с уменьшением степени мобилизации АОС в условиях торможения свободнорадикальных процессов.

Данные, полученные при исследовании $tg\alpha_2$ хемилюминесценции, соотносятся с результатами определения активности таких ферментов-антиоксидантов, как СОД и каталаза. Активность СОД и каталазы, возрастающая при патологии [23], при введении мелаксена животным с постишемической реперфузией уменьшалась в мозге в 2,1 и 1,6 раза. У животных данной экспериментальной группы в сыворотке крови было отмечено снижение активности исследуемых ферментов в 1,9 и 1,3 раза соответственно относительно значений при ИРГМ (рис. 3, 4). По всей видимости, снижение активности СОД и каталазы при введении мелаксена на фоне развития патологии является следствием проявления его антиоксидантных свойств и тем самым снижения нагрузки на основные антиоксидантные звенья организма.

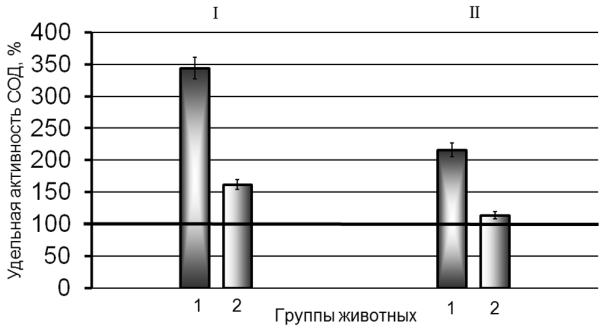


**Рисунок 3.** Активность супероксиддисмутазы в головном мозге (I) и сыворотке крови (II) крыс экспериментальных групп: 1 - животные с ИРГМ, 2 - крысы с патологией, которым вводили мелаксен. За 100% принимали контрольные значения (для ткани головного мозга 3,43±0,16 Е/мг белка; для сыворотки крови 0,633±0,029 Е/мг белка).

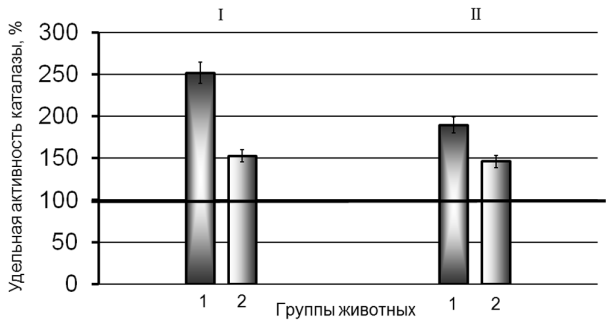


**Рисунок 4.** Активность каталазы в головном мозге (I) и сыворотке крови (II) крыс экспериментальных групп: 1 - животные с ИРГМ, 2 - крысы с патологией, которым вводили мелаксен. За 100% принимали контрольные значения (для ткани головного мозга 0,0187±0,0009 Е/мг белка; для сыворотки крови 0,0039±0,0002 Е/мг белка).

Ранее мы показали, что активность АГ в условиях постишемической реперфузии снижалась, вероятно, за счёт влияния свободных радикалов, концентрация которых возрастала в условиях ишемии/реперфузии [24]. Введение мелаксена животным с патологией сопровождалось увеличением удельной активности АГ в мозге и сыворотке крови в 1,4 и 4,8 раза (рис. 5). Содержание цитрата, возрастающее при постишемической реперфузии по сравнению с контролем [25], в этих условиях снижалось как в ткани мозга, так и в сыворотке крови в 2,0 раза по сравнению с патологией (рис. 6). По-видимому, вследствие проявления антиоксидантных свойств исследуемого препарата снижается степень окислительного повреждения молекул аконитазы, что и сказывается на её активности и содержании субстрата фермента.

