

УДК: 615.21+616.36-092.9

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ЦЕРЕБРОЛІЗИНУ ЗА УМОВ ІНДУКОВАНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ У ГОМОГЕНАТАХ ПЕЧІНКИ

Луценко Р.В.

Українська медична стоматологічна академія

Церебралізін – збалансований комплекс пептидів і амінокислот, який застосовують при порушеннях мозкового кровообігу, нейродегенеративних захворюваннях, травмах головного мозку [14, 15]. Вплив препарату досліджено, в основному, стосовно нервової тканини, де він оптимізує метаболізм глюкози, стимулює біосинтез протеїнів, виявляє антиоксидантні (АО) властивості [10, 16]. Це призводить до покращення нейротрофічної стимуляції і підвищує адаптаційно-компенсаторні можливості нервових клітин за умов напруження адаптаційних процесів. Для нього характерні й екстрацеребральні ефекти, які в умовах гострого стресу стосуються імунокомпетентних органів, системи крові та печінки [3, 5]. Відомо, що антиоксидантна дія лікарських засобів проявляється в межах відповідних доз, вихід за які обумовлює, навпаки, прооксидантні властивості препаратів [1]. Це свідчить про необхідність більш поглибленого дослідження впливу різних концентрацій церебралізіну на процеси перекисного окиснення ліпідів у тканині печінки.

Мета роботи – дослідити антиоксидантну активність різних концентрацій церебралізіну на процеси пероксидації в гомогенатах печінки за умов індукованого перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ).

Матеріали і методи

В експериментах використовували 10% гомогенати печінки нелінійних білих щурів-самців масою 200-250 г, в яких досліджували спонтанне, індуковане ПОЛ, а також його зміни на фоні впливу церебралізіну. Процеси пероксидації в гомогенатах печінки ініціювали додаючи в модельну систему водний розчин $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, до кінцевої концентрації 10мМ, що відповідало співвідношенню

3,7 мг FeSO₄/мл гомогената в інкубаційному середовищі [7]. Суспензію клітин печінки та субклітинних компонентів інкубували при температурі 37 °С, постійно струшуючи. Проби відбирали на початку та через 45 і 90 хв інкубації. Для корекції індукованого ПОЛ використовували церебролізін – комерційний препарат фірми “Евев” (Австрія), додаючи його в інкубаційне середовище з розрахунку 10⁻⁶; 10⁻⁵; 10⁻⁴ мл/г тканини. Діапазон концентрацій був обраний з урахуванням активності препарату *in vivo* [10]. В інкубаційному середовищі визначали вміст проміжних продуктів ПОЛ, які реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБКАП) [4], а також активність супероксиддисмутази (СОД) [9] і каталази [6]. Для оцінки антиоксидантної активності різних концентрацій цереброліzinу та порівняння їх між собою за умов індукованого ПОЛ, застосовували один з методів класифікації - дискримінантний аналіз. За умовну норму приймали параметри спонтанного окиснення гомогенатів печінки, що формувало перший клас. Другий клас утворювався з показників, що описували патологічний фон (індукція ПОЛ). Якщо показники досліджуваної концентрації потрапили до одного класу з “умовною нормою”, то вона вважалась ефективною. Це можливо, якщо значення константи менше від середнього значення дискримінантної функції. За результатами середньої дискримінантної функції для кожної досліджуваної концентрації проводили порівняння їх ефективності між собою [8]. Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Ст’юдента.

Результати та обговорення

Показано, що спонтанне окиснення гомогенатів печінки підвищило вміст ТБКАП в 2,7 рази на 45-ій хв інкубації, а на 90-ій хв - у 4 рази порівняно з початковим значенням (таблиця). Активність СОД на 45-ій хв суттєво не змінилась, а наприкінці 90-ої хв зменшилась у 2 рази порівняно з вихідною. На цьому фоні активність каталази в гомогенатах печінки на 45-ій хв зросла в 1,4 рази, тоді як на 90-ій хв – в 1,8 рази порівняно з базальною активністю.

Додавання індуктора в модельну систему стимулювало ПОЛ, тобто вміст ТБКАП на 45-ій хв підвищився в 3,5 рази, а на 90-ій хв - збільшився в 5 разів

порівняно з вихідним значенням (див. таблицю). За цих умов активність СОД на 45-ій хв знизилась в 1,3 рази, а на 90-ій хв була в 2,5 рази нижчою за базальне значення. Активність каталази на 45-ій хв індукції не зазнала істотних змін, однак, наприкінці інкубації зменшилась в 2,3 рази.

