

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ФЕНИЛЭТИЛБИГУАНИДА НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, Д. В. Крыльский¹

Проведено исследование общей антиоксидантной активности, содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов, восстановленного глутатиона, активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и NADP-изоцитратдегидрогеназы в тканях крыс при действии фенилэтилбигуанида на фоне развития экспериментальной ишемии/реперфузии головного мозга. Показано, что в головном мозге и сыворотке крови животных при введении данного производного бигуанида на фоне патологии в дозе 25 мг/кг дважды в сутки в течение 3 дней происходит уменьшение анализируемых параметров в среднем на 35 % ($p < 0,05$), возрастающих в условиях ишемии/реперфузии. Полученные данные могут быть объяснены снижением степени мобилизации антиоксидантной системы, в частности, ее глутатионного звена, и необходимости в поставке NADPH для его функционирования, по сравнению с патологией, вследствие проявления фенилэтилбигуанидом антиоксидантных и протекторных свойств в условиях развития оксидативного стресса, сопровождающегося накоплением продуктов свободнорадикального окисления биомолекул, при ишемическом повреждении головного мозга.

Ключевые слова: ишемия/реперфузия головного мозга; диеновые конъюгаты; глутатионовая антиоксидантная система; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; NADP-изоцитратдегидрогеназа; фенилэтилбигуанид; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени доказано, что свободнорадикальное окисление (СРО) биомолекул, участвующее в различных процессах жизнедеятельности, при чрезмерной интенсификации служит одним из ведущих механизмов развития клеточной патологии, включая ишемические повреждения тканей, аутоиммунные болезни, хронические воспаления, нейродегенеративные заболевания, болезни печени и др. [4, 9, 11]. В частности, каскад метаболических изменений, центральными звеньями которого выступают нарушения энергетического обмена и интенсификация СРО биосубстратов, вносит значительный вклад в развитие ишемических повреждений головного мозга, занимающих одно из ведущих мест среди причин смертности и снижения качества жизни населения [1, 5]. При оксидативном стрессе важную адаптивную роль играет активация антиоксидантной системы (АОС) организма, в частности, ее глутатионного звена, отвечающего за обезвреживание H_2O_2 и органических пероксидов, в том числе пероксидов липидов. В роли лимитирующего фактора для функционирования данного компонента АОС выступает уровень NADPH, в поставке которого могут

участвовать глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) и NADP-изоцитратдегидрогеназа (NADP-ИДГ, КФ 1.1.1.42) [11].

В связи с распространенностью и тяжестью свободнорадикальных патологий исследование возможностей применения соединений с антиоксидантными свойствами, способных оказывать позитивный эффект при развитии окислительного стресса, остается актуальной задачей. В этом плане большой интерес вызывают производные гуанидина, обладающие широким спектром биологической активности. Имеются данные о способности некоторых из них тормозить клеточные окислительные реакции, в том числе и окислительного гликозилирования белков [14]. Кроме этого, гуанидиновые производные, например, меркаптоэтилгуанидин, метформин и др., способны выступать как в качестве ловушек свободных радикалов, так и ингибировать процессы их образования, в частности, реакции, катализируемые NADPH-оксидазой и NO-синтазой [13].

В связи с вышесказанным целью данной работы явилось исследование влияния фенилэтилбигуанида (ФЭБ) на общую антиоксидантную активность, содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов (ДК), восстановленного глутатиона, активность глутатионпероксидазы (ГП, КФ 1.11.1.9), глутатионредуктазы (ГР, КФ

¹ ФГБОУ ВО “Воронежский государственный университет”, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1.

