

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЦИТОФЛАВИНА ПРИ ОСТРОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Бизенкова М.Н., Чеснокова Н.П., Романцов М.Г., Невважай Т.А.

ГОУ ВПО «Саратовский ГМУ» Росздрава

В опытах на беспородных белых мышах с экспериментальной острой гипоксической гипоксией обнаружено резкое увеличение содержания в крови промежуточных продуктов липопероксидации – диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) на фоне подавления активности ферментного и неферментного звеньев антиоксидантной системы крови. Достигнута эффективная коррекция метаболических сдвигов, спустя 30 мин с момента развития острой гипоксической гипоксии, с помощью комплексного препарата – цитофлавина. Последний обеспечивает активацию НАД – зависимых, а также флавинозависимых дегидрогеназ, усиливает энергообеспечение клеток, а также их антирадикальную защиту в процессе активации убихиноновых оксиредуктаз и восстановления глутатиона.

Процессы свободнорадикального окисления являются необходимым звеном метаболической активности клеток в условиях нормы при наличии сбалансированности антирадикальной защиты клеток и интенсивности образования свободных радикалов, в частности, активных форм кислорода (АФК). В настоящее время дано четкое объяснение происхождению свободных радикалов при различных формах патологии, осложненных развитием гипоксического синдрома.

Как известно, в условиях нормы около 98% молекулярного кислорода подвергается тетравалентному восстановлению в митохондриях в биологическом процессе, связанном с генерацией АТФ (Ерохин И.А., Шляпников С.Н., 1997).

Около 1-2% общего количества потребляемого кислорода подвергается одновалентному восстановлению с образованием так называемых свободнорадикальных соединений, имеющих неспаренный электрон на внешней орбитали. В условиях гипоксии различного генеза в связи с дефицитом кислорода происходит разгрузка дыхательной цепи за счет утечки электронов на пути следования к цитохромоксидазе. При этом возникает последовательное одновалентное восстановление кислорода с образованием супероксидного анион – радикала, перекиси водорода, гидроксильного радикала. Последние обладают выраженным цитотоксическим действием [7].

В цитозоле клеток образование супероксидного анион – радикала возможно при участии ксантинооксидазы, активируемой в условиях гипоксии, а также в процессе метаболизма и взаимопревращения катехоламинов, простагландинов, лейкотриенов в системах, содержащих кислоты переменной валентности, в микросомах и т.д.

Вышеизложенное делает очевидным тот факт, что в механизмах развития гипоксического некробиоза клеток важная роль должна быть отведена избыточному образованию свободных радикалов и соответственно дестабилизации структурных компонентов клеток различной функциональной значимости под влиянием указанных соединений [2]. Последнее определяет целесообразность апробации различных антигипоксантов, антиоксидантов, мембранопротекторов при различных видах гипоксии [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение метаболических эффектов цитофлавина в условиях экспериментальной острой гипоксической гипоксии.

Цитофлавин – новый фармакологический препарат со свойствами антигипоксанта и антиоксиданта, предложенный фирмой «Полисан», 2000г.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 360 беспородных белых мышах – самцах массой 20-22 г.

Острую экзогенную гипоксическую гипоксию моделировали, помещая животного в герметически закрытый сосуд объемом 250 мл. Продолжительность жизни животных без медикаментозной коррекции составляла в среднем 32,2 мин.

Проведена сравнительная оценка состояния процессов липопероксидации и активности антиоксидантной системы крови в 3-х группах наблюдения:

1. в интактной группе животных;
2. в группе животных с экспериментальной гипоксической гипоксией без медикаментозной коррекции;
3. в группе животных с экспериментальной гипоксией, развивающейся на фоне предварительного введения цитофлавина.

Цитофлавин вводили внутривенно в дозе 1,2 мл/кг за 5 мин до моделирования гипоксии.

