

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2014

О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, А. И. Сливкин, А. С. Беленова, Ю. Талми

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ И ХИТОЗАНА НА АКТИВНОСТЬ АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ ЦИТРАТА В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

¹ ФГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Россия, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1; e-mail: solya333@mail.ru

При введении фармакологических средств на основе янтарной кислоты и хитозана в различных дозах крысам с ишемией/реперфузией головного мозга было отмечено снижение в ткани мозга уровня лактата — маркера развития ишемического состояния — по сравнению со значением при патологии. В этих условиях также выявлено возрастание активности аконитазы — чувствительной мишени действия свободных радикалов — и снижение уровня цитрата в головном мозге и сыворотке крови животных в сторону контрольных значений. Выявленные изменения носят дозозависимый характер. Полученные результаты свидетельствуют о способности данных соединений снижать степень метаболических повреждений и развитие окислительного стресса при постишемической реперфузии. Вследствие этого исследуемые средства могут представлять значительный интерес с точки зрения фармакологической коррекции изменений метаболизма при развитии патологий подобного рода. Более выраженный нейропротекторный и антиоксидантный эффект был обнаружен для сукцината хитозана (по сравнению с N-сукцинилхитозаном).

Ключевые слова: янтарная кислота; хитозан; ишемия/реперфузия головного мозга; аконитатгидратаза; цитрат.

Острые нарушения мозгового кровообращения относятся к одним из наиболее распространенных заболеваний зрелого, пожилого, а в последние десятилетия и молодого возраста, часто приводящих к инвалидизации и смертности населения. Известно, что среди патобиохимических и патофизиологических механизмов гибели нервной ткани при ишемии важное место принадлежит активации свободнорадикального окисления (СО) биомолекул [1]. Показателем ускорения данных процессов может служить активность аконитатгидратазы (АГ, аконитазы; код фермента 4.2.1.3), относящейся к числу чувствительных мишеней действия свободных радикалов, поскольку разрушение Fe-S-кластера данного фермента активными формами кислорода (АФК) приводит к его инактивации [2, 3]. Это может сопровождаться накоплением цитрата — субстрата АГ, способного оказывать антиоксидантный эффект за счет хелатирования ионов Fe^{2+} , участвующих в реакции Фентона, приводящей к образованию самой реакционноспособной АФК — гидроксильного радикала.

В терапии ишемических повреждений мозга важнейшую роль играет применение ноотропных и нейропротекторных препаратов, повышающих резистентность мозга к различным повреждающим воздействиям (в первую очередь к гипоксии), и антиоксидантных

средств. В связи с вышесказанным актуальной проблемой биомедицины является поиск и тестирование новых фармакологических средств, обладающих подобным действием. В этом плане интерес вызывают производные янтарной кислоты и хитозана. Один из универсальных внутриклеточных метаболитов — янтарная кислота (I) — обладает антигипоксическим действием вследствие способности интенсифицировать утилизацию кислорода тканями, восстановление НАД-зависимого клеточного дыхания, ресинтез АТФ клетками [4]. Также данное соединение проявляет антистрессорный и ноотропный эффекты, обусловленные его влиянием на транспорт медиаторных аминокислот и увеличение содержания в мозге гамма-аминомасляной кислоты путем активации шунта Робертса [5, 6]. При ряде патологических состояний описано антиоксидантное действие I, в частности, приводящее к увеличению концентрации восстановленного глутатиона, усилению устойчивости митохондрий к пероксидной дегградации [7, 8]. Хитозан — β -(1,4)-2-амино-2-дезоксид-Д-глюкан (II), деацетилованный аналог хитина, — также способен проявлять широкий спектр активности: антимутагенную и антиоксидантную, противолучевую, иммуномодулирующую, обеспечивающую способность к индукции в организме образования интерферона. Данное соединение может

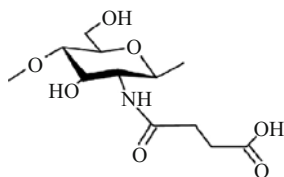


Рис. 1. Структурное звено N-сукцинилхитозана.

