ВЛИЯНИЕ ЦИННАРИЗИНА НА МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ СИСТЕМУ ОКИСЛЕНИЯ МОЗГА, АНТИОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КРОВИ И ПОВЕДЕНИЕ КРЫС ПРИ ГИПОКСИИ

Л. И. Белостоцкая, Л. А. Чайка, О. Н. Гомон[1]

Исследовано влияние циннаризина на функциональное состояние митохондрий мозга, антиокислительную активность крови и поведенческую реактивность крыс в условиях гипоксической гипоксии. Установлено, что 4-дневное лечение циннаризином (50 мг/кг, внутрижелудочно, 2 раза в день) предотвращает вызванное гипоксией развитие отека мозга, восстанавливает показатели окисления NAD^+- зависимых субстратов, существенно повышает интенсивность фосфорилирующего окисления FAD^+-зависимого субстрата сукцината, не влияет на высокий уровень антиокислительной активности крови, нормализует эмоционально- исследовательскую активность и вызывает гиперлокомоцию животных.

Ключевые слова: циннаризин, гомогенат мозга, окислительное фосфорилирование, антиокислительная активность крови, поведение

ВВЕДЕНИЕ

В терапии больных с сосудистыми заболеваниями головного мозга в настоящее время используются различные лекарственные средства, среди которых одним из наиболее широко применяемых является циннаризин, обладающий комплексом фармакологических свойств, которые обусловливают выраженный церебропротекторный эффект. Однако конкретные механизмы воздействия циннаризина на митохондрии мозга, в том числе и при его ишемизации, в настоящее время недостаточно ясны.

В связи с этим задачей настоящей работы явилось исследование влияния циннаризина на функциональное состояние митохондрий мозга, а также на антиокислительную активность сыворотки [1] у крыс при гипоксии. Одновременно исследованы и особенности поведения животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 32 крысах-самцах массой 180 – 220 г, содержащихся в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986 г.).

Животных подвергали гипоксической гипоксии в гермокамере объемом 1670 $см^3$ [4]. В предварительных исследованиях установлено время наступления агональных явлений — 55 – 65 мин. Каждую крысу помещали в гермокамеру 4-кратно в режиме нарастающих гипоксических нагрузок: 1-й день — на 35 мин, 2-й — на 45 мин, 3-й и 4-й — на 55 мин.

У всех животных определяли исходный уровень поведенческих реакций в тесте “открытое поле” в течение 3 мин, по результатам чего в экспериментальные группы отбирали крыс с примерно одинаковым типом поведения. Повторное тестирование (для оценки влияния гипоксии и циннаризина) проводили через 16 – 18 ч после третьего сеанса гипоксии.

Циннаризин (стугерон, “Gedeon Richter”) вводили в дозе 50 мг/кг внутрь 2 раза в день в течение 4 дней — за час до сеанса гипоксии и сразу после нее. Контролем служили группа интактных крыс (без гипоксии) и группа нелеченных животных с гипоксией, которым вводили дистиллированную воду.

Через час после последнего введения циннаризина крыс декапитировали и получали гомогенат головного мозга на среде гомогенизации (СГ; 0,3 М сахароза, 1 мМ трилон Б, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4) в соотношении мозг: СГ — 2:3. Состояние митохондриальной системы окисления в гомогенате оценивали по скорости потребления кислорода [3] на полярографе Radelkis (Венгрия) с платиновым электродом Кларка при 37 °С в реакционной среде, содержащей 150 мМ сахарозу, 75 мМ KCl, 10 мМ KH_2P0_4, 2 мМ $MgCl_2$, 1,5 мМ ЭГТА, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4. Регистрировали скорость потребления кислорода при окислении экзогенных субстратов сукцината (5 мМ) и глутамата + малата (по 5 мМ); ADP добавляли в концентрации 200 мкМ. Рассчитывали скорость дыхания при окислении субстратов в метаболических состояниях 3 и 4 по Чансу (V_3 и V_4), а также дыхательный контроль (ДК; V_3/V_4).

Содержание белка в гомогенатах мозга измеряли по методу [7]. Общую антиокислительную активность сыворотки оценивали по методу [2]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4-кратное гипоксическое воздействие, не изменяя массу тела, вызывает достоверное увеличение массы и массового коэффициента мозга на 12 и 19 % соответ-

[1] Государственный научный центр лекарственных средств, Украина, Харьков, 61085, ул. Астрономическая, 33.

