

УДК 577.334:616.831:577.112.3

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ГУАНИДИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И АКТИВНОСТЬ АКОНИТАЗЫ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

А.В. Макеева^{1}, Т.Н. Попова¹, А.И. Сливкин², Д.В. Крыльский²*

¹Кафедра медицинской биохимии и микробиологии, биолого-почвенный факультет,

²Кафедра фармацевтической химии и технологии, фармацевтический факультет

Воронежского государственного университета, 394024, Воронеж,

Университетская пл., д. 1; тел.: (4732)20-82-78; факс: (4732)20-87-55;

эл. почта: makeeva81@mail.ru

Исследовано влияние некоторых производных гуанидина на интенсивность свободнорадикального окисления и активность аконитазы при ишемии-реперфузии головного мозга у крыс. Выявлено, что под воздействием N-(4-хлорбензоил)бензтиазол-2-илгуанидина, N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и N-[имино(4-морфолинил)метил]гуанидина параметры биофлуоресценции, возрастающие при патологии мозга, изменялись в сторону нормы. Удельная активность аконитазы снижалась в мозге и крови животных с ишемией-реперфузией. При введении производных гуанидина на фоне развития ишемии-реперфузии удельная активность аконитазы возрастала. Полученные результаты свидетельствуют, что исследуемые вещества при ишемии-реперфузии головного мозга могут выступать в роли нейропротекторов, предотвращая развитие свободнорадикального окисления.

Ключевые слова: мозг, ишемия-реперфузия, производные гуанидина, свободнорадикальное окисление, аконитаза.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время считается общепризнанным, что окислительный стресс играет ключевую роль в развитии состояния дезадаптации и возникновения патологии [1]. Важным звеном в патогенезе ишемического повреждения головного мозга является в той или иной степени выраженная гипоксия, выступающая в качестве пускового фактора активации свободнорадикальных процессов [2, 3]. В период реоксигенации ещё более усугубляются процессы свободнорадикального окисления (СРО) и нарушается функциональное состояние стресс-лимитирующей системы антиоксидантной защиты организма [4]. Чрезмерное образование свободных радикалов, накопление продуктов перекисидации липидов, высвобождение глутамата и гиперкальциемия являются так называемыми медиаторами смерти нейронов [5]. Известно, также, что в условиях активации СРО наблюдаются существенные изменения в активности ряда ферментов. В частности, имеются данные, что одной из мишеней действия свободных радикалов является аконитаза (АГ; К.Ф.4.2.1.3). Снижение активности данного фермента может приводить к накоплению цитрата, являющегося эффективным низкомолекулярным антиоксидантом, вследствие хелатирующих свойств по отношению к ионам Fe^{2+} [6]. Многочисленные работы указывают на большое значение биоантиоксидантов в обеспечении защитно-приспособительных реакций организма, что может быть обусловлено

* - адресат для переписки

их способностью регулировать состояние клеточных мембран [7, 8]. Поскольку особая чувствительность головного мозга к окислительному стрессу объясняется его низкой антиоксидантной защитой, то проблема поиска веществ, обладающих выраженным органотропным протекторным действием, является весьма актуальной. Известно, что для синтетических производных гуанидина характерен широкий спектр биологической активности. Производные гуанидина обладают бактерицидной и фунгицидной активностью [9], проявляют антигипертензивные и кардиопротекторные свойства, выступают в качестве ингибиторов адренорецепторов и натриевых каналов [10], являются супрессорами пероксидного окисления липидов (ПОЛ) [11]. В связи с этим целью данной работы явилось исследование воздействия N-(4-хлорбензоил)бензтиазол-2-илгуанидина (ХББГ), N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина (ИПМГ) и N-[имино(4-морфолинил)метил]гуанидина (ИММГ) на уровень СРО и активность аконитазы при развитии экспериментальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс.

