

ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ 4-ГИДРОКСИ-3,5-ДИТРЕТБУТИЛ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ, МЕКСИДОЛА И ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ НА МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

А.В. Воронков

д.м.н., доцент, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ
E-mail: prohor.77@mail.ru

Д.И. Поздняков

аспирант, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Е.И. Хури

аспирант, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ
E-mail: elena.belova@hotmail.ru

Ю.Е. Кульбекова

аспирант, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ
E-mail: kulbekoyu@mail.ru

А.А. Кобин

преподаватель, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ
E-mail: kobin@inbox.ru

Проведено исследование, посвященное оценке антиоксидантной активности 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричной кислоты, а также препаратов сравнения – мексидола и тиоктовой кислоты, на фоне фокальной ишемии головного мозга. Установлено, что соединение 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричная кислота оказывает антиоксидантный эффект в условиях ишемии головного мозга у крыс, сопоставимый с таковым у мексидола, и превосходит по данному виду активности тиоктовую кислоту.

Ключевые слова: антиоксиданты, мексидол, ишемия головного мозга, тиоктовая кислота, производные коричной кислоты.

Ишемический инсульт является одной из ведущих причин смертности, инвалидизации и утраты трудоспособности населения как в развитых, так и во многих развивающихся странах [1]. Одним из основных элементов патогенеза повреждения нейронов при инсульте является гиперпродукция активных форм кислорода (АФК), т.е. окислительный стресс [2–6]. Головной мозг – наиболее уязвимый орган для повреждения активными формами кислорода, поскольку нейроны богаты полиненасыщенными жирными кислотами, а активность ферментов эндогенной антиоксидантной защиты несколько снижена [7].

Свободные радикалы, такие как супероксидный анион радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксонитрит ($ONOO^-$), гидроксильный радикал (OH^\cdot) являются важными патофизиологическими посредниками повреждения нейронов при инсульте. Активные формы кислорода не только инициируют окислительное повреждение клеточных макромолекул, таких как липиды мембран, белки и ДНК, но и по-

вреждают эндотелий сосудов, что ведет к ухудшению мозговой гемодинамики и повышенному тромбообразованию [5–10]. Также АФК нарушают деятельность митохондрий, активируя апоптотический каскад гибели клетки [6], а кроме того, могут усиливать проявление воспалительной реакции, что в свою очередь ведет к увеличению зоны инфаркта головного мозга [3, 5].

В литературных источниках приводятся данные о том, что соединения, способствующие экспрессии ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГП)), и таким образом снижающие проявление окислительного стресса, могут рассматриваться как перспективные средства для комплексной фармакотерапии ишемического инсульта [3, 9].

Цель исследования – оценка антиоксидантной активности 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричной кислоты (АТАСЛ), мексидола и тиоктовой кислоты на модели фокальной ишемии головного мозга.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 50 крысах-самцах (массой 200–220 г) линии Wistar, разделенных на 5 групп по 10 особей в каждой. Животные были получены из вивария Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ и содержались на полноценном рационе при естественной смене свето-темнового режима. Содержание и все проводимые с животными манипуляции соответствовали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Strasbourg, 22 June, 1998.).

Первая группа крыс являлась группой позитивного контроля – ложнооперированные животные (Л/О). Оставшимся крысам моделировали ишемическое повреждение головного мозга путем правосторонней окклюзии средней мозговой артерии методом пережигания [11].

Вторая группа крыс – негативный контроль (НК) с фокальной ишемией, животные, не получавшие фармакологическую поддержку.

Третья и четвертая группы крыс – животные с ишемией головного мозга, получавшие препараты сравнения мексидол («ФАРМАСОФТ», Россия) в дозе 30 мг/кг и тиоктовую кислоту (октолипен, «Фармстандарт-Лексредства», Россия) – 50 мг/кг.

Пятой группе крыс вводили 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричную кислоту (лабораторный шифр – АТАСЛ) в дозе 100 мг/кг [11].

Изучаемое соединение и препараты сравнения вводились *per os* непосредственно после воспроизведения фокальной ишемии и на протяжении трех суток, в утренние часы (натошак). По истечении указанного времени животных декапитировали под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг) и извлекали головной мозг. Затем в гомогенате головного мозга определяли содержание диеновых конъюгатов (ДК) [12] и малонового диальдегида (МДА) [13]. В постядерной фракции головного мозга крыс оценивали активность ферментов антиоксидантной защиты – каталазы [14], СОД [15], ГП [16]. Также для оценки про/антиоксидантного равновесия рассчитывали коэффициент окислительного стресса.