О состоянии процессов липопероксидации судили по содержанию в крови гидроперекисей липидов (ГПЛ) и малонового диальдегида (МДА), определяемых общепринятыми спектрофотометрическими методами [4,9]. О состоянии ферментного звена антиоксидантной системы крови судили по активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, определяемых соответственно спектрофотометрическими методами исследования в модификации Fried R. et al., 1975; Copen S. et al., 1970. О состоянии неферментного звена антирадикальной защиты клеток судили по уровню витамина Е в сыворотке крови [3]. Одновременно определяли уровень общих сульфгидрильных групп (-SH-) [10], перекисную резистентность эритроцитов (ПРЭ) [8]. Интегративным показателем оценки состояния аутоинтоксикации явилось определение молекул средней массы (МСМ) в сыворотке крови [6].

Результаты исследований были подвергнуты статистическому анализу с помощью программ Statistica 99 (Версия 5.5 А, «Statsoft, Inc», г. Москва, 1999); «Microsoft Excel, 97 SR-1» (Microsoft, 1997). Проведен расчет коэффициентов линейной корреляции.

Результаты и их обсуждение Как показали результаты проведенных исследований закономерными особенностями системных метаболических расстройств, формирующихся на фоне острой гипоксической гипоксии, является активация процессов липопероксидации, недостаточность ферментного и неферментного звеньев антиоксидантной системы крови с последующей дестабилизацией биологических мембран.

Об этом свидетельствовало избыточное накопление в крови ГПЛ и МДА (табл. 1), снижение активности СОД и уровня витамина Е в крови (табл. 2). Показателями абсолютной недостаточности антирадикальной защиты клеток явилось снижение общих SH – групп в сыворотке крови и ПРЭ (табл. 2).

Характерным признаком острой гипоксической гипоксии явилось увеличение содержания в крови МСМ (табл. 1).

Целью последующих экспериментальных исследований явилось определение возможности медикаментозной коррекции обнаруженных метаболических сдвигов и соответственно депотенцирование молекулярно-клеточных механизмов развития гипоксической дезорганизации структуры и функции клеток различных органов и тканей.

Для частичного решения этого вопроса использовали введение цитофлавина, предшествующее развитию гипоксической гипоксии.

Как известно, цитофлавин является комплексным лекарственным препаратом, обладающим свойством антигипоксанта субстратного и регуляторного действия, а также антиоксиданта. Основными метаболическими активными компонентами цитофлавина являются янтарная кислота, никотинамид, рибоксин и рибофлавин мононуклеотид.

Как показали результаты исследований, цитофлавин подавляет чрезмерную интенсификацию липопероксидации и обеспечивает частичную реактивацию ферментного звена антиоксидантной системы крови.

Так, введение цитофлавина, предшествующее развитию гипоксической гипоксии, приводило к снижению уровня МДА, ГПЛ по сравнению с таковыми показателями в группе животных с гипоксией без медикаментозной коррекции (табл. 1).

Одновременно имело место возрастание активности СОД. Уровень витамина Е оставался сниженным, как и в опытах без медикаментозной коррекции. Активность каталазы несколько снижалась по сравнению с таковыми показателями без медикаментозной коррекции, но оставалась значительно выше показателей контроля (табл. 2).

Введение цитофлавина обеспечивало повышение стабильности эритроцитарных мембран и соответственно ПРЭ, а также увеличение уровня SH – групп, не достигающее, однако, показателей нормы (табл. 2).

Цитофлавин препятствовал развитию аутоинтоксикации, на что указывала нормализация уровня МСМ в сыворотке крови животных с гипоксической гипоксией, развивающейся на фоне медикаментозной коррекции (табл. 1). Положительные метаболические эффекты цитофлавина сопровождались резким увеличением продолжительности жизни животных до 52,2 мин. ($p > 0,001$) [1].