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 150-200 г., содержащихся на стандартном рационе питания в виварии. Индуцирование ишемии головного мозга у животных опытной группы осуществляли путем 30-минутной окклюзии обеих общих сонных артерий [12], реперфузия достигалась снятием окклюдоров, восстановление кровотока контролировали визуально. Спустя трое суток животные были умерщвлены под наркозом и головной мозг, извлеченный по стандартной методике из полости черепа, был заморожен в жидком азоте. Гомогенизацию ткани мозга осуществляли в трехкратном объеме охлажденной среды выделения (0,05 М Tris-HCl-буфер (pH 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА и 1% β -меркаптоэтанола). Гомогенат центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин. Забор крови осуществляли из сердца животного. Кровь помещали на 0,5 часа в термостат при 37°C, затем центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин. Сыворотку крови и гомогенат ткани головного мозга использовали для дальнейших исследований. Крысы были разделены на 5 экспериментальных групп: I группа (контроль) – ложнооперированные животные; II группа – животные с постишемической реперфузией головного мозга; в III группе животным с ишемией-реперфузией головного мозга вводили ХББГ внутрибрюшинно в виде суспензии в физиологическом растворе в дозе 25 мг/кг, один раз в сутки в течение 3-х дней эксперимента [13]; в IV группе животным с постишемической реперфузией головного мозга вводили ИПМГ также внутрибрюшинно в виде суспензии в физиологическом растворе в дозе 25 мг/кг веса животного дважды в сутки в течение 3-х дней эксперимента; в V группе животным с ишемией-реперфузией головного мозга вводили ИММГ внутрибрюшинно в виде суспензии в физиологическом растворе в дозе 25 мг/кг веса животного дважды в сутки в течение 3-х дней эксперимента [14]. Состояние энергетического обмена в ткани головного мозга оценивали по содержанию лактата и пирувата [15]. Уровень первичных продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) - диеновых конъюгатов (ДК) - оценивали спектрофотометрически при 233 нм [16]. Оценку интенсивности свободнорадикальных процессов в сыворотке крови и ткани сердечной мышцы осуществляли методом Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции. Активность АГ определяли спектрофотометрически при длине волны 240 нм [17]. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование микромоля продукта за 1 мин при 25°C. Оценку содержания белка в пробах проводили по методу Лоури и др. [18]. Полученные данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, различия сравниваемых показателей считали достоверными при $p < 0,05$.

В ходе работы использовали трис-HCl-буфер, ЭДТА ("Reanal", Венгрия), цитрат ("Sigma", США), остальные реактивы отечественного производства марки "хч" или "чда".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Показано, что окклюзия обеих общих сонных артерий с последующей реперфузией приводила к глубоким изменениям в метаболизме головного мозга крыс. Было выявлено значительное увеличение содержания лактата – более чем в 3 раза (на фоне снижения содержания пирувата – почти в 3 раза). Отношение лактат/пируват, являющееся показателем интенсивности анаэробного гликолитического пути превращения углеводов, возрастало более чем в 8 раз, что свидетельствует о подавлении аэробного и усилении “аварийного” гликолитического механизма образования энергии. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что перевязка сонных артерий у крыс приводит к выраженному снижению интенсивности кровотока в больших полушариях и нарушению оксигенации мозга [19].

Введение ХББГ крысам на фоне развития патологии приводило к снижению содержания лактата в 3,7 раза и увеличению содержания пирувата в 3,1 раза относительно крыс с ишемией-реперфузией. При введении ИПМГ и ИММГ животным с постишемической реперфузией головного мозга наблюдалось также снижение содержания лактата - в 2,7 и 4,2 раза, увеличение содержания пирувата – в 1,5 и 1,8 раза соответственно по сравнению со значениями при патологии. Наряду с этим, было выявлено снижение отношения лактат/пируват в 11,3; 4,1 и 7, 5 раза при введении ХББГ, ИПМГ и ИММГ крысам с патологией мозга (табл. 1). Наблюдаемые изменения согласуются с литературными данными о том, что гетероциклические соединения на основе гуанидина способны расширять кровеносные сосуды, увеличивая мозговой кровоток, тем самым, снижая степень клеточного отека [20].

Таблица 1. Содержание лактата и пирувата у контрольных животных, при развитии ишемии-реперфузии головного мозга и введении синтетических производных гуанидина.

