

УДК 57.021

© Коллектив авторов

**ДОЗАЗАВИСИМОЕ ВЛИЯНИЕ
3,5-ДИКАРБОМЕТОКСИФЕНИЛБИГУАНИДА НА АКТИВНОСТЬ
ГЛУТАТИОНОВОГО ЗВЕНА АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ
В СЕРДЦЕ И СЫВОРОТКЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ИНФАРКТЕ МИОКАРДА**

*Е.С. Таныгина, Т.Н. Попова, А.В. Семенихина,
Л.В. Матасова*, Е.Д. Крыльский*

Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж,
Университетская пл., 1; тел.: (473)2208278; факс (473)2208755;
эл. почта: larissamatasova@yandex.ru

Введение синтетического вещества с предсказанной противоишемической и кардиопротекторной активностью – 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида – на фоне экспериментального инфаркта миокарда приводило к снижению уровня пероксидации липидов, активности глутатионпероксидазы, уровня глутатиона, активности NADP-изоцитратдегидрогеназы в сердце и сыворотке крови крыс, а также активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сердце по сравнению с их уровнем при патологии, что может быть обусловлено снижением интенсивности свободнорадикальных процессов и нагрузки на антиоксидантную систему в условиях реализации протекторного действия исследуемого вещества. В то же время наблюдалось увеличение активности глутатионредуктазы в сердце и сыворотке крови крыс, вероятно, вследствие специфического воздействия 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида на фермент.

Ключевые слова: экспериментальный инфаркт миокарда, глутатионовая антиоксидантная система, 3,5-дикарбометоксифенилбигуанид.

ВВЕДЕНИЕ. Одной из основных проблем медицины являются сердечно-сосудистые патологии. Известно, что ведущим патогенетическим фактором при развитии инфаркта миокарда, миокардита и других сердечно-сосудистых заболеваний, является окислительный стресс [1]. Одним из важнейших звеньев защиты от окислительных повреждений биомолекул является глутатионовая антиоксидантная система, включающая глутатионпероксидазу (ГП, К.Ф. 1.11.1.9), глутатионредуктазу (ГР, К.Ф. 1.6.4.2) и глутатион. Функционирование данной системы осуществляется

