

АНТИГИПОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ N-ФЕНИЛАЛКИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО ТАУРИНА

БУЛЬОН В. В., СЕЛИНА Е. Н., КРЫЛОВА И. Б.,
член-корреспондент РАМН САПРОНОВ Н. С.

ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН»,
Санкт-Петербург

Бульон В. В., Селина Е. Н., Крылова И. Б., Сапронов Н. С. Антигипоксические эффекты N-фенилалкильного производного таурина // Мед. академ. журн. 2009. Т. 9. № 3. С. 42–46. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12.

Установлено антигипоксическое действие ИЭМ-1715 на модели острой гистотоксической гипоксии, вызванной блокатором гликолиза фторидом натрия. Антигипоксическая активность препарата на данной модели гипоксии сопоставима с эффектом амтизола. Выявлено энергостабилизирующее и антиоксидантное действие ИЭМ-1715 при острой ишемии головного мозга и миокарда у крыс.

Ключевые слова: гипоксия, ишемия, энергетический обмен, свободнорадикальное окисление, головной мозг, миокард, антигипоксанты, ИЭМ-1715, амтизол.

Bulion V. V., Selina E. N., Krylova I. B., Sapronov N. S. Of the antihypoxic effect of N-phenylalkyl derivate of taurine // Med. Acad. Journ. 2009. Vol. 9. № 3. P. 42–46. Research Institute of Experimental Medicine of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 197376.

The antihypoxic effect of IEM-1715 was shown on the model of rat sharp histotoxic hypoxia produced by the glycolysis blocker sodium fluoride. Its antihypoxic activity which became apparent on this model can be compared with the effect of amthizol. The stabilization of energy metabolism and antioxidant action of IEM-1715 were demonstrated during acute brain and myocardial ischemia in rats.

Key words: hypoxia, ischemia, energy metabolism, free-radical oxidation, brain, myocardium, antihypoxants, IEM-1715, amthizol.

Антигипоксанты – фармакологические препараты метаболического типа действия – находят широкое применение в медицинской практике как средства повышения устойчивости организма к кислородной недостаточности. В основе механизмов такого действия антигипоксантов лежит активная перестройка внутриклеточных процессов, направленная на предотвращение энергодефицита, а также экономное использование кислорода с перераспределением его потока в интенсивно работающие метаболические пути. Полагают, что в реализации энергостабилизирующих эффектов антигипоксантов особое место занимает их участие в поддержании гликолиза [2].

Как известно, гипоксия является универсальным патологическим процессом, сопровождающим или определяющим самые разнообразные патологические состояния. Этим объясняется интенсивный поиск и изучение новых веществ, проявляющих антигипоксические свойства.

В отделе фармакологии ГУНИИЭМ РАМН на основе сульфаминокислоты таурин синтезирован препарат ИЭМ-1715 [хлоргидрат-N-изопропиламид-2-(1-фенилэтил) аминокетансульфонокислоты], проявляющий антигипоксические свойства на моделях гипобарической гипоксической гипоксии и гемической гипоксии [12]. Антигипоксическое действие ИЭМ-

1715 сравнивалось с эффектом гутимины – представителя группы аминотиолов. Антигипоксические свойства аминотиолов связывают с повышением интенсивности гликолиза с сопутствующим усилением утилизации лактата в глюконеогенных реакциях [5]. Было установлено, что антигипоксическое действие ИЭМ-1715 на модели гипобарической гипоксической гипоксии сопоставимо с эффектом гутимины и несколько превосходит его на модели гемической гипоксии.

Целью данной работы является оценка антигипоксической активности ИЭМ-1715 на модели гистотоксической гипоксии, развивающейся в результате блокады гликолиза, а также на моделях локальной гипоксии – острой ишемии головного мозга и миокарда. В качестве препарата сравнения использовали вещество гутиминового ряда второго поколения – амтизол, который наряду с оксибутиратом признан Фармакологическим комитетом МЗ РФ эталонным антигипоксантом.