Результаты опытов обрабатывали методом вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 для операционной системы Windows (StatSoft, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования установлено, что фокальная ишемия головного мозга приводит к смещению про/антиоксидантного равновесия в сторону образования оксидантов, что подтверждается увеличением концентрации МДА и ДК у крыс НК-группы по сравнению с животными Л/О-группы на 145,7% ($p < 0,01$) и 178,8% ($p < 0,05$) соответственно (рис. 1). Также у животных НК-группы на фоне ишемии головного мозга наблюдалось по сравнению с крысами Л/О-группы снижение активности ферментов: СОД – в 20,3 раза ($p < 0,05$), каталазы – в 7 раз ($p < 0,05$), ГП – в 6,4 раза ($p < 0,05$). В итоге значение коэффициента окислительного стресса у крыс НК-группы составило 17,69 усл. ед. (* – статистически значимо относительно крыс НК группы ($p < 0,05$)):

НК	17,69
Мексидол	2,68*
Тиоктовая кислота	5,87*
АТАСЛ	2,29*

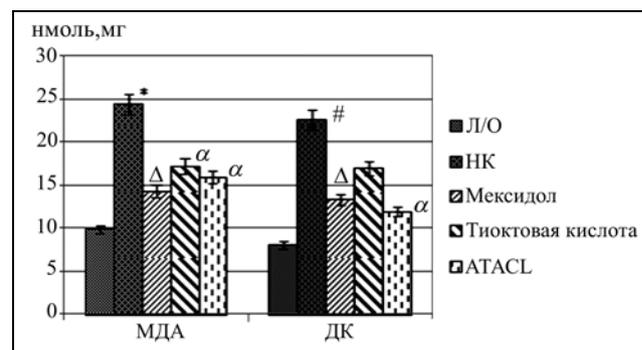


Рис. 1. Влияние соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на концентрацию МДА и ДК в гомогенате головного мозга крыс на фоне фокальной ишемии: * – статистически значимо относительно крыс Л/О-группы ($p < 0,01$); # – статистически значимо относительно крыс Л/О-группы ($p < 0,05$); Δ – статистически значимо относительно крыс НК-группы ($p < 0,02$); α – статистически значимо относительно крыс НК-группы ($p < 0,05$)

Полученные данные согласуются с литературными источниками.

Пероральное введение мексидола на фоне ишемии головного мозга способствовало снижению концентрации МДА и ДК относительно крыс НК-группы на 70,1% ($p < 0,02$) и 69,3% ($p < 0,02$) соответственно. Также отмечено повышение по сравнению с крысами НК-группы активности СОД в 19,4 раза ($p < 0,02$) (рис. 2,а), каталазы – на 245,5% ($p < 0,05$) (рис. 2,б), ГП – на 292,8% ($p < 0,02$).

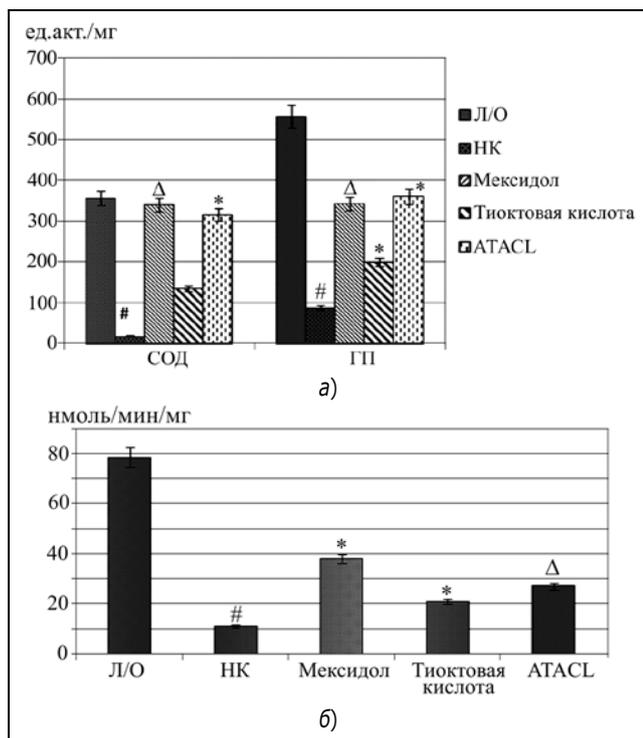


Рис. 2. Влияние соединения АТАСЛ и препаратов сравнения на активность СОД и ГП (а) и каталазы (б) в постъядерной фракции головного мозга крыс на фоне фокальной ишемии: # – статистически значимо относительно крыс Л/О-группы ($p < 0,05$); Δ – статистически значимо относительно крыс НК-группы ($p < 0,02$); * – статистически значимо относительно крыс НК-группы ($p < 0,05$)