1.6.4.2), Г6ФДГ и NADP-ИДГ в тканях крыс при экспериментальной ишемии/реперфузии головного мозга (ИРГМ). Выбор данного вещества с предсказанным антиишемическим действием был осуществлен с помощью компьютерной программы прогнозирования биологической активности – PASS, доступной в режиме on-line по адресу <http://www.ibmh.msk.su/pass>.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 150 – 200 г, полученных из вивария, расположенного по адресу: Воронежская обл., с. Медовка, ул. Новоселов, 6. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженным в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Экспериментальные животные были разделены на 3 группы: 1-я группа ($n = 8$) – контроль (ложнооперированные животные), 2-я группа ($n = 9$) – крысы с ИРГМ, 3-я группа ($n = 9$) – животные с ИРГМ, которым вводили ФЭБ. Индуцирование ишемии головного мозга у животных опытных групп осуществляли под кетаминным наркозом путем 30-минутной окклюзии общих сонных артерий [5]. Реперфузии достигали снятием окклюдоров. Визуально контролировали восстановление кровотока. Спустя 3 сут животных забивали. Кровь забирали из сердца, головной мозг извлекали из черепной коробки по стандартной методике и сразу использовали в ходе исследования. Фенилэтилбигуанид – производное гуанидина – был синтезирован на кафедре органической химии химического факультета Воронежского государственного университета. Контроль за ходом реакций, качественный и количественный анализ реакционных смесей, определение индивидуальности и установление структуры полученных соединений осуществляли методами тонкослойной хроматографии, масс-спектрометрии, хроматомасс-спектрометрии, ИК-, ^1H ЯМР-спектроскопии, элементного анализа. Выход полученного вещества составил 64 %. Тестируемое соединение вводили внутривентриально в виде раствора в 0,9 % NaCl в дозе 25 мг/кг массы животного дважды в сутки в течение 3 дней (первое введение – через 15 мин после восстановления кровотока, последнее – за 12 – 16 ч до исследования). Использованная схема введения препарата была выбрана на основе дозировок, рекомендованных при приеме метформина, а также результатов собственных исследований. Длительность приема соответствовала периоду развития ИРГМ у крыс.

Для получения гомогената навеску целого головного мозга крысы гомогенизировали в 3-кратном объеме охлажденной среды выделения (50 мМ трис-НСl-буфер (pH 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1 % β -меркаптоэтанол) и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант и сыворотку крови крыс использовали для дальнейших исследований.

Общую антиоксидантную активность оценивали методом биофлуоресценции (БХЛ) [3]. Содержание ДК определяли спектрофотометрически при 233 нм [7]. Концентрацию восстановленного глутатиона определяли спектрофотометрически при длине волны 412 нм по реакции с реактивом Элмана, в ходе которой в эквимольных количествах образуется окрашенный в желтый цвет тионитрофенильный анион [6]. Активность ферментов оценивали спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности в результате окисления NADPH при длине волны 340 нм. Измерение активности ГП проводили по сопряженной ферментативной реакции в среде следующего состава: 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ NADPH, 0,85 мМ восстановленного глутатиона, 0,37 мМ H_2O_2 , 1 ЕД/мл ГР (Sigma, США). Контрольная проба не содержала восстановленного глутатиона. Активность ГР определяли в среде спектрофотометрирования, содержащей 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ NADPH и 0,8 мМ окисленного глутатиона. Для измерения активности Г6ФДГ использовали 50 мМ трис-НСl-буфер (pH 7,8), содержащий 3,0 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,25 мМ NADP, 1,0 мМ MnCl_2 . Среда для определения активности NADP-ИДГ имела следующий состав: 50 мМ трис-НСl-буфер (pH 7,6 – 7,8), содержащий 1,5 мМ изоцитрат, 2 мМ MnCl_2 , 0,25 мМ NADP, 0,1 мМ ЭДТА. Реакцию начинали добавлением ферментного препарата (гомогената или сыворотки крови). За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта реакции или превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при температуре +25 °С. Определение общего белка проводили по методу Лоури [15]. Данные, полученные при проведении опытов в 2-кратной аналитической повторности, обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента [12]. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0,05$. На рисунках приводятся средние арифметические значения исследуемых параметров и их стандартные ошибки.