также оказывать положительное воздействие на обмен липидов, способствуя связыванию и выведению из организма жиров и холестерина [9].

В связи с вышесказанным, целью данной работы явилось исследование влияния производных I и II — сукцината хитозана (III) и N-сукцинилхитозана (IV) — на активность АГ и содержание цитрата в тканях крыс при ишемии/реперфузии головного мозга (ИРГМ).

Экспериментальная химическая часть

Сукцинат хитозана (III). Янтарную кислоту (“Реахим”, Россия) с т. пл. 185 °С, 4,8 г (40 ммоль) и 100 мл дистиллированной воды помещают в коническую колбу емкостью 250 мл, растворяют при 50 – 60 °С. Добавляют 2,8 г хитозана (синтезированного на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВПО “Воронежский государственный университет”) с молекулярной массой 600 – 650 кДа, с ДА > 0,9 в подготовленный раствор I. Соотношение реагентов I:II составляет 1:0,4 моль. Образовавшуюся суспензию термостатируют в колбе с обратным воздушным холодильником при температуре 80 – 90 °С до полной гомогенизации реакционной массы в течение 60 – 90 мин. Полученный раствор сушат при температуре 50 °С. Содержание примесей в продукте составляет не более 1,2 % (IV — 0,7 %, II — 0,3 %, I — 0,2 %; по результатам проведения тонкослойной хроматографии).

N-сукцинилхитозан (IV) (см. рис. 1). 1,6 г ангидрида янтарной кислоты (16 ммоль) (“Реахим”, Россия) с т. пл. 119,6 °С помещают в плоскодонную колбу вместимостью 200 мл и растворяют в 60 мл дистиллированной воды при ручном перемешивании (70 – 80 °С). 1,3 г гранулометрически подготовленного II (8 ммоль) с молекулярной массой 600 – 650 кДа вводят в раствор янтарного ангидрида. Образовавшуюся суспензию перемешивают в колбе с обратным воздушным холодильником при 80 – 90 °С. Полученный продукт IV сушат при температуре 50 °С, содержание примесей в нем не превышает 3 % (III — 1,5 %, II — 0,7 %, I — 0,5 %, ангидрида янтарной кислоты — 0,3 %; по результатам проведения тонкослойной хроматографии).

Для полученных соединений III и IV были зарегистрированы ИК-спектры, параметры которых существенно не отличаются от данных, описанных для сукцината хитозана и для N-сукцинилхитозана в работах [10, 11].

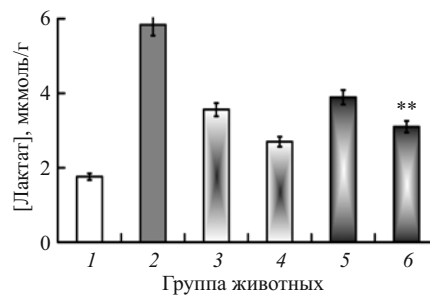


Рис. 2. Содержание лактата в головном мозге крыс: в контроле (1); при ИРГМ (2); при введении сукцината хитозана в дозах 6 мг/кг (3) и 12 мг/кг (4); при введении N-сукцинилхитозана в дозах 6 мг/кг (5) и 12 мг/кг (6) животным на фоне развития патологии. ** — достоверно по сравнению с 4-й группой.

Экспериментальная биологическая часть

В экспериментах использовали 51 самца белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 150 – 200 г. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженным в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). ИРГМ у животных опытных групп воспроизводили под кетаминным наркозом путем 30-минутной окклюзии общих сонных артерий и последующего снятия окклюдоров. Восстановление кровотока контролировали визуально по изменению цвета и пульсации артерий [12]. Спустя 3 сут животных забивали. Кровь забирали из сердца, головной мозг извлекали из черепной коробки по стандартной методике.

