

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ АЛЬФА-ЛИПОЕВОЙ
КИСЛОТЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ
ПРИ ИШЕМИИ МОЗГА У КРЫС

© A. A. Шмонин,^{1, 2} Е. В. Мельникова,¹ И. В. Чурилова,³ Т. Д. Власов^{1, 2}

¹ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8, e-mail: langendorff@gmail.com;

² Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Россия, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2;

³ Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепараторов, Россия, 197110, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7

Цель исследования — изучение нейропротективной роли альфа-липоевой кислоты и супероксиддисмутазы при фокальной и общей ишемии головного мозга крысы. Исследование проводились на крысах линии Вистар ($n = 125$): 1) оценка нейропротективного эффекта при перманентной окклюзии левой средней мозговой и левой общей сонной артерии ($n = 26$); 2) исследование влияния препаратов и их комбинаций на выживаемость при окклюзии 2 сонных артерий ($n = 81$). Инфаркт-лимитирующий эффект был выявлен в группе, где альфа-липоевая кислота вводилась за 30 мин до ишемии ($p = 0.00004$). Введение супероксиддисмутазы за 30 мин до ишемии или альфа-липоевой кислоты непосредственно перед ишемией не приводило к снижению размера некроза. Введение альфа-липоевой кислоты или комбинации альфа-липоевой кислоты с супероксиддисмутазой приводило к увеличению продолжительности жизни животных ($p = 0.003$, $p = 0.013$), а применение только супероксиддисмутазы — нет ($p = 0.127$). Альфа-липоевая кислота вызывает нейропротективный эффект при фокальной и общей ишемии головного мозга. Супероксиддисмутаза не обладает защитным эффектом при ишемии.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, альфа-липоевая кислота, ишемия мозга нейропrotekция.

Рос. физiol. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 97. № 1. С. 65—71. 2011

A. A. Shmonin, E. V. Melnikova, I. V. Churilova, T. D. Vlasov. NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF LIPOIC ACID AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN THE RAT MODEL OF CEREBRAL ISCHEMIA. ¹ Saint-Petersburg I. P. Pavlov State Medical University, 197022, Saint-Petersburg, Russian Federation, L. Tolstoy str., 6/8, e-mail: langendorff@gmail.com; ² V. A. Almazov Federal Centre of Heart, Blood and Endocrinology, 197341, St. Petersburg, Russian Federation, Akkuratova str., 2.

Background: the present study was aimed at investigation of neuroprotective effects of alpha-lipoic acid (LA) and superoxide dismutase (SOD) in brain ischemia in rats. Methods: two models were used to produce brain ischemia: focal ischemia (permanent left middle cerebral artery occlusion) and permanent ligation of both CCA without subsequent reperfusion. Cu/Zn-SOD at a dose 5 mg/kg, i. v. and LA at a dose of 20 mg/kg, i. p. were injected 30 minutes prior or 5 minutes after onset of ischemia. The end-points of the study were histochemically determined: infarcti-

on size, ultrastructural changes in the cerebral tissue, and survival rate. Results: LA administration 30 minutes prior to ischemia dramatically reduced infarction size ($p < 0.001$). Injection of LA 5 minutes after beginning of ischemia did not affect the infarction size. Besides, infarction size was unchanged after injection of SOD 30 minutes prior to ischemia. Conclusion: the LA treatment regimen used in this study resulted in significant cerebral protection against ischemia. In contrast, SOD did not show any protective effects in focal and forebrain ischemia.