В работе были использованы следующие материалы и реактивы: трис, препарат глутатионредуктазы, GSH, GSSG, 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота), изоцитрат (Sigma, США), NADP, NADPH (AppliChem, Германия), глюкозо-6-фосфат (MP Biomedicals (ICN), США), остальные реактивы – отечественного производства марки “х.ч.” или “ч.д.а.”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным ранее данным, на фоне нарушения кровоснабжения головного мозга у экспериментальных животных происходит увеличение содержания ДК в ткани мозга и сыворотке крови по сравнению с контрольными значениями [8]. Накопление данных высокотоксичных первичных продуктов ПОЛ, оказывающих повреждающее действие на мембраны и

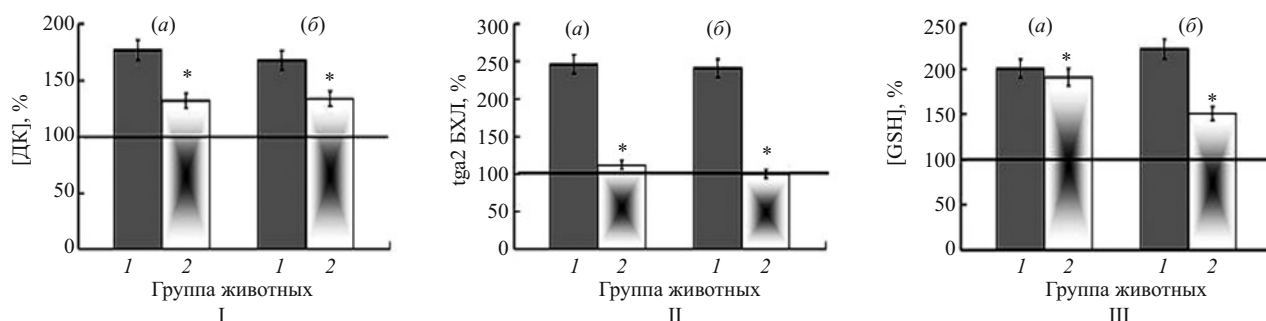


Рис. 1. Содержание диеновых конъюгатов (I), значения tga_2 биофлуоресценции (II) и содержание восстановленного глутатиона (III) в мозге (a) и сыворотке крови (б) крыс: 1 – животные с ишемией/реперфузией головного мозга, 2 – животные с ишемией/реперфузией головного мозга, которым вводили фенилэтилгуанид. За 100 % принимали контрольные значения (для I: в мозге – 7,89 мкМ, в сыворотке крови – 10,21 мкМ; для II: в мозге – 1,93, в сыворотке крови – 1,09; для III: в мозге – 0,225 мМ, в сыворотке крови – 0,272 мМ). Достоверность значений $p < 0,05$: * – по сравнению с животными с патологией.

клеточные структуры, свидетельствует об интенсификации СРО биомолекул на фоне развития ИРГМ. В группе животных, которым на фоне постишемической реперфузии вводили ФЭБ, содержание ДК снижалось как в головном мозге, так и в сыворотке крови в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению со значениями при ИРГМ (рис. 1-а), что, очевидно, свидетельствует о наличии антиоксидантных свойств у данного соединения и согласуется с литературными данными о том, что некоторые производные гуанидина могут выступать в качестве супрессоров ПОЛ и ингибиторов образования свободных радикалов [13, 14].

У животных с постишемической реперфузией головного мозга было также выявлено увеличение значений такого параметра БХЛ, как тангенс угла кинетической кривой хемилюминесценции tga_2 , характеризующего общую антиоксидантную активность организма [8]. Это может быть объяснено активацией компенсаторных механизмов, направленных на снижение уровня СРО биомолекул, в условиях ИРГМ. При введении ФЭБ животным с патологией было отмечено снижение значений tga_2 в мозге животных в 2,2 раза ($p < 0,05$), в сыворотке крови – в 2,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с ИРГМ (рис. 1-б). По всей видимости, это связано с уменьшением степени мобилизации АОС в условиях торможения свободнорадикальных процессов под действием тестируемого соединения.

