

О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, Е. Д. Крыльский, Е. С. Таныгина, Е. М. Кирилова

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ 2,4-ДИМЕТОКСИФЕНИЛБИГУАНИДА НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНОВОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В СЕРДЦЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

ФГБОУ ВО "Воронежский государственный университет", Россия, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1; e-mail: solya333@mail.ru

Разработана методика синтеза 2,4-диметоксифенилбигуанида, отобранного с помощью компьютерной программы прогнозирования биологической активности PASS, и проведена оценка влияния этого нового бигуанидинового производного на содержание восстановленного глутатиона, активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы в сердце и сыворотке крови крыс с экспериментальным ревматоидным артритом. При введении животным с патологией тестируемого соединения выявлено изменение исследуемых параметров в сторону контрольных значений, что может быть объяснено с точки зрения реализации его кардиопротекторного и антиоксидантного действия. Данные, полученные в ходе работы, могут быть применены при разработке новых способов профилактики и лечения указанного патологического состояния.

Ключевые слова: 2,4-диметоксифенилбигуанид; ревматоидный артрит; крысы; восстановленный глутатион; глутатионпероксидаза; глутатионредуктаза; глутатионтрансфераза.

Имеется ряд литературных данных, свидетельствующих, что ревматоидный артрит (РА) — болезнь, приводящая к инвалидизации и потере трудоспособности, может быть отнесен к числу свободнорадикальных патологий [1, 2]. РА — системное воспалительное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением суставов по типу хронического прогрессирующего эрозивно-деструктивного полиартрита [3]. Данная патология связана также с высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), которые являются ведущей причиной смертности больных РА [4]. Системные и внесуставные проявления РА, в том числе и ССЗ, имеющие в данном случае наибольшее значение, определяют прогноз в целом, поэтому важно их раннее распознавание и целенаправленное лечение.

Как известно, одним из первичных звеньев системы иммуногенеза, участвующих в развитии воспалительного процесса, в том числе и при РА, являются гранулоцито-макрофагальные клетки. При их контакте с внешним сигналом инициируется процесс генерации активных форм кислорода (АФК), отражающий особенности кислородного метаболизма клеток иммунной системы, что в результате оказывает патогенное влияние на биомолекулы клеток различных типов и межклеточного пространства [5–7]. В то же время конкретные механизмы возникновения и патогенеза данного заболевания, особенности свободнорадикального гомеостаза и функционирования антиоксидантной системы (АОС) организма, лимитирующей скорость процессов свободнорадикального окисления (СО) биомолекул, в этих условиях остаются до конца не выясненными [8, 9].

В связи с распространенностью и тяжестью свободнорадикальных патологий до настоящего времени актуальной задачей биомедицины остается поиск и оценка возможности применения соединений с анти-

оксидантными свойствами в технологии разработки новых лекарственных препаратов, способных оказывать позитивный эффект при развитии заболеваний подобного рода. В этом плане большой интерес вызывают производные бигуанида, обладающие широким спектром биологической активности. Среди них, в частности, обнаружены вещества, на основе которых запатентованы препараты, применяемые для лечения расстройств ССС [10–12]. В литературе имеются также сведения о возможном проявлении данными соединениями антиоксидантных свойств, связанных с ингибированием образования $O_2^{\bullet-}$ и NO^{\bullet} , подавлением пероксидного окисления липидов [13, 14].

В данной работе был проведен поиск бигуанидов и их производных с целевой биологической активностью с помощью программы прогноза "структура — свойство" PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), доступной в режиме on-line: <http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/>. В результате проведенного компьютерного анализа нескольких сотен веществ был отобран бигуанид I с предполагаемым спектром интересующей нас биологической активности (табл. 1).

Таким образом, в задачу настоящей работы входила разработка метода синтеза выбранного соединения — N-(2,4-диметоксифенил)иминодидикарбонимид диамида (I, 2,4-диметоксифенилбигуанида) и исследование влияния данного ранее не описанного соединения на содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность глутатионпероксидазы (ГП, КФ 1.11.1.9), использующей его для детоксикации пероксидов, глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2), обеспечивающей регенерацию этого антиоксиданта, а также глутатионтрансферазы (ГТ, КФ 2.5.1.18), обезвреживающей различные ксенобиотики или их микросомальные метаболиты и органические пероксиды, в сердце и сыворотке крови крыс с экспериментальным РА. Синтез

I осуществлен на кафедре органической химии Воронежского государственного университета.

Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР ^1H сняты на приборах Bruker AC (250 – 400 МГц) в диметилсульфоксиде DMCO-d_6 относительно тетраметилсилана (ТМС). Элементный анализ проводился на приборе Carlo Erba NA 1500. Данные анализа соответствуют вычисленным для I.

N-(2,4-Диметоксифенил)иминодидикарбонимид диамид (I).

А). Получение гидрохлорида I. 10 ммоль 2,4-диметоксианилина растворяют в 5 мл изопропилового спирта, добавляют при перемешивании 1 мл соляной кислоты (36,46 М), затем 10 ммоль дициандиамида. Нагревают до кипения в течение 0,5 – 1 ч, охлаждают до комнатной температуры, закристаллизовавшуюся массу отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают изопропиловым спиртом, перекристаллизовывают из воды.

Б). Получение свободного основания I. 10 ммоль гидрохлорида I растворяют в минимальном количестве горячей воды, добавляют (осторожно) 15 ммоль твердого гидроксида натрия при перемешивании. Охлаждают до комнатной температуры, выпавшие кристаллы отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают холодной водой, перекристаллизовывают из воды.

Полученные в ходе работы физико-химические характеристики и данные ЯМР-спектроскопии синтезированного соединения приведены в табл. 2.

Экспериментальная биологическая часть

В экспериментах использовали самцов белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) 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).

В ходе работы животные были разделены на 4 экспериментальные группы: 1-ю группу ($n = 22$) составили контрольные животные; 2-ю группу ($n = 23$) — крысы с РА, вызванным однократным подкожным введением в подушечку лапки полного адьюванта Фрейнда — комплекса соединений, вызывающего развитие

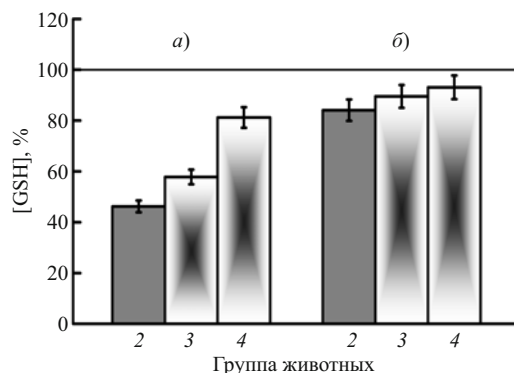


Рис. 1. Содержание GSH в сердце (а) и сыворотке крови (б) крыс: при экспериментальном РА (2-я группа животных); при введении бигунида I в дозах 25 мг/кг (3-я группа) и 50 мг/кг (4-я группа) животным с патологией. За 100 % принимали значения в контроле (1-я группа животных): в сердце — 0,29 мМ, в сыворотке крови — 0,37 мМ

данной патологии, в объеме 100 мкл [15]; в 3-й ($n = 19$) и 4-й ($n = 20$) группах животным с патологией внутрибрюшинно вводили I в дозе 25 или 50 мг/кг массы соответственно в виде раствора в 1 мл 0,9 % раствора NaCl ежедневно 1 раз в сутки, начиная с 7 дня после введения адьюванта Фрейнда. На 15 день после введения адьюванта Фрейнда у наркотизированных животных забирали кровь и извлекали сердце.

Содержание ревматоидного фактора (РФ) — маркера развития патологии — определяли в сыворотке крови крыс турбидиметрическим методом с помощью приборов Cobas 6000 (“F. Hoffmann-LaRocheLtd”, Швейцария) и CobasIntegra 400 (“F. Hoffmann-LaRocheLtd”, Швейцария). Концентрацию GSH определяли спектрофотометрически при длине волны 412 нм по реакции с реактивом Элмана [16]. Активность ферментов оценивали спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Измерение активности ГП проводили с помощью сопряженной ферментативной реакции в среде следующего состава: 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ NADPH, 0,85 мМ GSH, 0,37 мМ H_2O_2 , 1 ЕД/мл ГР. Контрольная проба не содержала GSH. Активность ГР определяли в среде спектрофотометрирования, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ NADPH и 0,8 мМ окисленного глутатиона (GS-SG). Активность ГТ определяли с помощью метода, основанного на оценке скорости образования глутатион-S-2,4-динитробензола в реакции GSH с