Экспериментальные животные были разделены на 6 групп: 1-я группа (контроль; $n = 8$) — ложнооперированные животные; 2-я группа ($n = 8$) — крысы с ИРГМ; 3-я группа ($n = 9$) — животные с ИРГМ, которым вводили внутривентриально сукцинат низкомолекулярного хитозана (соль, молекулярная масса 5 кДа) в дозе 6 мг/кг массы в виде раствора в 0,5 мл 0,9 % NaCl дважды в день в течение 3 сут; 4-я группа ($n = 9$) — крысы с ИРГМ, которым вводили III в дозе 12 мг/кг массы по той же схеме; 5-я группа ($n = 8$) — животные с ИРГМ, которым вводили IV (молекулярная масса 10 кДа) в дозе 6 мг/кг по той же схеме; 6-я группа ($n = 9$) — крысы с ИРГМ, которым вводили IV в дозе 12 мг/кг. Выбор доз осуществляли, основываясь на результатах собственных экспериментов и рекомендациях по применению в клинике препаратов, содержащих янтарную кислоту.

Гомогенат головного мозга крысы получали путем растирания навески ткани в 3-кратном объеме охлажденной среды выделения (50 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,8, содержащий 1 мМ ЭДТА, 1 % β-меркаптоэтанол) и центрифугирования при 5000 g в течение 10 мин при 0...+ 4 °С. Полученный гомогенат и сыворотку крови использовали для дальнейших исследований. Для определения содержания лактата — маркера развития ишемии — использовали диагностический набор фир-

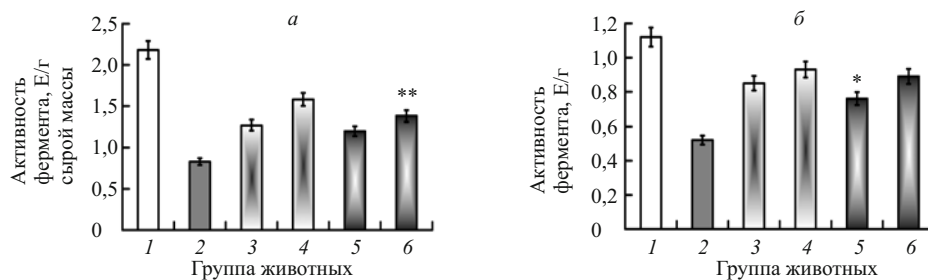


Рис. 3. Активность аконитазы в головном мозге (а) и сыворотке крови (б) крыс: в контроле (1); при ИРГМ (2); при введении сукцината хитозана в дозах 6 мг/кг (3) и 12 мг/кг (4); при введении N-сукцинилхитозана в дозах 6 мг/кг (5) и 12 мг/кг (6) животным на фоне развития патологии. * — достоверно по сравнению с 3-й группой, ** — достоверно по сравнению с 4-й группой.

мы “Витал”; принцип метода заключается в образовании из лактата окрашенного комплекса с λ_{\max} 505 нм под действием лактатоксидазы и пероксидазы. Активность АГ определяли спектрофотометрически при 240 нм в среде, содержащей 50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,8), 4 мМ цитрат. За единицу активности (Е) аконитазы принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25 °С. Концентрацию цитрата определяли по методу Нательсона [13]. Аналитические определения для каждой пробы проводили в 2-кратной повторности. Результаты опытов сравнивали с контролем. Для статистической обработки использовали стандартные методы с применением *t*-критерия Стьюдента [14]. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Среди ключевых звеньев патогенеза ишемического повреждения головного мозга необходимо назвать нарушения энергетического обмена и интенсификацию СО биомолекул [1, 12]. Ранее нами было показано, что при окклюзии обеих общих сонных артерий с последующей реперфузией в головном мозге крыс значительно увеличивается содержание лактата (рис. 2), то есть интенсифицируется анаэробный гликолиз вследствие нарушения оксигенации ткани [15]. Введение III в дозах 6 и 12 мг/кг животным с ИРГМ приводило к снижению уровня данного метаболита в 1,6 и 2,2 раза, IV в тех же дозах — в 1,5 и 1,9 раза соответственно по сравнению с животными с патологией (рис. 2). Частичная компенсация постгипоксического метаболиче-

ского ацидоза свидетельствует о наличии нейрометаболических свойств у тестируемых соединений.

