

УДК 616.831:616-005.4:547.495.9

©Коллектив авторов

**ВЛИЯНИЕ N-[ИМИНО(1-ПИПЕРИДИНИЛ)МЕТИЛ]ГУАНИДИНА
И N-[ИМИНО(4-МОРФОЛИНИЛ)МЕТИЛ]ГУАНИДИНА
НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТРАТА, АКТИВНОСТЬ АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ
И ЦИТРАТСИНТАЗЫ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС**

О.В. Суховеева, Т.Н. Попова, А.В. Макеева, И.Ю. Искусных*

Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет,
кафедра медицинской биохимии и микробиологии, 394006 Воронеж,
Университетская пл. 1; эл. почта: ooleenka@mail.ru

Исследовано влияние производных гуанидина на содержание цитрата, активность аконитатгидратазы и цитратсинтазы при ишемии-реперфузии головного мозга у крыс. Введение N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и N-[имино(4-морфолинил)метил]гуанидина способствовало изменению удельных активностей аконитатгидратазы и цитратсинтазы в сторону контрольных значений. При введении производных гуанидина на фоне развития ишемии-реперфузии уровень цитрата значительно снижался относительно значений при патологии. Применение бигуанидов приводило к уменьшению степени фрагментации ДНК, значительно выраженной при ишемии-реперфузии головного мозга у крыс. Дозозависимое действие гуанидиновых производных свидетельствует в пользу проявления ими не только антиоксидантного но и прооксидантного эффектов.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время считается общепризнанным, что окислительный стресс (ОС) является неотъемлемым звеном в развитии состояния дезадаптации и возникновения патологии [1]. Основными механизмами активации свободнорадикального окисления (СРО), при котором происходит значительное увеличение выработки активных форм кислорода (АФК) и высвобождение каталитически активных ионов из вне- и внутриклеточных депо [2]. При разрушении Fe-S кластера аконитатгидратазы (АГ, КФ. 4.2.1.3) супероксидным радикалом [3] происходит резкое снижение её активности, что позволяет рассматривать данный фермент в качестве чувствительной и критической мишени действия АФК в условиях ОС [4]. АГ отводится основная роль в регуляции накопления цитрата [5] – ключевого интермедиата цикла трикарбоновых кислот в митохондриях, исходного субстрата липогенеза и регулятора активности цитоплазматических ферментов: фосфофруктокиназы, ацетил-КоА-карбоксилазы и транскетолазы [6]. В литературе имеются указания на антиоксидантные свойства цитрата, связанные со способностью хелатировать ионы Fe^{2+} , участвующие в образовании OH^{\bullet} в реакциях Фентона и Хабера-Вайса. Особый интерес в этом аспекте представляет изучение особенностей функционирования ферментов, ответственных за накопление и утилизацию

* - адресат для переписки

ДЕЙСТВИЕ БИГУАНИДОВ НА ОБМЕН ЦИТРАТА ПРИ ИШЕМИИ

цитрата, прежде всего, АГ, катализирующей превращение цитрата в изоцитрат и цитратсинтазы (ЦС, КФ 2.3.3.1), катализирующий реакцию образования цитрата из ацетил-КоА и оксалоацетата.

В медицинской практике при лечении заболеваний различной этиологии, в том числе и патологий головного мозга, когда естественная антиоксидантная система организма не справляется с усиленной продукцией АФК, широко используют природные и синтетические антиоксиданты. Гетероциклические производные гуанидина обладают широким спектром биологической активности [7]. Они проявляют антигипертензивные и кардиопротекторные свойства, являются супрессорами пероксидного окисления липидов и ингибиторами адренорецепторов и натриевых каналов [8]. Вещества этой группы обладают бактерицидной и фунгицидной активностью, способствуют всасыванию глюкозы в желудочно-кишечном тракте, уменьшают глюконеогенез, снижают уровень холестерина, триглицеридов и инсулина у больных страдающих ожирением [9]. Однако вопрос о роли бигуанидов в области нейропротекции до сих пор остаётся открытым. В связи с этим, целью данной работы явилась сравнительная оценка воздействия N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина (ИПМГ) и N-[имино(4-морфолинил)метил]гуанидина (ИММГ) на содержание цитрата, активность АГ и ЦС в ткани мозга и сыворотке крови крыс при развитии ишемии-реперфузии головного мозга (ИРГМ).

