РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-1-18-21

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ АКТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ 4-ГИДРОКСИ-3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛКОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ НА ФОНЕ ИСТОЩАЮЩИХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК

А. В. Воронков[2], А. Д. Геращенко[1]

Проведено исследование по изучению потенциальных механизмов актопротекторного действия 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на фоне истощающих физических нагрузок. Эксперимент был выполнен на крысах-самцах линии Wistar, предварительно рандомизированных по времени плавания. В ходе эксперимента было установлено, что введение ATACL способствует повышению концентрации изоформ оксида азота, в частности, eNOS-на 95 % ($p < 0,05$) и снижению iNOS на 53,3 % ($p < 0,05$). При этом концентрация eNOS была выше, чем у референтного препарата Метапрот на 76,6 % ($p < 0,05$). Применение препарата Метапрот не оказало значимого влияния на содержание изоферментов монооксида азота, их концентрация статистически значимо не отличалась от группы крыс негативного контроля. На фоне применения ATACL изменению подвергался также и уровень PPAR. Так, концентрация PPAR была выше на 57,9 % ($p < 0,05$), в группе, получавшая ATACL, относительно группы негативного контроля. Необходимо также отметить, что на фоне применения ATACL концентрация JNK1 была ниже, относительно группы негативного контроля на 64,3 % ($p < 0,05$). Применение препарата сравнения Метапрот привело к снижению концентрации JNK1 на 43,9 % ($p < 0,05$), и заметному повышению PPAR на 139,7 % ($p < 0,05$), в сравнении с группой крыс НК.

Ключевые слова: актопротекторное действие; 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота; Метапрот; физические нагрузки; утомляемость; энергодефицит.

ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ на долю патологий, связанных с психической и физической дисфункцией (утомлением) приходится 76,6 % [7, 10, 13, 15]. Психо-физическому напряжению подвергаются ликвидаторы аварий, спасатели, космонавты, горнопроходцы и т.д. [3, 4, 5]. Известно, что истощающие физические нагрузки приводят к развитию многих сердечно-сосудистых заболеваний, эндокринной дисфункции, а также скелетно-мышечной дисфункции, которая, безусловно, представляет огромный интерес [4, 5]. Необходимо отметить, что к факторам, лимитирующим работу скелетных мышц, относится низкий уровень мышечного кровотока, а также энергодефицит. При нарушении данных показателей в клетке происходят необратимые изменения: окислительный стресс, метаболические нарушения, апоптоз и т.д. [6, 12]. Поэтому воздействие на ключевые звенья патогенеза мышечной дисфункции является актуальной проблемой фармакологии и спортивной медицины.

Целью данного исследования явилось изучение потенциальных механизмов актопротекторной активности 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты на фоне истощающих физических нагрузок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

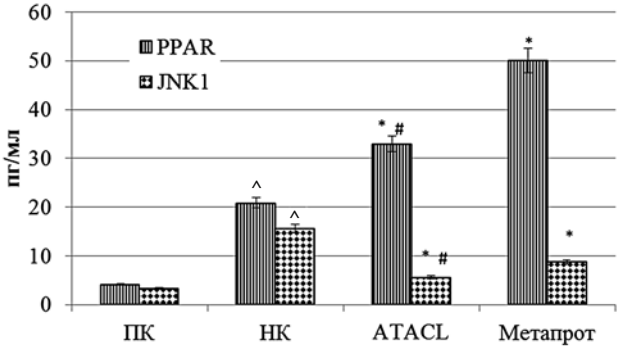
Предварительно была проведена рандомизация крыс по времени плавания, после чего они были разделены на четыре равные группы ($n = 10$). Истощающие физические нагрузки (ФН) воспроизводили путем проведения теста “Принудительного плавания” [11]. Первая группа животных — положительный контроль (ПК), подвергалась физическим нагрузкам группами по $n = 3$, $n = 3$ и $n = 4$ животных ежедневно. Вторая группа негативный контроль (НК), животные, лишенные фармакологической поддержки, получавшие на всем протяжении эксперимента 0,9 % раствор хлорида натрия в эквиобъемном количестве. Третья группа получала 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричную кислоту (ATACL) в дозировке 100 мг/кг [1], четвертая — препарат сравнения Метапрот, доза 25 мг/кг [2]. Все вещества животным вводились интрагастрально за 60 мин до плавания. По истечении 10 дней оценивали

[1] Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО “Волгоградский государственный медицинский университет” Минздрава России, Россия, 357532, Пятигорск, пр. Калинина, 11.