Таким образом применение мексидола способствовало снижению коэффициента окислительного стресса, по отношению к крысам НК-группы в 6,6 раз ($p < 0,05$). Полученные данные подтверждают высокий антиоксидантный потенциал мексидола и согласуются с ранее проведенными исследованиями.

Введение тиоктовой кислоты привело к статистически значимому снижению по сравнению с животными НК-группы, концентрации МДА на 41,4% ($p < 0,05$) и повышению активности каталазы и ГП на 90,9% ($p < 0,05$) и 127,3% ($p < 0,05$) соответственно. Остальные изучаемые показатели статистически значимо не отличались от показателей животных НК-группы. Коэффициент окислительного стресса при этом был ниже, чем у животных НК-группы в 3,01 раза ($p < 0,05$).

Применение АТАСЛ способствовало восстановлению про/антиоксидантного равновесия на фоне фокальной ишемии головного мозга. Данный факт подтверждается снижением концентрации МДА (по сравнению с крысами НК-группы) на

52,6% ($p < 0,05$) и ДК на 88,5% ($p < 0,05$). Также на фоне введения 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричной кислоты увеличилась активность ферментов антиоксидантной защиты: СОД – в 18 раз ($p < 0,05$), каталазы – на 1456% ($p < 0,02$) и ГП – в 4,1 раза ($p < 0,05$). Коэффициент окислительного стресса при применении изучаемого соединения (АТАСЛ) был ниже относительно крыс НК-группы в 7,7 раз ($p < 0,05$).

Антиоксидантные свойства соединения АТАСЛ (производное коричной кислоты), вероятно, связаны с химической структурой данного соединения. Наличие виниленового фрагмента, ароматического кольца и заместителей в ароматическом ядре предопределяет способность данного соединения выступать в виде «ловушки» свободных радикалов, образуя стабильный феноксил, что ведет к снижению окислительной модификации структур клетки и уменьшает напряженность ферментных регуляторных антиоксидантных систем [10, 17].

ВЫВОДЫ

1. Соединение АТАСЛ практически в равной степени с мексидолом (статистически значимых отличий между группами животных не установлено) способствует восстановлению про/антиоксидантного равновесия на фоне фокальной ишемии головного мозга и превосходит по данному виду активности тиоктовую кислоту (при применении соединения АТАСЛ активности СОД и ГП были выше, а содержание ДК ниже по сравнению с животными, получавшими тиоктовую кислоту на 134,3% ($p < 0,05$), 81,6% ($p < 0,05$) и 41,4% ($p < 0,05$) соответственно).
2. Соединение 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричная кислота может быть рекомендовано для дальнейшего исследования с целью создания на его основе лекарственного препарата, проявляющего антиоксидантные свойства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кожина А.В., Левин О.С. Фармакотерапия больных, перенесших ишемический инсульт, в период реабилитации // Современная терапия в психиатрии и неврологии. 2015. № 1. С. 4–11.
2. Луцкий М. А., Земсков А. М., Смелянец М. А. Формирование окислительного стресса, одного из звеньев сложного патогенеза социально значимых заболеваний нервной системы – инсульта и рассеянного склероза // Фундаментальные исследования. 2014. № 10-5. С. 924–929.
3. Маслюкова А.В., Томилова И.К., Баклушина Е.А. Биохимические маркеры перенесенного острого нарушения