Развитие ИРГМ у крыс сопровождается увеличением содержания восстановленного глутатиона, активности ГП и ГР в гомогенате ткани мозга и сыворотке крови по сравнению с контролем [2, 10], что, по-видимому, отражает активацию глутатионического звена АОС – адаптивного ответа на интенсификацию СРО биомолекул, в частности, ПОЛ, вызванную нарушением кровообращения ткани мозга. При введении ФЭБ животным с ИРГМ в сыворотке крови было отмечено снижение уровня восстановленного глутатиона в 1,5 раза относительно значений при патологии ($p < 0,05$), в то время как при исследовании гомогената мозга наблюдалась лишь тенденция к уменьшению данного параметра (рис. 1-в) ($p < 0,05$). Наряду с этим было выяв-

лено снижение активности ГП и ГР, выраженной в виде Е/г массы сырой ткани мозга, в 1,2 и 1,3 раза ($p < 0,05$) (рис. 2-а), а представленной в виде Е/мл сыворотки – в 1,3 и 1,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с данными при патологии (рис. 3-а). При этом удельная активность ГП в ткани головного мозга и сыворотке крови уменьшалась в 1,1 и 1,3 раза, ГР – в 1,1 и 1,4 раза соответственно относительно данных при ИРГМ (рис. 2-б, 3-б). По-видимому, данные изменения были связаны со снижением степени мобилизации глутатионического звена АОС в условиях действия ФЭБ.

Таким образом, в условиях введения данного производного гуанидина происходит снижение активности ГП, действие которой направлено на обезвреживание пероксидов органической и неорганической природы, относительно значений при патологии. При уменьшении потребности в восстановленном глутатионе было отмечено и снижение активности ГР, катализирующей регенерацию данного соединения из окисленной формы. По-видимому, ФЭБ за счет ингибирования свободнорадикальных реакций способствует ослаблению нагрузки на глутатионовую АОС при развитии оксидативного стресса, вызванного нарушением кровообращения ткани мозга [8]. Это подтверждается данными по изменению уровня первичных продуктов ПОЛ при введении тестируемого соединения на фоне развития патологии.

Поскольку важную роль в функционировании глутатионовой системы играет постоянное поступление NADPH, используемого ГР для восстановления окисленного глутатиона, то при интенсификации работы этой АОС в условиях оксидативного стресса выявленное возрастание активности Г6ФДГ и NADP-ИДГ в тканях крыс с постишемической реперфузией головного мозга может быть связано с необходимостью поддержания данного звена антирадикальной защиты [2, 10]. Введение ФЭБ животным на фоне развития ИРГМ сопровождалось уменьшением активности Г6ФДГ и NADP-ИДГ в мозге, выраженной в Е/г сырой массы, в 1,4 и 1,3 раза ($p < 0,05$) (рис. 2-а), удельной активности – в 1,2 и 1,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению

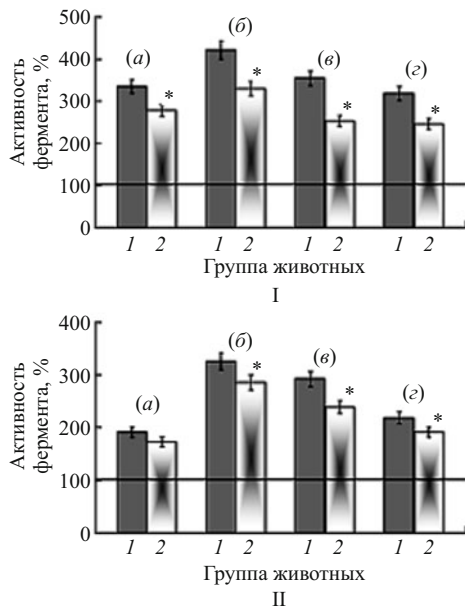


Рис. 2. Активность глутатионпероксидазы (а), глутатионредуктазы (б), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (в) и NADP-изоцитратдегидрогеназы (з) в ткани мозга крыс, выраженная в процентах в пересчете на массу сырой ткани (I) и белок гомогената (II): 1 – животные с ишемией/реперфузией головного мозга, 2 – животные с ишемией/реперфузией головного мозга, которым вводили фенилэтилбигуанид. За 100 % принимали активность фермента в контроле (для а – 0,073 Е/г массы сырой ткани и 0,011 Е/мг белка; для б – 0,034 Е/г массы сырой ткани и 0,0047 Е/мг белка; для в – 0,11 Е/г массы сырой ткани и 0,013 Е/мг белка; для з – 0,085 Е/г массы сырой ткани и 0,011 Е/мг белка). Достоверность значений $p < 0,05$ (*) – по сравнению с животными с патологией.