Группа животных	Содержание лактата, мкМ/г	Содержание пирувата, мкМ/г	Соотношение лактат/пируват
I	1,76 ± 0,07	0,170 ± 0,0068	10,35 ± 0,42
II	5,84 ± 0,23*	0,071 ± 0,0029*	82,25 ± 3,29*
III	1,59 ± 0,06	0,219 ± 0,0087*	7,26 ± 0,31*
IV	2,13 ± 0,08*	0,105 ± 0,0042*	20,29 ± 0,81*
V	1,38 ± 0,06	0,125 ± 0,0051*	11,04 ± 0,44

Примечание: * - отличия от контроля достоверны (уровень значимости $p < 0,05$).

В результате проведенных исследований нами было установлено, что при развитии постишемической реперфузии головного мозга происходит увеличение содержания ДК на 77% и 68% в ткани мозга и сыворотке крови крыс соответственно, относительно контрольных значений. Полученные данные свидетельствуют об активации процессов ПОЛ и накоплении их продуктов в ткани мозга и сыворотке крови животных, подвергнутых экспериментальной ишемии-реперфузии. Однако под действием производных гуанидина на фоне развития патологии наблюдалось снижение уровня ДК. Так, после введения ХББГ животным с ишемией-реперфузией уровень ДК в ткани мозга снижался в 1,5 раза, а в сыворотке крови в 1,7 раза по сравнению с животными II опытной группы. Введение ИПМГ и ИММГ животным с патологией приводило также к снижению уровня ДК в ткани головного мозга – на 15% и 22%, в сыворотке крови на 13% и 38% соответственно (табл. 2).

ВЛИЯНИЕ ГУАНИДИНА НА СРО ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Таблица 2. Параметры биофлуоресценции и содержание диеновых конъюгатов в ткани мозга и сыворотке крови крыс в контроле, при ишемии-реперфузии и введении гуанидиновых производных.

Биофлуоресцентный материал	Группа животных	Параметры биофлуоресценции			Уровень диеновых конъюгатов, мкмоль/л
		Светосумма медленной вспышки (S), мВ·с	Интенсивность максимальной вспышки (Imax), мВ	Тангенс угла наклона кинетической кривой ($tg\alpha_2$)	
мозг	I	11,66 ± 0,46	1,72 ± 0,07	1,93 ± 0,08	7,89 ± 0,32
	II	26,85 ± 1,07*	3,68 ± 0,15*	4,75 ± 0,19*	13,96 ± 0,56*
	III	13,71 ± 0,55*	2,28 ± 0,09	1,17 ± 0,05*	9,53 ± 0,38*
	IV	12,74 ± 0,51*	2,66 ± 0,11*	3,51 ± 0,14*	12,19 ± 0,48*
	V	12,11 ± 0,48	2,09 ± 0,08	2,95 ± 0,11*	10,88 ± 0,43*
сыворотка	I	33,11 ± 1,32	6,12 ± 0,24	1,09 ± 0,04	10,21 ± 0,41
	II	58,99 ± 2,36*	13,61 ± 0,54*	2,63 ± 0,11*	17,13 ± 0,69*
	III	33,12 ± 1,32	8,78 ± 0,35*	1,32 ± 0,05	10,18 ± 0,41
	IV	31,48 ± 1,26*	6,33 ± 0,25	1,61 ± 0,06*	14,98 ± 0,59*
	V	30,19 ± 1,21*	5,91 ± 0,24	0,98 ± 0,04	10,56 ± 0,42

Показано, что светосумма хемилюминесценции (S) и интенсивность максимальной вспышки (Imax), отражающие интенсивность СРО, значительно возрастали при экспериментальной ишемии-реперфузии головного мозга, как в ткани мозга, так и в сыворотке крови крыс. S увеличивалась в 2,3 раза в мозге и в 1,8 раза в сыворотке крыс относительно контроля. Значение Imax при патологии возрастало в ткани мозга и сыворотке крови более чем в 2 раза по сравнению с ложнооперированными животными. При ишемии-реперфузии головного мозга наблюдалось повышение величины тангенса угла наклона кинетической кривой ($tg\alpha_2$), характеризующей общую антиоксидантную активность, в ткани мозга в 2,5 раза, а в сыворотке крови - в 2,4. Это позволяет заключить, что в условиях развития данной патологии начинают действовать компенсаторные механизмы, направленные на снижение уровня СРО в клетке. Введение ХББГ, ИПМГ и ИММГ животным II опытной группы приводило к снижению параметров биофлуоресценции в ткани мозга: S в 2,0; 2,1 и 2,2 раза; Imax в 1,6; 1,4 и 1,8 раза; $tg\alpha_2$ в 4,1; 1,4 и 1,6 раза. Подобные изменения параметров биофлуоресценции наблюдались и в сыворотке крови животных с ишемией-реперфузией головного мозга (табл. 2). Полученные результаты указывают на нейропротекторное действие исследуемых веществ, что согласуется с предположениями о том, что фенольные соединения способны проявлять себя в качестве ловушек свободных радикалов [11].

