

© Коллектив авторов, 2013
УДК 615.03:577.164.2

К МЕХАНИЗМУ АНТИГИПОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

В.Е. Новиков,¹ Е.О. Маркова,¹ Э.А. Парфенов²

ГБОУ ВПО Смоленская Государственная Медицинская Академия, г. Смоленск (1)
Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва (2)

В эксперименте на крысах изучено новое производное аскорбиновой кислоты с антигипоксической активностью. Показано, что в дозе 100 мг/кг в условиях нормоксии и после воздействия острой гипоксии оно уменьшает активность свободно-радикального окисления, не оказывает влияния на гемограмму, но приводит к существенному снижению активности АлАТ, АсАТ, ЩФ, ЛДГ, уровня мочевого кислоты и общего белка после воздействия острой гипоксии, что имеет определенное значение в его антигипоксическом эффекте.

Ключевые слова: антигипоксиканты, свободнорадикальное окисление, гемограмма, биохимические показатели.

Комплексное соединение ванадила с аскорбатом и рибофлавином – L-аскорбаторибофлавинатованадил(II) трисемигидрата(I) – под лабораторным шифром πQ 1968, синтезированное д.х.н. Э.А. Парфеновым в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, является антигипоксикантным средством [5]. Механизм антигипоксического действия данного соединения, возможно, обусловлен снижением интенсивности метаболических процессов в клетке, его оптимизирующим влиянием на функциональное состояние ЦНС [4]. Важным и информативным объектом исследования является кровь, т.к. кровь, как жидкая соединительная ткань организма, не только обеспечивает взаимосвязь всех органов и систем, являясь индикатором состояния организма, но и сама непосредственно реагирует на дефицит кислорода [7, 8]. В условиях недостаточного для удовлетворения потребностей метаболизма снабжения тканей кислородом начинается цепь физиологических и биохимических изменений, цель которых обеспечить оптимальную функцию и по возможности интактно восстановление организма после окончания периода гипоксии. Перспективным при ги-

поксии является применение лекарственных средств, способных тормозить активацию процессов свободнорадикального окисления в клетке, уменьшать образование токсических метаболитов и снижать их повреждающее действие.

Как известно, аскорбиновая кислота относится к числу наиболее активных прооксидантов, а также заметно усиливает действие истинных биоантиоксидантов. Исходя из этого, представляло интерес изучить действие комплексного производного аскорбиновой кислоты πQ 1968 на процессы свободнорадикального окисления (СРО), гемограмму и биохимические показатели крови крыс в условиях нормоксии и после воздействия острой гипоксии, что позволит расширить представления о механизме антигипоксического действия соединения.

Материалы и методы

Исследование проведено на 240 крысах-самцах линии Wistar массой 180-200 г в соответствии с «Руководством по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ» [6]. Анализируемое соединение πQ 1968 вводили однократно внутривенно за 1 час до эксперимента

в дозе 100 мг/кг (эффективная доза при гипоксии). Контрольным животным вводили равный объем дистиллированной воды. В качестве препаратов сравнения выступали антигипоксикант мексидол (ООО «ФАРМА-СОФТ», Россия) и природный антиоксидант аскорбиновая кислота (ООО «ОЗОН», Россия) в дозах 100 мг/кг. Кровь для исследования брали из сосудов шеи декапитированного животного через час после введения исследуемого соединения в группе животных, содержащихся в условиях нормоксии, и при появлении признаков острой гипоксии (беспокойное поведение, подергивание лап, попытка выбраться) в группе животных, подвергшихся воздействию острой гипоксии с гиперкапнией (ОГсГк). ОГсГк моделировали помещением крыс в герметичные индивидуальные камеры объемом 1 л до появления признаков острой гипоксии. Сыворотку крови получали путем центрифугирования цельной крови в течение 15 минут при 3000 об/мин.

