№ 6 - 2013 г.
14.00.00 медицинские и фармацевтические науки

УДК 616.153.915:615.363

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ «ТИОФАН» И «α-ТОКОФЕРОЛ» ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

С. Н. Луканина[1], А. В. Сахаров[1], А. Е. Просенко[1], А. В. Ефремов[2]

[1]ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» (г. Новосибирск)
[2]ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Новосибирск)

На модели глюкокортикоид-индуцированного окислительного стресса у крыс в плазме крови исследована специфическая активность полифункционального серосодержащего антиоксиданта нового поколения «Тиофан» и фармакопейного «α-токоферол». Показатели уровня развития окислительного стресса оценивали методами хемилюминесцентного и спектрофотометрического анализов по изменению активности в плазме крови супероксиддисмутазы, каталазы и содержанию малонового диальдегида и диеновых коньюгатов. Доказано, что в условиях глюкокортикоид-индуцированного окислительного стресса антиоксидант «Тиофан» по уровню специфической активности достоверно превосходит «α-токоферол».

Ключевые слова: окислительный стресс, активные кислородные метаболиты, ферменты антиоксидантной защиты, антиоксиданты.

Луканина Светлана Николаевна — кандидат биологических наук, доцент кафедры анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет», рабочий телефон 8 (383) 244-34-50

Сахаров Андрей Валентинович — доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии и методики обучения биологии ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет», e-mail: eav48@yandex.ru

Просенко Александр Евгеньевич — доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой химии ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет», e-mail: eav48@yandex.ru

Ефремов Анатолий Васильевич — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН, доктор социологических наук, академик МАН ВШ, заслуженный деятель науки РФ, академик РАЕН, почетный профессор Тасманского

университета (Австралия), почетный профессор госпиталя Святой Антония (Германия), почетный профессор Кыргызской государственной академии, действительный член Всемирной академии медицины Альберта Швейцера (Варшава), заведующий кафедрой патологической физиологии и клинической патофизиологии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 225-39-78, e-mail: eav48@yandex.ru

---

Введение. Свободнорадикальное перекисное окисление липидов (СПОЛ) является важным компонентом системы регуляции окислительно-восстановительных процессов в клетках различных тканей [8]. Считается, что биологическая значимость процессов СПОЛ связана с участием данных реакций в обеспечении поддержания физико-химических свойств биологических мембран, регуляции состояния внутриклеточных редокс-систем, участвующих в реализации важнейших клеточных реакций — пролиферации, дифференцировки и апоптоза [5]. По своей сути СПОЛ представляет собой сложный, многостадийный процесс, контролируемый ферментативными и неферментативными антиоксидантными системами [1]. Важно отметить, что усиление свободнорадикальных процессов при различных патологических процессах и нарушение существующего в физиологических условиях баланса между анти- и прооксидантными системами приводит к развитию окислительного стресса (ОС).

В современной интерпретации под ОС понимается состояние превышения уровня липопероксидации на фоне депрессии системы антиоксидантной защиты [3, 5]. При этом в качестве основных «инструментов» окислительного стресса выступают активные формы кислорода (АФК), атакующие и разрушающие биологически важные молекулы [10]. Как известно, АФК отличаются способностью практически мгновенно реагировать с контактирующими с ними молекулами-мишенями. Прежде всего, к ним относятся мембранные белки и липиды, а также гликопротеины и нуклеиновые кислоты. В этом случае АФК выступают в качестве основных медиаторов клеточного повреждения, а компоненты ферментативного и неферментативного звеньев системы антиоксидантной защиты выступают в роли инструментов регуляции образования и активности АФК [5]. Являясь неспецифической реакцией организма при воздействии на него различных факторов, СПОЛ рассматривается в качестве одного из ключевых, но вместе с тем недостаточно изученных механизмов повреждения клеток различный тканей и органов. Универсальность развития ОС при различных патологических состояниях определяет необходимость поиска мощных антиоксидантных соединений для управления свободнорадикальными процессами. В этой связи исследование в сравнительном аспекте специфической активности полифункционального актиоксидантного соединения нового поколения «Тиофан» и «α-токоферол» определяет высокую актуальность настоящего исследования.