Таблица 1

Характеристика бигунида, отобранного для дальнейшего исследования

Структурная формула бигунида	Наиболее вероятная активность	Вероятность
<p>N-(2,4-Диметоксифенил)иминодидикарбонимид диамид</p>	Кардиопротекторная, противоишемическая	0,75 – 0,82

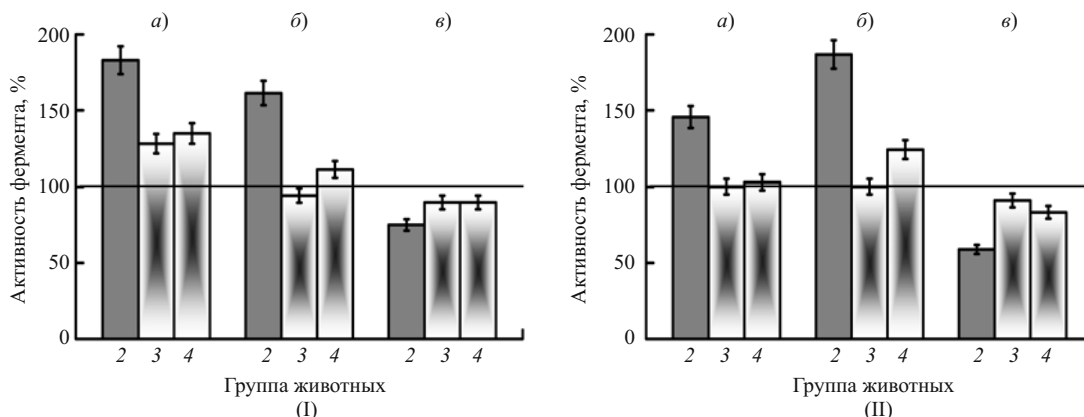


Рис. 2. Активность глутатионпероксидазы (а), глутатионредуктазы (б), глутатионтрансферазы (в) в сердце (I) и сыворотке крови (II) крыс: при экспериментальном РА (2-я группа животных); при введении бигуанида I в дозах 25 мг/кг (3-я группа) и 50 мг/кг (4-я группа) животным с патологией. За 100 % принимали значения в контроле (1-я группа животных): в сердце для ГП — 0,059, для ГР — 0,007, для ГТ — 0,0108 Е/мг белка; в сыворотке крови для ГП — 0,018, для ГР — 0,0019, для ГТ — 0,0009 Е/мг белка.

1-хлор-2,4-динитробензолом, в среде следующего состава: 0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ 1-хлор-2,4-динитробензол, 5 мМ GSH. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25 °С. Определение общего белка проводили по методу Лоури [17]. Активность ферментов представляли в виде удельной активности (Е/мг белка). Данные, полученные при проведении опытов в 2-кратной аналитической повторности, обрабатывали с использованием статистических критериев [18]. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0,05$. На рисунках приводятся средние арифметические значения исследуемых параметров и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение

Согласно полученным результатам, значения РФ при развитии РА достигали максимума на 15 день эксперимента, что согласуется с имеющимися литературными данными [19]. Так, содержание РФ у крыс 2-й группы увеличивалось в 1,5 раза по сравнению с контролем (с $5,31 \pm 0,25$ до $7,84 \pm 0,38$) МЕ/мл). Введение бигуанида I в дозах 25 и 50 мг/кг животным с патологией приводило к снижению данного параметра в 1,2 и 1,3 раза относительно значений при РА, что свидетельствует о способности данного бигуанида проявлять протекторное действие в условиях эксперимента.