Оценку показателей СРО окисления в сыворотке крови проводили методом хемилюминесценции на биохемиолуцинометре 3606 М (разработка конструкторско-технологического бюро «Наука», Россия) с помощью программного обеспечения к прибору. Для инициации перекисного окисления липидов в исследуемый материал (0,1 мл плазмы, 0,2 мл фосфатного буфера (рН 7,4), 0,1 мл 12,5 мМ двухвалентного железа в виде соли $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), помещенный в темную камеру биохемиолуцинометра, на 10 цикле вводили 0,1 мл 3% раствора перекиси водорода с последующей регистрацией хемилюминесценции в течение 50 циклов (1 цикл – 0,1 секунды), при 37°C с учетом фоновой хемилюминесценции. В качестве оценочного показателя использовалась величина светосуммы, рассчитываемой как площадь под кривой свечения в относительных единицах. Данный показатель отражает интенсивность образования свободных радикалов и участие в процессе свободно-радикального окисления антиоксидантных систем.

Показатели гемограммы крови крыс (уровень гемоглобина, число эритроцитов и гематокрит) определяли на минифотометрах DP 300, DP 310 (DIALAB G.m.b.H., Австрия), используя

реактивы DIALAB GPT (ALT), mod. IFCC фирмы DIALAB (Австрия). Подсчет числа лейкоцитов проводили в камере Горяева.

При биохимическом исследовании определяли активность ферментов: аламинотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и уровень креатинина, мочевой кислоты, мочевины, общего белка. Исследования проведены на биохимическом анализаторе «Ultra» фирмы «Kone» (Финляндия) с использованием наборов реактивов фирмы Olvex (Россия).

Статистическую обработку результатов опытов проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica Version 6.0.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования показали, что в условиях нормоксии величина светосуммы у контрольных животных составляла $67138,11 \pm 9906$ условных единиц. Соединение πQ 1968 в условиях нормоксии достоверно снижало показатель свечения до 51109 ± 7277 . Препараты сравнения в условиях нормоксии не вызывали достоверных изменений величины светосуммы (табл. 1).

После воздействия ОГсГк в сыворотке крови контрольных животных наблюдалось угнетение хемилюминесцентного свечения по сравнению с интактными животными (нормоксия), что выразилось в снижении величины светосуммы в 1,3 раза, что может быть обусловлено адаптационным напряжением антиоксидантной системы сыворотки крови, проявляющимся в повышении содержания и активности биоантиоксидантов (супероксиддисмутазы, каталазы, церулоплазмина, α -токоферола и др.), способствующих компенсаторному повышению антирадикальной устойчивости липидов в условиях гиперпродукции прооксидантов. Выраженное снижение активности свободно-радикального окисления в сыворотке крови наблюдалось после воздействия острой гипоксии при введении соединения πQ 1968 (уменьшение величины светосуммы в 1,25 раза). Действие соединения πQ 1968 соответствует по эффективности мексидолу и несколько уступает аскорбиновой кислоте (снижение – в 1,28 раза).

Таблица 1

Влияние πQ 1968, аскорбиновой кислоты и мексидола на интенсивность процессов свободнорадикального окисления

Группа животных (n = 10)	Величина светосуммы, усл. ед.	
	Нормоксия	Гипоксия с гиперкапнией
Контроль	67138,11 ± 9906	51480 ± 6658*
πQ 1968	51109 ± 7277*	41191 ± 4089 ^Δ
Аскорбиновая кислота	59114 ± 3151	40087 ± 9308 ^Δ
Мексидол	62483 ± 12217	41160 ± 6118 ^Δ

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе.

Δ – $p < 0,05$ по сравнению с контролем при гипоксии

В ходе изучения гемограммы, было выявлено, что у контрольных животных значения показателей в условиях нормоксии соответствовали физиологическим величинам [1]. Введение соединения под лабораторным шифром πQ 1968 в условиях нормоксии не оказывало влияния на общее содержание лейкоцитов и гематок-

рита, но наблюдалось некоторое увеличение показателей содержания эритроцитов (на 5,36%) и гемоглобина (на 5,26%) (табл. 2). Однако эти изменения находились в пределах физиологической нормы для крыс. Препараты сравнения в условиях нормоксии достоверных изменений в гемограмме не вызывали.