Целью исследования явилась оценка эффективности применения антиоксидантов «Тиофан» и «α-токоферол» для управления процессами липопероксидации в организме крыс при моделировании глюкокортикоид-индуцированного ОС.

Материалы и методы. Эксперимент проводили на взрослых крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. В соответствии с целью исследования всех животных распределили на 5 групп — интактную, основную и три группы сравнения (ГС) по 10 особей в каждой. У крыс основной группы и всех ГС индуцировали развитие ОС путем введения преднизолона (per os) в дозе 50 мг/кг в течение 14-ти дней. Через 3 часа после приема

преднизолона крысы основной группы таким же способом получали 0,2 мл водопроводной воды, 1-й ГС — 0,2 мл масляного раствора синтетического серосодержащего полифункционального антиоксиданта «Тиофан» в дозе 100 мг/кг веса, 2-й — масляный раствор натурального антиоксиданта «α-токоферол» в таком же объеме и дозе. Поскольку «Тиофан» и «α-токоферол» растворяли в растительном масле, животным 3-й ГС после приема преднизолона вводили только 0,2 мл растительного масла.

На 15-е сутки крыс всех групп выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза. В плазме крови животных всех групп определяли содержание малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК). В исследуемых образцах определяли также активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты — супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). Оценку активности СОД и КАТ осуществляли хемилюминесцентным методом [2, 9], а содержание МДА и ДК — спектрофотометрически [6, 7].

Для статистической обработки полученных результатов использовали метод вариационной статистики по t-критерию Стьюдента, отличия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. При анализе маркеров ОС в плазме крови крыс установлено, что у животных основной группы и всех ГС отмечается повышение уровня липопероксидации в исследуемых образцах крови по сравнению с аналогичными показателями крыс интактной группы (рис. 1). Полученные результаты позволяют сделать 2 заключения. Первое — длительное использование глюкокортикоидов приводит к повышению процессов липопероксидации. Второе — фармакопейный антиоксидант «α-токоферол» и новый полифункциональный антиоксидант «Тиофан» различаются по уровню их специфической активности. При сравнительном анализе содержания в плазме крови крыс ДК и МДА установлено, что использование антиоксиданта «Тиофан» для снижения уровня липопероксидации приводит к достоверному снижению исследуемых показателей по сравнению с образцами крыс основной группы. В то же время применение α-токоферола показывает лишь тенденцию к снижению уровня маркеров ОС.