МЕТОДИКА

Эксперименты выполнены на 120 беспородных белых крысах-самцах. Острую гистотоксическую гипоксию (ОГТГ) у крыс массой 180–200 г вызывали

внутрибрюшинным введением ингибитора гликолиза фторида натрия (50 мг/кг). ИЭМ-1715 (25 мг/кг) или амтизол (25 мг/кг) животные получали внутрибрюшинно за 30 мин до начала воздействия гипоксического фактора. Контрольные животные получали физиологический раствор. Об эффективности препаратов судили по продолжительности жизни животных и их выживаемости.

Для оценки локального антигипоксического эффекта ИЭМ-1715 использовали модели острой ишемии головного мозга и миокарда.

Острую ишемию головного мозга воспроизводили окклюзией общих сонных артерий под эфирным наркозом. Опыты были выполнены на 30 крысах (250–300 г), которые были разделены на 3 группы: ложнооперированные, контрольные (ишемия) и получавшие ИЭМ-1715 (25 мг/кг) через 30 мин после перевязки сонных артерий. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Через 90 мин после окклюзии в гомогенатах, полученных из больших полушарий головного мозга, определяли содержание лактата, пирувата, гидроперекисей липидов (ГПЛ), малонового диальдегида (МДА), а также активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы [3, 7, 11, 13].

Острую ишемию миокарда воспроизводили перевязкой нисходящей ветви левой коронарной артерии на уровне нижнего края ушка левого предсердия под эфирным наркозом. Опыты выполнены на 30 крысах (250–300 г). Животные были распределены на 3 группы: ложнооперированные, контрольные (ишемия) и получавшие ИЭМ-1715 (25 мг/кг) сразу после окклюзии. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Через 60 мин после окклюзии в сердечной мышце определяли содержание АТФ, КФ, МДА, восстановленного глутатиона (ВГ), а также активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ), СОД и каталазы [3, 7, 11, 13].

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента, дисперсионного анализа ANOVA и непараметрического метода Kruskal-Wallis в случае достоверного различия дисперсий сравниваемых выборок. Использовали пакет статистических программ «Statistica 6».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Продолжительность жизни контрольных крыс при ОГТГ составляла $40,4 \pm 1,2$ мин. Предварительное введение ИЭМ-1715 способствовало увеличению длительности жизни животных в этих условиях до $70,8 \pm 4,7$ мин, при этом 20% крыс выживало. Продолжительность жизни животных, получавших эталонный препарат амтизол, увеличивалась до $64,7 \pm 5,1$ мин. Количество выживших крыс составляло 30% (рис.).

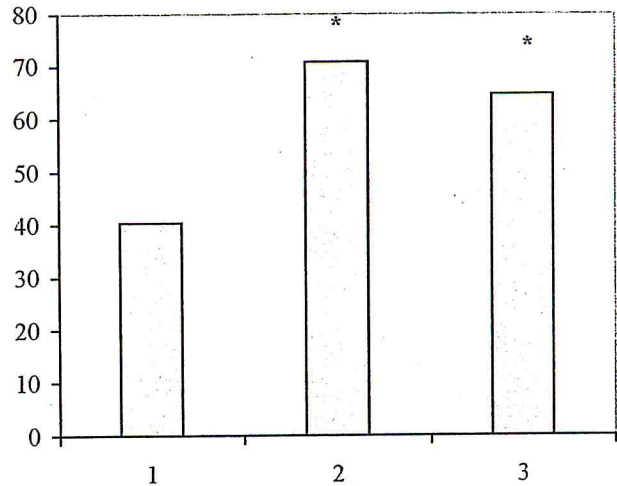


Рис. Влияние ИЭМ-1715 и амтизола на продолжительность жизни мышей в условиях ОГТГ.

По оси ординат – продолжительность жизни, мин; по оси абсцисс – 1 – контроль, 2 – ИЭМ-1715, 3 – амтизол; * – достоверность отличия по сравнению с контролем при $p < 0,05$

Окклюзия общих сонных артерий у крыс продолжительностью 90 мин приводила к увеличению содержания лактата на 161% и уменьшению количества пирувата на 42% в мозге по сравнению с этими показателями у ложнооперированных животных (табл. 1). Коэффициент лактат/пируват возрастал при этом с 9,8 до 44,3. Отмечалась также активация ПОЛ: увеличивалась продукция ГПЛ и МДА на 39% и 49% соответственно. Одновременно снижалась активность СОД на 32% и каталазы на 24%.

