

Шурыгина Л.В., Злищева Э.И., Кравцов А.А., Полецук Л.А., Абрамова Н.О.

Влияние комената калия на антиоксидантную глутатионовую систему головного мозга стрессированных мышей

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Отдел биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, 350040, г.Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149

Цель исследования. Изучение влияния комената калия на содержание восстановленного глутатиона, активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в головном мозге мышей при иммобилизационном стрессовом воздействии. **Методика.** Эксперименты выполнены на 62 белых беспородных мышцах-самцах массой 23—25 г. Иммобилизационный стресс у мышей вызывали путем подвешивания их за шейную складку в течение пяти часов. Через 5 ч мышей декапитировали, головной мозг помещали в жидкий азот и затем в ткани мозга определяли содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность ферментов: глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР). Коменат калия вводили в дозах 2, 4 и 8 мг/кг массы тела внутривентрикулярно через зонд, до стрессирования, натощак, в течение трёх сут. Животные были разделены на 4 группы: 1-я — контроль, 2-я — получавшие коменат калия, 3-я — стрессированные и 4-я — стрессированные, получавшие коменат калия. **Результаты.** Установлено, что применение комената калия в дозах 4 и 8 мг/кг способствует сохранению активности ГПО, ГР и содержания GSH в мозге стрессированных мышей на уровне интактного контроля. То есть, наблюдается поддержание ресурса антиоксидантной глутатионовой системы на уровне физиологической нормы, что свидетельствует о выраженной антиоксидантной, стресспротекторной активности комената калия. Доза 2 мг/кг способствовала поддержанию содержания GSH на уровне физиологической нормы, но на активность ГР и ГПО существенного влияния не оказала. **Заключение.** Профилактическое (до стресса) применение комената калия в дозах 4 и 8 мг/кг сохраняет активность ферментов ГПО, ГР и содержание GSH в головном мозге стрессированных мышей на уровне физиологической нормы, что свидетельствует о его антиоксидантной, стресспротекторной активности.

Ключевые слова: коменат калия, мыши, окислительный стресс, головной мозг, GSH, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза

Для корреспонденции: Шурыгина Людмила Васильевна, канд. сельхоз. наук, ст. науч. сотр., зав. отделом биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, ФГБОУ ВО «КубГУ», www.kubsu.ru, e-mail: baliz-farm@mail.ru

Для цитирования: Шурыгина Л.В., Злищева Э.И., Кравцов А.А., Полецук Л.А., Абрамова Н.О. Влияние комената калия на антиоксидантную глутатионовую систему головного мозга стрессированных мышей. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 20—23.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (государственное задание, проект № 847).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила 15.08.15

Shurygina L.V., Zlischeva E.I., Kravtsov A.A., Poleschuk L.A., Abramova N.O.

Effect of potassium comenate on antioxidant glutathione system in brain of stressed mice

Kuban State University, A.Ya. Shurygin Department of biologically active substances, Russia, 350040, Krasnodar, Stavropolskaya st., 149

The purpose. This work is devoted to study of potassium comenate influence on the content of reduced glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in the brain of mice exposed to immobilization stress. **Methods.** The experiments were performed on 62 white mongrel male mice weighing 23—25 g. Immobilization stress in mice was induced by suspending them for cervical crease for five hours. After 5 hours the mice were decapitated, the brain was placed in liquid nitrogen and then in the brain tissue was determined by the content of reduced glutathione (GSH), the activity of glutathione peroxidase (GPO) and glutathione reductase (GR). Potassium comenate was administered intragastrically (gavage) in doses of 2, 4 and 8 mg/kg body weight, before of stressing, fasting for three days, once per day. The animals were divided into groups: control; treated with potassium comenate; stressed; stressed treated with potassium comenate. **Results.** It is found that the use of potassium comenate at doses of 4 and 8 mg / kg contributes to maintaining, GPO and GR activ-

ity and GSH content in the brain of stressed mice to intact control levels. That is, there is the maintenance of the resource of the antioxidant glutathione system at the level of the physiological norm, indicating a pronounced antioxidant, stress-protective activity of potassium comenante. The dose of 2 mg / kg contributed to keeping the content of GSH at the physiological norm, but the activity of the GR and GPO had no significant effect. **Conclusion.** Prestress application of potassium comenante in doses of 4 and 8 mg / kg retains GR and GPO activity and GSH content in the brain of stressed mice at physiological norm that indicates its antioxidant, stress-protective activity.