Key words: brain ischemia, neuroprotection, lipoic acid and superoxide dismutase.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 97. N 1. P. 65—71. 2011

Антиоксидантная терапия занимает лидирующую позицию среди других видов нейропротекции [1]. Супероксиддисмутаза относится к группе антиоксидантных ферментов, катализирующих реакцию дисмутации супероксидного радикала, одного из основных радикалов, вызывающих повреждение при ишемическом оксидативном взрыве. Альфа-липоевая кислота является кофактором пируватдигидрогеназного комплекса и может пассивно принимать участие в реакции разложения перекиси водорода за счет наличия в ее составе тиоловых групп [1]. Увеличение активности и экспрессии в клетке супероксиддисмутазы, а также увеличение внутриклеточного пула тиоловых групп может быть рассмотрено как один из эффекторных механизмов ишемического прекондиционирования [2]. Оба этих препарата могут быть использованы с профилактической (при назначении до развития инсульта) и лечебной (терапевтической — при назначении в любой срок от начала инсульта) целью [1].

По данным экспериментальных исследований известно около нескольких тысяч нейропротекторов, показавших высокую эффективность. Крупные многоцентровые плацебоконтролируемые исследования не смогли продемонстрировать эффективность фармакологических нейропротекторов при ишемическом инсульте [3]. Одна из причин неэффективности фармакологических нейропротекторов в клинических исследованиях — это некорректное проведение экспериментальных исследований, заключающееся в использовании только профилактического введения препаратов, проведения экспериментов на модели ишемии и реперфузии, пренебрегая исследованиями на модели перманентной ишемии. Таким образом, цель данного исследования — изучить нейропротективные свойства альфа-липоевой кислоты и супероксиддисмутазы при введении на различных этапах ишемии мозга, используя модель перманентной окклюзии средней мозговой артерии и двухсосудистой модели ишемии у крыс.

МЕТОДИКА

Исследование проводилось на крысах-самцах ($n = 125$) линии Вистар массой 250—300 г под тиопенталовым наркозом (75 мг/кг) в три этапа. Протокол эксперимента представлен на рис. 1. Альфа-липоевая кислота вводилась внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг, а Cu,Zn-супероксиддисмутаза — 5 мг/кг (18 000 ед./кг), внутримышечно.

На первом этапе оценивали инфаркт-лимитирующий эффект профилактического и терапевтического введения супероксиддисмутазы и альфа-липоевой кислоты при фокальной перманентной ишемии мозга. Для моделирования перманентной фокальной ишемии выполняли перевязку левой общей сонной артерии и затем перевязку корковой ветви левой средней мозговой артерии (полипропиленовая нить 7—0 Cardioint), доступ к которой осуществлялся путем трепанации [15]. Продолжительность постишемического периода составляла 48 ч, после чего животных выводили из опыта и извлекали головной мозг. Оценка величины зоны инфаркта производилась с помощью количественного анализа срезов мозга, гистохимически окрашенных хлоридом трифенилтетразолия [15]. Для этого срезы головного мозга толщиной 2 мм инкубировали в 0.1%-ном растворе трифенилтетразолия хлорида (MP Biomed., США) при $t = 37.0^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. Затем получали цифровые фотографии поверхности срезов. Анализировали 5 срезов мозга толщиной 3 мм, произведенных во фронтальной плоскости. Вычисляли средний относительный показатель площади инфаркта. Группа 1 ($n = 10$) — пе-