* - адресат для переписки

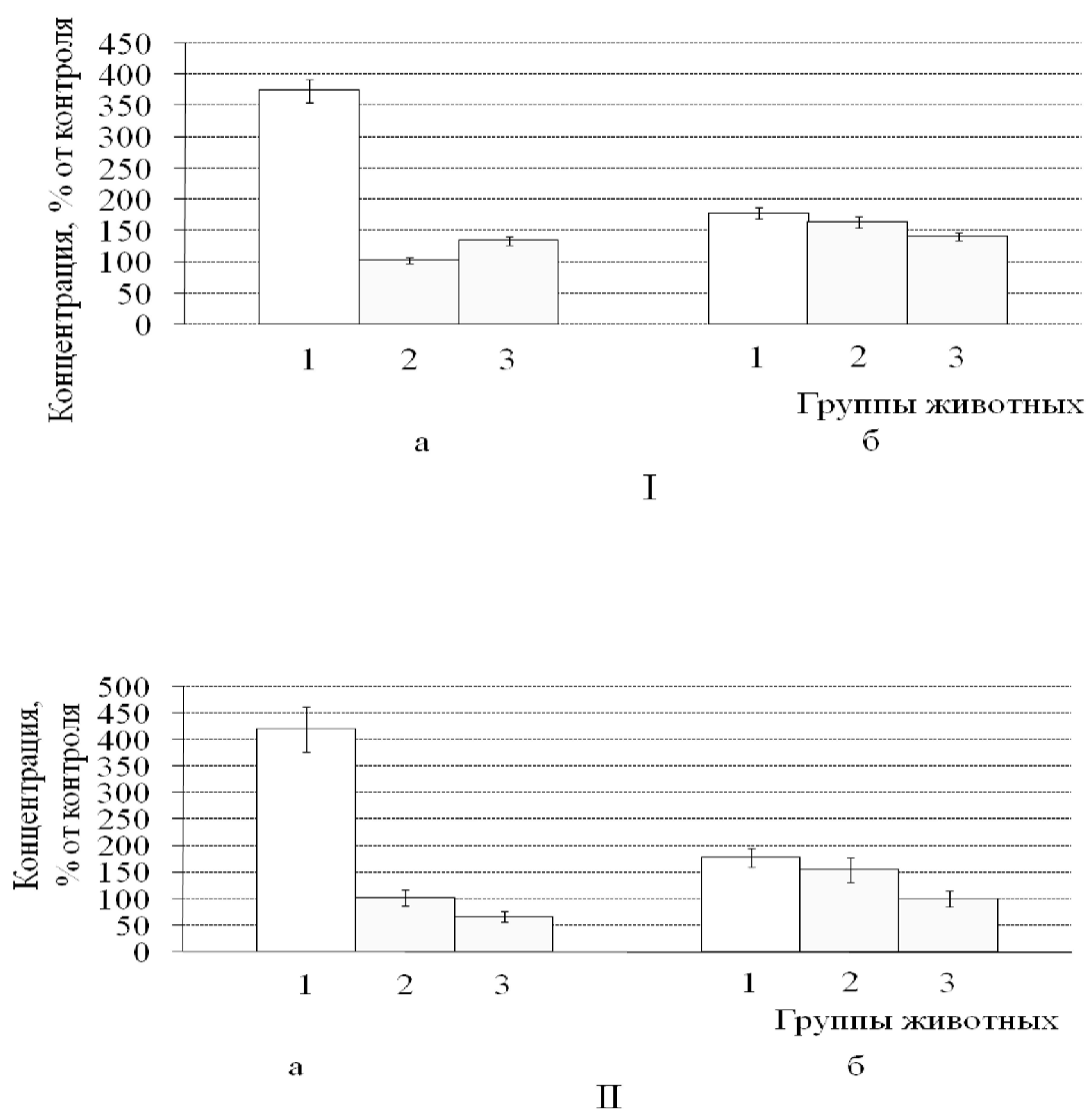
ВЛИЯНИЕ 3,5-ДИКАРБОМЕТОКСИФЕНИЛБИГУАНИДА НА СИСТЕМУ ГЛУТАТИОНА

при постоянном притоке восстановительных эквивалентов, основными поставщиками которых в клетке являются глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ, К.Ф. 1.1.1.49) и NADP-изоцитратдегидрогеназа (NADP-ИДГ, К.Ф. 1.1.1.42). В разработке методов терапии сердечно-сосудистых заболеваний важное значение уделяется поиску веществ, способных усиливать антиоксидантную защиту организма. В результате проведенного поиска производных бигуанидов с целевой биологической активностью с помощью программы прогноза “структура-свойство” PASS [2] было отобрано вещество с предполагаемой антиишемической и антиоксидантной активностью – 3,5-дикарбометоксифенилбигуанид (3,5-ДКМФБ).

Целью работы являлось исследование влияния введения различных доз 3,5-ДКМФБ на уровень продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) (диеновых конъюгатов, ДК), активность ГП, ГР, Г6ФДГ, NADP-ИДГ, а также на содержание восстановленного глутатиона (GSH) в сердце и сыворотке крыс при экспериментальном инфаркте миокарда (ЭИМ), индуцированном введением адреналина.

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовали белых лабораторных крыс-самцов массой 150-200 г. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженных в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Животные были разделены на 4 группы. Крыс контрольной группы (n=19) содержали на стандартном режиме вивария. Первую экспериментальную группу (n=14) составляли животные с ЭИМ, который индуцировали путем подкожного введения 0,1% раствора адреналина в дозе 0,15 мл на 100 г массы тела. Вторую экспериментальную группу (n=8) составляли животные, которым после индукции ЭИМ внутрибрюшинно вводили 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг/кг в виде суспензии в 1 мл 0,9% NaCl трижды в течение суток – первый раз через 15 мин после индукции ЭИМ, затем через 4 ч и 8 ч. Крысам третьей экспериментальной группы (n=8) вводили 3,5-ДКМФБ по вышеуказанной схеме в дозе 50 мг/кг. Через сутки после введения адреналина у животных забирали кровь и извлекали сердце для проведения исследований. Сыворотку крови получали с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 3000 g. Для получения гомогената навеску ткани сердца растирали в ступке с охлажденной средой выделения (50 mM трис-HCl буфер, pH 7,5, содержащий 1 mM ЭДТА, 1% β -меркаптоэтанол) в соотношении 1:3 и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Содержание ДК определяли на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 233 нм [3]. Активность ферментов определяли при 340 нм [4]. Содержание GSH определяли при 412 нм, используя реактив Элмана [4]. Содержание общего белка определяли биуретовым методом. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C. Данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Развитие ЭИМ сопровождалось увеличением уровня ДК в сердце крыс в 3,7 раза, в сыворотке крови – в 4,2 раза по сравнению с содержанием у контрольных животных (рис. 1). Накопление промежуточных продуктов окисления липидов свидетельствует об интенсификации свободнорадикального окисления в тканях крыс, что может быть результатом усиления клеточного дыхания в миокарде под действием адреналина и последующей ишемии миокарда.