© 2003 Коллектив авторов

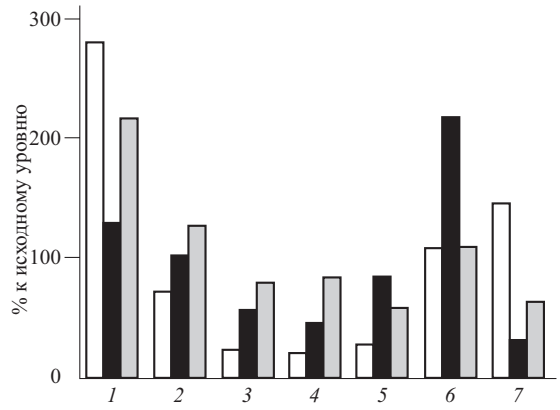
ственно, что свидетельствует о развитии его отека (см. табл. 1). При этом у животных нелеченной группы изменяются параметры функционального состояния митохондрий. Так, установлено снижение как нефосфорилирующего (неактивное состояние; V_4), так и фосфорилирующего (активное состояние; V_3) окисления FAD^+-зависимого субстрата сукцината на 34 и 39 % соответственно (см. табл. 2). Изменение скоростей потребления кислорода при окислении NAD^+-зависимых субстратов глутамата + малата имеет такую же количественную выраженность — V_4 уменьшается на 28%, V_3 – на 35% (табл. 2). Полученные данные о практически одинаковой степени снижения V_4 и V_3 при окислении FAD^+- и NAD^+-зависимых субстратов при гипоксии могут являться отражением не только существенного нарушения активности соответствующих дегидрогеназ, но и повреждения митохондриальных мембран.

Лечение циннаризином препятствует развитию отека мозга (см. табл. 1). При этом V_4 при окислении глутамата + малата и сукцината полностью восстанавливается (см. табл. 2), что свидетельствует о нормализации целостности внутренней мембраны митохондрий. Подтверждением этому является и повышение ДК при окислении сукцината до уровня интактных животных. V_3 при окислении NAD^+– зависимых субстратов достигает исходного уровня, а при окислении сукцината – превышает его на 25 % (см. табл. 2).

В сыворотке крыс с гипоксией повышается общая антиокислительная активность в 1,85 раза (“интактные” — 25,14 ± 6,69 %; “ гипоксия” — 46,61 ± 5,41 %; $p < 0,05$), которая при лечении циннаризином сохраняется на высоком уровне (45,05 ± 4,42 %; $p < 0,05$ относительно группы интактных крыс).

При исследовании поведенческой активности у крыс интактной группы при повторном тестировании отмечено изменение реакций относительно исходного уровня: увеличено время выхода из первого квадрата на 179 % и снижено число заходов в центральную зону на 79 %, число пересеченных центральных квадратов — на 81 %, число стоек — на 75 % (рисунок). В то же время спонтанная локомоторная активность, число умываний и дефекаций существенно не изменяются. Полученные результаты о снижении ориентировочно-исследовательской активности с сохранением уровня эмоционально-двигательной свидетельствуют о формировании у животных этой группы “пространственной карты” и о том, что данная обстановка для них уже “знакомая”.

У животных группы “гипоксия” при повторном тестировании после трехкратных сеансов гипоксии ряд показателей поведенческой активности либо практически не отличается от исходного уровня (время выхода из первого квадрата, общая локомоторная активность, число стоек), либо их изменения выражены в меньшей степени, чем в группе “интактных крыс” (число заходов в центральную зону, число пересеченных центральный квадратов) (см. рисунок). В то же время в этой группе существенно увеличивается число умываний (на 115 %) и снижается количество дефекаций (на 71 %). Таким образом, при гипоксии наблюдается изменение эмоционального состояния и нарушение процесса формирования “пространственной карты” (поведение крыс аналогично поведению в новой незнакомой обстановке). Полученные результаты о развитии дефицита привыкания при гипоксии согласуются с данными других исследователей [5, 13].



Влияние циннаризина (50 мг/кг внутрь, 2 раза в день, в течение 3-х дней) на показатели поведенческой активности крыс при гипоксии. Результаты представлены в % к исходному уровню для каждого показателя.