[2] Волгоградский государственный медицинский университет, Россия, 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

концентрацию изоформ оксида азота: эндотелиальной формы (eNOS), индуцируемой (iNOS) и нейрональной (nNOS), а также концентрацию PPAR (рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом) и JNK1 (c-Jun-концевая киназа) в супернатанте скелетной мышцы. Данные концентрации оценивали методом ИФА на микропланшетном ридере Tecan Infinite F50 (Австрия). Ход работы соответствовал прилагаемым производителем инструкциям к набору реактивов.

Результаты обрабатывали методом вариационной статистики. Межгрупповые различия анализировались параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. В качестве параметрического критерия использован критерий Стьюдента. В качестве непараметрического критерия — U-критерий Манна — Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Для статистической обработки результатов использовали пакет программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США) и Microsoft Excel 2010.



Изучение влияния соединения ATACL и препарата сравнения на концентрацию PPAR и JNK1 в супернатанте скелетной мышцы животных.

Обозначения: ^ — статистически значимо относительно группы животных ПК (*t*-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); * — статистически значимо относительно группы животных НК (*t*-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # — статистически значимо, относительно группы, получавшая Метапрот (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

На фоне ежедневной физической нагрузки у группы крыс ПК концентрация изоферментов NO составляла 81,2 ± 2,32 пг/мл-eNOS, 20,3 ± 1,05 нг/мл-nNOS, 11,7 ± 1,23 нг/мл-iNOS; концентрация JNK1 составляла 3,4 ± 0,8 пг/мл, PPAR — 4,2 ± 0,7 пг/мл.

У группы мышей НК по истечении ФН наблюдалось снижение концентрации эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) на 112 % ($p < 0,05$), повышение концентрации индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS) на 143,6 % ($p < 0,05$), при этом концентрация nNOS статистически значимо не отличалась от группы крыс ПК (таблица).

Что касается концентрации JNK1 и PPAR в группе крыс НК, относительно группы животных ПК наблюдалось повышение концентрации на 78,3 % ($p < 0,05$) и 79,9 % ($p < 0,05$) соответственно (рисунок).

На фоне применения ATACL наблюдались изменения в концентрациях изоформ NO, что нашло свое отражение в повышении концентрации eNOS на 95 % ($p < 0,05$) и снижении на 53,3 % ($p < 0,05$) индуцируемой NO-синтазы, в сравнении с группой негативного контроля. Стоит отметить, что применение ATACL и Метапрота не привело к достоверному изменению экспрессии изофермента нейрональной синтазы (nNOS), но концентрация eNOS в группе крыс, получавших ATACL была выше, чем у референтного препарата Метапрот на 76,6 % ($p < 0,05$).

При этом наблюдалось повышение уровня PPAR на 57,9 % ($p < 0,05$) и снижение концентрации JNK1 на 64,3 % ($p < 0,05$) относительно группы НК. Необходимо также сказать, что активность JNK1 была ниже на 36,4 % ($p < 0,05$) в группе животных, получавших ATACL, в сравнении с группой крыс, получавших препарат сравнения Метапрот.

Применение референтного препарата Метапрот не оказало значимого влияния на содержание изоферментов монооксида азота, их концентрация статистически значимо не отличалась от группы крыс негативного контроля. В свою очередь наблюдалось снижение концентрации JNK1 на 43,9 % ($p < 0,05$) и заметное повышение PPAR на 139,7 % ($p < 0,05$), в сравнении с группой крыс НК.

Ежедневные физические нагрузки приводят к снижению работоспособности животных, что подтверждается в проведенных ранее работах [1, 2]. Особое внимание уделяется мышечной усталости, явлению, которое ограничивает спортивные результаты и другую напряженную и длительную деятельность. Известно множество факторов, приводящих к развитию физической дисфункции (утомлению), один из них-снижение мышечного кровотока [6, 12]. Известно,

Влияние ATACL и катехин гидрата на концентрацию изоферментов NO-синтазной системы

Группа	ПК	НК	ATACL	Метапрот
nNOS, нг/мл	20,3 ± 1,05	17,3 ± 1,05	18,2 ± 1,22	18,5 ± 0,67
iNOS, нг/мл	11,7 ± 1,23	28,5 ± 1,6*	13,3 ± 1,28$^{\#}$	25,2 ± 1,54
eNOS, пг/мл	81,2 ± 2,32	38,3 ± 1,58*	74,7 ± 2,87$^{\#,\wedge}$	42,3 ± 2,4

Примечания: * — статистически значимо относительно группы животных ПК (*t*-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # — статистически значимо относительно группы животных НК (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); ^ — статистически значимо относительно группы животных, получавших Метапрот (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$).