Таблица 2

Влияние πQ 1968, аскорбиновой кислоты и мексидола на показатели гемограммы крыс в условиях нормоксии

Группа животных (n = 10)	Контроль	πQ 1968	Аскорбиновая кислота	Мексидол
Значение показателей, абс. (%)				
Эритроциты × 10 ¹² /л	7,74±0,16 (100%)	8,16±0,27* (105,36%)	7,47±0,37 (96,53%)	7,58±0,43 (97,86%)
Гемоглобин г/л	141,49±2,15 (100%)	148,94±0,91* (105,26%)	139,28±1,77 (98,43%)	139,05±2,17 (98,27%)
Лейкоциты × 10 ⁹ /л	9,77±0,42 (100%)	9,69±0,45 (99,18%)	9,34±0,40 (95,58%)	9,23±1,00 (94,44%)
Гематокрит %	43,02±0,56 (100%)	44,18±1,23 (102,68%)	43,30±0,80 (100,65%)	42,23±1,00 (98,16%)

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе.

После воздействия острой гипоксии у животных наблюдалось достоверное увеличение содержания эритроцитов и гемоглобина на 8,80% и 7,82% (табл. 3). Возможно, изменения количества эритроцитов и гемоглобина обусловлены колебаниями гематокритного числа, что может свидетельствовать о перераспределении крови в организме животного. Так, показатель гематокрита у животных в группе гипоксия увеличивался на 7,98% относительно контроля, свидетельствуя о сгущении крови и нарушении гемодинамики. Выявленные изменения показателей гемограммы после воздействия ОГсГк согласуются с данными

литературы, из которых следует, что одним из срочных компенсаторных механизмов адаптации к гипоксии является увеличение кислородной емкости крови за счет усиления гемопоэза и выброса депонированной крови [2].

На фоне введения лекарственных веществ не происходило достоверных изменений гемограммы крыс в условиях гипоксии. Но после введения πQ 1968 наблюдалась тенденция к увеличению содержания эритроцитов и гемоглобина, что, вероятно, способствует лучшей доставке кислорода к тканям и увеличивает время жизни мышей при ОГсГк.

Таблица 3

Влияние πQ 1968, аскорбиновой кислоты и мексидола на показатели гемограммы крыс после воздействия ОГсГк

Группа животных (n = 10)	Контроль	Гипоксия	πQ 1968	Аскорбиновая кислота	Мексидол
Значение показателей, абс.(%)					
		% к контролю	% к гипоксии		
Эритроциты $\times 10^{12}/л$	7,74 \pm 0,16 (100%)	8,42 \pm 0,25* (108,80%)	9,18 \pm 1,10 (108,94%)	8,02 \pm 0,51 (107,36%)	8,12 \pm 0,48 (96,44%)
Гемоглобин г/л	141,49 \pm 2,15 (100%)	152,55 \pm 1,61* (107,82%)	155,69 \pm 2,71 (102,06%)	154,33 \pm 2,37 (101,16%)	152,64 \pm 2,82 (100,06%)
Лейкоциты $\times 10^9/л$	9,77 \pm 0,42 (100%)	9,13 \pm 0,86 (93,45%)	9,50 \pm 0,58 (104,02%)	9,18 \pm 0,75 (100,48%)	9,27 \pm 1,10 (101,54%)
Гематокрит %	43,02 \pm 0,56 (100%)	46,46 \pm 0,48* (107,98%)	46,27 \pm 1,65 (99,60%)	47,20 \pm 0,86 (101,59%)	46,31 \pm 0,80 (99,67%)

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе.