**Рисунок 1.**

Концентрация диеновых конъюгатов (а) и восстановленного глутатиона (б) в сердце (I) и сыворотке крови (II) крыс с экспериментальным инфарктом миокарда (1) и при введении 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида в дозах 25 мг (2) и 50 мг (3) на фоне патологии.

При развитии ЭИМ наблюдалась активация глутатионовой антиоксидантной системы. При этом активность ГП и ГР увеличивалась в сердце крыс в 3,5 и 2,1 раз, в сыворотке – в 2,7 и 2,8 раз по сравнению с показателями контрольной группы животных (рис. 2). Увеличение активности ферментов сопровождалось возрастанием содержания GSH в сердце и сыворотке крови крыс в 1,8 раз (рис. 1). Вероятно, усиление процессов свободнорадикального окисления приводит к интенсификации функционирования глутатионowego звена антиоксидантной системы, основной функцией которого является обезвреживание пероксидов органической и неорганической природы. В основе увеличения активности ГР и ГП при окислительном стрессе может лежать индукция данных ферментов под действием редокс-зависимых транскрипционных факторов [5].

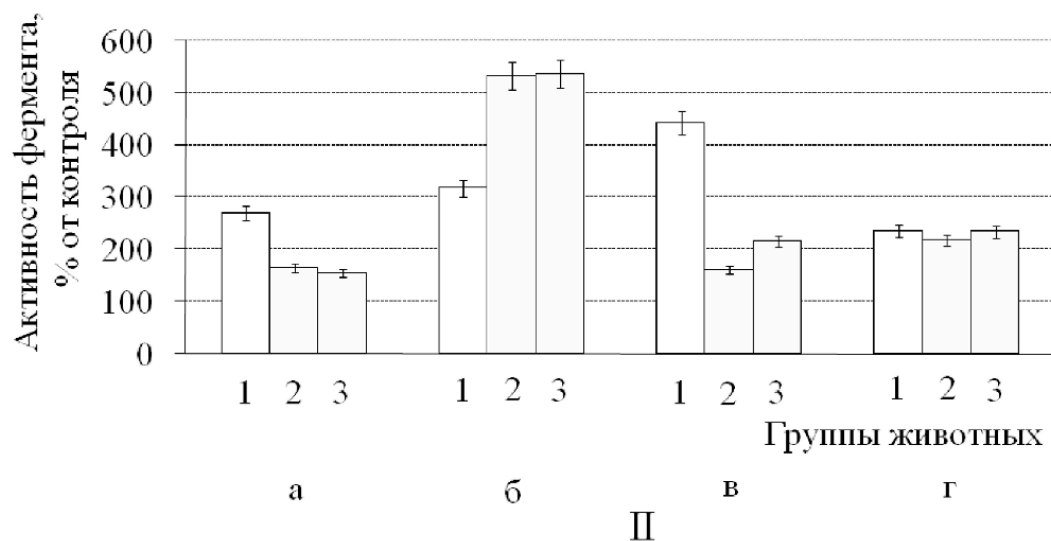
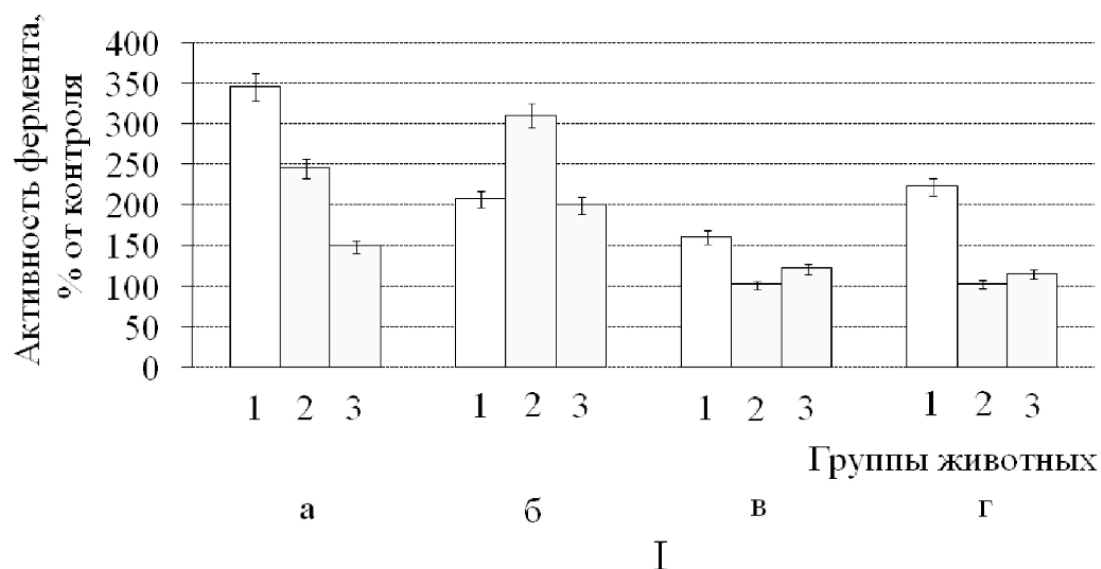