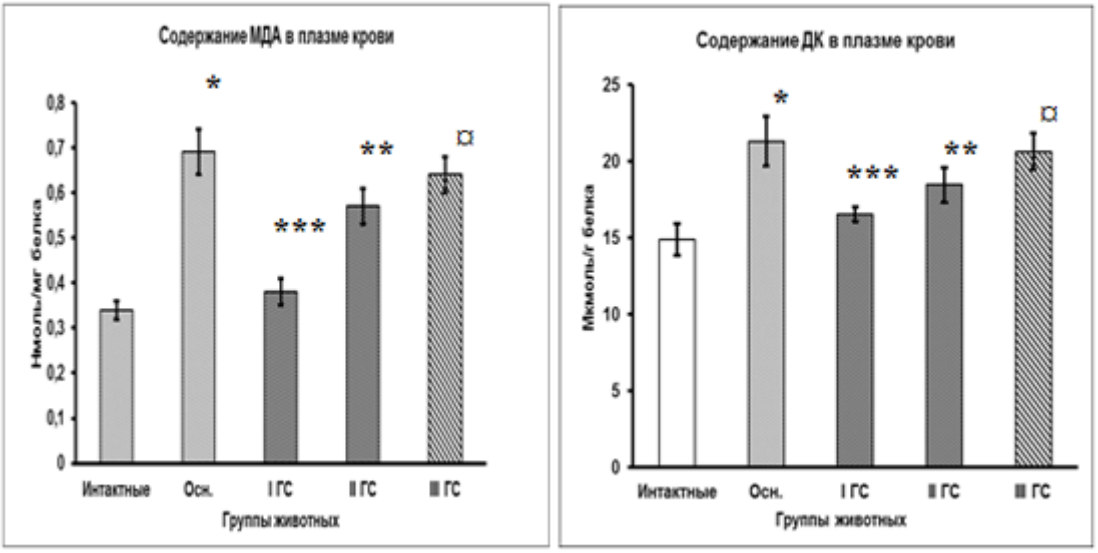

Рис. 1. Содержание продуктов СПОЛ в плазме крови крыс: Осн. — основная группа; I ГС — первая ГС; II ГС — вторая ГС; III ГС — третья ГС; * — отличия между интактными и животными основной группы; ** — отличия между интактными и животными 2-й ГС; *** — отличия между животными основной группы и 1-й ГС; ¤ — отличия между животными

1-й и 3-й ГС (p ≤ 0,05)

При исследовании активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты было установлено, что исследуемые показатели в плазме крови крыс основной и всех ГС снижаются по сравнению с аналогичными значениями крыс интактной группы (рис. 2). Полученные результаты позволяют считать, что длительное применение глюкокортикоидов приводит к развитию глюкокортикоид-индуцированного ОС. При дифференциальной оценке специфической активности двух антиоксидантов между ними установлены достоверные различия. Активность СОД и КАТ в плазме крови крыс 1-й ГС на 14,98 и 39,32 % превышает значения показателей у крыс 2-й ГС.

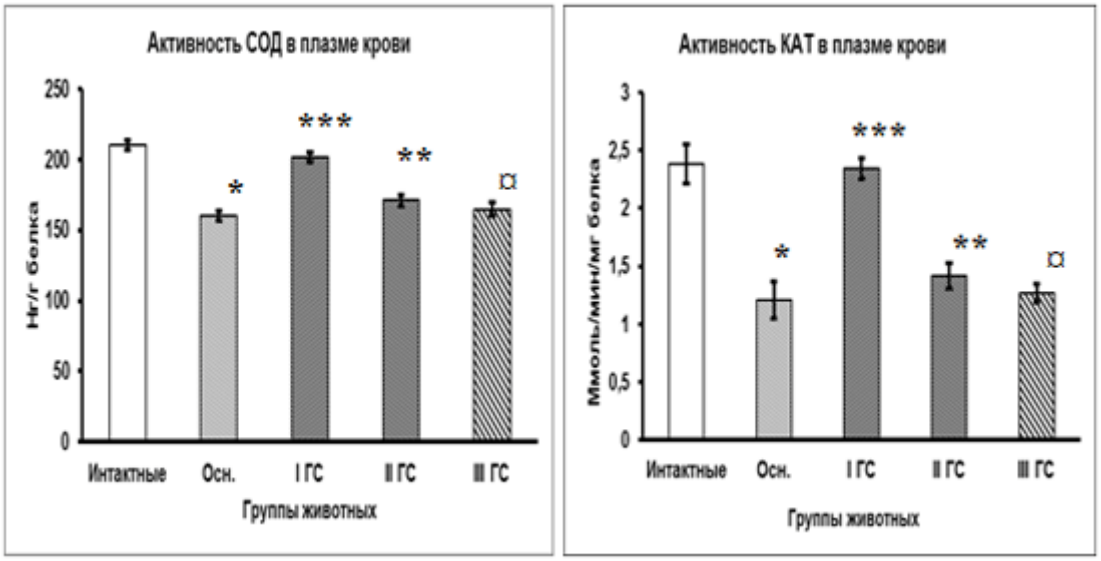

Рис. 2. Активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты в плазме крови крыс: Осн. — основная группа; I ГС — первая ГС; II ГС — вторая ГС; III ГС — третья ГС; * — отличия между интактными и животными основной группы; ** — отличия между интактными и животными 2-й ГС; *** — отличия между животными основной группы и 1-й ГС; ¤ — отличия между животными 1-й и 3-й ГС (p ≤ 0,05)