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 [10], реперфузия достигалась снятием окклюдоров. Восстановление кровотока контролировали визуально. Спустя трое суток животные были умерщвлены под наркозом и головной мозг извлечён из полости черепа по стандартной методике. Извлечённый мозг замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в трехкратном объеме охлаждённой среды выделения (0,05 М трис-НСl-буфер (рН 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА и 1% β-меркаптоэтанол). 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 10 экспериментальных групп: 1 группа (контроль) – ложнооперированные животные; 2 группа – животные с постишемической реперфузией головного мозга; в 3, 4, 5 и 6 группах животным после индуцирования ишемии-реперфузии головного мозга интраперитонеально вводили ИММГ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг веса животного соответственно, один раз в сутки в течение 3-х дней эксперимента; в 7, 8, 9 и 10 группах крысам с постишемической реперфузией головного мозга вводили ИПМГ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг, также внутривентально, один раз в сутки в течение 3-х дней эксперимента. Количество цитрата определяли по методу Нательсона [11]. Активность аконитатгидратазы определяли спектрофотометрически при длине волны 233 нм [12]. Активность цитратсинтазы определяли спектрофотометрически при длине волны 412 нм [13]. Содержание общего белка оценивали по методу Лоури [14]. ДНК выделяли фенольно-хлороформным методом, фрагментацию ДНК выявляли методом электрофореза в агарозном геле [15]. На дорожку наносили 10 мкг ДНК. В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор MassRuler ("Fermentas", Литва).

Полученные данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, различия сравниваемых показателей считали достоверными при $p < 0,05$.

В ходе работы использовали трис-НСl-буфер, ЭДТА ("Reanal", Венгрия), цитрат, ацетил-КоА ("Sigma", США), оксалоацетат ("Applichem Biochemica", Германия), остальные реактивы отечественного производства марки "хч" или "чда".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Развитие ишемического повреждения головного мозга сопровождалось повышением содержания лактата в ткани мозга более чем в 3 раза, на фоне снижения уровня пирувата в 2,4 раза относительно группы контрольных животных. При этом 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 [16].

Согласно полученным данным, введение ИММГ и ИПМГ животным с ИРГМ сопровождалось дозозависимым изменением содержания цитрата. У крыс с постишемической реперфузией головного мозга отмечено значительное увеличение содержания цитрата как в ткани мозга (в 2,6 раза), так и в сыворотке крови (в 3,0 раза) по сравнению с контрольными значениями. Введение ИММГ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг животным с ИРГМ приводило к снижению уровня цитрата в мозге в 1,1, 2,0, 1,8 и 1,7 раза (рис. 1а), а в сыворотке крови в 1,7, 2,2, 1,6 и 1,5 раза (рис. 1б) соответственно. При введении ИПМГ в вышеуказанных дозах на фоне развития патологии выявлено снижение содержания цитрата в ткани мозга в 1,1, 1,9, 1,6 и 1,1 раза (рис. 1а), а в сыворотке крови в 1,9, 2,2, 1,4 и 1,1 раза (рис. 1б) соответственно, по отношению к животным с ИРГМ.

