

Т. Н. Попова, О. В. Суховеева, А. В. Макеева, А. А. Агарков,
Е. Д. Крыльский, Амин С. М. С. Мухаммад

СИНТЕЗ И ВЛИЯНИЕ БИГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ПАРАМЕТРЫ БИОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ И УРОВЕНЬ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА В МОЗГЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

ГОУ ВПО "Воронежский государственный университет", Воронеж, Россия

Проведено исследование влияния некоторых вновь синтезированных бигуанидов (N-[амино(имино)метил]морфолин-4-карбоксимид (I) и N-[амино(имино)метил]пиперидин-1-карбоксимид (II)) на параметры биохемилюминесценции (БХЛ): светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность максимальной вспышки (I_{max}), характеризующие интенсивность свободнорадикальных процессов, и величину тангенса угла наклона кривой ($tg\alpha_2$), отражающую общую антиоксидантную активность, а также на уровень восстановленного глутатиона в ткани мозга и сыворотке крови крыс в условиях постишемической реперфузии головного мозга. Выявлено, что под влиянием данных бигуанидов исследуемые параметры, возрастающие в ответ на развитие оксидативного стресса при патологии мозга, изменялись в сторону нормы. Установлен дозозависимый характер воздействия данных веществ. Так, при введении I и II в дозах 25 и 50 мг/кг обнаружено наиболее выраженное снижение параметров БХЛ и концентрации восстановленного глутатиона. Использование данных протекторов в дозах 12,5 и 75 мг/кг не приводило к значительным изменениям исследуемых параметров. Полученные результаты свидетельствуют, что вещества гуанидинового ряда, вводимые в определенных дозах, могут выступать в роли нейропротекторов, способствуя снижению уровня свободнорадикального окисления.

Ключевые слова: бигуанидовые производные, ишемия-реперфузия головного мозга.

Нарушение функционирования системы антиоксидантной защиты (АОЗ), контролирующей каскад свободнорадикальных реакций, неизбежно отражается на эффективности процессов детоксикации активных форм кислорода (АФК) в клетке и может привести к возникновению окислительного стресса и связанных с ним необратимых изменений в тканях [1]. Окислительный стресс является характерным звеном патогенеза ряда заболеваний, включая ишемическое поражение головного мозга [2]. Ишемия представляет собой ухудшение или полное прекращение всех функций локального кровоснабжения, что взаимосвязано с нарушением работы АОЗ организма.

Нейропротективная терапия при ишемии мозга включает препараты, обладающие антиоксидантным действием. В настоящее время активно изучаются свойства антиоксидантных препаратов природного и синтетического происхождения. Бигуаниды являются производными гуанидина, которые интересны, прежде всего, широким спектром биологической активности, которая может быть полезна для использования в практической деятельности. В настоящее время некоторые из них уже нашли применение в медицине, фармакологии, микробиологии. Они обнаружены в составе веществ, на основе которых запатентованы препараты, применяемые для лечения расстройств сердечно-сосудистой [3 – 7], нервной [8] и эндокринной систем (N,N-дизамещенные гуанидины) [9], а также веществ с противоопухолевой активностью (произ-

водные пиридилцианогуанидина) [10]. Ряд работ также свидетельствует, что некоторые синтетические производные гуанидина обладают антиоксидантной активностью, обусловленной торможением клеточных окислительных реакций, в том числе и окислительного гликозилирования белков [11]. Известно, что гуанидиновые производные, например меркаптоэтилгуанидин, метформин и другие, способны непосредственно перехватывать свободные радикалы, в частности пероксинитрит, или опосредованно уменьшать их содержание за счет торможения внутриклеточного формирования. Этот эффект обусловлен ингибированием НАДФН-оксидазы, являющейся основным источником супероксидного радикала, и NO-синтазы, образующей оксид азота [12]. Однако до сих пор существует достаточно вопросов о возможности использования бигуанидов в области нейропротекции. В связи с этим целью данной работы явилась сравнительная оценка воздействия N-[амино(имино)метил]морфолин-4-карбоксимид (I) и N-[амино(имино)метил]пиперидин-1-карбоксимид (II) на параметры биохемилюминесценции, отражающие интенсивность свободнорадикальных процессов (СРП), а также на уровень восстановленного глутатиона в ткани мозга и сыворотке крови при развитии ишемии-реперфузии головного мозга (ИРГМ) у крыс.