Введение животным ИЭМ-1715 через 30 мин после окклюзии сонных артерий оказывало коррективное влияние на нарушенные ишемией энергетический обмен, процессы ПОЛ и антиоксидантную систему (АОС) головного мозга. Так, отмечалось снижение концентрации лактата и увеличение концентрации пирувата до уровня значений этих показателей у ложнооперированных животных. Коэффициент лактат/пируват уменьшался с 44,3 до 13. Наблюдалось снижение содержания ГПЛ и МДА, а также восстановление активности ферментов СОД и каталазы до исходных значений.

Результаты исследования антиишемического эффекта ИЭМ-1715 на модели острой ишемии миокарда представлены в табл. 2. Как видно из таблицы, окклюзия коронарных артерий сопровождалась увеличением активности ЛДГ на 39% и снижением активности СДГ на 27%, а также падением концентрации макроэргических соединений КФ и АТФ на 41% и 23% соответственно. Отмеченные нарушения в энергетическом обмене сопровождалось увеличением продукции МДА на 54%, падением активности СОД и каталазы на 30% и 36% соответственно и снижением содержания ВГ на 41%.

Влияние ИЭМ-1715 на показатели энергетического обмена, ПОЛ и антиоксидантной системы в ишемизированном головном мозге крыс (Mean±SEM)

Показатель	Группы животных (n=10)		
	ложнооперированные	контроль	ИЭМ-1715
Лактат, мкМ/г	2,55±0,03	6,65±0,10*	2,73±0,2**
Пируват, мкМ/г	0,26±0,02	0,15±0,01*	0,21±0,02**
Лактат/пируват	9,8	44,3	13
ГПЛ, ОД ₄₈₀	0,097±0,002	0,134±0,002*	0,100±0,002**
МДА, нМ/г	7,30±0,43	10,86±0,42*	7,40±0,75**
СОД, А/мг белка	3,48±0,16	2,37±0,11*	3,57±0,10**
Каталаза, мкМ Н ₂ О ₂ /мг белка · мин	7,35±0,37	5,63±0,27*	7,13±0,18**

Примечание. * – достоверность отличия по сравнению с группой ложнооперированных крыс, ** – достоверность отличия по сравнению с контролем при p<0,05.

Таблица 2

Влияние ИЭМ-1715 на показатели энергетического обмена, ПОЛ и антиоксидантной системы ишемизированного миокарда крыс (Mean±SEM)

Показатель	Группы животных (n=10)		
	ложнооперированные	контроль	ИЭМ-1715
ЛДГ, мкМ НАДН/мг белка · мин	1,31±0,04	1,82±0,08*	1,25±0,03**
СДГ, нМ сукцината/мг белка · мин	3,44±0,13	2,53±0,18*	3,27±0,17**
АТФ, мкМ/г	2,88±0,07	2,23±0,07*	2,73±0,05**
КФ, мкМ/г	5,3±0,12	3,14±0,16*	5,08±0,18**
МДА, нМ/г	6,58±0,16	10,12±0,26*	6,86±0,26**
СОД, А/мг белка	1,54±0,03	1,08±0,02*	1,43±0,03**
Каталаза, мкМ Н ₂ О ₂ /мг белка · мин	6,56±0,13	4,23±0,16*	6,35±0,14**
ВГ, мкМ/г	36,6±0,44	21,6±0,65*	35,4±0,73**

Примечание. * – достоверность отличия по сравнению с группой ложнооперированных крыс, ** – достоверность отличия по сравнению с контролем при p<0,05.