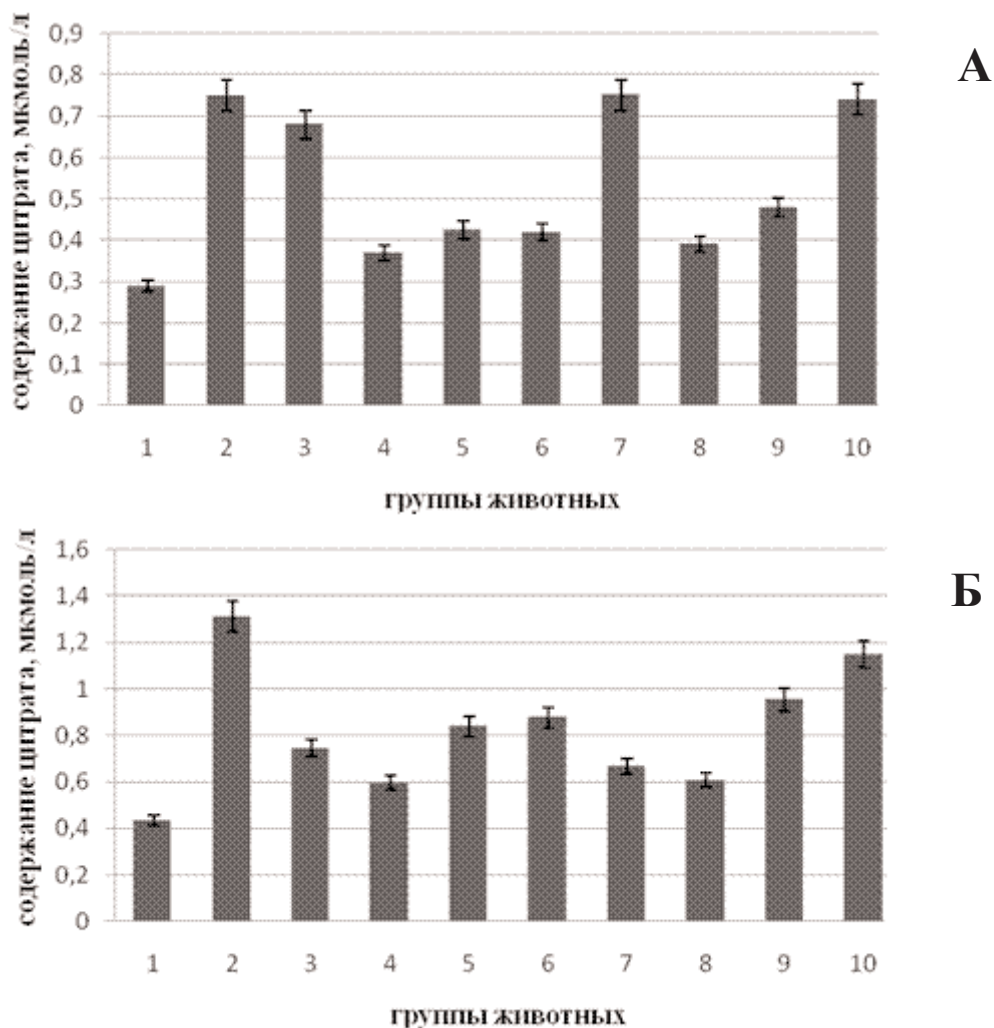


Рисунок 1.

Содержание цитрата в ткани головного мозга (А) и сыворотке крови (Б) крыс в контроле (1); при ишемии-реперфузии (2); введении ИММГ в дозах 12,5 мг/кг (3), 25 мг/кг (4), 50 мг/кг (5), 75 мг/кг (6); введении ИПМГ в дозах 12,5 мг/кг (7), 25 мг/кг (8), 50 мг/кг (9), 75 мг/кг (10).

ДЕЙСТВИЕ БИГУАНИДОВ НА ОБМЕН ЦИТРАТА ПРИ ИШЕМИИ

Наряду с этим, было выявлено увеличение активности АГ, значительно снижающейся при патологии. Введение ИММГ в дозах 25 и 50 мг/кг животным на фоне развития постишемической реперфузии головного мозга приводило к наиболее выраженному действию на активность данного фермента. Так, удельная активность АГ увеличивалась в мозге в 1,9 и 1,6 раза и 3,5 и 2,5 раза в сыворотке крови по отношению к животным с патологией. Однако, при введении ИММГ в дозах 12,5 и 75 мг/кг животным с ИРГМ положительный эффект данного препарата по отношению к аконитатгидратазной активности был менее выраженным. При введении ИММГ в дозах 12,5 и 75 мг/кг удельная активность АГ в ткани мозга возрастала в 1,2 и 1,3 раза (рис. 2а), а в сыворотке крови в 1,7 и 2,2 раза (рис. 2б) соответственно. Введение ИПМГ в дозах 25 и 50 мг/кг сопровождалось увеличением удельной активности АГ в мозге в 1,7 и 1,5 раза (рис. 2а) и сыворотке крови в 4,0 и 3,2 раза (рис. 2б) по сравнению с животными с ИРГМ. Введение ИПМГ в дозах 12,5 и 75 мг/кг приводило к менее значительному увеличению активности АГ, как в ткани мозга, так и в сыворотке крови экспериментальных животных относительно второй опытной группы.