Установлено, что при развитии экспериментального РА у крыс наблюдается снижение содержания GSH в сердце в 2,2 раза, в сыворотке крови — в 1,2 раза (рис. 1), что могло быть связано с его расходом на обезвреживание образующихся при данной патологии интермедиатов и продуктов СО биомолекул. При

этом, очевидно, уменьшение уровня этого антиоксиданта не могло быть уравновешено даже повышением активности ГР, имеющим место в данных условиях, что соотносится с литературными сведениями [20]. Нами было отмечено увеличение активности этого фермента, катализирующего восстановление GS-SG за счет использования NADPH, в 1,6 и 1,9 раза в сердце и сыворотке крови соответственно (рис. 2). Это может иметь важное адаптивное значение для формирования клеточного ответа на развитие оксидативного стресса, поскольку в этих условиях возрастает также активность ГП, непосредственно участвующей в обезвреживании метаболитов и продуктов реакций СО при участии GSH. Так, на фоне развития экспериментального РА выявлено увеличение активности ГП в сердце животных в 1,8 раза, в сыворотке крови — в 1,5 раза относительно контрольных значений (рис. 2). В то же время для активности ГТ — еще одного фермента, использующего GSH для обезвреживания экзо- и эндогенных токсикантов, при развитии РА у крыс было выявлено снижение значений относительно контроля в сердце в 1,3 раза, в сыворотке крови — в 1,7 раза (рис. 2). Полученные данные соотносятся со снижением активности ГТ при развитии окислительного стресса у пациентов с остеоартритом коленного сустава [21].

Введение I в дозах 25 и 50 мг/кг на фоне развития экспериментального РА приводило к повышению содержания GSH в сердце в 1,3 и 1,8 раза. При исследовании данного параметра в сыворотке крови животных с патологией, которым вводили тестируемый бигуанид I в дозе 25 мг/кг, достоверных изменений обнаружено не было, а при его действии в дозе 50 мг/кг уровень GSH возрастал в 1,1 раза относительно значений при РА (рис. 1). По-видимому, за счет реализации антиоксидантного и кардиопротекторного

Таблица 2

Характеристики синтезированного бигуанида

Соединение	Брутто-формула	Т. пл., °С	Выход, %	Химический сдвиг, δ, м.д.
I	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₂	202 – 203	85	3,44 (с, 3H, OCH ₃), 3,56 (с, 3H, OCH ₃), 7,22 (с, 1H, аром.), 7,60 (д, 1H, аром.), 7,82 (д, 1H, аром.), 8,54 (уш.с, 2H, бигуанид), 8,85 (уш.с, 4H, бигуанид)

действия исследуемого бигуанида I при РА происходило уменьшение степени развития оксидативного стресса и, как следствие, расходования GSH, более выраженное в сердце животных.

Наряду с этим было выявлено снижение активности ГП в сердце при введении животным с патологией бигуанида I в дозах 25 и 50 мг/кг в 1,4 раза, а ГР — в 1,7 и 1,5 раза соответственно по сравнению с животными 2-й опытной группы (рис. 2). Активность ГП в сыворотке крови в этих условиях снижалась в 1,5 и 1,4 раза, ГР — в 1,9 и 1,5 раза (рис. 2). При действии бигуанида I в дозах 25 и 50 мг/кг в сердце крыс было выявлено также возрастание активности ГТ в 1,2 раза, в сыворотке крови — в 1,5 и 1,4 раза относительно значений при РА (рис. 2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об изменении исследуемых параметров в направлении контроля при действии выбранного бигуанидинового производного на фоне развития патологии. По всей видимости, бигуанид I может способствовать ослаблению нагрузки на глутатионовую АОС на фоне развития окислительного стресса, вызванного экспериментальным РА, за счет проявления антиоксидантных и кардиопротекторных свойств. При этом сравнение влияния бигуанида I в различных дозах на исследуемые параметры в большинстве случаев не выявило возрастания степени проявления протекторного эффекта, напротив, в некоторых случаях было обнаружено более выраженное действие бигуанида I в дозе 25 мг/кг. Как известно, некоторые соединения способны оказывать как анти-, так и прооксидантный эффект, причем результат зависит от дозы воздействующего вещества. По-видимому, в случае бигуанида I имеет место подобное влияние на свободнорадикальный гомеостаз живых систем, когда с повышением дозы отмечается снижение степени проявления протекторного действия. Данные, полученные в ходе работы, могут быть применены при разработке новых способов профилактики и лечения указанного патологического состояния.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания ВУЗам в

сфере научной деятельности на 2014 – 2016 годы. Задание № 6.2477.2014/К.