Изучение биохимических показателей показало их соответствие у контрольных животных в условиях нормоксии значениям физиологической нормы для крыс [1]. Предварительное введение соединения πQ 1968 и препаратов сравнения в условиях нормоксии не приводило к достоверному изменению рассматриваемых показателей (табл. 4).

Данные, полученные при исследовании биохимических показателей сыворотки крови экспериментальных животных после воздействия ОГсГк, представлены в таблице 5, из которой следует, что ОГсГк вызывала повышение активности АлАТ и АсАТ животных на 52,23% и 70,05% соответственно, щелочной фосфатазы в 2

раза, что вероятно связано с нарушением функции печени и активизацией цитолиза. Показатель ЛДГ был увеличен на 56,75% по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о значительной активации процесса гликолиза в условиях недостатка кислорода, вследствие чего в крови не разрушается до нейтральных продуктов лактат, что и приводит к накоплению ЛДГ. Уровень мочевой кислоты повышался в 4 раза, что вероятно, обусловлено тем, что гипоксическое повреждение тканей индуцирует разрушение нуклеиновых кислот, сопровождающееся образованием пуриновых оснований, с последующей их модификацией. Кроме того, увеличился и уровень общего белка на 22,43%.

Таблица 4

Влияние πQ 1968, аскорбиновой кислоты и мексидола на биохимические показатели крови крыс в условиях нормоксии

Группа животных (n = 10)	Контроль	πQ 1968	Аскорбиновая кислота	Мексидол
Значение показателя, абс.(%)				
АлАТ, ед/л	112,20 \pm 16,20 (100%)	135,00 \pm 22,60 (120,32%)	123,00 \pm 13,06 (109,63%)	106,70 \pm 19,27 (95,10%)
АсАТ, ед/л	159,60 \pm 22,80 (100%)	173,80 \pm 41,84 (108,90%)	162,10 \pm 12,00 (101,57%)	178,90 \pm 45,35 (112,09%)
ЩФ, ед/л	158,30 \pm 7,30 (100%)	133,60 \pm 34,24 (84,40%)	161,50 \pm 2,12 (102,02%)	136,30 \pm 25,63 (86,10%)
ЛДГ, ед/л	735,80 \pm 78,56 (100%)	796,30 \pm 60,50 (108,22%)	793,30 \pm 56,45 (107,81%)	732,10 \pm 54,33 (99,50%)
Мочевина, ммоль/л	8,50 \pm 1,00 (100%)	8,17 \pm 1,37 (96,12%)	8,40 \pm 1,06 (98,82%)	8,30 \pm 0,69 (97,65%)
Мочевая кислота, мкмоль/л	67,40 \pm 3,40 (100%)	64,70 \pm 11,10 (95,99%)	67,40 \pm 3,27 (100%)	67,50 \pm 6,82 (100,15%)
Креатинин, мкмоль/л	79,00 \pm 0,80 (100%)	84,80 \pm 5,44 (107,34%)	81,00 \pm 2,00 (102,53%)	79,90 \pm 2,61 (101,14%)
Общий белок, г/л	60,20 \pm 0,64 (100%)	61,90 \pm 2,54 (102,82%)	59,70 \pm 3,31 (99,17%)	62,50 \pm 2,94 (103,82%)

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе.

Таблица 5

Влияние π Q 1968, аскорбиновой кислоты и мексидола на биохимические показатели крови крыс после воздействия ОГсГк