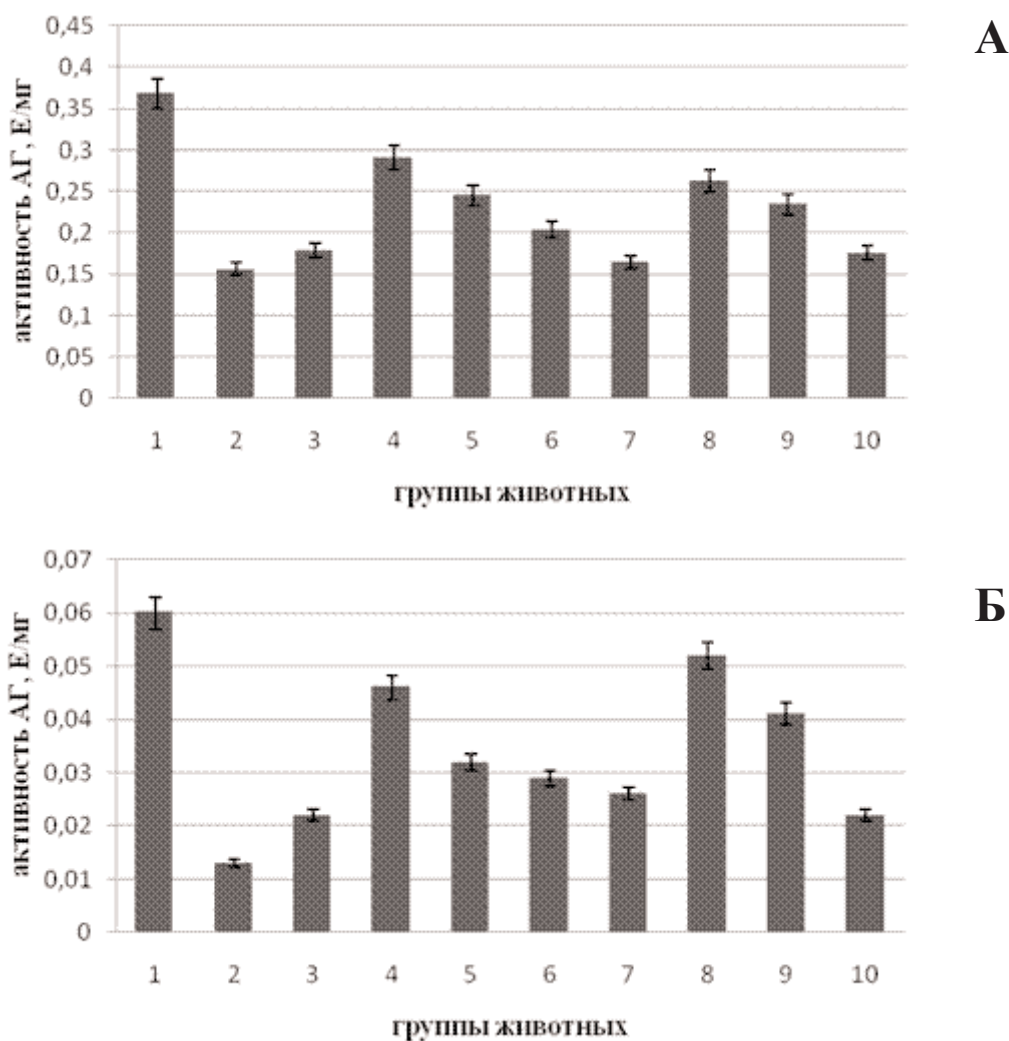


Рисунок 2.