Результаты проведенного исследования показали, что на фоне длительного приема глюкокортикоидов у крыс регистрируется повышение уровня липопероксидации и снижается активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты. Принимая во внимание широкую распространенность использования глюкокортикоидов в медицинской практике, становятся понятными масштабность развития ОС у людей и актуальность поиска эффективных антиоксидантных соединений для управления свободнорадикальными процессами в организме. Сочетанное с глюкокортикоидами использование синтетического серосодержащего полифункционального антиоксиданта «Тиофан» оптимизирует процессы СПОЛ в плазме крови и приближает показатели липопероксидации у крыс к значениям у интактных животных. Отсутствие выраженного антиоксидантного эффекта у α-токоферола может объясняться его молекулярным строением. Известно, что молекулы α-токоферола, окисляясь, теряют свои биологические свойства, что делает это антиоксидантное соединение непригодным для использования по его прямому назначению. Кроме того, в процессе окисления α-токоферола происходит образование о-токоферилхинона — его биологического антагониста [4].

Выводы

1. В условиях глюкокортикоид-индуцированного ОС полифункциональный серосодержащий антиоксидант «Тиофан» проявляет выраженный специфический

эффект.
2. Полифункциональный серосодержащий антиоксидант «Тиофан» может рассматриваться в качестве перспективного препарата для использования в комплексном лечении осложнений глюкокортикоидной терапии.

Список литературы

1. Дубинина Е. Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса / Е. Е. Дубинина // Вопр. мед. химии. — 2001. — Т. 47, № 6. — С. 561–581.
2. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–19.
3. Куликов В. Ю. Роль окислительного стресса в регуляции метаболической активности внеклеточного матрикса соединительной ткани (обзор) [Электронный ресурс] / В. Ю. Куликов // Медицина и образование в Сибири : электронный научный журнал. — 2009. — № 4. — Режим доступа : http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=363
4. Мелентьева Г. А. Фармацевтическая химия некоторых природных веществ с сильным биологическим действием / Г. А. Мелентьева. — М. : Изд-во мед. института им. И. М. Сеченова, 1984. — С. 73–78.
5. Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньшикова. — М. : «Слово», 2006. — 553 с.
6. Определение резистентности к окислению липопротеинов низкой плотности сыворотки крови: метод. рекомендации / Сост. Ю. И. Рагина, М. И. Душкин. — Новосибирск, 1998. — 11 с.
7. Стальная И. Д. Современные методы в биохимии / И. Д. Стальная. — М. : Медицина, 1977. — 391 с.
8. Якубовский С. В. Динамика некоторых показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у больных острым холециститом / С. В. Якубовский, С. В. Ткачев, Д. П. Кривонос // БМЖ. — 2007. — № 2 (20). — С. 41–47.
9. Laihia J. K. Lucigenin and linoleate enhanced chemiluminescent assay for superoxide dismutase activity / J. K. Laihia // Free Radic. Biol. Med. — 1993. — Vol. 14. — P. 457–461.
10. Yoshikawa T. What Is Oxidative Stress? / T. Yoshikawa // JMAJ. — 2002. — Vol. 45 (7). — P. 271–276.