Касаясь механизмов выявленного нами феномена депотенцирования метаболических расстройств при участии цитофлавина в условиях гипоксической гипоксии необходимо обратиться к следующим фактам. Как известно, наиболее зависимым от радикалов «субстратным» участком дыхательной цепи является НАД – дегидрогеназа – убихинон, что свидетельствует о целесообразности активации альтернативных НАД – зависимых метаболических потоков и, прежде всего сукцинатдегидрогеназного шунта в условиях острой гипоксии. Именно таким свойством – вызывать активацию сукцинатдегидрогеназы – железосернистого флавопротеина – обладает один из компонентов цитофлавина – витамин В₂ – рибофлавина мононуклеотид. Рибофлавин оказывает эффект антигипоксанта за счет увеличения активности флавинредуктаз, а его антиоксидантная активность связана со способностью обеспечивать восстановление глутатиона.

Установлено, что для восстановления дыхательной цепи митохондрии необходима активация не только флавинзависимых ферментов, но и никотинадениннуклеотид (НАД) – зависимых ферментов.

Один из компонентов цитофлавина – рибофлавина – никотинамид активирует НАД-зависимые ферменты клеток, в том числе антиоксидантные компоненты убихиноновых оксиредуктаз, защищающие мембраны клеток от деструктивного действия свободных радикалов.

Третий компонент цитофлавина – янтарная кислота – усиливает активность НАД-зависимых ферментов, дезактивирует пероксидазы в митохондриях.

И, наконец, последний компонент – рибоксин – агонист пуриnergических рецепторов, оказывает выраженные метаболические эффекты через ГТФ – связанные белки (Gi – белки), усиливает энергообеспечение клеток.

Таким образом, все компоненты цитофлавина обладают взаимопотенцирующим антигипоксическим и антиоксидантным действием, препятствует развитию гипоксического некролиза, пролонгирует время выживания животных при острой экзогенной гипоксической гипоксии.

Результаты проведенных исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Эффективная коррекция метаболических сдвигов возможна спустя 30 мин с момента развития острой гипоксической гипоксии с помощью комплексного препарата – цитофлавина.
2. Цитофлавин обеспечивает активацию НАД – зависимых, а также флавинзависимых дегидрогеназ, усиливает энергообеспечение клеток, а также их антирадикальную защиту в процессе активации убихиноновых оксиредуктаз и восстановления глутатиона.

Таблица 1. Влияние цитофлавина на показатели липопероксидации крови и аутоинтоксикации при острой экспериментальной гипоксической гипоксии

| Группы наблюдения | Контроль | Острая гипоксическая гипоксия | | | |
|---------------------------------------|------------|--------------------------------|-------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | | На фоне плацебо (физ. раствор) | | На фоне введения цитофлавина | |
| | | М±m | М±m | p/p1 | М±m |
| Изучаемые показатели | М±m | М±m | p/p1 | М±m | p/p1 |
| Малоновый диальдегид (МДА), мкмоль/мл | 3,42±0,062 | 6,75±0,373 | p<0,001 p1>0,5 | 4,05±0,052 | p<0,001 p1<0,001 p2<0,001 |

| | | | | | |
|--|------------|-------------|-------------------|--------------|--------------------------------|
| Гидроперекиси липидов (ГПЛ), ед/мл цельной крови | 3,46±0,074 | 5,51± 0,153 | p<0,001 p1>0,5 | 3,21± 0,046 | p<0,05 p1<0,001 p2<0,001 |
| МСМ, ед. экс. сыворотка крови | 0,23±0,004 | 0,27±0,003 | p<0,001 p1>0,5 | 0,228±0,0054 | p>0,5 p1<0,001 p2<0,001 |

Примечание: n - во всех группах наблюдения – 16.

p – рассчитано по отношению к контролю;

p1 – рассчитано по отношению к группе животных с гипоксической гипоксией без медикаментозной коррекции;

p2 – рассчитано по отношению к плацебо (физ. раствор).