Введение ИЭМ-1715 сразу после перевязки коронарных артерий способствовало восстановлению активности ЛДГ и СДГ. Количество КФ и АТФ увеличивалось до величин, достоверно не отличающихся от этих показателей у ложнооперированных крыс. Нормализация энергетического обмена в миокарде сопровождалась снижением интенсивности ПОЛ и восстановлением активности ферментов АОС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования показали, что ИЭМ-1715 проявлял выраженную антигипоксическую активность на модели ОГТГ, вызванной введением фторида натрия, блокирующего гликолиз. Так, препарат способствовал увеличению продолжительности жизни крыс в 1,75 раза по сравнению с контролем и выживанию 20% животных. Антигипоксическое действие ИЭМ-1715 сопоставимо с эффектом амтизола. Амтизол увеличивал длительность

жизни крыс в 1,6 раза по сравнению с контролем, при этом выживало 30% животных.

Полученные данные позволяют предположить, что оба препарата в равной степени активируют гликолиз, являющийся одним из срочных механизмов адаптации клетки к гипоксии. Известно, что амтизол оказывает положительное многокомпонентное влияние на энергетику клетки в условиях гипоксии. Одним из компонентов такого влияния является активация гликолиза с увеличением анаэробного образования АТФ [10]. Обычно возможности гликолиза реализуются в течение непродолжительного времени, затем интенсивность его падает вплоть до полной остановки из-за развивающегося ацидоза вследствие накопления лактата. Амтизол снижает содержание лактата, усиливая его утилизацию в реакциях глюконеогенеза [4]. Можно полагать, что ИЭМ-1715, как и амтизол, не только активирует гликолиз, но и уменьшает количество лактата в клетках.

Выявленная способность ИЭМ-1715 предупреждать блокаду гликолиза в условиях ОГТГ послужит

да основанием для изучения его возможного антиишемического эффекта на моделях острой ишемии головного мозга и миокарда. Головной мозг очень чувствителен к недостатку кислорода, что обусловлено особенностью его кровоснабжения, низкими запасами макроэргических соединений и углеводов, а также высокой потребностью нейронов в кислороде. Результаты проведенного исследования показали, что окклюзия сонных артерий продолжительностью в 90 мин приводила к выраженному нарушению энергетического обмена в мозге. Об этом свидетельствует увеличение коэффициента лактат/пируват в 4,5 раза, отражающее угнетение интенсивности аэробных процессов образования энергии и резкое усиление анаэробного гликолитического пути.

Миокард, энергообеспечение которого целиком зависит от аэробного пути окисления субстратов, также очень чувствителен к недостатку кислорода. Окклюзия коронарных артерий длительностью в 60 мин приводила к выраженному нарушению энергетического статуса сердца. Так, увеличивалась активность ЛДГ, обратимо катализирующей восстановление пирувата в лактат, и снижалась активность наиболее устойчивого к гипоксии дыхательного фермента СДГ. Ранее показано, что 60-минутная ишемия миокарда приводила к увеличению концентрации лактата на 211% [1]. Отмеченные изменения в энергетическом обмене сопровождались снижением содержания АТФ и КФ.

Известно, что КФ играет важную роль в обеспечении внутриклеточного транспорта энергии в клетках и является одним из естественных факторов стабилизации клеточных мембран. Снижение концентрации этого макроэрга в нейронах и кардиомиоцитах в условиях гипоксии приводит к дестабилизации и повреждению мембранных структур [8].

Энергодефицит, вызванный гипоксией, сопровождается активацией ПОЛ и подавлением активности ферментов АОС, в первую очередь СОД, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, вследствие распада и торможения синтеза их белковых компонентов [8, 9]. Полученные нами данные свидетельствуют, что при ишемии головного мозга увеличивалась продукция ГПЛ и МДА и снижалась активность СОД и каталазы. При ишемии миокарда также отмечалась активация ПОЛ и подавление активности СОД, каталазы и ферментной системы биорегенерации окисленного глутатиона.

Как известно, активация свободнорадикальных процессов в условиях гипоксии приводит к комплексной модификации функций биологических мембран, затрагивающей как липидный слой, так и мембранные ферменты. Повреждаются или модифицируются

главные функции мембран: барьерная, рецепторная, каталитическая [8].