ASSESSMENT OF SPECIFIC ACTIVITY OF ANTIOXIDANTS «THIOPHANE» AND «α-TOCOPHEROL» AT MODELLING OXIDIZING STRESS

S. N. Lukanina[1], A. V. Sakharov[1], A. E. Prosenko[1], A. V. Efremov[2]

[1]FSBEI HPE «Novosibirsk State Pedagogical University» (Novosibirsk c.)
[2]SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk c.)

Specific activity of multifunctional sulfur-containing antioxidant of new generation «Tiophane» and officinal «α-tocopherol» is investigated on model of glucocorticoid-induced oxidizing stress at rats in blood plasma. Indicators of level of development of oxidizing stress were estimated by methods of chemiluminescence and spectrophotometric analyses on change of activity in blood plasma superoxide dismutase, catalases and to the maintenance of low-new dialdehyde and diene of conjugates. It is proved that in conditions of glucocorticoid-induced oxidizing stress «Tiophane» authentically surpasses antioxidant in level of specific activity «α-tocopherol».

***Keywords**:* oxidizing stress, active oxygen metabolites, enzymes of antioxidatic protection, antioxidants.

About authors:

Lukanina Svetlana Nikolaevna — candidate of biological sciences, assistant professor of anatomy, physiology and health and life safety at FSBEI HPE «Novosibirsk State Pedagogical University», office phone: 8 (383) 244-34-50

Sakharov Andrey Valentinovich — doctor of biological sciences, professor, head of chair of zoology and biology training technique at FSBEI HPE «Novosibirsk State Pedagogical University», e-mail: eav48@yandex.ru

Prosenko Alexander Evgenyevich — doctor of chemical sciences, professor, head of chemistry at FSBEI HPE «Novosibirsk State Pedagogical University», e-mail: eav48@yandex.ru

Efremov Anatoly Vasilevich — doctor of medical sciences, professor, corresponding member of the RAMS, doctor of sociological sciences, academician of IAS HS, honored worker of science of the Russian Federation, academician of the RANS, honourable professor of Tasmanian university (Australia), honourable professor of hospital of Sacred Antonius (Germany), honourable professor of Kyrgyz state academy, active member of the World academy of medicine of Albert Schweitzer (Warsaw), head of pathological physiology and clinical pathophysiology chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8(383) 225-39-78, e-mail: patfiz_ngmu@mail.ru

List of the Literature:

1. Dubinina E. E. Role of active forms of oxygen as alarm molecules in metabolism of tissues at condition of oxidizing stress / E. E. Dubinina // Quest of. medical chemistry. — 2001. — T. 47, № 6. — P. 561-581.
2. Korolyuk M. A. Method of determination of activity of catalase / M. A. Korolyuk // Lab. business. — 1988. — № 1. — P. 16-19.
3. Sandpipers V. Y. Role of oxidizing stress in regulation of metabolic activity of extracellular matrix of connecting tissue (review) [electron resource] / V. Y. Kulikov // Medicine and education in Siberia: electron scientific magazine. — 2009. — № 4. — Access mode: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=363
4. Melentyeva G. A. Pharmaceutical chemistry of some natural substances with strong biological effect / G. A. Melentyeva. — M.: Publishing house of medical institute of I. M. Sechenov, 1984. — P. 73-78.
5. Menshikova E. B. Oxidizing stress. Pro-oxidizers and antioxidants / E. B. Menshikova. — M.: «Word», 2006. — 553 P.
6. Determination of resistance to oxidation of lipoproteins of low density of blood serum: method. references / Red. Y. I. Ragina, M. I. Dushkin. — Novosibirsk, 1998. — 11 P.
7. Stalnaya I. D. Modern methods in biochemistry / I. D. Stalnaya. — M.: Medicine, 1977. — 391 P.
8. Yakubovsky S. V. Dynamics of some indicators of peroxide oxidation of lipids and antioxidatic protection at patients with acute cholecystitis / S. V. Yakubovsky, S. V. Tkachyov, D. P. Krivonos // BMJ. — 2007 . — № 2 (20). — P. 41-47.