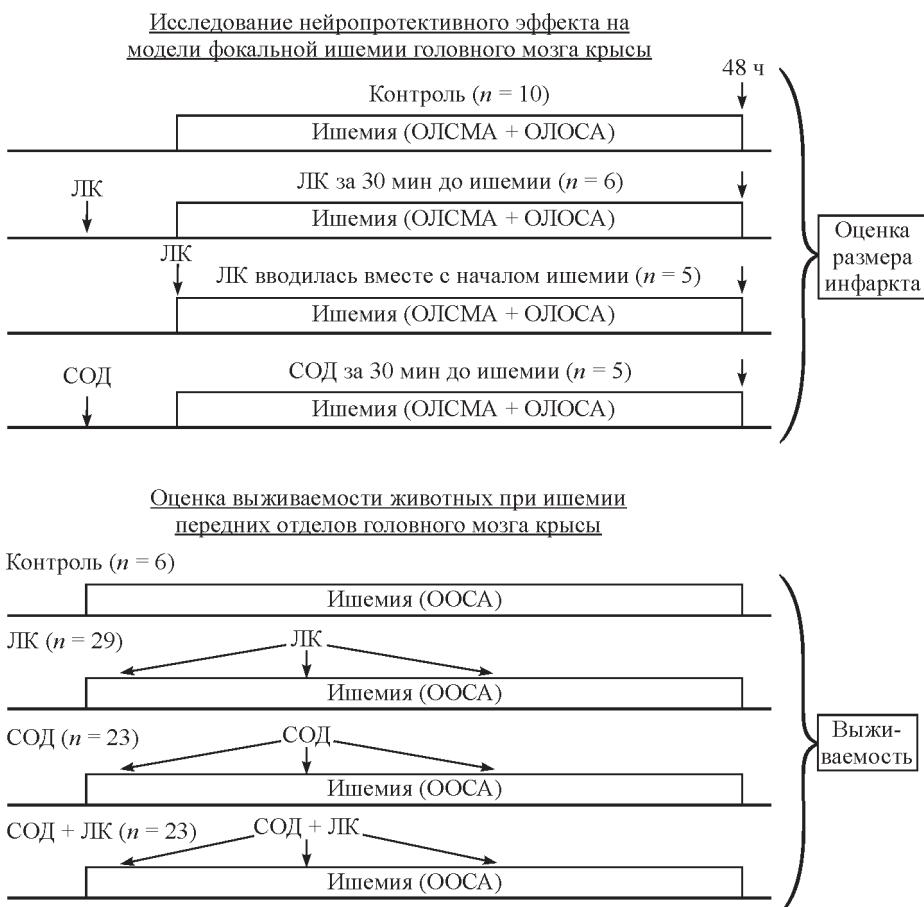


Рис. 1. Протокол исследования.

ЛК — альфа-липоевая кислота, СОД — супероксиддисмутаза, ОЛСМА — окклюзия левой средней мозговой артерии, ОЛОСА — окклюзия левой общей сонной артерии, ООСА — окклюзия обеих общих сонных артерий.

ревязка левой средней мозговой артерии и определение размера инфаркта через 48 ч. Группа 2 ($n = 6$) — так же, как в группе 1, но с введением альфа-липоевой кислоты за 30 мин до начала ишемии. Группа 3 ($n = 5$) — так же, как в группе 1, но с введением альфа-липоевой кислоты сразу после перевязки артерий. Группа 4 ($n = 5$) — так же, как в группе 1, но с введением супероксиддисмутазы за 30 мин до начала окклюзии артерий.

На втором этапе оценивали выживаемость крыс при перевязке сонных артерий и терапевтическом введении альфа-липоевой кислоты и супероксиддисмутазы. Группа 1 ($n = 6$) — двухсторонняя перевязка общих сонных артерий и оценка выживаемости. Группа 2 ($n = 6$) — так же, как в группе 1, но с введением альфа-липоевой кислоты сразу после перевязки артерий через 24 и 48 ч. Группа 3 ($n = 6$) — так же, как в группе 1, но с введением супероксиддисмутазы сразу после перевязки артерий через 24 и 48 ч. Группа 4 ($n = 6$) — так же, как в группе 1, но с введением комбинации альфа-липоевой кислоты и супероксиддисмутазы сразу после перевязки артерий через 24 и 48 ч.

Статистический анализ данных. Статистический анализ данных осуществлялся с помощью программного пакета SPSS 12.0. Для статистической оценки двух независимых выборок использовали критерий Манна—Уитни, а для анализа выживаемости метод Каплана—Мейера (критерий Мантелля—Кокса). Результат представлен в виде графиков «ящики и усы» и таблиц дожития.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При окклюзии левой средней мозговой артерии и общих сонных артерий (перманентная фокальная ишемия) значимый инфаркт-лимитирующий эффект был продемонстрирован (рис. 2) только в группе, где альфа-липоевая кислота вводилась в профилактическом режиме за 30 мин до ишемии (медиана — 6 %, $p = 0.00004$, по сравнению с контролем — 9.5 %). Введение супероксиддисмутазы в профилактическом режиме за 30 мин до ишемии или альфа-липоевой кислоты в терапевтическом режиме непосредственно перед ишемией не приводило к статистически значимому снижению размера некроза.