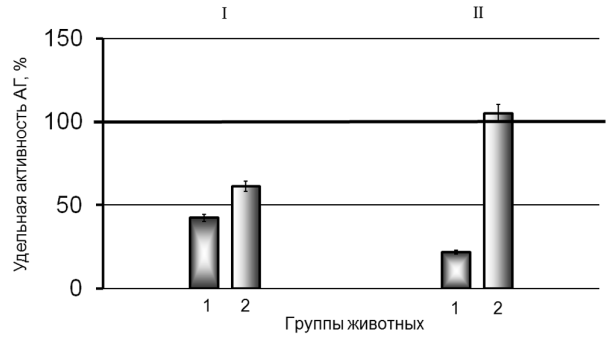


**Рисунок 5.** Активность аконитатгидратазы в головном мозге (I) и сыворотке крови (II) крыс экспериментальных групп: 1 - животные с ИРГМ, 2 - крысы с патологией, которым вводили мелаксен. За 100% принимали контрольные значения (для ткани головного мозга 0,368±0,017 Е/мг белка; для сыворотки крови 0,0600±0,0028 Е/мг белка).

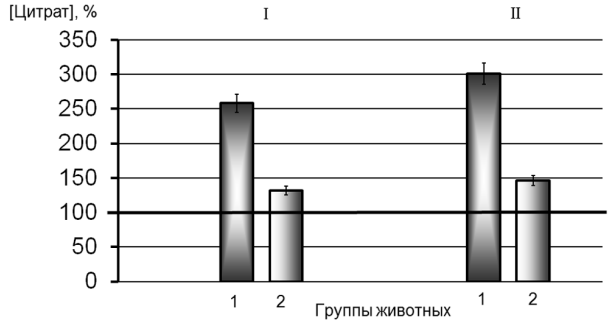


**Рисунок 6.** Содержание цитрата в головном мозге (I) и сыворотке крови (II) крыс экспериментальных групп: 1 - животные с ИРГМ, 2 - крысы с патологией, которым вводили мелаксен. За 100% принимали контрольные значения (для ткани головного мозга 0,290±0,013 ммоль/л; для сыворотки крови 0,435±0,019 ммоль/л).

Согласно полученным результатам, определение активности АГ, изменения которой в тканях животных экспериментальных групп могут быть соотнесены с изменениями параметров БХЛ и уровня ДК, можно использовать в качестве информативного показателя выраженности оксидативного стресса и состояния АОС организма, то есть может иметь важное диагностическое значение.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

При введении мелаксена животным с ИРГМ происходит изменение в сторону контроля исследуемых параметров: уровня лактата, показателей биохемилюминесценции, содержания продуктов ПОЛ, активности СОД, каталазы и АГ, концентрации цитрата. Это свидетельствует о способности мелаксена снижать степень метаболических повреждений и развития окислительного стресса при ИРГМ, вследствие чего данный препарат может представлять значительный интерес с точки зрения фармакологической коррекции изменений метаболизма при развитии патологий подобного рода.