Было выявлено значительное снижение активности АГ в тканях животных с патологией относительно контроля, что может являться результатом действия свободных радикалов, концентрация которых возрастает в условиях ишемии/реперфузии [16]. В то же время введение крысам с ИРГМ фармакологических средств на основе янтарной кислоты и хитозана приводит к повышению активности этого фермента. Так, активность аконитазы, выраженная в виде Е/г сырой массы головного мозга, возрастала при введении сукцината хитозана в дозах 6 и 12 мг/кг в 1,5 и 1,9 раза, в виде Е/мл сыворотки крови — в 1,6 и 1,8 раза относительно значений при патологии (рис. 3). В условиях действия N-сукцинилхитозана на фоне развития ИРГМ было отмечено повышение активности фермента в мозге в 1,4 и 1,7 раза, в сыворотке крови — в 1,5 и 1,7 раза соответственно. По-видимому, вследствие проявления антиоксидантных свойств компонентов тестируемых средств снижается степень свободнорадикального повреждения молекул фермента, что и сказывается на его активности. Это может быть подтверждено представленными ранее данными по снижению в условиях введения III и IV крысам с ишемией/реперфузией головного мозга параметров биофлюоресценции, отражающих интенсивность свободнорадикальных процессов, и содержания продуктов перексидного окисления липидов — диеновых конъюгатов в тканях животных относительно значений при патологии [15].

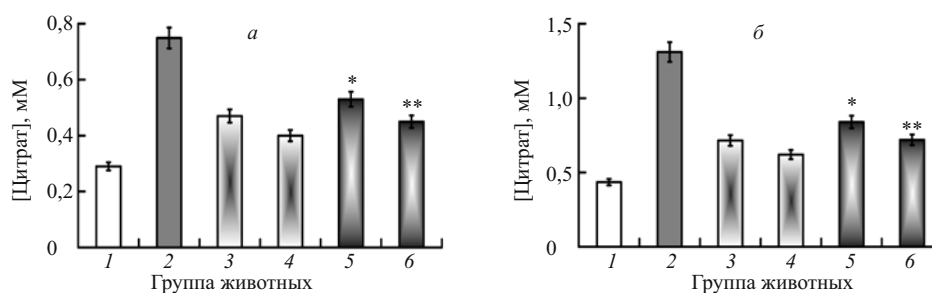


Рис. 4. Содержание цитрата в головном мозге (а) и сыворотке крови (б) крыс: в контроле (1); при ИРГМ (2); при введении сукцината хитозана в дозах 6 мг/кг (3) и 12 мг/кг (4); при введении N-сукцинилхитозана в дозах 6 мг/кг (5) и 12 мг/кг (6) животным на фоне развития патологии. * — достоверно по сравнению с 3-й группой, ** — достоверно по сравнению с 4-й группой.

Наряду со снижением активности АГ при патологии было показано повышение содержания низкомолекулярного антиоксиданта цитрата — субстрата данного фермента, по-видимому, вследствие нарушения его утилизации аконитазой [17]. При введении III в дозах 6 и 12 мг/кг на фоне развития ИРГМ происходит уменьшение уровня цитрата в мозге в 1,6 и 1,9 раза, в сыворотке крови крыс — в 1,8 и 2,1 раза. В группах животных, которым вводили IV в тех же дозах, было отмечено снижение уровня этого метаболита в головном мозге в 1,4 и 1,7 раза, в сыворотке крови — в 1,6 и 1,8 раза относительно патологии (рис. 4). Вероятно, на изменении данного параметра в сторону контроля сказывается торможение процессов СО под действием компонентов тестируемых средств.