Введение альфа-липоевой кислоты или комбинации альфа-липоевой кислоты с супероксиддисмутазой у животных с перевязкой сонных артерий (перманентная ишемия передних отделов мозга) приводили к увеличению продолжительности жизни (рис. 3) экспериментальных животных более чем в 2 раза ($p = 0.003$, $p = 0.013$ по сравнению с контролем соответственно). Применение супероксиддисмутазы не увеличивает продолжительность жизни крыс ($p = 0.127$ по сравнению с контролем). Добавление к альфа-липоевой кислоте супероксиддисмутазы не приводило к увеличению продолжительности жизни животных по сравнению с монотерапией альфа-липоевой кислотой.

Согласно результатам нашего исследования, альфа-липоевая кислота обладает нейропротективным эффектом при различных видах ишемии мозга, что проявляется инфаркт-лимитирующим эффектом, увеличением продолжительности жизни животных. Более эффективно применение альфа-липоевой кислоты в профилактическом режиме, однако альфа-липоевая кислота проявляет защитный эффект и во время ишемии на модели перманентной перевязки сонных артерий. Анализ данных литературы с 1995 по 2010 г. показал, что применение альфа-липоевой кислоты приводит к нейропротективному эффекту только при профилактическом введении до ишемии [4, 9, 10, 12, 16]. Альфа-липоевая кислота уменьшает выраженность перекисного окисления липидов [9], стимулирует нейрональное ремоделирование [10], угнетает глиальную реактивность [10], что проявляется уменьшением размера некроза [4, 9, 16] и неврологического дефицита [4, 9, 10, 12]. Применение альфа-липоевой кислоты после ишемии в течение 7 дней не уменьшало выраженную ишемическое повреждения [10]. Некоторые авторы утверж-

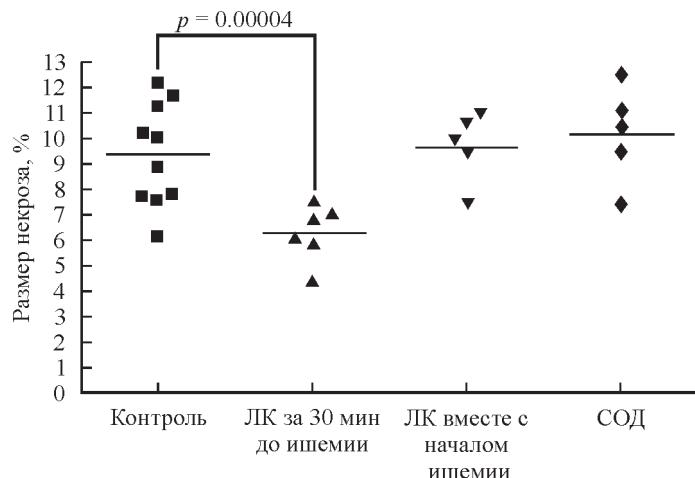


Рис. 2. Размер некроза при фокальной перманентной ишемии головного мозга крысы (критерий Манна—Уитни).

ЛК — альфа-липоевая кислота, СОД — супероксиддисмутаза.

