

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОНА НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

И. В. Силкина, Т. А. Зенина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян¹

В опытах на крысах изучено влияние афобазона на накопление продуктов свободнорадикального окисления и активность антиоксидантного фермента каталазы в коре и стриатуме в условиях ишемического повреждения мозга. Показано, что после введения афобазона в условиях ишемии в коре наблюдается тенденция к снижению концентрации продуктов индуцированного окисления. В стриатуме у крыс, перенесших ишемию, снижается интенсивность свободнорадикального окисления по сравнению с контролем. Афобазол вызывает частичное восстановление этого показателя. В коре в условиях ишемии афобазол увеличивает активность каталазы. В стриатуме при ишемии наблюдается снижение активности каталазы. В этих условиях введение препарата не влияет на активность фермента. Таким образом, афобазол способствует повышению устойчивости мембранных структур коры и стриатума к свободнорадикальным процессам. На фоне введения препарата наблюдается увеличение активности каталазы в коре большого мозга в условиях глобальной преходящей ишемии.

Ключевые слова: афобазол, глобальная преходящая ишемия, продукты свободнорадикального окисления, каталаза

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее важных звеньев в развитии ишемического поражения ткани мозга является окислительный стресс. Как известно, головной мозг является высокочувствительным к свободнорадикальному окислению органом вследствие того, что его мембранные структуры богаты полиненасыщенными жирными кислотами. Они являются прямой мишенью для свободнорадикального повреждения. В то же время в мозге в сравнении с другими органами и тканями активность антиоксидантной системы ниже. В норме антиоксидантная система уравновешивает действие прооксидантной. В условиях ишемического повреждения равновесие смещается в сторону увеличения функции последней: происходит накопление окисленных липидов (гидропероксиды жирных кислот, малоновый диальдегид и другие) и белков, содержащих S-S-связи, карбонилы и другие модифицированные группы, а также фрагментов окисленных нуклеотидов, что в конечном итоге приводит к гибели клетки. В литературе имеются сведения о различной чувствительности структур мозга к ишемическому повреждению. Наиболее чувствительными являются стриатум и гиппокамп. В этих структурах, в отличие от коры мозга, обнаружено значительное снижение активности антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы) на различных моделях ишемии [6 – 10].

Ранее была обнаружена способность производных 2-меркаптобензимидазола, в частности, нового селективного анксиолитика афобазона снижать мутагенные эффекты химических прооксидантов за счет нормализации процессов свободнорадикального окисления и связанного с ним возникновения эндогенных мутагенов [2, 4]. Установлено, что афобазол обладает выраженной нейропротекторной активностью, о чем свидетельствуют опыты с использованием моделей локальной и глобальной ишемии мозга [1, 5]. На культуре нейронов гиппокампа также получены данные о защитном эффекте афобазона в условиях оксидативного стресса, вызванного перекисью водорода, и глутаматной токсичности [15].

Целью исследования явилось изучение влияния афобазона на резистентность мембранных структур нейронов к индуцированному окислению и активность фермента антиоксидантной защиты — каталазы — в коре и стриатуме в условиях ишемического повреждения мозга.

Методы исследования

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на 54 белых беспородных крысах массой 250 – 300 г. Глобальную преходящую ишемию у крыс вызывали окклюзией обеих общих сонных артерий в течение 10 – 15 мин с одновременным снижением уровня артериального давления до

¹ ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

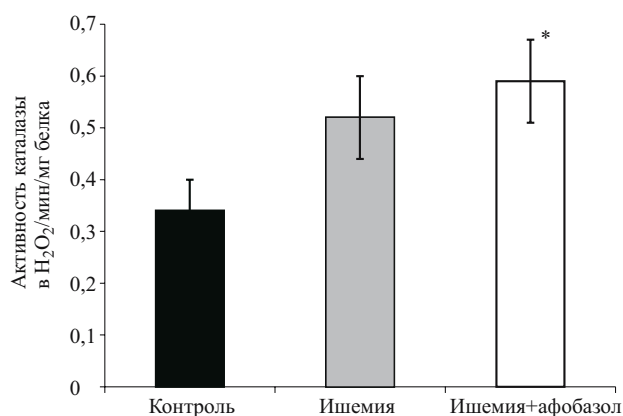


Рис. 1. Активность каталазы в коре большого мозга у ложнооперированных животных, в условиях ишемии и после введения афобазола (5 мг/кг внутривенно),

* — $p < 0,05$.