Таким образом, при введении производных I и II животным с ИРГМ происходит изменение в сторону контроля исследуемых параметров. Выявленные изменения носят дозозависимый характер. При сравнении действия производных сукцината и хитозана в большинстве случаев был обнаружен более выраженный нейрометаболический и антиоксидантный эффект III, по-видимому, вследствие более высокой скорости образования свободных ионогенных функциональных групп, а также меньшей молекулярной массы. Полученные результаты свидетельствуют о способности тестируемых соединений снижать степень метаболических повреждений и развития окислительного стресса при ИРГМ, вследствие чего они могут представлять значительный интерес с точки зрения фармакологической коррекции изменений метаболизма при развитии патологий подобного рода.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Болдырев, *Сорос. образов. журн.*, 7(4), 21 – 28 (2001).
2. P. R. Gardner, D. M. Nguyen, and C. W. White, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 91(25), 12248 – 12252 (1994).
3. K. Murakami and M. Yoshino, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 41(3), 481 – 486 (1997).
4. А. В. Коваленко, Н. В. Белякова, *Фармация*, № 5 – 6, 40 – 43 (2000).
5. М. Н. Кондрашова, *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, № 1, 7 – 12 (2002).
6. М. Н. Кондрашова (ред.), *Терапевтическое действие янтарной кислоты*, Институт биофизики АН СССР, Пущино (1976), сс. 122 – 234.
7. Ю. Ю. Ивницкий, А. И. Головкин, Г. А. Софронов, *Янтарная кислота в системе средств метаболической коррекции функционального состояния и резистентности организма*, Лань, Санкт-Петербург (1998), сс. 10 – 80.
8. С. А. Румянцева, *Вестн интенс. тер.*, № 3, 23 – 26 (2005).
9. A. Steinbeuchel and R. H. Marchessault (eds.), *Biopolymers For Medical And Pharmaceutical Applications*, Vol. 1: *Humic Substances, Polyisoprenoids, Polyesters, And Polysaccharides*, Wiley-VCH, Weinheim (2005), pp. 542 – 568.
10. K. Noerati, C. L. Radiman, S. Achmad, et al., *Proceeding of The International Seminar on Chemistry*, 703 – 708 (2008).
11. G. Q. Ying, H. Yang, Y. Yi, et al., *African J. Biotechnol.*, 8(17), 4260 – 4264 (2009).
12. В. В. Бульон, Л. С. Хныченко, Н. С. Сапронов и др., *Бюл. экпер. биол. и мед.*, 129(2), 149 – 151 (2000).
13. В. Г. Афанасьев, В. С. Зайцев, Т. И. Вольфсон, *Лаб. дело*, № 4, 115 – 116 (1973).
14. Э. Ллойд, У. Ледерман, Ю. Н. Тюрин (ред.), *Справочник по прикладной статистике*, Т. 1, Финансы и статистика, Москва (1989), сс. 141 – 197.
15. О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, А. И. Сливкин и др., *Эксперим. и клин. фармакология*, 77(1), 7 – 9 (2014).
16. О. А. Сафонова, А. И. Сливкин, Т. Н. Попова и др., *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, № 9, 44 – 49 (2011).
17. О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, Л. Ф. Панченко, *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, № 8, 30 – 34 (2010).

Поступила 20.06.14

EFFECT OF SUCCINIC ACID AND CHITOSAN DERIVATIVES ON ACONITATE HYDRATASE ACTIVITY AND CITRATE CONTENT IN RAT BRAIN TISSUES UNDER ISCHEMIA/REPERFUSION CONDITIONS

O. A. Safonova*, T. N. Popova, A. I. Slivkin, A. S. Belenova, and U. Talmi

Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia

* e-mail: solya333@mail.ru

The introduction of drugs based on succinic acid and chitosan at various doses to rats with brain ischemia/reperfusion leads to a decrease in the level of lactate (a marker of ischemic state) in brain tissue as compared to the value in pathology. Under these conditions, an increase in the activity of aconitase (a sensitive target of free radical action) and a decrease in citrate level in the brain and blood serum of animals toward control values have also been revealed. The observed changes were dose-dependent. The obtained results show that these drugs are capable of reducing the degree of metabolic damage and oxidative stress development during post-ischemic reperfusion. Therefore, the investigated substances may be of considerable interest in terms of pharmacological correction of metabolic changes during the development of such pathologies. Chitosan succinate exhibited more pronounced antioxidant and neuroprotective effects in comparison to N-succinylchitosan.

Keywords: succinic acid; chitosan; brain ischemia/reperfusion; aconitase hydratase; citrate