Удельная активность аконитатгидратазы в ткани головного мозга (А) и сыворотке крови (Б) крыс в контроле (1); при ишемии-реперфузии (2); введении ИММГ в дозах 12,5 мг/кг (3), 25 мг/кг (4), 50 мг/кг (5), 75 мг/кг (6); введении ИПМГ в дозах 12,5 мг/кг (7), 25 мг/кг (8), 50 мг/кг (9), 75 мг/кг (10).

Вероятно, подобный эффект связан с проявлением антиоксидантных свойств используемых бигуанидов. Снижение интенсивности свободнорадикальных процессов сопровождается уменьшением повреждающего действия АФК на Fe-S-кластеры АГ, что и проявляется в нормализации её активности. Изменение содержания цитрата, по-видимому, связано с увеличением активности АГ при введении используемых протекторов.

При развитии постишемической реперфузии головного мозга происходило снижение удельной активности ЦС на 35% в ткани мозга и 30% в сыворотке крови крыс относительно контрольных значений. При введении ИММГ в дозах 25 и 50 мг/кг животным с ИРГМ наблюдалось увеличение удельной активности ЦС в ткани мозга на 10% и 32% (рис. 3а), в сыворотке крови – 10% и 20% (рис. 3б) соответственно, по сравнению со значениями при патологии. Под воздействием ИПМГ в дозах 25 и 50 мг/кг на фоне развития патологии выявлено увеличение удельной активности ЦС в ткани мозга на 7% и 40% (рис. 3а), в сыворотке крови – 11% и 19% (рис. 3б) соответственно. При введении ИММГ и ИПМГ в дозах 12,5 и 75 мг/кг не было выявлено протекторного эффекта по отношению к активности ЦС как в ткани мозга, так и в сыворотке крови экспериментальных групп животных. Очевидно, особенности действия гуанидиновых производных в дозе 75 мг/кг могут быть связаны с прооксидантным действием препаратов этого ряда. Полученные результаты согласуются с данными литературы о двойственной роли антиоксидантов и возможности проявления их прооксидантного эффекта в зависимости от ряда факторов. Известно, что эффективность действия многих веществ зависит от их концентрации, в результате чего они могут проявлять либо антиоксидантные свойства, либо выступать в качестве прооксидантов. Такая инверсия может наблюдаться при превышении условно-допустимых пределов концентраций веществ с антиоксидантной активностью [17].