Согласно современным представлениям, АГ рассматривается в качестве чувствительной и критической мишени действия свободных радикалов в условиях окислительного стресса [6, 20]. При развитии постишемической реперфузии головного мозга происходило существенное снижение активности АГ. Удельная активность фермента снижалась в ткани мозга и сыворотке крови крыс в 2,4 и 4,6 раза соответственно. Также наблюдалось понижение активности АГ в мозге, выраженной в виде Е/г сырой массы, в 2,6 раза по сравнению с контрольными животными (рис. 1а). В сыворотке крови животных II опытной группы активность

АГ, выраженная в виде Е/мл, снижалась в 2,1 раза по сравнению с контролем (рис. 2а). Снижение активности АГ, вероятно, связано с тем, что свободные радикалы, содержание которых возрастает при патологии, разрушают железо-серные кластеры молекулы данного фермента и переводят его в неактивную форму [21].

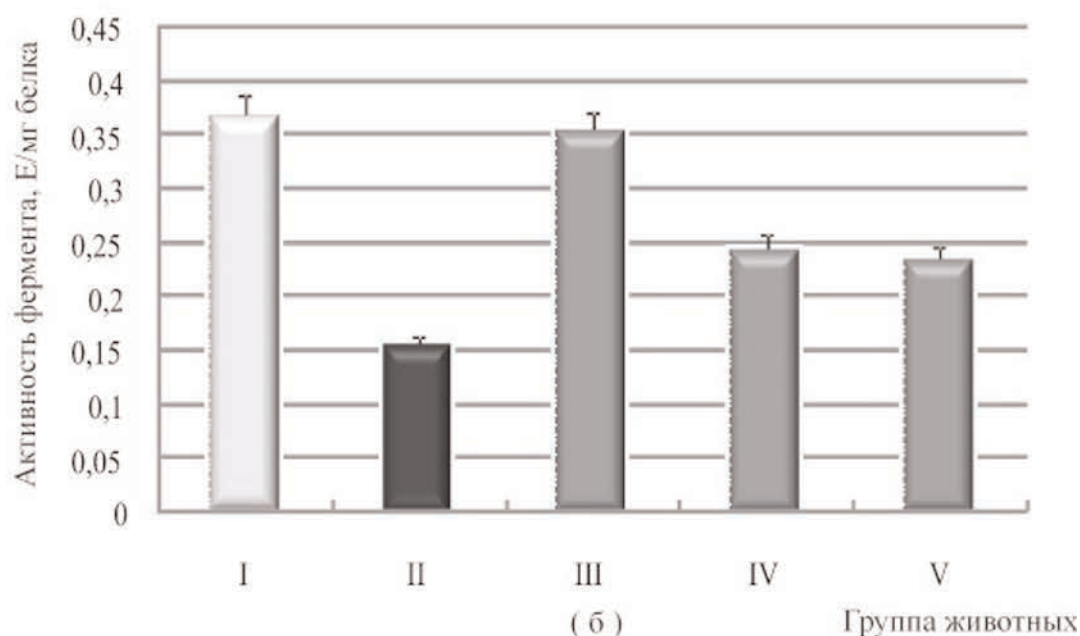
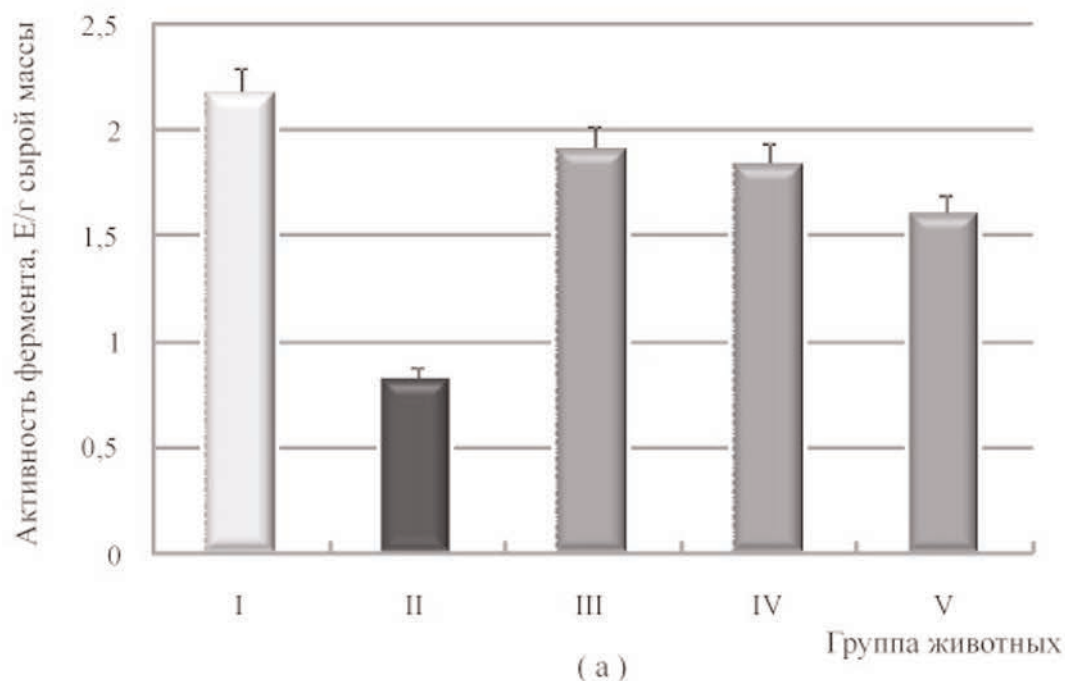