- мозгового кровообращения // Вестник ИвГМА. 2015. № 1. С. 37–44.
4. *Пиеничникова В.* Первичная профилактика инсульта // Врач. 2015. № 12. С. 17–19.
 5. *Manzanero S., Santro T., Arumugam T.V.* Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury // *Neurochem Int.* 2013. V. 62. P. 8–12.
 6. *Radak D., Resanovic I., Isenovic E.R.* Link between oxidative stress and acute brain ischemia // *Angiology.* 2014. V. 65. P. 67–76.
 7. *Kundan S.B., Anupam S.* Evaluation of Antioxidant and Cerebroprotective Effect of *Medicago sativa* Linn. against Ischemia and Reperfusion Insult // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2011. P. 1–9.
 8. *Fenster B.E., Tsao P.S., Rockson S.G.* Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress // *Am. Heart J.* 2003. V. 146. P. 218–226.
 9. *Jae. C.L., Moo H.W.* Neuroprotection of antioxidant enzymes against transient global cerebral ischemia in gerbils // *Anat. Cell Biol.* 2014. V. 47. P. 149–156.
 10. *Warner D.S., Sheng H.* Oxidants, antioxidants and the ischemic brain // *J. Exp. Biol.* 2004. V. 207. P. 21–31.
 11. *Воронков А.В., Поздняков Д.И., Мамлеев А.В.* Сравнительная оценка влияния АТАСЛ, мексидола и тиоктовой кислоты на антитромботическую функцию эндотелия и некоторые показатели состава периферической крови экспериментальных животных на фоне фокальной ишемии головного мозга // *Современные проблемы науки и образования.* 2016. № 2. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24398> (дата обращения: 24.07.2016).
 12. *Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И.* Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // *Лабораторное дело.* 1983. № 3. С. 33–35.
 13. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью ТБК // *Современные методы в биохимии / Под. ред. В.Н. Ореховича М.: Медицина.* 1977. С. 44–46.
 14. *Королюк М.А.* Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело.* 1988. № 1. С. 16–19.
 15. *Чумаков В.Н., Осинская Л.Ф.* Количественный метод определения активности цинк-, медь-зависимой супероксиддисмутазы в биологическом материале // *Вопросы медицинской химии.* 1977. № 5. С. 712–716.
 16. *Pierce S., Tappel A.L.* Glutathione peroxidase activities from rat liver // *Biochim. et biophys. Acta.* 1978. V. 523. № 1. P. 27–36.
 17. *Машенцева А.А., Сейтембетов Т.С.* Экспериментальное и теоретическое исследование взаимосвязи «структурно-активность» производных коричной кислоты // *Journal of Siberian Federal University. Chemistry.* 2010. № 3. P. 183–192.

Поступила после доработки 17 ноября 2016 г.

THE EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY 4-HYDROXY-3,5-DITRETBUTYL CINNAMIC ACID, MEXIDOL AND THIOCTIC ACID AT THE MODEL OF BRAIN FOCAL ISCHEMIA

© Authors, 2017

A.V. Voronkov

Dr.Sc. (Med.), Associate Professor, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a Branch FSEI HE VolgFMU
E-mail: prohor.77@mail.ru

D.I. Pozdnyakov

Post-graduate Student, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a Branch FSEI HE VolgFMU
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

E.I. Khoury

Post-graduate Student, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a Branch FSEI HE VolgFMU
E-mail: elena.belova@hotmail.ru

Yu.E. Kulbekova

Post-graduate Student, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a Branch FSEI HE VolgFMU
E-mail: kulbekoyu@mail.ru

A.A. Kobin

Lecturer, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a Branch FSEI HE VolgFMU
E-mail: kobin@inbox.ru

A study on the evaluation of the antioxidant activity of 4-hydroxy-3,5-ditretbutyl cinnamic acid on the background of focal cerebral ischemia of rats is done. The test compound is 4-hydroxy-3,5-ditretbutyl cinnamic acid and comparison preparations mexidol and thioctic acid was administered immediately after the playback ischemia of the brain and throughout the 3-day, in the morning hours. After this time the animals were decapitated, the brain was extracted and was measured in the homogenate content malondialdehyde, and conjugated dienes, and in post-nuclear fractions of brain activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. As a result, the study found that in terms of focal cerebral ischemia in rats experienced higher education pro-oxidants and a decrease in the activity of endogenous antioxidant defense enzymes. Introduction mexidol similar conditions contributed to the decline of education malondialdehyde and diene conjugates, as well as the restoration of the activity of antioxidant enzymes. Against the background of the introduction of the thioctic acid decreased the concentration of malondialdehyde and increased the activity of superoxide dis-

mutase and catalase. With the introduction of 4-hydroxy-3,5-ditretbutil cinnamic acid in rats showed regeneration pro / antioxidant balance, which is reflected in the decrease in the concentration of malondialdehyde (by 52,6% ($p < 0,05$)), diene conjugates (88, 5% ($p < 0,05$)) and increasing the activity of catalase (to 1456% ($p < 0,02$)), superoxide dismutase (18- times ($p < 0,05$)) and glutathione peroxidase (4.1 times ($p < 0,05$)) in this case, on the antioxidant properties of 4-hydroxy-3,5-ditretbutil cinnamic acid is close to mexidol and exceeds thioctic acid.