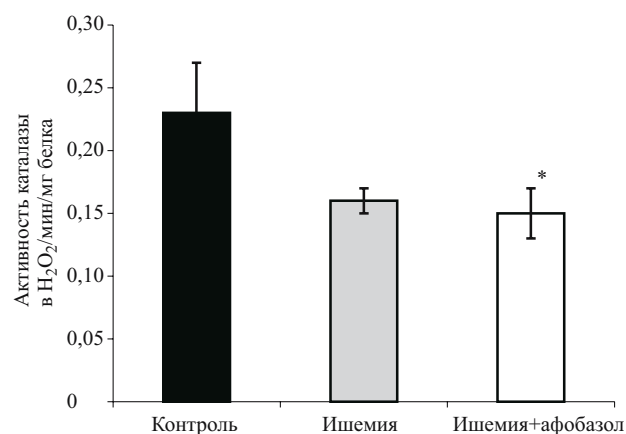


Рис. 2. Активность каталазы в стриатуме у ложнооперированных животных, в условиях ишемии и после введения афобазола (5 мг/кг внутривенно),

* — $p < 0,05$.

40 – 50 мм рт. ст. методом кровопускания. У животных под общей анестезией (хлоралгидрат, 400 мг/кг внутривенно) выделяли кору большого мозга и стриатум. Выделенные ткани замораживали и хранили в жидком азоте. Замороженные образцы измельчали в гомогенизаторе тefлон-стекло в пяти объемах буфера, содержащего 20 мМ Tris HCl, 100 мМ NaCl (pH 7,4 при 4 °C). Гомогенаты фильтровали через 6 слоев марли.

Резистентность различных отделов головного мозга к свободнорадикальному окислению определяли *in vitro*, индуцируя окисление добавлением в гомогенаты мозга аскорбиновой кислоты (0,2 мМ), и проводили инкубацию при 37 °C в течение 60 мин с постоянным перемешиванием в среде, содержащей 20 мМ Tris HCl, 100 мМ NaCl (pH 7,4 при 37 °C). Отбор проб проводили сразу после добавления 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК) и через 30 и 60 мин инкубации. Реакцию проводили, добавляя к 1,5 мл ТБК-реагента [0,4 % ТБК, 0,54 % SDS, 10 % уксусная кислота (pH 3,5)] 0,2 мл инкубационной смеси и 0,3 мл воды. Для развития окраски пробы выдерживали в термостате при 98 °C в течение 1 ч. Концентрацию продуктов окисления, индуцированного активными формами кислорода, оценивали по реакции их с 2-тиобарбитуровой кислотой спектрофотометрическим способом [14] в модификации [11]. Концентрацию ТБК-активных продуктов определяли по спектру поглощения при

длине волны 532 нм и выражали в единицах оптической плотности на мг белка.

Активность каталазы определяли спектрофотометрически при длине волны 240 нм, регистрируя скорость уменьшения концентрации добавленной перекиси водорода (H₂O₂) при 37 °C [13]. Реакция начиналась после добавления к гомогенату мозга, находящемуся в буфере [20 мМ Tris HCl, 100 мМ NaCl (pH 7,4 при 37 °C)] 2 мМ перекиси водорода. Активность каталазы выражали в мкмоль H₂O₂, разлагаемой в минуту на 1 мг белка, используя коэффициент молярной экстинкции для перекиси водорода, равный 39,4 M⁻¹ см⁻¹.

Количественное определение белка в гомогенате проводили по методу О. Н. Lowry [12].

Для оценки накопления продуктов свободнорадикального окисления и активности каталазы животных разделили на 3 группы: 1 — контроль — “ложнооперированные” крысы; 2 — крысы, перенесшие глобальную преходящую ишемию; 3 — животные, которым через 30 мин после ишемии вводили афобазол.