ЛИТЕРАТУРА

1. F. Karatas, I. Ozates, and H. Canatan, et al., *Indian J. Med. Res.*, **118**, 178 – 181 (2003).
2. A. Kamanli, M. Naziroglu, and N. Aydilek, et al., *Cell Biochem. Funct.*, **22**(1), 53 – 57 (2004).
3. В. И. Мазуров (ред.), *Клиническая ревматология*, Фолиант, Санкт-Петербург (2005), сс. 87 – 140.
4. S. S. Dhawan and A. A. Quyyumi, *Cur. Atheroscler. Rep.*, **10**(2), 128 – 133 (2008).
5. L. I. Filippin, R. Vercelino, and N. P. Marroni, et al., *Clin. Exp. Immunol.*, **152**, 415 – 422 (2008).
6. L. Bazzichi, M. L. Ciompi, and L. Betti, et al., *Clin. Exp. Rheumatol.*, **20**(6), 761 – 766 (2002).
7. C. A. Hitchon and H. S. El-Gabalawy, *Arthritis Res. Ther.*, **6**(6), 265 – 278 (2004).
8. D. Vijayakumar, K. Suresh, and S. Manoharan, *Indian J. Clin. Biochem.*, **21**(1), 104 – 108 (2006).
9. K. M. Surapneni and V. S. Chandrasada Gopan, *Indian J. Clin. Biochem.*, **23**(1), 41 – 44 (2008).
10. C. B. Chapleo, J. C. Doxey, and P. L. Myers, *J. Med. Chem.*, **25**(7), 821 – 824 (1982).
11. C. Dardonville, P. Goya, and I. Rozas, *Bioorg. Med. Chem.*, № 8, 1567 – 1577 (2000).
12. L. Sunkyung, Y. Y. Kyu, and K. H. Sun, et al., *J. Med. Chem.*, **48**(8), 2882 – 2891 (2005).
13. Л. В. Кондратьева, *Рус. мед. ж., Эндокринология*, **13**(6), 305 (2005).
14. C. Szabo, G. Ferrer-Sueta, and B. Zingarelli, *J. Biol. Chem.*, **272**(14), 9030 – 9036 (1997).
15. D. Wang, Y. Chang, and Y. Wu, et al., *Clin. Exp. Immunol.*, **163**, 225 – 234 (2011).
16. В. С. Бузлама, *Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных*, Воронеж (1997).
17. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, and A. L. Farr, et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 – 275 (1951).
18. Э. Ллойд, У. Ледерман, *Справочник по прикладной статистике*, Финансы и статистика, Москва (1990).
19. S. Manzi and M. C. Wasko, *Ann. Rheum. Dis.*, **59**, 321 – 325 (2000).
20. В. А. Дмитриев, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Москва (2008).
21. W. Kulich, N. Fagerer, and H. Schwann, *Cur. Med. Res. Opin.*, **23**(8), 1981 – 1986 (2007).

Поступила 04.06.15

SYNTHESIS AND ESTIMATION OF THE INFLUENCE OF 2,4-DIMETOKSIPHENYLBIGUANIDE ON GLUTATHIONE ANTIOXIDANT SYSTEM ACTIVITY IN RAT HEART AND BLOOD SERUM UNDER EXPERIMENTAL RHEUMATOID ARTHRITIS CONDITIONS

O. A. Safonova*, T. N. Popova, E. D. Kryl'skii, E. S. Tanygina, and E. M. Kirilova

Voronezh State University; Voronezh, 394006 Russia

* e-mail: solya333@mail.ru

A method for the synthesis of 2,4-dimethoxyphenylbiguanide – drug selected with the aid of computer program for Prediction of Activity Spectra of Substances (PASS) – have been developed. The influence of this newly synthesized biguanide derivative on the reduced glutathione content, glutathione peroxidase, glutathione reductase, and glutathione transferase activities in rat heart and blood serum was estimated under experimental rheumatoid arthritis conditions. A change in the investigated parameters toward the corresponding control values has been revealed upon the injection of tested substance to animals with the pathology. This can be explained in terms of manifestation of the cardioprotective and antioxidant activity of the drug. The obtained data can be used in developing new methods for prevention and treatment of the indicated pathological state.

Keywords: 2,4-dimetoksifenylbигуанид; ревматоидный артрит; крысы; сниженный глутатион; глутатион пероксидаза; глутатион редуктаза; глутатион трансфераза.