Рисунок 1.

Активность аконитатгидратазы в ткани мозга крыс, выраженная в виде Е на грамм сырой массы (а) и в виде удельной активности (б), в контроле (I), при ишемии-реперфузии головного мозга (II) и действии синтетических производных гуанидина на фоне развития патологии: ХББГ - (III); ИПМГ - (IV); ИММГ - (V)

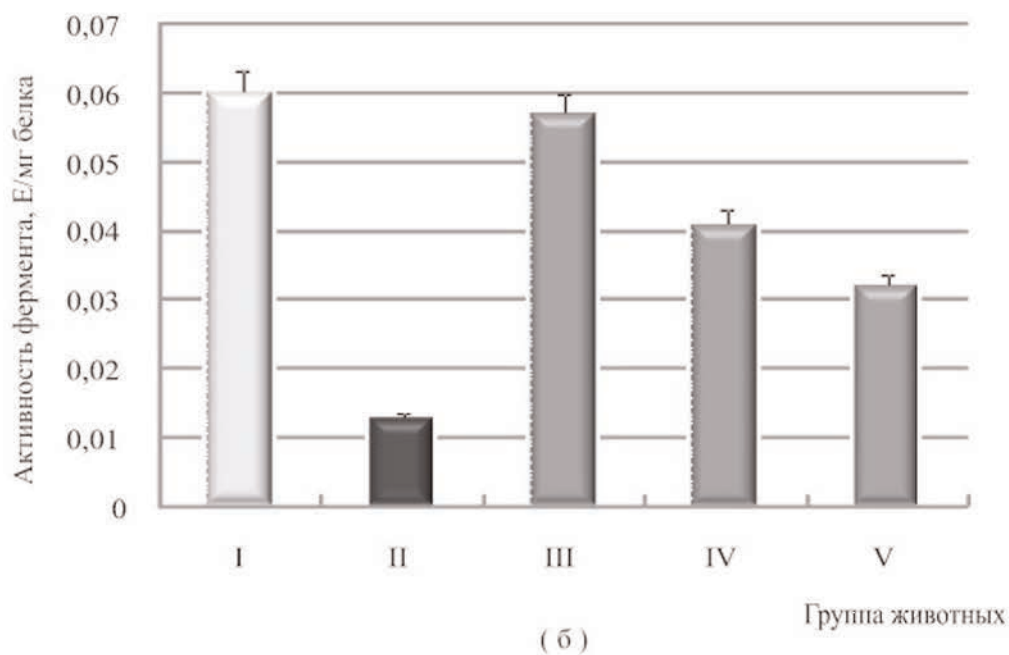
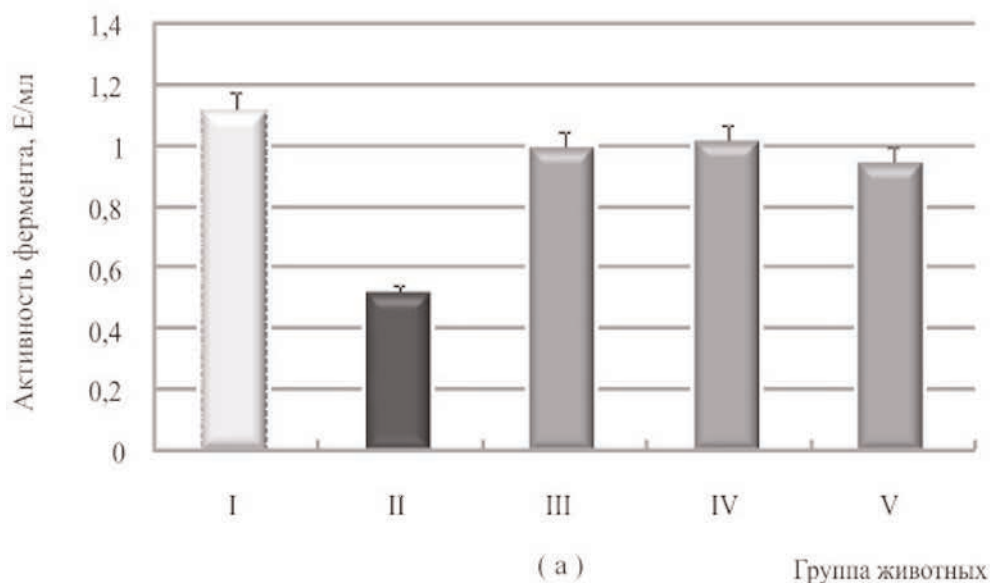


Рисунок 2.

Активность аконитатгидратазы в сыворотке крови крыс, выраженная в виде Е на мл (а) и в виде удельной активности (б), в контроле (I), при ишемии-реперфузии головного мозга (II) и действии синтетических производных гуанидина на фоне развития патологии: ХББГ - (III); ИПМГ - (IV); ИММГ - (V)

Действие ХББГ, ИПМГ и ИММГ на фоне развития патологии приводило к увеличению удельной активности АГ в ткани мозга - в 2,3; 1,6 и 1,5 раза (рис. 1б), в сыворотке крови - в 4,4; 3,2 и 2,5 раза (рис. 2б), по сравнению с животными с патологией. Активность АГ в мозге, выраженная в виде Е/г сырой массы, при введении исследуемых веществ животным с ишемией-реперфузией также

повышалась: при введении ХББГ – в 2,3 раза, при введении ИПМГ – в 2,2 раза, при введении ИММГ – в 1,9 раза по сравнению с уровнем АГ у животных с постишемической реперфузией (рис. 1а). Изменение активности АГ в сыворотке крови, выраженной в виде Е/мл, имело ту же тенденцию (рис. 2а). Вероятно, нормализация активности АГ происходила вследствие снижения уровня СРО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. На основании результатов проведённых исследований можно сделать вывод о корригирующем воздействии исследуемых синтетических производных гуанидина на оксидативный статус ткани головного мозга и крови крыс с постишемической реперфузией, что проявляется в торможении свободнорадикальных процессов и сопутствующем снижении степени мобилизации антиоксидантной системы. Нормализация параметров энергетического обмена при введении гетероциклических соединений на основе гуанидина, вероятно, объясняется способностью гуанидина и его производных расширять кровеносные сосуды, увеличивая мозговой кровоток, тем самым, снижая степень клеточного отека. Кроме того, под действием исследуемых веществ на фоне развития патологии головного мозга происходит изменение активности аконитазы в сторону контрольных значений, что, в свою очередь, связано со способностью гуанидиновых производных принимать участие в нормализации клеточного метаболизма в условиях развития окислительного стресса, обусловленного ишемическим повреждением ткани головного мозга и дальнейшим восстановлением кровотока.