Keywords: potassium comenante, mice, oxidative stress, brain, GSH, glutathione peroxidase, glutathione reductase.

For citation: Shurygina L.V., Zlischeva E.I., Kravtsov A.A., Poleshchuk L.A., Abramova N.O. Effect of potassium comenante on antioxidant glutathione system in brain of stressed mice. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 20–23. (in Russ).

For correspondence: Shurygina Lyudmila Vasil'evna, e-mail: balizfarm@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (state assignment, project number 847).

Received 15.08.15

Введение

Окислительный стресс играет важную роль в развитии нейродегенеративных процессов, наблюдающихся при инсультах, черепно-мозговых травмах и других патологиях головного мозга [1]. Развитие окислительного стресса характеризуется гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК), возрастанием интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также нарушением функционального состояния антиоксидантных защитных систем [2]. В соответствии с этим для успешной терапии патологических состояний головного мозга, развитие которых связано с окислительным стрессом, актуален поиск и применение лекарственных средств, препятствующих накоплению радикалов и поддерживающих собственную антиоксидантную систему организма, способную защитить мозговую ткань от повреждения [3].

Коменовая (5-гидрокси-γ-пирон-2-карбоновая) кислота — основной физиологически активный компонент высокоэффективного лекарственного препарата бализ-2 — обладает антиоксидантной активностью, оказывает выраженное ростстимулирующее действие на культивируемые нейроны коры головного мозга, снижает гибель нейронов при глутаматной нейротоксичности, одном из ключевых факторов развития ишемических состояний и нейродегенеративных заболеваний [4, 5].

Ввиду того, что биологическая активность производных коменовой кислоты может в значительной степени отличаться, а по некоторым параметрам и превосходить действие коменовой кислоты [6], представляется целесообразным исследование их биологических свойств, в том числе, антиоксидантных и нейропротекторных. Ранее нами была установлена высокая антиоксидантная активность комената калия *in vitro* в модельной системе, генерирующей радикалы

[7]. Известно, что влияние различных негативных факторов, в том числе физическая нагрузка, стресс, сопровождается повышенным образованием свободных радикалов, а также нарушением антиоксидантной защиты в ткани головного мозга [2].

Целью работы было исследование влияния комената калия на содержание восстановленного глутатиона, активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в головном мозге мышей при иммобилизационном стрессе.

Методика

Коменат калия синтезирован в отделе биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет» (патент РФ № 2514632, опубл. 27.04.2014), препарат представляет собой кристаллический порошок желтого цвета, растворим в воде и спирте, молекулярная масса — 194.18.

Эксперименты выполнены на 62 белых беспородных мышках-самцах массой 23—25 г, полученных из питомника «Столбовая». Животных содержали в виварии при естественном освещении, свободном доступе к пище и воде в клетках размером 30 х 20 х 15 см. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики»).

Иммобилизационный стресс у мышей вызывали путем подвешивания их за шейную складку в течение 5 ч., после чего мышью декапитировали, головной мозг помещали в жидкий азот и затем в ткани мозга определяли содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность ферментов: глутатионпероксида-

зы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР). Водные растворы комената калия вводили мышам внутрижелудочно, через зонд до стрессирования, натошак, 1 раз в сутки в течение трёх сут. Коменат калия вводили в дозах 2, 4 и 8 мг/кг массы тела, животные были разделены на 4 группы: 1-я — контроль, 2-я получавшие коменат калия, 3-я — стрессированные, 4-я — стрессированные, получавшие коменат калия.