что ведущую роль в оптимальном поддержании кровотока в скелетных мышцах отводят эндотелию сосудов [8]. В результате дисбаланса в сторону вазоконстрикторных агентов на фоне чрезмерной мышечной деятельности развивается эндотелиальная дисфункция (ЭД). Стоит также отметить, что снижение мышечного кровотока до критического уровня провоцирует развитие дисфункции митохондрий, что в конечном итоге приводит к развитию энергодефицита в клетке, метаболическим нарушениям и апоптозу. На сегодняшний день известен ряд механизмов, способных препятствовать данным негативным проявлениям. Поэтому к числу таких путей коррекции относится воздействие на изоформы оксида азота, рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом (PPAR) и c-Jun-концевая киназа (JNK). Ввиду этого в данной статье внимание было акцентировано именно на влияние исследуемого вещества на потенциальные мишени.

В результате проведенной работы было установлено, что применение изучаемого соединения ATACL способствует каталитической активности eNOS на 95 % ($p < 0,05$) и снижению iNOS на 53,3 % ($p < 0,05$), что свидетельствует о повышении продукции NO в скелетных мышцах. Поэтому можно предположить, что с повышением биодоступности в клетках оксида азота наблюдается нормализация мышечного кровотока и устранение явлений эндотелиальной дисфункции [14]. На сегодня известно, что одним из путей возможного поддержания энергетического потенциала в скелетных мышцах является воздействие на рецепторы PPAR. По данным литературного анализа, лиганды PPAR применяются для лечения сахарного диабета и дислипидемии, а в мышечной ткани данные рецепторы являются также и регуляторами процессов деструкции мышечных волокон и миогенеза. Было установлено, что ATACL активирует рецепторы PPAR. Активация данных рецепторов может приводить к образованию адипонектина, который в скелетной мускулатуре способен регулировать проницаемость мембраны клетки для глюкозы и жирных кислот, что, в свою очередь, может способствовать обеспечению клетки необходимой энергией для работы. К семейству митоген-активированных протеинкиназ относится JNK. Известно три JNK-изоформы: JNK1, JNK2 и JNK3, которые различаются по своим функциональным свойствам. Доказано, что JNK1 участвуют в апоптотических сигнальных путях, а также в ремоделировании скелетных мышц. Экспериментальным путем было установлено, что вводимое соединение ATACL ингибирует JNK1, что приводит к подавлению путей апоптоза и адаптации мышц к физическим нагрузкам. Возможно, данный факт связан с нивелированием каскада реакций TNFRSF10B/TRAIL-R2 пути в клетке [9]. Также было установлено, что ингибирование JNK1 в скелетных мышцах приводит к снижению активности миостатина, что, в конечном итоге, повышает выносливость и работоспособность животных в ранее проведенных экспериментах [2, 8].

ВЫВОДЫ

1. После перенесенных ежедневных физических нагрузок на фоне применения ATACL отмечается положительное влияние на экспрессию эндотелиальной синтазы (eNOS), что оказывает позитивное влияние на эндотелий сосудов, приводя к повышению работоспособности животных, отмеченной в ранее проведенных исследованиях. При этом отмечается, что концентрация eNOS была выше, чем у референтного препарата Метапрот на 76,6 % ($p < 0,05$).

2. На фоне перорального приема ATACL отмечено снижение концентрации JNK1 64,3 % ($p < 0,05$), относительно группы животных НК.