Группа животных (n = 10)	Контроль	Гипоксия	π Q 1968	Аскорбиновая кислота	Мексидол
	Значение показателя, абс. (%)				
	абс.	% к контролю	% к гипоксии		
АлАТ, ед/л	112,20±16,20	170,80±17,20* (152,23%)	101,20±18,20 ^Δ (59,25%)	140,10±20,41 ^Δ (82,03%)	131,70±27,22 ^Δ (77,11%)
АсАТ, ед/л	159,60±22,80	271,40±48,28 ^Δ (170,05%)	190,30±29,90 ^{Δ*} (70,12%)	195,80±26,20 ^Δ (72,14%)	200,00±26,60 ^Δ (73,69%)
ЩФ, ед/л	158,30±7,30	349,40±64,20* (220,72%)	219,00±49,20 ^Δ (62,68%)	323,90±40,88 (92,70%)	273,60±65,40 (78,31%)
ЛДГ, ед/л	735,80±78,56	1153,40±219,76* (156,75%)	776,90±104,92 ^Δ (67,36%)	850,40±72,60 ^Δ (73,73%)	772,30±141,36 ^Δ (66,96%)
Мочевина, ммоль/л	8,50±1,00	9,04±1,44 (106,35%)	8,15±0,42 (90,15%)	8,51±0,33 (94,14%)	8,07±0,40 (89,27%)
Мочевая кислота, мкмоль/л	67,40±3,40	275,90±19,10* (409,35%)	234,40±23,24 ^Δ (84,96%)	247,00±9,80 ^Δ (89,53%)	244,70±5,56 ^Δ (88,69%)
Креатинин, мкмоль/л	79,00±0,80	80,50±4,40 (101,90%)	71,40±8,16 ^Δ (88,70%)	66,20±1,68 ^Δ (82,24%)	67,80±2,08 ^Δ (84,22%)
Общий белок, г/л	60,20±0,64	73,70±2,22* (122,43%)	64,40±5,00 ^Δ (87,38%)	59,20±1,60 ^Δ (80,33%)	64,00±2,40 ^Δ (86,84%)

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе^Δ - $p < 0,05$ по отношению к группе гипоксии

При применении лекарственных веществ на фоне ОГсГк наблюдалось снижение указанных показателей. Наиболее значительно предупреждало повышение активности АлАТ (на 40,75%), АсАТ (на 29,88%), ЛДГ (на 32,64%), мочевой кислоты (на 15,04%) и общего белка (на 12,62%) комплексное соединение аскорбиновой кислоты под лабораторным шифром π Q 1968. Мексидол и аскорбиновая кислота в меньшей степени, но также достоверно уменьшали концентрацию указанных показателей в сыворотке крови опытных животных. Так, мексидол способствовал снижению АлАТ, АсАТ, ЛДГ, мочевой кислоты и общего белка на 22,89; 26,31; 33,04; 11,31 и 13,16% соответственно, а аскорбиновая кислота – на 17,97; 27,86; 26,27; 10,47 и 19,67% соответственно. Следует отметить, что только при применении соединения π Q 1968 достоверно снижался уровень ЩФ на 37,32%. Кроме того, применение π Q 1968 препятствовало повышению АлАТ, АсАТ, ЩФ, ЛДГ и общего белка выше показателей физиологической нормы крыс.

Выводы

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что

комплексное соединение аскорбиновой кислоты под шифром π Q 1968, обладающее выраженным антигипоксическим действием, проявляет антиоксидантные свойства в условиях нормоксии, и особенно в условиях гипоксии, о чем свидетельствует снижение величины светосуммы хемилюминисцентного свечения. Наблюдаемый антиоксидантный эффект данного соединения, возможно, является не только результатом его прямого влияния на процессы пероксидации липидов, но и опосредован стабилизацией энергетического обмена клетки, что было подтверждено нами ранее [3]. ОГсГк существенно изменяет показатели гемограммы (возрастает уровень эритроцитов, гемоглобина, гематокрита) и биохимические показатели крови экспериментальных животных (возрастает активность АлАТ, АсАТ, ЩФ, ЛДГ, уровень мочевой кислоты и общего белка), что свидетельствует о том, что гипоксия является мощным стрессорным фактором и запускает каскад срочных механизмов адаптации к гипоксии, проявляющиеся усилением гемопоэза, выброса депонированной крови, увеличением гликолиза, активацией симпатно-адреналовой системы. Исследуемое соединение π Q

1968 не оказывает выраженного влияния на показатели гемограммы в условиях гипоксии, но приводит к достоверному снижению активности АлАТ, АсАТ, ЩФ, ЛДГ и уровня мочевой кислоты, общего белка. Положительная динамика показателей АлАТ, АсАТ, ЩФ может свидетельствовать о замедлении процессов цитолиза и возможном гепатопротекторном действии изучаемого соединения.