Светлые столбики — интактные крысы; темные — гипоксия; серые — циннаризин. *1* — время выхода из первого квадрата, с; *2* — общая локомоторная активность, число пересеченных квадратов; *3* — число заходов в центральную зону; *4* — число пересеченных центральных квадратов; *5* — число стоек; *6* —число умываний; *7* — дефекации, количество болюсов.

Циннаризин приводит к изменениям компонентов поведенческой активности, характеризующих в основном эмоциональное и исследовательское состояние животных, полностью (число умываний) или частично (время выхода из первого квадрата, число стоек и дефекаций) аналогичным изменениям в группе “интактных крыс” (см. рисунок). Однако повышенный уровень локомоторной активности (по числу общих и центральных пересеченных квадратов и числу заходов в центральную зону) свидетельствует о развитии у них гиперлокомоции.

Таблица 1. **Влияние циннаризина (50 мг/кг внутрь, 2 раза в день, в течение 4-х дней) на массу тела, массу мозга и массовый коэффициент мозга крыс при гипоксической гипоксии**

Группа	Масса тела, г	Масса мозга, г	Массовый коэффициент мозга, г/г, $\cdot 10^{-3}$
Интактные (9)	198 ± 7,40	1,165 ± 0,041	5,689 ± 0,176
Гипоксия (7)	197 ± 9,55	1,305 ± 0,042*	6,795 ± 0,444*
Циннаризин (16)	198 ± 5,23	1,198 ± 0,019	6,163 ± 0,174

Примечание. * — различия достоверны при сравнении с группой интактные, $p < 0,05$. В скобках — число животных в группах.

Таблица 2. **Влияние циннаризина (50 мг/кг внутрь, 2 раза в день, в течение 4-х дней) на скорость потребления кислорода и дыхательный контроль гомогенатов мозга крыс при гипоксической гипоксиии**

Группа	V_4	V_3	ДК
	натом О/мг белка/мин		
	Субстрат окисления — сукцинат		
Интактные (9)	23,67 ± 2,87	49,17 ± 4,09	2,22 ± 0,11
Гипоксия (7)	15,75 ± 1,02*	29,85 ± 4,36*	1,96 ± 0,16
Циннаризин (13)	24,56 ± 1,39**	61,24 ± 1,60*,**	2,73 ± 0,20
	Субстрат окисления — глутамат + малат		
Интактные (9)	15,33 ± 2,07	41,87 ± 5,56	3,04 ± 0,23
Гипоксия (7)	11,03 ± 1,55	27,41 ± 1,23	3,15 ± 0,22
Циннаризин (13)	15,83 ± 1,29	40,92 ± 3,06	3,02 ± 0,17

Примечание. Различия достоверны при сравнении: * — $p < 0,05$ с группой интактные; ** — $p < 0,05$ с группой гипоксия. В скобках — число животных в группах.

Таким образом, при гипоксической гипоксии развивается отек мозга, существенно нарушается функционирование митохондриальной системы окисления (что приводит к снижению уровня АТР), повреждаются когнитивные функции мозга и изменяется эмоциональный статус животных. Выявленное повышение уровня антиокислительной активности сыворотки, вероятно, является компенсаторной реакцией и свидетельствует об активации антиокислительной защитной системы организма.

Циннаризин предотвращает развитие отека головного мозга, нормализует показатели митохондриального окисления NAD^+-зависимых субстратов, повышает скорость синтеза АТР при окислении FAD^+-зависимого субстрата сукцината, поддерживает на высоком уровне антиокислительную активность крови, полностью или частично восстанавливает показатели поведенческой активности, но вызывает гиперлокомоцию животных.

Митохондрии играют одну из ключевых ролей в развитии обширных апоптических изменений клеток мозга при гипоксии [6, 9 – 11], которые выявляются вокруг зоны некроза с некоторой временной задержкой [1]. Выявленная в настоящей работе активация фосфорилирущего окисления сукцината циннаризином в условиях гипоксии может способствовать восполнению запасов АТР в условиях некроза и апоптоза части клеток. Вместе с тем, длительное перенапряжение митохондриальной системы окисления под влиянием циннаризина может приводить к неблагоприятным последствиям. В частности, в настоящее время имеются сведения о том, что продолжительный прием препарата вызывает серьезные побочные эффекты вплоть до ухудшения или даже инициирования болезни Паркинсона у пожилых [8, 12]. Учитывая, что в патогенезе этой болезни участвует митохондриальная дисфункция [12], возможно, что причиной наблюдаемых осложнений является перенапряжение функционирования митохондрий. Подтверждением может служить и гиперлокомоция у животных, получавших циннаризин.