*Работа поддержана финансированием по гранту РФФИ р_центр_а №13-04-97536.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Биленко М.В.* (1989) Ишемические и реперфузионные повреждения органов, Медицина, М., 368 с.
2. *Gardner P.R., Nguyen D.M., White C.W.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**(25), 12248-12252.
3. *Murakami K., Yoshino M.* (1997) Biochem. Mol. Biol. Int., **41**(3), 481-486.
4. *Maack C., Kartes T., Kilter H., Schäfers H.J., Nickenig G., Böhm M., Laufs U.* (2003) Circulation, **108**, 1567-1574.
5. *Матасова Л.В., Попова Т.Н.* (2008) Биохимия, **73**(9), 1189-1198.
6. *Беспятых А.Ю., Бурлакова О.В., Голиченков В.А.* (2010) Успехи современной биологии, **130**(5), 487-496.
7. *Бульон В.В., Хныченко Л.К., Коваленко А.Л., Алексеева Л.Е., Сапронов Н.С.* (2000) Бюлл. экспер. биол. мед., **129**(2), 149-151.
8. *Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николаенко И.А., Корнилец Г.В., Холодова Ю.Д.* (1997) Биохимия, **62**(6), 712-715.
9. *Стальная И.Д.* (1977) в: Современные методы в биохимии (под ред. В.Н. Ореховича), Медицина, М., с. 63-64.
10. *Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д.* (1991) Лаб. дело, №7, 16-19.
11. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токорева В.Е.* (1988) Лаб. дело, №1, 16-19.
12. *Афанасьев В.Г., Зайцев В.С., Вольфсон Т.И.* (1973) Лаб. дело, №4, 115-116.
13. *Ллойд Э., Ледерман У.* (1990) Справочник по прикладной статистике, Финансы и статистика, М., 525 с.
14. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* (2001) Ишемия головного мозга, Медицина, М., 328 с.
15. *Болдырев А.А.* (2001) Сорос. образовательный журнал, **7**(4), 21-28.
16. *Сафонова О.А., Попова Т.Н., Сливкин А.И., Данковцева А.С.* (2014) Экспер. клин. фармакология, **77** (1), 7-9.
17. *Панченко Л.Ф., Попова Т.Н., Сафонова О.А.,* Макеева *А.В.* (2009) Нейрохимия, №4, 328-332.
18. *Макеева А.В., Попова Т.Н., Сливкин А.И., Крыльский Д.В.* (2009) Биомед. химия, **55**, 643-650.
19. *Reiter R.J., Tan D.X., Osuna C., Gitto E.* (2000) J. Biomed. Sci., **7**, 444-458.
20. *Reiter R.J., Tan D.X., Terron M.P., Flores L.J., Czarnocki Z.* (2007) Acta Biochimica Polonica, **54** (1), 1-9.
21. *Tan D.X., Manchester L.C., Burkhardt S., Sainz R.M., Mayo J.C., Kohen R., Shohami E., Huo Y.X., Hardeland R., Reiter R.J.* (2001) FASEB J., **15**, 2294-2296.

22. *Sanchez-Barcelo E.J., Martinez-Campa C.M., Mediavilla M.D., Gonzalez A., Alonso-Gonzalez C., Cos S.* (2007) Recent patents on endocrine, metabolic and immune drug discovery, №1, 142-151.
23. *Сафонова О.А., Попова Т.Н., Вершкова Ю.В.* (2011) Вопр. биол., мед. фарм. химии, №8, 39-42.
24. *Сафонова О.А., Сливкин А.И., Попова Т.Н., Суслина С.Н., Сливкин Д.А.* (2011) Вопр. биол., мед. фарм. химии, №9, 44-49.
25. *Сафонова О.А., Попова Т.Н.,* Панченко *Л.Ф.* (2010) Вопр. биол., мед. фарм. химии, №8, 30-34.

Поступила: 17. 05. 2016.
Принята к печати: 19. 09. 2016.

## THE EFFECT OF MELAXEN ADMINISTRATION ON THE TISSUE OXIDATIVE STATUS IN RATS WITH BRAIN ISCHEMIA/REPERFUSION

***T.N. Popova, O.A. Safonova, A.O. Stolyarova***

Voronezh State University,
1 Universitetskaya sq., Voronezh, 394006 Russia; e-mail: stolyarova-anna@yandex.ru

Melaxen administration to rats with brain ischemia/reperfusion was accompanied by a decrease of the lactate level (an organ ischemia marker), biochemiluminescence parameters characterizing the intensity of free radical processes and total antioxidant activity, the content of lipid peroxidation products, activity of superoxide dismutase and catalase, as compared with the values determined in rats with induced brain ischemia/reperfusion. Activity of aconitate hydratase, a sensitive target of free radicals action, and the citrate level in the brain and blood serum of melaxen-treated animals changed towards control values of intact animals. It is assumed that the effect of melaxen is associated with implementation of the antioxidant and protective properties of melatonin, the melaxen constituent, under conditions of post-ischemic reperfusion injury, accompanied by oxidative stress development.

**Key words:** melaxen, brain ischemia/reperfusion, free radical oxidation, antioxidants, aconitate hydratase, citrate