Афобазол (5 мг/кг) вводили внутривенно. Данные обрабатывали статистически с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии было изучено влияние афобазола на накопление продуктов индуцированного свободнора-

Таблица 1. Динамика накопления продуктов свободнорадикального окисления (через 30 и 60 мин после индукции окисления *in vitro*) в единицах оптической плотности на 1 мг белка

Ткань головного мозга	Время	Контроль	Ишемия	Ишемия + афобазол
Кора	30 мин	1,45 ± 0,28 (n = 10)	2,52 ± 0,37* (n = 9)	2,21 ± 0,33 (n = 7)
	60 мин	3,16 ± 0,30 (n = 8)	4,29 ± 0,30* (n = 7)	3,81 ± 0,39 (n = 7)
Стриатум	30 мин	1,2 ± 0,30 (n = 7)	0,88 ± 0,09 (n = 6)	1,02 ± 0,10 (n = 5)
	60 мин	2,49 ± 0,5 (n = 7)	1,92 ± 0,28 (n = 6)	2,18 ± 0,24 (n = 5)

* — $p < 0,05$.

дикального окисления в коре большого мозга и стриатуме крыс, перенесших глобальную преходящую ишемию. Этот параметр характеризует чувствительность мембранных структур мозга к оксидативному стрессу в условиях ишемии.

У крыс, перенесших ишемию головного мозга, в коре наблюдалось статистически значимое по сравнению с контрольными животными увеличение концентрации продуктов окисления через 30 и 60 мин после его индукции *in vitro* (табл. 1). У животных, которым через 30 мин после ишемии вводили афобазол, наблюдалась тенденция к снижению скорости накопления продуктов свободнорадикального окисления. Полученные данные свидетельствуют о том, что ишемия повышает чувствительность ткани коры большого мозга к свободнорадикальным процессам, что соответствует данным, имеющимся в литературе [3, 9]. Афобазол, введенный после ишемии, снижает ее повреждающее действие.

В стриатуме ситуация отличается от коры. После индукции наблюдалось снижение интенсивности свободнорадикального окисления в 1,3 раза у животных, перенесших ишемию, по сравнению с контролем (табл. 1). Этот факт свидетельствует о выраженном повреждении мембранных структур этого отдела мозга и согласуется с литературными данными [6–10]. У крыс, которым был введен афобазол, этот параметр был также ниже контрольного уровня, однако, наблюдалась тенденция к его восстановлению.

В следующей серии опытов исследовали влияние афобазола (5 мг/кг, внутривенно) на активность каталазы в коре и стриатуме в условиях глобальной преходящей ишемии. Опыты показали, что в коре на фоне увеличения интенсивности свободнорадикальных процессов наблюдается увеличение активности каталазы на 53 % по сравнению с контролем. Полученные результаты согласуются с данными литературы [3, 10]. После введения афобазола активность фермента увеличивается на 20 % по сравнению с ишемией (табл. 2, рис. 1).

В стриатуме обнаружено снижение активности каталазы у крыс после ишемии, что соответствует данным [6–10] о значительном повреждении данной структуры головного мозга, которое не компенсируется введением афобазола в полной мере (табл. 2, рис. 2).

Результаты наших экспериментов показывают, что афобазол способствует увеличению устойчивости мембранных структур нейронов коры и стриатума к свободнорадикальным процессам. Введение афобазола животным после ишемии приводит к увеличению активности фермента антиоксидантной защиты — каталазы в коре. Известно, что каталаза проявляет максимальную лабильность при острых патологических воздействиях [3], к которым следует отнести и глобальную преходящую ишемию головного мозга. Увели-

Таблица 2. Активность каталазы в мкмоль H_2O_2 /мин/мг белка

Ткань головного мозга	Контроль	Ишемия	Ишемия + афобазол
Кора	0,34 ± 0,06 (n = 10)	0,52 ± 0,08 (n = 9)	0,59 ± 0,08* (n = 9)
Стриатум	0,23 ± 0,04 (n = 7)	0,16 ± 0,01 (n = 6)	0,15 ± 0,02 (n = 5)

* Разница по сравнению с контролем — $p < 0,05$.