3. В результате проведенного эксперимента можно предположить, что актопротекторное действие 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты, вероятно, может быть связано с ингибированием путей, реализуемых посредством JNK1, активированием рецепторов PPAR, а также влиянием данных соединений на изоформы NO (повышение концентрации eNOS и снижение iNOS).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Воронков, В. Т. Абаев, Э. Т. Оганесян и др., *Совр. пробл. науки и образов.*, № 3, 628 (2015).
2. А. Д. Геращенко, Д. И. Поздняков, *Фармац. и фармакол.*, **3**, 35 – 36 (2015).
3. Е. Н. Купко, Б. А. Гусова, М. В. Молчанов и др., *Фармац. и фармакол.*, **7**(6), 88 – 91 (2014).
4. С. В. Мусина, Е. В. Егорычева, М. К. Татарников, *Известия Волгоградского гос. техн. универ.*, № 5, 148 – 150 (2008).
5. Е. Д. Савилов, *Эпидемиол. и инфекц. болезни*, № 2, 4 – 8 (2011).
6. C. R. Abbiss, J. J. Peiffer, R. Meeusen, et al., *Sport Med.*, **45**(9), 1235 – 1243 (2015); doi: 10.1007 / s40279-015-0344-5.
7. D. A. Baron, D. M. Martin, S. Abol Magd, *World Psychiatry*, **6**, 118 – 123 (2007).
8. I. Eitenmuller, O. Volger, A. Kluge, et al., *Circ Res.*, **99**, 656 – 662 (2006); doi: 10.1161 / 01.RES. 0000242560. 77512.dd.
9. W. He, Q. Wang, J. Xu, et al., *Autophagy*, **8**(12), 1811 – 1821 (2012); doi: 10.4161 / auto.22145.
10. L. C. Hespanhol Jun., S. D. Barboza, W. van Mechelen, et al., *Braz. J. Phys. Ther.*, **19**(5), 369 – 380 (2015); doi: 10.1590 / bjpt-rbf.2014.0110.
11. R. D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 47, 379 – 391 (1978); doi: 10.1016 / 0014-2999(78)90118-8.
12. C. B. Saper, P. M. Fuller, N. P. Pedersen, et al., *Neuron*, **68**(6), 1023 – 1042 (2010); doi: 10.1016 / j.neuron.2010.11.032.
13. J. Ouellet, L. Boisvert, L. Fischer, *Can. Fam. Physician*, **62**(6), e340 – 345 (2016).
14. C. K. Tan, Y. Zhuang, W. Wahli, *Expert Opin. Ther. Targets*, **21**, 333 – 348 (2017); doi: 10.1080 / 14728222.2017.1280467.
15. T. Vos, A. D. Flaxman, M. Naghavi, et al., *Lancet*, **380**, 2163 – 2196 (2012); doi: 10.1016 / S0140-6736(12) 61729-2.

Поступила 29.10.20

STUDYING POTENTIAL MECHANISMS OF THE ACTOPROTECTIVE ACTIVITY OF 4-HYDROXY-3,5-DI-TERT-BUTYLCINNAMIC ACID ON THE BACKGROUND OF EXHAUSTIVE PHYSICAL LOAD

A. V. Voronkov[1] **and A. D. Gerashchenko**[2]

[1] Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch of the Volgograd State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, prosp. Kalinina 11, Pyatigorsk, 357532 Russia

[2] Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1a, Volgograd, 400131, Russia

Potential mechanisms of the actoprotective action of 4-hydroxy-3,5-di-tert-butylcinnamic acid (ATACL) against the background of depleting physical exercise were studied. The experiments were performed on male Wistar rats previously randomized in respect of the forced swim time. It was experimentally established that the introduction of ATACL increased the concentration of nitric oxide isoforms, in particular, eNOS by 95% ($p < 0.05$) and reduced iNOS by 53.3% ($p < 0.05$) so that the concentration of eNOS was higher by 76.6% ($p < 0.05$) than that for the reference drug Metaprot. At the same time, the use of Metaprot did not noticeably influence the content of nitrogen monoxide isoenzymes, and their concentration did not statistically significantly differ from that in rats of the negative control (NC) group. The administration of ATACL also changed the PPAR level. The PPAR concentration was increased by 57.9% ($p < 0.05$) relative to that in the NC group. It should also be noted that when ATACL was used, the concentration of JNK1 was lower than in the negative control group by 64.3% ($p < 0.05$). The use of Metaprot led to a decrease in the JNK1 concentration by 43.9% ($p < 0.05$) and to a noticeable increase in the PPAR level by 139.7% ($p < 0.05$) as compared to the NC group.

Keywords: actoprotective effect; 4-hydroxy-3,5-di-tert-butylcinnamic acid; metaprot; physical exercise; fatigue; energy deficiency.