Аналізуючи процеси ПОЛ і активність АО ферментів у модельній системі слід зазначити, що рівень ТБКАП, активність СОД і каталази в усіх групах дослідів суттєво не відрізнялись. Порівняння процесів стимульованої пероксидації зі спонтанним окисненням гомогенатів показало, що вміст інтермедіатів ПОЛ вірогідно збільшився як на 45-ій, так і на 90-ій хв інкубації. На цьому фоні активність СОД на 45-ій хв зменшилась в 1,4 рази ($p < 0,02$), а на 90-ій – суттєво не відрізнялась від такої при спонтанному окисненні. Ініціація ПОЛ зменшила активність каталази на 45-ій хв в 1,4 рази ($p < 0,05$) тоді, як наприкінці інкубації цей показник відрізнявся порівняно зі спонтанним окисненням в 4,1 рази ($p < 0,001$). Динаміку змін активності СОД і каталази, можна пояснити гальмуванням ферментативної ланки АО захисту надлишком субстрату, або його виснаженням [1].

Додавання церебролізину в модельну систему з розрахунку 10^{-6} мл/г тканини не впливало на вміст ТБКАП під час усього періоду спостереження (див. таблицю). На цьому фоні активність СОД і каталази на 45-ій хв дослідження істотно не змінилась, а на 90-ій хв спостерігалась тенденція до підвищення активності АО ферментів, порівняно з індукцією без препарату. За даними дискримінантного аналізу зміни, викликані церебролізином у цій концентрації в гомогенатах печінки, дозволяють віднести цю сукупність показників до другого класу, тобто патологічного фону: значення константи становить $-85,69$; середнє значення дискримінантної функції - $-86,95$.

Церебролізін з розрахунку 10^{-5} мл/г тканини викликав тенденцію до зменшення вмісту проміжних продуктів ПОЛ на 45-ій хв і запобігав їх підвищенню наприкінці інкубації (див. таблицю). За цих умов активність СОД і каталази на 45-ій хв дослідження були на рівні контрольних значень. Однак, препарат у цій концентрації на 90-ій хв індукції сприяв нормалізації АО захисту

в суспензії гепатоцитів. Так, активність каталази збільшилась в 1,9 рази ($p < 0,002$), а СОД – в 2,3 рази ($p < 0,001$) порівняно з контролем. За даними дискримінантного аналізу зміни процесів пероксидації, викликані церебролізином у концентрації 10^{-5} мл/г тканини печінки, дозволяють віднести сукупність цих параметрів до патологічного фону: значення константи - $-85,69$; середнє значення дискримінантної функції - $-108,69$.

Додавання церебролізину до інкубаційного середовища в концентрації 10^{-4} мл/г тканини зменшувало вміст ТБКАП на 45-ій хв і 90-ій хв в 1,3 рази ($p < 0,02$) і в 1,7 рази ($p < 0,002$) відповідно, а також вірогідно стимулювало активність СОД під час всього періоду спостережень порівняно з таким без препарату (див. таблицю). Це супроводжувалось збільшенням активності каталази в суспензії гепатоцитів на 45-ій хв в 1,4 рази ($p < 0,05$), а на 90-ій хв експерименту – в 2,5 рази ($p < 0,002$) порівняно з гомогенатами без церебролізину. За даними дискримінантного аналізу зміни, викликані церебролізином (10^{-4} мл/г) у модельній системі, дозволяють віднести досліджувану сукупність показників до умовної норми: значення константи становить $-85,69$; середнє значення дискримінантної функції - $-68,33$.

Як бачимо, в досліджах *in vitro* церебролізин у концентрації 10^{-6} мл/г тканини не впливав на процеси пероксидації, в концентрації 10^{-5} мл/г проявляв антиоксидантні властивості лише на 90-ій хв інкубації гомогенатів печінки і максимальну антиоксидантну дію у всі терміни дослідження проявляв у концентрації 10^{-4} мл/г тканини. Останнє підтверджує найбільший показник середнього значення дискримінантної функції.

Зменшення вмісту інтермедіатів ПОЛ під впливом церебролізину, на нашу думку, пов'язано як з його безпосередньою АО дією, так і за рахунок змін структури біологічних мембран за умов стимульованого ПОЛ. Це узгоджується з даними інших авторів, які показали, що церебролізин здатен попереджати нейродегенеративну дію іонів заліза в досліджах *in vitro* [13]. Зростання активності СОД і каталази в гомогенатах печінки, зі збільшенням концентрації препарату, вказує на прямий модулюючий вплив церебролізину на активність

АО ферментів. Подібну дію церебралізіну спостерігали в тканинах головного мозку за умов експериментальної патології [11]. Такі особливості АО активності характерні також для інших препаратів з ноотропною дією, у яких відмічаються периферичні метаболічні ефекти [5]. Як бачимо, до периферичних механізмів дії церебралізіну слід включати його безпосередню АО активність та здатність підвищувати потужність ферментативної ланки АО захисту в ефекторних органах.