Таблица 2. Влияние цитофлавина на показатели антиоксидантной системы крови при острой экспериментальной гипоксической гипоксии

| Группы наблюдения Исследуемые показатели | Контроль | Острая гипоксическая гипоксия | | | |
|---|-------------|---|-------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | | На фоне введения плацебо (физ. раствор) | | На фоне введения цитофлавина | |
| | | M±m | M±m | p/p1 | M±m |
| Каталаза, мкЕ/л, цельная кровь | 2,91±0,083 | 4,61±0,249 | p<0,001 p1>0,5 | 3,39± 0,054 | p<0,001 p1<0,001 p2<0,001 |
| Супероксиддисмут аз (СОД), ед/мл, цельная кровь | 415,9±10,06 | 340,8±17,48 | p<0,001 p1>0,5 | 381,9±10,15 | p<0,05 p1<0,001 p2<0,001 |
| ПРЭ, у.е. | 1,64±0,092 | 2,27±0,121 | p<0,001 p1>0,5 | 1,33±0,103 | p<0,05 p1<0,001 p2<0,001 |
| Витамин Е, у.е., сыворотка крови | 24,71±1,102 | 17,59±1,011 | p<0,001 p1>0,5 | 18,05±1,531 | p<0,005 p1<0,001 p2<0,001 |
| SH-группы, ммоль/л, кровь | 2,27±0,073 | 1,02±0,067 | p<0,001 p1>0,5 | 1,68±0,033 | p<0,001 p1<0,001 p2<0,001 |

Примечание: n - во всех группах наблюдения – 16.

p – рассчитано по отношению к контролю;

p1 – рассчитано по отношению к группе животных с гипоксической гипоксией без медикаментозной коррекции;

p2 – рассчитано по отношению к плацебо (физ. раствор).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Бизенкова М.Н., Романцов М.Г., Чеснокова Н.П. Метаболические эффекты антиоксидантов в условиях острой гипоксической гипоксии // Фундаментальные исследования. – 2006. - №1. – С. 17 – 21.
2. Бизенкова М.Н., Чеснокова Н.П., Романцов М.Г. О роли активации процессов липопероксидации в механизмах ишемического повреждения миокарда // Современные наукоемкие технологии. – 2006. - №2. – С. 26-31
3. Габриэлян Н.И. Методы определения витамина Е в сыворотке крови / Н.И. Габриэлян, Э.Г. Левицкий, О.И. Щербакова // Тер. архив. – 1983. - №6. – С. 76 – 78.
4. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мешкорудная // Лаб. дело. – 1983. - №3. – С. 33-35.
5. Зайцев В.Г., Закревский В.И. Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Вестник Волгоградской медицинской академии (ВМА; Тр., т. 54, вып. 4) – Волгоград, 1998. – С. 49-53.
6. Ковалевский А.Н. Замечания по скрининговому методу определения молекул средних масс / А.Н. Ковалевский, О.Е. Нифантьев // Лаб. дело. – 1989. – №10. – С. 35-39.
7. Патологическая физиология и биохимия: Учебное пособие для ВУЗов / - М.: Издательство «Экзамен». 2005. – 480с. – с.140-151.
8. Покровский А.А. К вопросу о перекисной резистентности эритроцитов / А.А. Покровский, А.А. Абраров // Вопр. питания. – 1964. - №6. – С. 44-49.
9. Суплонов С.Н. Суточные и сезонные ритмы перекисей липидов и активности супероксиддисмутазы в эритроцитах у жителей средних широт и Крайнего Севера / С.Н. Суплонов, Э.Н. Баркова // Лаб. дело. – 1986. - №8. – С. 459 – 463.
10. Фоломеев В.Ф. Фотоколориметрические ультрамикрометод количественного определения сульфгидрильных групп белка и небелковых соединений крови / В.Ф. Фоломеев. // Лаб. дело. – 1981. - №1. – С. 33-35.