Литература

1. Ананич И. В. Биохимические характеристики крови крыс / И.В. Ананич, М.А. Дерхо, С.Ю. Концевая // Ветеринарная клиника. – 2008. – №10. – С.18-19.
2. Зюзьков Г.Н. Гуморальные механизмы регуляции эритропоэза при гипоксии / Г.Н. Зюзьков, А.М. Дыгай, Е.Д. Гольдберг // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2005. – № 2. – С. 133-137.
3. Производные аскорбиновой кислоты как антигипоксанта природного происхождения / Е.О. Маркова [и др.] // Патогенез: науч.-практ. журн. – 2011. – Т. 9, №3. – С. 45. – (Сод. журн.: Тез. докл. VI Рос. конф. с Междунар. участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция». – М., 2011).
4. Антигипоксическая активность комплексных соединений на основе аскорбиновой кислоты / В.Е. Новиков [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – СПб., 2011. – Т. 9, №2. – С. 35-41.
5. Пат. 2461376 РФ, МПК. Антигипоксантающее средство / В.Е. Новиков, Е.О. Маркова, Э.А. Парфенов. – опубл. 20.09.2012, бюл. 26.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – М., 2005. – 832 с.
7. Титов В.Н. Методические вопросы и диагностическое значение определения перекисного окисления липидов в липопротеинах низкой плотности. Олеиновая жирная кислота как биологический антиоксидант (обзор литературы) / В.Н. Титов, Д.М. Лисицын, С.Д. Разумовский // Клинич. лаб. диагностика. – 2005. – №4. – С. 3-10.
8. Улитко М.В. Роль моноцитов-макрофагов в адаптивных реакциях кроветворной ткани при действии на организм экстремальных факторов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / М.В. Улитко. – Екатеринбург, 2008. – 24 с.

TO THE MECHANISM OF ACTION OF NEW ANTIHYPoxic COMPLEX COMPOUND OF ASCORBIC ACID

V.E. Novikov, E.O. Markova, E.A. Parfenov

In the experiment on rats a new derivative of ascorbic acid with antihypoxic activity was learned. It is shown that a dose of 100 mg / kg in normoxia and after exposure to acute hypoxia, it reduces the activity of free radical oxidation, has no effect on the hemogram, but leads to a significant reduction of ALT, AST, alkaline phosphatase, LDG, the level of uric acid and total protein after acute hypoxia, which is of some importance in its hypoxic effect.

Key words: antihypoxants, free radical oxidation, hemogram, biochemical parameters.

Новиков Василий Егорович – д-р мед. наук, проф., заведующий кафедрой фармакологии с курсом фармации ФПК и ППС, ГБОУ ВПО Смоленская Государственная Медицинская Академия Минздрава России.

214019, г. Смоленск, ул. Крупской, д. 28.

E-mail: nau@sgma.info.

Маркова Екатерина Олеговна – ст. преподаватель кафедры общей и медицинской химии, соискатель кафедры фармакологии с курсом фармации ФПК и ППС, ГБОУ ВПО Смоленская Государственная Медицинская Академия Минздравсоцразвития РФ.

214019, г. Смоленск, ул. Крупской, д. 28.

E-mail: smeshik-kate@mail.ru.

Парфенов Эдгар Андреевич – д-р хим. наук, вед. научный сотрудник, Российский Онкологический Научный Центр имени Н.Н. Блохина Российской Академии Медицинских Наук.

115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24.

E-mail: phcao@yandex.ru.