Известно, что при гипоксии происходит интенсификация перекисного окисления липидов и повышение активности антиокислительных защитных систем крови, поскольку мозг характеризуется низким уровнем антиоксидантной защиты и основные протекторные факторы находятся в крови [1]. Учитывая церебропротекторный эффект циннаризина, логично предположить, что препарат должен повышать уровень антиокислительной активности. Однако при данной модели патологии такого эффекта не выявлено, что, вероятно, объясняется максимально возможным повышением активности антиокислительных защитных систем крови, на фоне которого действие препарата не проявляется.

ВЫВОДЫ

1. 4-кратная гипоксическая гипоксия приводит к развитию отека мозга, снижению функционального состояния митохондрий мозга, повышению уровня антиокислительной активности крови, повреждению когнитивной функции и изменению эмоционального статуса крыс.

2. Циннаризин (50 мг/кг, внутрь, 2 раза в день) препятствует развитию отека мозга, нормализует митохондриальное окисление NAD^+-зависимых субстратов глутамата + малата, полностью или частично восстанавливает показатели эмоционально-исследовательского статуса животных.

3. Циннаризин вызывает активацию фосфорилирующего окисления FAD^+-зависимого субстрата сукцината, что может приводить к перенапряжению митохондрий и явиться причиной повышенной локомоторной активности животных.

4. Циннаризин не оказывает воздействия на компенсаторное повышение уровня антиокислительной активности крови, вероятно, из-за ее максимальной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. А. Зозуля, В. А. Барабой, Д. А. Сутковой, *Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга*, Знание-М, Москва (2000).
2. Г. И. Клебанов, И. В. Бабенкова, Ю. О. Теселкин и др., *Лаб. дело*, № 5, 59 – 62 (1988).
3. *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом*, Г. М. Франк (ред.), Наука, Москва (1973).
4. Р. Р. Сайфутдинов, В. А. Хазанов, *Экспер. и клин. фармакол.*, **61**(5), 27 – 29 (1998).
5. A. M. Babcock, D. A. Baker, and R. Lovec, *Brain Res.*, **625**(2), 351 – 354 (1993).
6. F. Galeffi, S. Sinnar, and R. D. Schwartz-Bloom, *J. Neurochem.*, **75**(3), 1242 – 1249 (2000).
7. G. I. Miller, *Anal. Chem.*, **91**(5), 964 – 966 (1959).
8. J. L. Montastruc, M. E. Llau, O. Rascol, and J. M. Senard, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **8**(4), 293 – 306 (1994).
9. F. J. Northington, D. M. Ferriero, and L. J. Martin, *Dev. Neurosci.*, **23**(3), 186 – 191 (2001).
10. M. Puka-Sundvall, B. Gajkowska, M. Cholewinski, et al., *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **125**(1 – 2), 31 – 41 (2000).
11. M. Puka-Sundvall, C. Wallin, E. Gilland, et al., *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **125**(1 – 2), 43 – 50 (2000).
12. K. Veitch and L. Hue, *Mol. Pharmacol.*, **45**(1), 158 – 163 (1994).
13. D. Wang and D. Corbett, *Brain Res.*, **533**(1), 78 – 82 (1990).

Поступила 25.09.02

THE EFFECT OF CINNARIZINE ON THE ACTIVITY OF CEREBRAL MITOCHONDRIAL OXIDATION SYSTEM AND BLOOD ANTIOXIDANT SYSTEM AND ON THE BEHAVIOR OF RATS UNDER HYPOXIA CONDITIONS

L. I. Belostotskaya, L. A. Chaika, and O. N. Gomon

National Scientific Center for Drugs, Astronomicheskaya ul. 33, 61085 Kharkov, Ukraine

The effect of cinnarizine on the functional state of brain mitochondria, the activity of blood antioxidant system, and the behavior of rats was studied under model hypoxic hypoxia conditions. A four-day treatment with cinnarizine (50 mg/kg, twice per day via a gastric tube) prevents the hypoxic brain edema development, restores NAD^+ dependent oxidation of a succinate substrate, normalizes emotional-exploratory activity, and causes hyperlocomotion of the experimental animals, while not influencing a high level of activity of the blood antioxidant system.