Таким чином, у модельній системі церебралізіну у концентрації 10^{-4} мг/г найбільш ефективно попереджував розвиток надлишкової пероксидації в тканини печінки. Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури стосовно дозозалежної дії у церебралізіну, яку він виявляє в модельних дослідах і на рівні системних поведінкових реакцій у щурів [2, 12]. Наявність прямої антиоксидантної активності у церебралізіну дає підстави для подальшого вивчення його периферичних метаболічних властивостей та їх механізмів.

Висновки:

1. Церебралізіну в модельній системі на основі гомогенатів печінки виявляє прямі антиоксидантні властивості, які характеризуються обмеженням перекисного окиснення ліпідів і стимуляцією активності супероксиддисмутази та каталази.

2. Антиоксидантна активність церебралізіну в гомогенатах печінки зростає зі збільшенням концентрації препарату і максимально виражена при концентрації 10^{-4} мг/г тканини.

Таблиця

Вплив церебролізину на процеси пероксидації у модельній системі на основі гомогенатів печінки ($M \pm m$)

Групи дослідів	ТБКАП, нмоль/г			СОД, од. акт.			Каталаза, ммоль/хв		
	Базальний рівень	Через 45хв	Через 90хв	Базальний рівень	Через 45хв	Через 90хв	Базальний рівень	Через 45хв	Через 90хв
1. Спонтанне окиснення	121,1 \pm 7,7	329,4 \pm 33	492,5 \pm 35	66,4 \pm 4,9	72,2 \pm 4,0	32,8 \pm 6,4	2,18 \pm 0,18	3,06 \pm 0,26	3,95 \pm 0,28
2. Індукція (контроль)	126,3 \pm 7,0	435,8 \pm 27*	622,0 \pm 45*	63,7 \pm 5,0	51,2 \pm 5,5*	26,2 \pm 4,5	2,16 \pm 0,18	2,22 \pm 0,15*	0,96 \pm 0,14*
3. Індукція+ церебролізин 10 ⁻⁶ мл/г	123,4 \pm 6,7	414,1 \pm 39	528,6 \pm 54	71,8 \pm 6,9	53,9 \pm 5,8	35,5 \pm 3,3	2,14 \pm 0,21	2,43 \pm 0,42	1,49 \pm 0,23
4. Індукція+ церебролізин 10 ⁻⁵ мл/г	117,9 \pm 10	373,1 \pm 22	400,5 \pm 30**	72,3 \pm 7,1	59,2 \pm 7,6	51,2 \pm 7,2**	2,21 \pm 0,20	2,62 \pm 0,19	2,24 \pm 0,24**
5. Індукція+ церебролізин 10 ⁻⁴ мл/г	121,7 \pm 11	335,1 \pm 20,6**	370,5 \pm 42**	70,6 \pm 8,3	67,9 \pm 5,2**	58,6 \pm 6,9**	2,07 \pm 1,94	3,13 \pm 0,37**	2,43 \pm 0,34**

Примітки: В кожній групі по 7 дослідів;

* - вірогідні відмінності порівняно зі спонтанним окисненням;

** - вірогідні відмінності порівняно з індукцією без препарату (контролем).

Література

1. Абрамченко В.В. Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве. (Оксидативный стресс в акушерстве и его терапия антиоксидантами и антигипоксантами).- СП б.: Издательство ДЕАП, 2001.-400с.
2. Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О., Машкова Н.В., Гусева М.Р. Антиоксидантная активность гистохрома и некоторых лекарственных препаратов, применяемых в офтальмологии// Вест. офтальмологии. – 1999. - № 4. – С. 22-24.
3. Важничка О.М. Дія церебролізину на клітинні реакції лімфоїдних органів і крові при гострому стресі// Фармац. журнал – 2000. – № 4. – С. 84-87.
4. Гаврилов В.Б., Гаврилова А. Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тио-барбитуровой кислотой// Вопр. мед. химии. - 1987. – Т. 33, вып.1. - С. 118-122.
5. Девяткина Т.О., Важничая Е.М., Луценко Р.В. Особенности процессов перекисного окисления липидов в различных тканях при остром стрессе и его коррекции пирацетамом и церебролизином// Эксперим. и клин. фармакол. – 2000. – Т.63, №4. – С. 38-41.
6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы// Лабораторное дело. - 1988. - № 1. - С. 16-19.
7. Кузьменко Д.И., Лаптев Б.И. Оценка резерва липидов сыворотки крови для перекисного окисления в динамике окислительного стресса у крыс// Вопр. мед. химии. - 1999. - Т.45, вып.1. - С. 47-52.
8. Лапач Н.С., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: МОРИОН, 2000. – 320 с.
9. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы// Вопр. мед. химии. – 1999. - Т.45, вып. 3. – С. 263 – 272.