Рисунок 2.

Активность глутатионпероксидазы (а), глутатионредуктазы (б), NADP-изоцитратдегидрогеназы (в) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (г) в сердце (I) и сыворотке крови (II) крыс с экспериментальным инфарктом миокарда (1) и при введении 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида в дозах 25 мг (2) и 50 мг (3) на фоне патологии.

Введение 3,5-ДКМФБ сопровождалось снижением уровня ДК по сравнению с группой животных с ЭИМ (рис. 1). Максимальный эффект был выявлен при введении дозы 50 мг/кг веса тела животного. При этом содержание ДК уменьшалось в 2,4 раза в сердце и в 6,4 раза в сыворотке. Известно, что гуанидиновые производные, например меркаптоэтилгуанидин, метформин и другие способны непосредственно перехватывать свободные радикалы или опосредованно уменьшать их содержание за счёт торможения

внутриклеточного формирования [6]. Необходимо отметить, что введение 3,5-ДКМФБ в дозе 50 мг/кг сопровождалось снижением уровня ДК ниже показателей контрольной группы животных. Это может быть вызвано специфическим действием исследуемого вещества на метаболизм липидов и согласуется с литературными данными о гипополипидемическом и антиатерогенном действии бигуанида метформина, используемого в терапии сахарного диабета [7].

Снижение интенсивности процессов ПОЛ приводило, вероятно, к уменьшению нагрузки на ГП, основным субстратом которой являются липопероксиды. При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг активность ГП снижалась в сердце крыс в 1,4 и 2,3 раза, в сыворотке – в 1,6 и 1,8 раза соответственно по сравнению с патологией (рис. 2). В то же время было выявлено увеличение активности ГР в сердце и сыворотке крыс с ЭИМ при введении 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг/кг соответственно в 1,5 и 1,9 раза, что может быть обусловлено специфическим воздействием данного вещества на фермент (рис. 2). Имеются литературные данные о подобном влиянии метформина на ряд белков: под его воздействием происходит стимуляция экспрессии и активности транспортеров глюкозы, увеличение их количества и транслокация из внутриклеточного пула на клеточную мембрану [8]. Помимо этого необходимо отметить, что активация ГР может быть сопряжена с функционированием других систем, использующих глутатион. Так, например, глутаредоксин-зависимая система, играющая важную роль в поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза, включает GSH в качестве агента, восстанавливающего окисленный глутаредоксин, и ГР, восстанавливающую глутатион из его окисленной формы [9]. Уровень GSH в сердце при введении 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг/кг не претерпевал изменений по сравнению с патологией, в сыворотке – снижался в 1,2 раза (рис. 1). При введении исследуемого вещества в дозе 50 мг/кг активность ГР в сердце практически не менялась по сравнению с патологией, в сыворотке крови – возрастала в 1,7 раза, в то же время уровень GSH снижался в сердце в 1,2 раза, в сыворотке – в 1,4 раза.