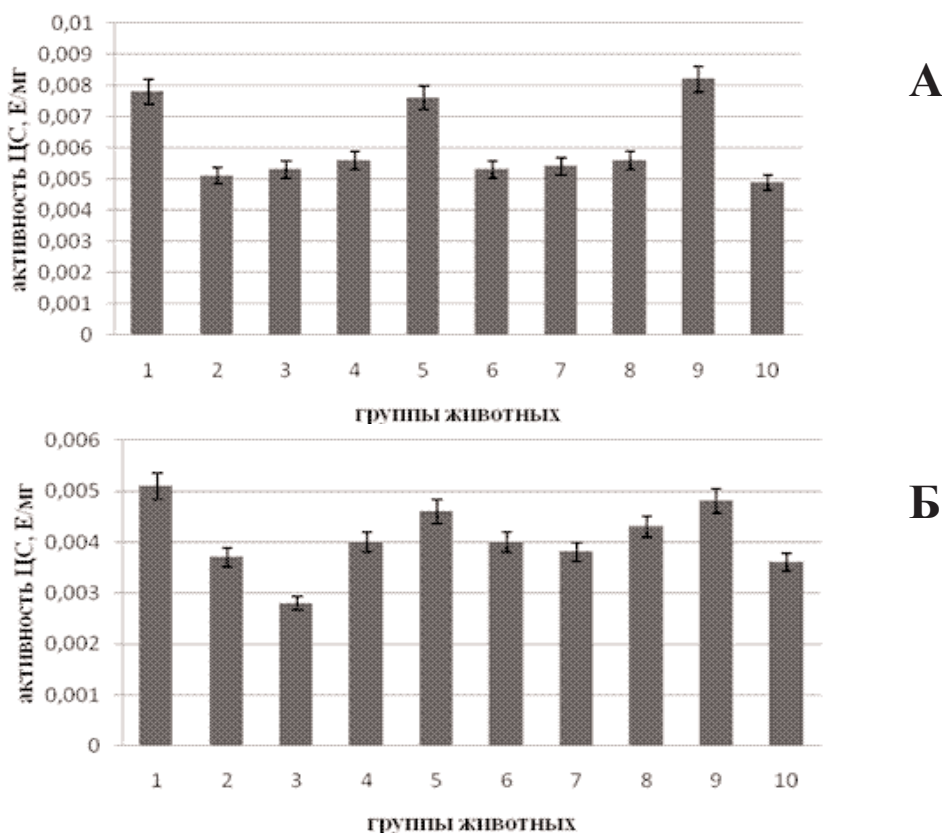


Рисунок 3.

Удельная активность цитратсинтазы в ткани головного мозга (А) и сыворотке крови (Б) крыс в контроле (1); при ишемии-реперфузии (2); введении ИММГ в дозах 12,5 мг/кг (3), 25 мг/кг (4), 50 мг/кг (5), 75 мг/кг (6); введении ИПМГ в дозах 12,5 мг/кг (7), 25 мг/кг (8), 50 мг/кг (9), 75 мг/кг (10).

ДЕЙСТВИЕ БИГУАНИДОВ НА ОБМЕН ЦИТРАТА ПРИ ИШЕМИИ

При развитии ишемии-реперфузии головного мозга наблюдалась фрагментация ДНК (рис. 4). Причем полученные фрагменты ДНК образовывали характерную “апоптотическую лестницу”. По мнению ряда исследователей, подобные фрагменты возникают при действии апоптозо-специфических нуклеаз, активация которых происходит при ОС [18]. Наблюдалась также высокоподвижная полоса в области низких молекулярных масс, соответствующая деградированной ДНК, наличие которой характерно для процесса некроза [19]. Введение ИММГ и ИПМГ в дозах 25 и 50 мг/кг крысам с ИРГМ приводило к снижению степени фрагментации ДНК, что может свидетельствовать в пользу антиапоптотического действия исследуемых бигуанидов.

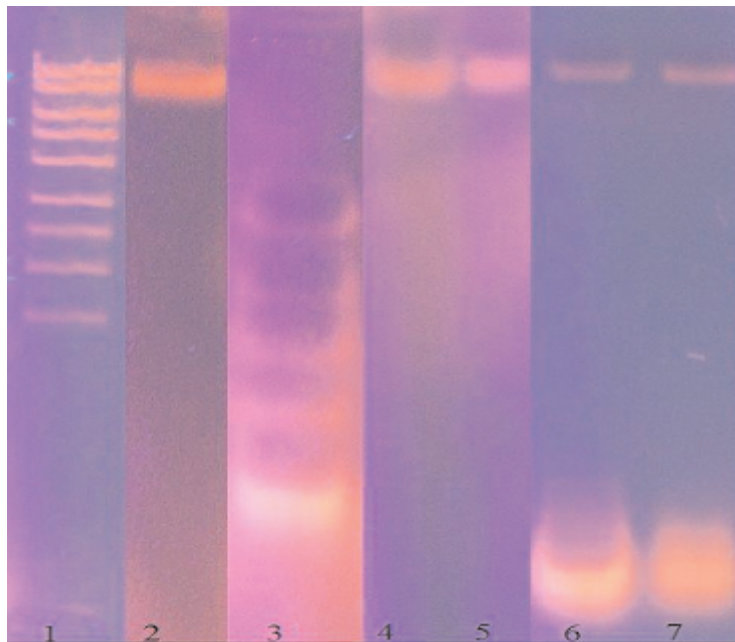


Рисунок 4.

Электрофореграмма препаратов ДНК из головного мозга крыс:

- 1 - маркеры молекулярной массы; 2 - крысы контрольной группы (контроль);
3 - крысы II группы (ишемия-реперфузия); 4, 5 - группы крыс с ИРГМ после введения ИПМГ в дозах 25 и 50 мг/кг; 6, 7 - группы крыс с ИРГМ после введения ИММГ в дозах 25 и 50 мг/кг.