со значениями при патологии (рис. 2-II). При этом в сыворотке крови активность данных ферментов, выраженная в Е/мл, уменьшалась на 17 % ($p < 0,05$) (рис. 3-I), удельная активность – на 11 % ($p < 0,05$) (рис. 3-II).

Полученные результаты по исследованию действия используемого бигуанидинового производного свидетельствуют о снижении степени мобилизации АОС, в частности, ее глутатионового звена, и уменьшении активности NADPH-генерирующих ферментов по сравнению со значениями при патологии, что может быть объяснено торможением процессов СРО биомолекул при участии данного соединения.

Результаты данного исследования, свидетельствующие о наличии протекторного и антиоксидантного эффектов у фенилэтилбигуанида, могут служить обоснованием возможности его применения для фармакологической коррекции изменений метаболизма при развитии оксидативного стресса на фоне патологических состояний мозга.

ВЫВОДЫ

1. Фенилэтилбигуанид в дозе 25 мг/кг массы животного дважды в сутки в течение 3 дней на фоне постишемической реперфузии вызывает снижение содержания продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов, возраст

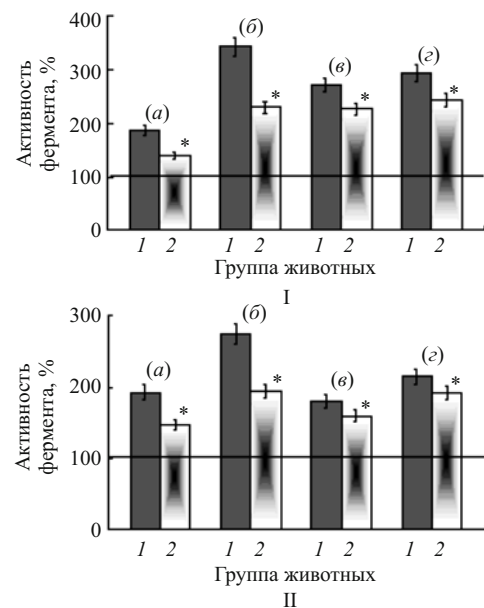


Рис. 3. Активность глутатионпероксидазы (а), глутатионредуктазы (б), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (в) и NADP-изоцитратдегидрогеназы (з) в сыворотке крови крыс, выраженная в процентах в пересчете на мл (I) и на белок (II): 1 – животные с ишемией/реперфузией головного мозга, 2 – животные с ишемией/реперфузией головного мозга, которым вводили фенилэтилбигуанид. За 100 % принимали активность фермента в контроле: а – 0,059 Е/мл и 0,0015 Е/мг белка; б – 0,023 Е/мл и 0,0008 Е/мг белка; в – 0,018 Е/мл и 0,001 Е/мг белка; з – 0,036 Е/мл и 0,0013 Е/мг белка. Достоверность значений $p < 0,05$ (*) – по сравнению с животными с патологией.

тающего при патологии, как в головном мозге, так и в сыворотке крови в среднем в 1,3 раза ($p < 0,05$).

2. При действии тестируемого соединения на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга было отмечено уменьшение общей антиоксидантной активности в ткани головного мозга в 2,2 раза, в сыворотке крови – в 2,4 раза относительно патологии ($p < 0,05$).

3. В группе животных с ишемией/реперфузией головного мозга, которым вводили фенилэтилбигуанид, наблюдалась нормализация большинства параметров, характеризующих функционирование глутатионовой антиоксидантной системы. Так, уровень восстановленного глутатиона в сыворотке крови снижался в 1,5 раза относительно значений при патологии ($p < 0,05$). Наряду с этим было обнаружено уменьшение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, выраженной в виде Е/г сырой массы мозга, в 1,2 и 1,3 раза, а представленной в виде Е/мл сыворотки – в 1,3 и 1,5 раза ($p < 0,05$).