чение активности данного фермента вызывает снижение интенсивности свободнорадикального окисления, что является еще одним из механизмов защитного эффекта афобазола при ишемическом повреждении мозга. В стриатуме после введения афобазола наблюдается тенденция к восстановлению до контрольного уровня резистентности мембранных структур к свободнорадикальному окислению без увеличения активности каталазы. Этот факт может свидетельствовать о прямом защитном эффекте препарата на мембраны нейронов головного мозга, когда образуемые после индуцированного окисления активные формы кислорода нейтрализуются при введении афобазола.

ВЫВОДЫ

1. Афобазол способствует повышению устойчивости мембранных структур нейронов коры большого мозга и стриатума к свободнорадикальным процессам, вызванным глобальной преходящей ишемией головного мозга.
2. Препарат увеличивает активность фермента антиоксидантной защиты каталазы в нейронах коры в условиях ишемии головного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Г. Баласаян, *Тезисы докладов 2-го съезда Российского научного общества фармакологов*, **1**, 57 (2003).
2. А. К. Жанатаев, А. Д. Дурнев, А. В. Кулакова, *Тезисы докладов 3-ей Межд. конф. "Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам"*, 15–18 мая, Суздаль (2001), с. 57.
3. Т. Г. Сазонтова, *Автореф. дис. докт. биол. наук*, Москва (1998).
4. С. Б. Середенин, А. Д. Дурнев, *Фармакологическая защита генома*, Москва (1992).
5. И. В. Силкина, В. В. Александрин, Т. С. Ганьшина, и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **67**(5), 9–13 (2004).
6. S. Barc, S. S. Ingrand, B. Fauconneau, et al., *Life Sci*, **74**(25), 3103–3113 (2004).
7. P. Calabresi, E. Saulle, D. Centonze, et al., *Brain*, **125**(4), 844–860 (2002).
8. C. Costa, G. Leone, E. Saulle, et al., *Stroke*, **35**(2), 596–600 (2004).
9. M. Gupta and P. K. Singal, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **67**(12), 1549–1559 (1989).
10. H. M. Homi, J. S. Freitas, R. Curi, et al., *Neuroscience Letters*, **333**, 37–40 (2002).
11. K. Kikugawa, M. Beppu, A. Mizukami, and K. Ando., *J. Biol. Chem.*, **267**, 14691–14696 (1992).

12. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 – 275 (1951).
13. D. J. Luck, *J. Cell Biol.*, **16**, 483 – 499 (1963).
14. H. Okhawa, N. Ohishi, and K. Yagi., *Anal Biochem*, **95**(2), 351 – 358 (1979).
15. T. A. Zenina, I. V. Gawrish, D. S. Melkumyan, and T. S. Seredenina, *Abstracts 8th European College of Neuropsychopharmacol*, 246 (2005).

Поступила 05.10.05

EFFECT OF AFOBAZOLE ON THE ACCUMULATION OF FREE RADICAL OXIDATION PRODUCTS AND THE CATALASE ACTIVITY IN RATS WITH CEREBRAL ISCHEMIA

I. V. Silkina, T. A. Zenina, S. B. Seredenin, and R. S. Mirzoyan

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

The influence of afobazole on the accumulation of free radical oxidation products (reactive oxygen species, ROS) and on the activity of antioxidative enzyme catalase was studied in striatum and cortex of rats under cerebral ischemia damage conditions. Afobazole showed a tendency to decrease the extent of ROS accumulation in the cortex. In striatum, the intensity of ROS accumulation in rats after ischemia was reliably lower as compared to that in control rats, but afobazole produced a partial recovery of this parameter. Afobazole induced an increase in the catalase activity in the cortex of rats with ischemia. In contrast, afobazole did not change the activity of this enzyme in striatum (where it was also decreased by ischemia). Thus, afobazole increased the resistance of neuron membrane structures to free radical oxidation in cortex and striatum and stimulated the catalase activity in the cortex in rats with global reversible cerebral ischemia.