Таким образом, введение ИММГ и ИПМГ в дозах 25 и 50 мг/кг на фоне развития постишемической реперфузии головного мозга приводит к снижению содержания цитрата и нормализации активностей АГ и ЦС, ответственных за его метаболизм в клетке. Кроме того, введение этих препаратов приводило к снижению степени фрагментации ДНК. Результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют о дозозависимом воздействии производных гуанидинового ряда на метаболизм цитрата в ткани мозга и сыворотке крови крыс с ишемией-реперфузией головного мозга, сопровождающейся, в связи с чрезмерной генерацией АФК, усилением апоптотических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. (2001) Ишемия головного мозга, Медицина, М.
2. Верещагин Н.В., Пирадов М.А. (1999) Медицинская газета, **5**(43), 125-128.
3. Осипов А.Н., Азизова Ю.А., Владимиров Ю.А. (1990) Успехи биол. хим., **31**, 180-208.

4. *Murakami K., Yoshino M.* (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **41**, 481-486.
5. *Gardner P.R., Nguyen D.M., White C.W.* (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **91**, 12248-12252.
6. *Биленко М.В., Тельпухов В.И., Чуракова Т.Д.* (1988) *Бюлл. exper. биол. мед.*, **107**, 394-396.
7. *Эльдерфилд Р.* (1953) Гетероциклические соединения (пер. с англ.), М.
8. *Sawhney S.N., Gupta A., Vir D.* (1991) *Indian J. Chem. Sect. B.*, **30**(6), 584-588.
9. *Крыльский Д.В.* (2006) Новые гетероциклические системы на основе производных гуанидина и его структурных аналогов. автореф. дисс. докт. наук, Воронеж.
10. *Бульон В.В., Хныченко Л.К., Сапронов Н.С. и др.* (2000) *Бюлл. exper. биол. мед.*, **129**, 149-151.
11. *Афанасьев В.Г., Зайцев В.С., Вольфсон Т.И.* (1973) *Лаб. дело*, №1, 115-116.
12. *Guilbault G.G.* (1976) *Handbook of enzymatic methods of analysis*, New-York.
13. *Matsuoka Y., Srere P.A.* (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 8022-8030.
14. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
15. *Калинина Т.С., Баннова А.В., Дыгало Н.Н.* (2002) *Бюлл. exper. биол. мед.*, **134**, 641-644.
16. *Макеева А.В., Попова Т.Н.* (2009) *Нейрохимия*, **26**(2), 130-137.
17. *Меньщикова Е.Б. Ланкин В.З., Зенков Н.К.* (2006) *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*, фирма "Слово", М.
18. *Muller K.* (1992) *Eur. J. Pharmacol.*, **226**(6), 209-214.
19. *Ярилин А.А.* (1998) *Патол. физиол. эксп. тер.*, №2, 38-48.

Поступила: 08. 11. 2010.

**THE INFLUENCE OF N-[IMINO(1-PIPERIDINYL)METHYL]GUANIDINE
AND N-[IMINO(4-MORPHOLINYL)METHYL]GUANIDINE ON CITRATE CONTENT,
ACONITASE AND CITRATE SYNTHASE ACTIVITIES AT ISCHEMIA-REPERFUSION
OF RATS BRAIN**

O.V. Sukhovееva, T.N. Popova, A.V. Makeeva, I.Yu. Iskusnykh

Voronezh State University, Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394006 Russia; e-mail: ooleenka@mail.ru

The influence of some guanidine derivatives on the level of brain citrate, brain activities of aconitase and citrate synthase has been investigated in rats subjected to ischemia-reperfusion. Administration of N-[imino(1-piperidiny)l)methyl]guanidine and N-[imino(4-morpholinyl)methyl]guanidine resulted in changes of specific activities of aconitase and citrate synthase towards control values. Under these conditions the citrate level considerably decreased versus rats with untreated ischemia-reperfusion. Treatment with these compounds also decreased the degree of DNA fragmentation markedly increased in rats with ischemia-reperfusion.

Key words: brain, ischemia-reperfusion, byguanidies, rats.