4. Введение фенилэтилбигуанида животным на фоне развития патологии сопровождалось уменьшением активности ферментов-поставщиков NADPH для работы глутатионовой системы, возрастающих при ишемии/реперфузии головного мозга. Так, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и NADP-изоцитратдегидрогеназы в мозге, выраженная в Е/г сырой мас-

сы, снижалась в 1,4 и 1,3 раза ($p < 0,05$), а представленная в виде Е/мл сыворотки – на 17 % ($p < 0,05$).

Работа поддержана финансированием по гранту РФФИ р_центр_а №13-04-97536.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Болдырев, *Сорос. образов. журн.*, **7**(4), 21 – 28 (2001).
2. А. В. Макеева, Т. Н. Попова, *Нейрохимия*, **26**(2), 130 – 137 (2009).
3. А. И. Кузьменко, Р. П. Морозова, И. А. Николенко и др., *Биохимия*, **62**(6), 712 – 715 (1997).
4. А. Н. Осипов, О. А. Азизова, Ю. А. Владимиров, *Успехи биол. химии*, **31**, 180 – 208 (1990).
5. В. В. Бульон, Л. К. Хныченко, Н. С. Сапронов и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **129**(2), 149 – 151 (2000).
6. В. С. Бузлама, М. И. Рецкий, Н. П. Мещеряков, Т. Е. Рогачева, *Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных*, Воронеж (1997).
7. И. Д. Стальная, *Современные методы в биохимии*, Москва (1972), сс. 63 – 64.
8. Л. Ф. Панченко, Т. Н. Попова, О. А. Сафонова, А. В. Макеева, *Нейрохимия*, № 4, 328 – 332 (2009).
9. О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, Л. Саиди, *Биомед. химия*, **56**(4), 490 – 498 (2010).
10. О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, Л. Ф. Панченко, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **151**(5), 488 – 491 (2011).
11. Т. Н. Попова, А. Н. Пашков, А. В. Семенихина и др., *Свободнорадикальные процессы в биосистемах*, Кириллица, Ст. Оскол (2008).
12. Э. Ллойд, У. Ледерман, *Справочник по прикладной статистике*, Финансы и статистика, Москва (1990).
13. C. Szabo, G. Ferrer-Suetai, B. Zingarelli, et al., *J. Biol. Chem.*, **272**(14), 9030 – 9036 (1997).
14. N. Musi, M. F. Hirshman, J. Nygren, et al., *Diabetes*, **51**(7), 2074–2081 (2002).
15. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**(5), 265 – 275 (1951).

Поступила 14.07.15

GLUTATHIONE SYSTEM ACTIVITY IN RAT TISSUES UNDER PHENYLETHYL BIGUANIDE ACTION ON THE BACKGROUND OF EXPERIMENTAL BRAIN ISCHEMIA/REPERFUSION DEVELOPMENT

O. A. Safonova, T. N. Popova, and D. V. Kryl'skii¹

¹ Voronezh State University, Universitetskaya ploshch. 1, Voronezh, 394006 Russia.

It was studied the total antioxidant activity, content of primary lipid peroxidation (LPO) products and reduced glutathione, and the activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and NADP-isocitrate dehydrogenase in rat tissues under phenylethyl biguanide (phenformin) action on the background of experimental brain ischemia/reperfusion development. It is established the analyzed parameters, increasing under ischemia/reperfusion conditions in the brain and blood serum of animals, exhibit a decrease upon the introduction of this biguanide derivative. The obtained data can be explained by a decrease in degree of mobilization of the antioxidant system – in particular, of its glutathione chain – in the pathologic state. Hence, there is a need in NADPH supply for the system functioning compared with the pathology. Thus, phenylethyl biguanide demonstrates its antioxidant and protective properties under oxidative stress development that is accompanied by accumulation of the products of free radical oxidation of biomolecules during the ischemic brain injury.

Keywords: brain ischemia/reperfusion, diene conjugates, glutathione antioxidant system, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADP-isocitrate dehydrogenase, phenylethyl biguanide, rats.