На фоне развития ЭИМ наблюдалось увеличение активности NADP-генерирующих ферментов в сердце и сыворотке крови крыс. Так, активность Г6ФДГ в сердце и сыворотке крови увеличивалась в 2,2 и 2,3 раза, активность NADP-ИДГ – в 1,6 раза и 4,4 раза соответственно по сравнению с показателями контрольной группы (рис. 2). Введение 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг/кг приводило к наиболее выраженному снижению активности NADP-ИДГ по сравнению с активностью фермента при патологии: в сердце крыс в – 2,3 раза, в сыворотке крови – в 3,0 раза (рис. 2). При повышении дозы вещества вдвое активность NADP-ИДГ в сердце приближалась к показателям контрольной группы животных, в сыворотке крови крыс уменьшалась в 2,0 раза по сравнению с патологией (рис. 2). При действии 3,5-ДКМФБ наблюдалось снижение активности Г6ФДГ в сердце крыс, причем наибольший эффект был выявлен при введении бигуанида в дозе 25 мг/кг. Возможно, это связано со снижением интенсивности свободнорадикальных процессов при введении исследуемого вещества и, как следствие, уменьшением потребности в NADP для работы таких антиоксидантных систем, как глутатионпероксидазная/глутатионредуктазная, а также тиоредоксин- и глутаредоксин-зависимые системы [9]. В то же время на активность Г6ФДГ в сыворотке крови крыс исследуемое вещество не оказывало влияния (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.

1. При введении 3,5-ДКМФБ при ЭИМ происходило снижение уровня пероксидации липидов в тканях крыс, оцениваемого по содержанию ДК.
2. Введение 3,5-ДКМФБ при ЭИМ сопровождалось уменьшением активности ГП и уровня GSH в сердце и сыворотке крови крыс, что, вероятно, обусловлено снижением нагрузки на данное звено антиоксидантной системы в условиях реализации протекторного действия исследуемого вещества.
3. При действии 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг/кг в сердце и сыворотке крови наблюдалось увеличение активности ГР по сравнению с патологией.
4. Введение исследуемого вещества приводило к снижению активности NADP-ИДГ в сердце и сыворотке крови и активности Г6ФДГ в сердце крыс по сравнению с их уровнем при патологии. На активность Г6ФДГ в сыворотке крови крыс исследуемое вещество не оказывало влияния.

Работа поддержана финансированием по Аналитической ведомственной целевой программе “Развитие научного потенциала высшей школы” № 2.1.1/9462.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. (2000) Кардиология, **7**, 48-57.
2. Садым А.В., Лагунин А.А., Филимонов Д.А., Поройков В.В. (2002) Хим.-фарм. журнал, **36** (10), 21-26.
3. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. (1977) Современные методы в биохимии. Под ред. Ореховича В.Н., М., Медицина, с. 63-64.
4. Попова Т.Н., Панченко Л.Ф., Семенихина А.В., Рахманова Т.И., Аллекрад Х. (2010) Вопр. биол. мед. фарм. химии, №2, 20-23.
5. Pahl H.L., Baererle P.A. (1994) BioEssays, **16**, 497-502.
6. Szabo C., Ferrer-Suetai G., Zingarelli B., Southan G.J., Salzman A.L., Radi R. (1997) J. Biol. Chem., **272** (14), 9030-9036.
7. Шубина А.Т., Карпов Ю.А. (2003) Росс. мед. журнал, **11**(19), 1097-1101.
8. Gerald M.R. (1995) Diabetes/Metabolism Reviews, **11**, 97-108.
9. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н. (2005) Успехи биол. химии, **48**, 319-331.

Поступила: 06. 07. 2011.

**THE DOSE-DEPENDENT INFLUENCE OF 3,5-DICARBOMETOXYPHENILBIGUANIDE
ON ACTIVITY OF THE GLUTATHIONE ANTIOXIDANT SYSTEM
IN HEART AND BLOOD SERUM OF RATS WITH
THE EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION**

E.S. Tanygina, T.N. Popova, A.V. Semenikhina, L.V. Matasova, E.D. Kryl'skiy

Voronezh State University, Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394006 Russia; tel.: (473)2208278;
fax: (473)2208755; e-mail: larissamatasova@yandex.ru

Administration of a synthetic compound with predicted anti-ischemic and cardioprotective activity, 3,5-dicarbomethoxyphenylbiguanide, - to rats with experimental myocardial infarction led to a decrease in the lipid peroxidation level, glutathione peroxidase activity, the level of reduced glutathione, activity of NADP-isocitrate dehydrogenase in the heart and blood serum, and also activity of glucoso-6-phosphate dehydrogenase in heart in comparison with their levels in untreated animals with myocardial infarction. This may be attributed to a decrease of free radical processes and reduction of antioxidant system loading. At the same time the increase glutathione reductase activity observed under these conditions in the heart and and blood serum probably associated with specific influence of 3,5-dicarbomethoxyphenylbiguanide on this enzyme.

Key words: experimental myocardial infarction, biguanides, glutathione antioxidant system.