10. Boado R.J. Brain – derived peptides increase blood – brain barrier GLUT1 glucose transport expression via mRNA stabilization// *Neurosci. Lett.* – 1998. – Vol. 255. - №3. – P. 147-150.
11. Gonzales M., Francis L., Castellano O. Antioxidant systemic effect of short-term Cerebrolysin administration// *J. Neural. Transm.* – 1998. – Vol.53. – P. 333-341.
12. Hurter-Paier B., Eggenreich U., Windisch M. Dose-dependent effects of two protein-free peptide derivatives on the passive avoidance reaction of rats// *Arzneimittelforschung/ Drug Research.* – 1996. – Vol. 46, №3. – P. 242-246.
13. Hutter-Paier B. et al. Further evidence that Cerebrolysin protects cortical neurons from neurodegeneration in vitro// *J. Neural. Transm.* – 1998. - Vol. 53. – P. 363-372.
14. Koppi S. et al. Haemodilutiontherapie mit nervenrellestoffwechsel – aktiver Therapie beim ischaemischen insult-ennutigende Resultate einer Vergleichsstudie// *Wein. Med. Wschr.* – 1996. – V. 146. – P. 41-48.
15. Rütter M. et al. Efficacy of the peptidergic nootropic drug Cerebrolysin in patients with senile dementia of Alzheimer's type (SDAT)// *Pharmacopsychiatry.* – 1994. – V. 27. – P. 32-40.
16. Sugita Y. et al. The protective effect of FPF 1070 (Cerebrolysin) on delayed neuronal radicals with salicylic acid// *Brain and Nerv.* – 1993. - Vol. 45. - P. 325-331.

Реферат

Дослідження антиоксидантної активності церебrolізину за умов індукованого перекисного окислення ліпідів у гомогенатах печінки

Луценко Р.В.

В експериментах досліджували антиоксидантні (АО) властивості церебrolізину (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} мл/г тканини), використовуючи модельну систему на основі гомогенатів печінки. Процеси пероксидації ініціювали шляхом додавання водного розчину $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. В інкубаційному середовищі вивчали процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), активність супероксиддисмутази (СОД) і каталази. Церебrolізин з розрахунку 10^{-6} мл/г тканини істотно не впливав на процеси пероксидації і активність АО ферментів в модельній системі. Збільшення концентрації препарату до 10^{-5} мл/г вірогідно змінювало вміст інтермедіатів ПОЛ, активність СОД і каталази на 90-ій хв інкубації. Церебrolізин у концентрації 10^{-4} мл/г тканини вірогідно обмежував вміст проміжних продуктів ПОЛ і підвищував АО захист в гомогенатах печінки під час всього періоду дослідження. Встановлено, що церебrolізин виявляє прямі АО властивості, які найбільш виражені у концентрації 10^{-4} мл/г тканини печінки.

Реферат

Изучение антиоксидантной активности церебролизина в условиях индуцированного перекисного окисления липидов в гомогенатах печени

Луценко Р.В.

В экспериментах изучали антиоксидантные (АО) свойства церебролизина (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} мл/г ткани), используя модельную систему из гомогенатов печени. Процессы пероксидации в которой инициировали путем добавления водного раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. В инкубационной среде изучали процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Церебролизин из расчета 10^{-6} мл/г ткани существенно не влиял на процессы пероксидации и активность АО ферментов в модельной системе. Увеличение концентрации препарата до 10^{-5} мл/г ткани достоверно изменяло содержание интермедиантов ПОЛ, активность СОД и каталазы на 90-ой мин инкубации. Церебролизин (10^{-4} мл/г ткани) уменьшал уровень промежуточных продуктов ПОЛ, повышал АО защиту в гомогенатах печени во время всего периода исследования. Установлено, что церебролизин оказывал прямое АО действие, которое наиболее выражено в концентрации 10^{-4} мл/г ткани печени.