Определение GSH (свободных небелковых сульфгидрильных групп) проводили в кислоторастворимом насадке после осаждения белков [8]. Активность ГПО определяли по скорости окисления GSH в присутствии гидроперекиси третичного бутила [9]. Активность ГР определяли по скорости окисления НАДФН в реакции, катализируемой ГР из супернатанта, во время инкубации с окисленным глутатионом [10].

Статистический анализ проводили с помощью t-критерия Стьюдента с использованием программы Statistica 10. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее значение в группе, m — стандартная ошибка.

Результаты и обсуждение

Полученные данные представлены в таблице. Как видно из таблицы, коменат калия в дозах 4 и 8 мг/кг в отсутствие стрессового воздействия не оказывал влияния на содержание GSH и активность ГПО и ГР в головном мозге мышей. Незначительные изменения глутатионового обмена отмечались при применении комената калия в дозе 2 мг/кг.

Иммобилизационное стрессовое воздействие способствовало статистически значимому снижению уровня GSH и повышению активности ферментов ГПО и ГР. В тоже время после применения комената калия в дозах 4 и 8 мг/кг в течение 3 сут до стрессирования в головном мозге мышей наблюдалось сохранение содержания

GSH и активности глутатионовых ферментов на уровне контрольных значений. Доза 2 мг/кг способствовала поддержанию содержания GSH на уровне физиологической нормы, но на активность ГР и ГПО существенного влияния не оказала.

Известно, что окислительный стресс сопровождается повышением содержания АФК и продуктов ПОЛ, а также истощением эндогенных антиоксидантов и нарушением ферментных систем защиты. Одно из основных мест в системах, обеспечивающих ингибирование образования радикалов кислорода и окисления липидов, отводят глутатиону и сопряжённым с ним ферментам [2, 11].

Наблюдаемое нами постстрессовое возрастание активности ГПО и ГР является физиологическим ответом организма на повышенную генерацию АФК и интенсификацию ПОЛ, предотвращающим чрезмерное развитие этих процессов. Снижение содержания восстановленного глутатиона свидетельствует, что скорость окисления GSH в результате взаимодействия с АФК и ферментами, использующими его в качестве донора при нейтрализации радикалов и для поддержания восстановительной силы других антиоксидантов, превышает скорость его восстановления, осуществляемого ГР. Таким образом, в ответ на стрессовое воздействие мы наблюдали, с одной стороны, повышение активности глутатионовых ферментов и, с другой стороны, снижение восстановительного ресурса антиоксидантной глутатионовой системы в виде падения уровня GSH.

Применение комената калия в дозах 4 и 8 мг/кг способствует сохранению активности ГПО, ГР и содержания GSH в мозге стрессированных мышей на уровне интактного контроля, то есть, наблюдается поддержание ресурса антиоксидантной глутатионовой системы на уровне физиологической нормы, что свидетельствует о выраженной антиоксидантной, стресс-протекторной активности комената калия.

Таблица

Влияние комената калия на состояние глутатионовой системы в головном мозге мышей при стрессе

Группы животных	Содержание GSH, мкмоль/1 г белка	Активность ГПО, мкМ GSH/мин x1 г белка	Активность ГР, мкМ НАДФН/1 с x1 г белка
Контроль	1,98 ± 0,04	631 ± 10	1,30 ± 0,07
Коменат калия 2 мг/кг	1,92 ± 0,04	677 ± 54	1,45 ± 0,05
Коменат калия 4 мг/кг	1,89 ± 0,04	627 ± 23	1,27 ± 0,09
Коменат калия 8 мг/кг	2,07 ± 0,06	612 ± 24	1,18 ± 0,16
Стресс	1,79 ± 0,02***	741 ± 25***	1,57 ± 0,04**
Стресс, коменат калия 2 мг/кг	1,93 ± 0,02###	706 ± 25**	1,49 ± 0,05
Стресс, коменат калия 4 мг/кг	1,89 ± 0,04#	619 ± 21##	1,20 ± 0,06###
Стресс, коменат калия 8 мг/кг	2,04 ± 0,08###	619 ± 22#	1,24 ± 0,10##

Примечание. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ в сравнении с группой «контроль»; # — $p < 0,05$, ## — $p < 0,01$, ### — $p < 0,001$ в сравнении с группой «стресс».