Поддержано финансированием гранта РФФИ р_офи 08-04-99018 и “Аналитической ведомственной целевой программой (2009-2010 гг)”, код проекта 2.1.1/492.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Skulachev V.P.* (1997) Bioscience Reports, **17**(3), 347-366.
2. *Боголепов Н.К.* (1971) Церебральные кризисы и инсульт, Медицина, М.
3. *Новиков В.Е.* (1995) Экспериментальная и клиническая фармакология, **1**, 46-49.
4. *Федин А.И.* (2001) Материалы научно-практической конференции “Лечение ишемии мозга”, 5-23.
5. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* (2001) Ишемия головного мозга, Медицина, М.
6. *Gardner P.R., Nguyen D.M., White C.W.* (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **91**(25), 12248-12252.
7. *Деримедведь Л.В.* (1998) Провизор, **13**, 64-67.
8. *Уклистая Е.А., Трубников Г.А., Панов А.А.* (1998) Южно-российский журнал, **4**, 94-98.
9. *Гембицкий П.А. Бокша Л.Ф., Болденков Г.Ф., Мурмыло С.И., Жук Д.С.* (1984) Химическая промышленность, **2**, 82.
10. *Sawhney S.N., Gupta A., Vir D.* (1991) Indian J. Chem. Sect. B., **30**(6), 584-588.
11. *Szabo C.J.* (1997) Biolog.Chem., **272**(14), 9030-9036.
12. *Бульон В.В., Хныченко Л.К., Сапронов Н.С., Коваленко А.Л., Алексеева Л.Е.* (2000) Бюлл. экспер. биол. и мед., **129**(20), 345-348.
13. *Крыльский Д.В., Шихалиев Х.С., Ковыгин Ю.А., Потанов А.Ю.* (2006) Гетероциклические системы на основе производных гуанидина и его структурных аналогов, ВГУ, Воронеж.
14. *Scheen A.J., Letiexhe M.R., Lefebvre P.J.* (1995) Diabet Metab Rev., **11**, 69-80.
15. *Edward P., Bach M., Wail M.H.* (1967) Clin. Chem., **13**, 314-325.
16. *Стальная И.Д., Гаришвили И.Д.* (1977) Современные методы в биохимии, Медицина, М, с. 66-68.
17. *Guilbault G.G.* (1976) Handbook of Enzymatic Methods of Analysis, New-York.
18. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* (1951) J. Biol. Chem., **193**(1), 265-275.

19. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. (1991) Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения, Медицина, М.
20. Murakami K., Yoshino M. (1997) Biochem. Mol. Biol. Int., **41**(3), 481-486.
21. Gardner P.R., Raineri J. (1995) J. Biol. Chem., **270**(22), 11399-13405.

Поступила: 08. 09. 2008.

THE INFLUENCE OF GUANIDINE DERIVATIVES ON FREE RADICAL OXIDATION
INTENSITY AND ACONITASE ACTIVITY AT DEVELOPMENT OF BRAIN
ISCHEMIA-REPERFUSION AT RATS

A.V. Makeeva¹, T.N. Popova¹, A.I. Slivkin², D.V. Krylsky²

¹Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty;

²Department of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Pharmaceutical Faculty, Voronezh State University, Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394006 Russia; tel.: (4732) 208-278; fax: (4732) 208-755; e-mail: makeeva81@mail.ru

The study of some guanidine derivatives influence on free radical oxidation intensity and aconitase activity during the development of brain ischemia-reperfusion at rats has been carried out. The biochemiluminescence parameters increasing at the brain pathology changed toward normal values under the influence of N-[4-(chlorbenzoyl)benzotiazol-2-yl]guanidine, N-[imino(1-piperidinyl)methyl]guanidine and N-[imino(4-morpholinyl)methyl]guanidine. The aconitase specific activity decreased in brain and blood of animals with ischemia-reperfusion. Administration of guanidine derivatives during brain ischemia-reperfusion development increased aconitase specific activity. These results suggest that investigated substances can play a role of neuroprotectors, preventing free radical oxidation development.

Key words: brain, ischemia-reperfusion, guanidine derivatives, free radical oxidation, aconitase.