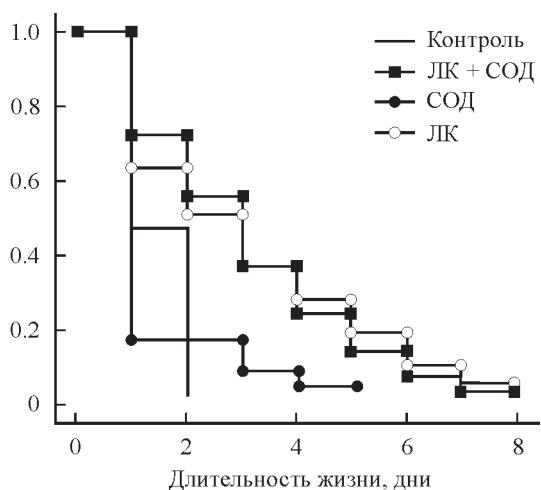


Рис. 3. Выживаемость крыс при перманентной общей ишемии передних отделов головного мозга крысы. (Метод Каплана—Мейера, критерий Мантеля—Кокса).

ЛК — альфа-липоевая кислота, СОД — супероксиддисмутаза.
По оси ординат — количество животных, %.

дают, что более целесообразна комбинация альфа-липоевой кислоты с витамином Е [9, 10].

Исследование применения супероксиддисмутазы при ишемии мозга показало отсутствие нейропротективного эффекта. Комбинация супероксиддисмутазы и альфа-липоевой кислоты тоже не приводила к дополнительному нейропротективному эффекту по сравнению с монотерапией альфа-липоевой кислотой. Известно, что при ишемии в цитоплазме клеток увеличивается количество гидроперекисей (H_2O_2) [1]. Конечным продуктом дисмутации супероксидного радикала является H_2O_2 . Так, супероксиддисмутаза может увеличивать количество гидроперекисей, которые вызывают дальнейшее свободнорадикальное повреждение, т. е. супероксиддисмутаза в условиях ишемии мозга может проявить прооксидантный эффект [1].

Анализ исследований нейропротективного эффекта супероксиддисмутазы при экспериментальной ишемии (1990—2010) продемонстрировал неоднозначный результат. Во-первых, наравне с обычной рекомбинантной супероксиддисмутазой, существуют ее различные модификации для улучшения свойств фермента: супероксиддисмутаза, заключенная в липосому [5], и супероксиддисмутаза, иммобилизованная с полиэтиленгликолем, — более устойчивы к повреждению (дольше период полувыведения) [7], а SOD:Tet451 связана с фрагментом столбнячного токсина для улучшенной проницаемости гематоэнцефалического барьера [6]. Интересно, что авторы [7] выявили U-образную зависимость инфаркт-лимитирующего эффекта супероксиддисмутазы, иммобилизированной на полиэтиленгликоле, от дозы при введении непосредственно перед ишемией. В отличие от альфа-липоевой кислоты, согласно данным литературы, различные варианты модифицированной супероксиддисмутазы вызывает нейропротективный эффект как при введении до ишемии [5, 11, 13, 17], так и вместе с реинфузией [6, 11, 14]. Наилучший защитный эффект при экспериментальной ишемии вызывала доза рекомбинантной супероксиддисмутазы 10 000—40 000 ед./кг. Однако существуют публикации, где супероксиддисмутаза не уменьшает ишемическое повреждение в дозе 10 000 ед./кг [13] при профилактическом введении.

Несмотря на противоречивые данные литературы и наших исследований, складывается впечатление о недостаточном понимании механизмов ишемического