Все вышеизложенное, а также полученные нами ранее данные о статистически значимо более высоком в сравнении с коеновой кислотой нейропротекторном действии коената калия при глутаматной цитотоксичности [6], указывают на перспективность проведения дальнейших исследований коената калия как антиоксидантного, стресс- и нейропротекторного средства.

Таким образом, дострессовое применение коената калия в дозах 4 и 8 мг/кг оказывает протекторное действие на антиоксидантный глутатионовый обмен в головном мозге стрессированных животных, сохраняет активность ферментов ГПО, ГР и содержание GSH в головном мозге мышей на уровне физиологической нормы, что свидетельствует о её антиоксидантной, стресспротекторной активности.

References

1. Gusev E.I., Skvorcova V.I. *Brain ischemia*, Moscow: Meditsina; 2001. (in Russian)
2. Zozulja Yu.A., Baraboj V.A., Sutkovej D.A. *Free radical oxidation and antioxidant protection in the pathology of the brain*, Moscow: Znanie; 2000. (in Russian)
3. Katunina E.A., Malyhina E.A., Kuznecov N.V. et al. The antioxidants in the complex therapy of Parkinson's disease. *Nevrologiya i Psikhatriya*. 2006; 9: 22-8. (in Russian)

4. Shurygin A.Ya. *The drug Baliz*. Krasnodar: Periodika Kubani; 2002. (in Russian)

5. Shurygin A.Ya., Kravtsov A.A., Skorokhod N.S. et al. Influence of comenic acid on cultured granule cells of cerebellum under glutamate neurotoxicity. in: *Materials of the III international scientific conference Traditional medicine: A current situation and perspectives of development*. 2008, August 18-22; Russia. Ulan-Ude. 2008: 73.

6. Shurygina L.V., Kravtsov A.A., Zlishheva E.I. et al. Neuroprotective effect of potassium comenate against glutamate toxicity on the model of cultured rat cerebellar neurons. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2014; 158(7): 56-9. (in Russian)

7. Kravtsov A.A., Shurygin A.Ya. A comparative study of antioxidant properties comenic acid and its salts. In: *Sbornik nauchnyh dokladov I Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii «Nauchno-tehnicheskoe tvorchestvo molodjozhi — put' k obshhestvu, osnovannomu na znanijah»*. Moscow; 2009. (in Russian)

8. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulphydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem*. 1968; 25(1): 192-205.

9. Moin V.M. A simple and specific method for determining the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. *Laboratornoe Delo*. 1986; 12: 724-9. (in Russian)

10. Jusupova L.B. About increase accuracy of determining the erythrocyte glutathione reductase activity. *Laboratornoe Delo*. 1989; 4: 19-21. (in Russian)

11. Dickinson D.A., Forman H.J. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 2002; 64(5-6): 1019-26.

Сведения об авторах

Злищева Энна Ивановна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., вед. науч. сотр. отдела биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, ФГБОУ ВО «КубГУ», e-mail: www.kubsu.ru, balizfarm@mail.ru

Кравцов Александр Анатольевич, канд. биол. наук, науч. сотр. отдела биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, ФГБОУ ВО «КубГУ», e-mail: www.kubsu.ru, aakravtsov@mail.ru

Полещук Лариса Афанасьевна, науч. сотр. отдела биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, ФГБОУ ВО «КубГУ», e-mail: www.kubsu.ru, balizfarm@mail.ru

Абрамова Наталья Олеговна, науч. сотр. отдела биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, ФГБОУ ВО «КубГУ», e-mail: www.kubsu.ru, balizfarm@mail.ru