Key words: antioxidants, mexidol, cerebral ischemia, thioctic acid, cinnamic acid derivatives.

REFERENCES

1. Kozhinova A.V., Levin O.S. Farmakoterapija bol'nyh, perenessih ishemicheskij insul't, v period rehabilitacii // *Sovremennaja terapija v psihatrii i neurologii*. 2015. № 1. S. 4–11.
2. Luckij M. A., Zemskov A. M., Smeljanec M. A. Formirovanie oksitel'nogo stressa, odnogo iz zven'ev slozhnogo patogeneza social'no znachimyh zabolevanij nervnoj sistemy – insul'ta i rassejannogo skleroza // *Fundamental'nye issledovanija*. 2014. № 10-5. S. 924–929.
3. Masljukova A.V., Tomilova I.K., Baklushina E.A. Biohimicheskie markery perenessnogo ostrogo narushenija mozgovogo krovoobrashhenija // *Vestnik IvGMA*. 2015. № 1. S. 37–44.
4. Pshenichnikova V. Pervichnaja profilaktika insul'ta // *Vrach*. 2015. № 12. S. 17–19.
5. Manzanero S., Santro T., Arumugam T.V. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury // *Neurochem Int*. 2013. V. 62. P. 8–12.
6. Radak D., Resanovic I., Isenovic E.R. Link between oxidative stress and acute brain ischemia // *Angiology*. 2014. V. 65. P. 67–76.
7. Kundan S.B., Anupam S. Evaluation of Antioxidant and Cerebroprotective Effect of *Medicago sativa* Linn. against Ischemia and Reperfusion Insult // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011. P. 1–9.
8. Fenster B.E., Tsao P.S., Rockson S.G. Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress // *Am. Heart J*. 2003. V. 146. P. 218–226.
9. Jae. C.L., Moo H.W. Neuroprotection of antioxidant enzymes against transient global cerebral ischemia in gerbils // *Anat. Cell Biol*. 2014. V. 47. P. 149–156.
10. Warner D.S, Sheng H. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain // *J. Exp. Biol*. 2004. V. 207. P. 21–31.
11. Voronkov A.V., Pozdnjakov D.I., Mamleev A.V. Sravnitel'naja ocenka vlijanija ATACL, meksidola i tioktovoj kisloty na antitromboticheskuju funkciju jendotelija i nekotorye pokazateli sostava perifericheskoj krovi jeksperimental'nyh zivotnyh na fone fokal'noj ishemii golovnogogo mozga // *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*. 2016. № 2. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24398> (дата обращения: 24.07.2016).
12. Gavrilov V.B, Mishkorudnaja M.I. Spektrofotometricheskoe opredelenie sodержanija gidroperekisej lipidov v plazme krovi // *Laboratornoe delo*. 1983. № 3. S. 33–35.
13. Stal'naja I.D., Garishvili T.G. Metod opredelenija malonovogo dial'degida s pomoshh'ju TBK // *Sovremennye metody v biohimii / Pod. red. V.N. Orehovicha M.: Medicina*. 1977. S. 44–46.
14. Koroljuk M.A. Metod opredelenija aktivnosti katalazy // *Laboratornoe delo*. 1988. № 1. S. 16–19.
15. Chumakov V.N., Osinskaja L.F. Kolichestvennyj metod opredelenija aktivnosti cink-, med'-zavisimoj super-oksiddismutazy v biologicheskom materiale // *Voprosy medicinskoj himii*. 1977. № 5. S. 712–716.
16. Pierce S., Tappel A.L. Glutathione peroxidase activities from rat liver // *Biochim. et biophys. Acta*. 1978. V. 523. № 1. P. 27–36.
17. Mashenceva A.A., Sejtembetov T.S. Jeksperimental'noe i teoreticheskoe issledovanie vzaimosvjazi «struktura-aktivnost'» proizvodnyh korichnoj kisloty // *Journal of Siberian Federal University. Chemistry*. 2010. № 3. R. 183–192.