го и реперфузионного повреждения головного мозга. Возможно разработка «идеального» нейропротектора для лечения и профилактики ишемических инсультов приведет в тупик из-за гетерогенности патогенеза церебральных сосудистых событий. Более целесообразна разработка лечебного комплекса, где препараты с различными механизмами вводятся на различных временных интервалах от начала ишемии (например, альфа-липоевая кислота вводится с профилактической целью до ишемии, а супероксиддисмутазы перед реперфузией).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение альфа-липоевой кислоты эффективно при фокальной ишемии без реперфузии только при назначении до начала ишемии. Введение альфа-липоевой кислоты увеличивает продолжительность жизни крыс при перевязке сонных артерий. Введение супероксиддисмутазы перед ишемией не вызывает защитного эффекта. Комбинация альфа-липоевой кислоты и супероксиддисмутазы менее эффективна, чем монотерапия альфа-липоевой кислоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб. Медицинская пресса. 2006.
- [2] Строев С. А., Самойлов М. О. Эндогенные антиоксиданты и гипоксическая толерантность мозга. СПб. Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН. 2006.
- [3] Рекомендации по ведению больных с ишемическим инсультом и транзиторными ишемическими атаками. 2008.
- [4] Clark W. M., Rinker L. G., Lessov N. S., Lowery S. L., Cipolla M. J. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke*. 32 (4) : 1000—1004. 2001.
- [5] Imaizumi S., Woolworth V., Fishman R. A., Chan P. H. Liposome-entrapped superoxide dismutase reduces cerebral infarction in cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 21 (9) : 1312—1217. 1990.
- [6] Francis J. W., Ren J., Warren L., Brown R. H., jr., Finklestein S. P. Postischemic infusion of Cu/Zn superoxide dismutase or SOD:Tet451 reduces cerebral infarction following focal ischemia/reperfusion in rats. *Exp Neurol*. 146 (2) : 435—443. 1997.
- [7] He Y. Y., Hsu C. Y., Ezrin A. M., Miller M. S. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase in focal cerebral ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol*. 265 (1, pt 2) : H252—H256. 1993.
- [8] Humphrey C. D., Pittman F. E. A simple methylene blue-azure II-basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Stain Technol*. 49 (1) : 9—14. 1974.
- [9] Garcia-Estrada J., Gonzalez-Perez O., Gonzalez-Castaneda R. E., Martinez-Contreras A., Luquin S., de la Mora P. G., Navarro-Ruiz A. An alpha-lipoic acid-vitamin E mixture reduces post-embolism lipid peroxidation, cerebral infarction, and neurological deficit in rats. *Neurosci. Res.* 47 (2) : 219—224. 2003.
- [10] Gonzalez-Perez O., Gonzalez-Castañeda R. E., Huerta M., Luquin S., Gomez-Pinedo U., Sanchez-Almaraz E., Navarro-Ruiz A., Garcia-Estrada J. Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neurosci Lett*. 15. 321 (1—2) : 1000—1004. 2002.
- [11] Matsumiya N., Koehler R. C., Kirsch J. R., Traystman R. J. Conjugated superoxide dismutase reduces extent of caudate injury after transient focal ischemia in cats. *Stroke*. 22 (9) : 1193—1200. 1991.
- [12] Panigrahi M., Sadguna Y., Shivakumar B. R., Kolluri S. V., Roy S., Packer L., Ravindranath V. Alpha-Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 717 (1—2) : 184—188. 1996.
- [13] Tagaya M., Matsumoto M., Kitagawa K., Niinobe M., Ohtsuki T., Hata R., Ogawa S., Handa N., Mikoshiba K., Kamada T. Recombinant human superoxide dismutase can attenuate ischemic neuronal damage in gerbils. *Life Sci.* 51 (4) : 253—259. 1992.

- [14] Tsubokawa T., Jadhav V., Solaroglu I., Shiokawa Y., Konishi Y., Zhang J. H. Lecithinized superoxide dismutase improves outcomes and attenuates focal cerebral ischemic injury via antiapoptotic mechanisms in rats. *Stroke*. 38 (3) : 1057—1062. 2007.
- [15] Wang-Fischer Y. Manual of stroke models in rats. N. Y. CRC Press. USA. 2009.
- [16] Wolz P., Kriegstein J. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid and its enantiomers demonstrated in rodent models of focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology*. 35 (3) : 369—375. 1996.
- [17] Uyama O., Matsuyama T., Michishita H., Nakamura H., Sugita M. Protective effects of human recombinant superoxide dismutase on transient ischemic injury of CA1 neurons in gerbils. *Stroke*. 23 (1) : 75—81. 1992.

Поступила 23 XI 2010