ИЭМ-1715 проявлял энергостабилизирующий эффект как при ишемии головного мозга, так и при ишемии миокарда. Так, препарат, введенный животным через 30 мин после окклюзии сонных артерий, снижал в ткани мозга концентрацию лактата до его уровня у ложноперированных крыс. Коэффициент лактат/пируват снижался с 44,3 до 13 (в 3,4 раза), что свидетельствует о значительной активации продукции макроэргов на фоне дефицита кислорода. В миокарде животных, получавших ИЭМ-1715 сразу после окклюзии коронарной артерии, восстанавливалась активность ЛДГ и СДГ, увеличивалось содержание АТФ и КФ.

Известно, что всем антигипоксантам присуще косвенное антиоксидантное действие [6]. Поддерживая достаточно высокий энергетический потенциал при дефиците кислорода в клетках, они предотвращают негативные сдвиги, приводящие к активации свободнорадикального окисления и к угнетению АОС.

ИЭМ-1715 эффективно подавлял гиперактивацию ПОЛ и восстанавливал активность ферментов АОС как в головном мозге, так и в миокарде. Можно полагать, что способность ИЭМ-1715 ингибировать свободнорадикальный (нефосфорилирующий) вид окисления позволяет нейронам и кардиомиоцитам экономить кислород и направлять его в энергопродуцирующие окислительные реакции в митохондриях.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что ИЭМ-1715 проявляет выраженную антигипоксическую активность. Препарат активирует гликолиз, снижает уровень лактата, устраняет энергодефицит, уменьшает интенсивность свободнорадикального окисления, восстанавливает активность АОС. Сочетание энергостабилизирующего и антиоксидантного свойств ИЭМ-1715 может способствовать сохранению функциональной активности клеточных мембран и ультраструктуры нейронов и кардиомиоцитов, что необходимо для защиты головного мозга и миокарда при ишемии.

Литература

1. Бульон В.В., Крылова И.Б., Родионова О.М. и др. Сравнительное изучение кардиопротекторных эффектов уридин-5-монофосфата и уридин-5-трифосфата на ранних сроках острой ишемии миокарда // Бюл. экспер. биол. 2007. Т. 144. № 9. С. 297–300.
2. Виноградов В.М., Смирнов А.В. Антигипоксанта – важный шаг на пути разработки фармакологии энергетического обмена // Антигипоксанта и ак-

- топротекторы: итоги и перспективы (Вып. 1). СПб., 1994. С. 23.
3. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лаб. дело. 1983. № 10. С. 30–33.
 4. Зарубина И.В. Влияние амтизола на процесс глюконеогенеза при острой гипоксии // Вопросы биологической медицины и фармацевтической химии. 2000. № 4. С. 45–50.
 5. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Молекулярная фармакология антигипоксантов. СПб.: Н-Л, 2004.
 6. Лукьянова Л.Д., Ушаков И.Б. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. М.: Истоки, 2004.
 7. Методы биохимических исследований / Под ред. М.И. Прохоровой. Л.: ЛГУ, 1982.
 8. Оковитый С.В. Клиническая фармакология антигипоксантов (Часть I). М.: ФАРМиндекс-Практик, 2004. Вып. 6. С. 30–39.
 9. Поварова О.В., Каленикова Е.И., Городецкая Е.И., Медведев О.С. Антиоксиданты как нейропротекторы при ишемическом инсульте // Экспер. и клин. фармакол. 2003. Т. 66. № 3. С. 69–73.
 10. Смирнов А.В., Зарубина И.В., Криворучко Б.И. Роль гликолиза в реализации защитных эффектов амтизола при острой гипоксии // Рус. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2000. № 4. С. 440–446.
 11. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977.
 12. Gavrovskaaya L.K. Krylova I.B., Selina E.N. Antihypoxic properties of taurinamide derivatives: the experimental study // Advances experimental biology. Taurine 6. / Ed. S.S. Oja, P. Saransaari // Springer. 2005. Vol. 583. P. 523–528.
 13. Johnsson L.H., Borg L.A.H. A spectrophotometric method of determination of catalase activity in small tissue samples // Anal. Biochem. 1988. Vol. 174. P. 331–336.