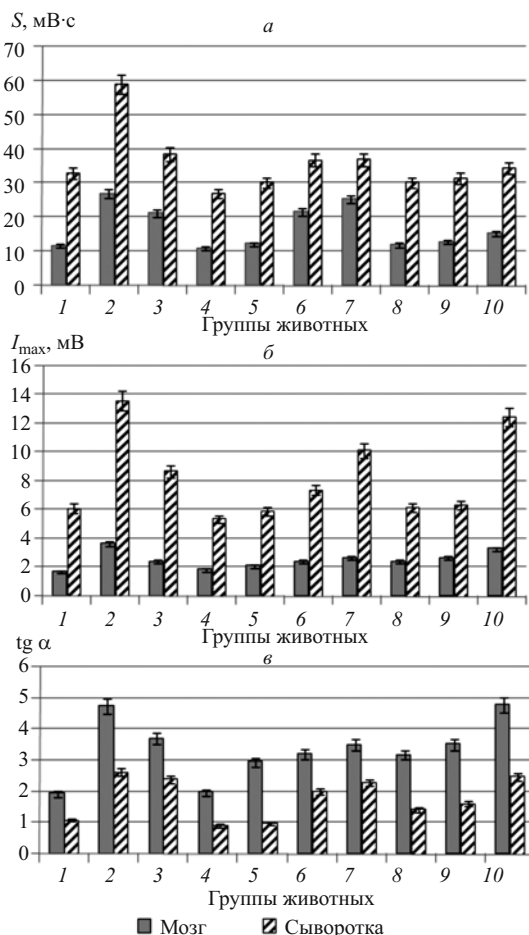


Рис. 1. Параметры биохемилюминесценции в мозге и сыворотке крови крыс: 1 — норма; 2 — ишемия-реперфузия головного мозга; 3–6 — введение I, 7–10 — введение II в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг соответственно при патологии: а — светосумма хемилюминесценции (S); б — интенсивность максимальной вспышки (I_{\max}); в — тангенс угла наклона кинетической кривой ($\text{tg}\alpha$).

Экспериментальная химическая часть

На первом этапе работы был проведен поиск бигуанидных производных с целевой биологической активностью с помощью программы прогноза структура – свойство PASS, доступной в режиме on-line [13 – 16]. Компьютерному анализу было подвергнуто несколько сотен веществ с наиболее высокой вероятностью ($> 0,7 - 0,9$) проявления той или иной активности. В результате были отобраны бигуаниды с предполагаемым спектром интересующей нас биологической активности (табл. 1). Использовали ЯМР-спектрометр ^1H Bruker AC, с частотой 400 Мгц. Съемка производилась в DMSO-d_6 относительно ТМС. Элементный анализ осуществлялся на Carlo Erba NA 1500. Данные, полученные в результате анализа, совпадают с рассчитанными для принятых брутто-формул.

Общая методика получения бигуанидов (соединения I, II).

А). Получение гидрохлоридов. 10 ммоль соответствующего амина (пиперидин, морфолин) растворяют в 5 мл бутилового спирта, добавляют при перемешива-

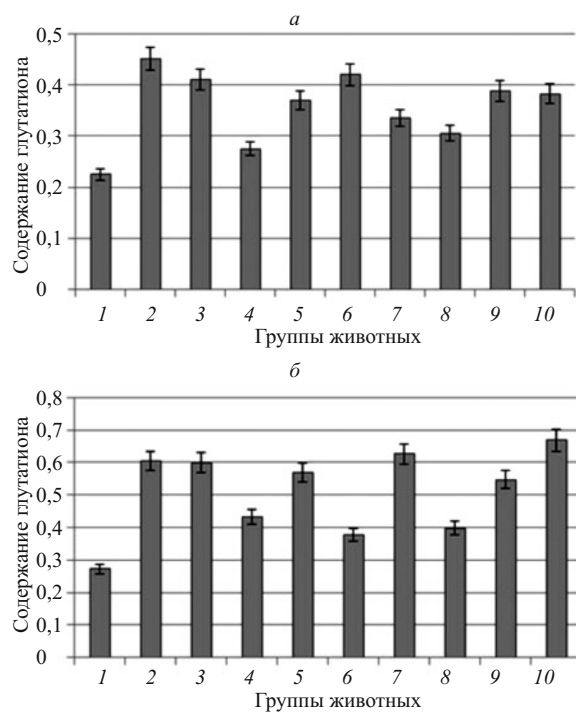


Рис. 2. Содержание восстановленного глутатиона: а — в мозге, б — в сыворотке крови крыс; 1 — норма; 2 — ишемия-реперфузия головного мозга; 3–6 — введение I, 7–10 — введение II в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг соответственно при патологии.

нии 1 мл соляной кислоты, затем 10 ммоль дистицидиамида. Нагревают до кипения в течение 8–10 ч, охлаждают до комнатной температуры, закристаллизовавшуюся массу отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают охлажденным изопропиловым спиртом и перекристаллизовывают из того же спирта.

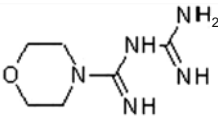
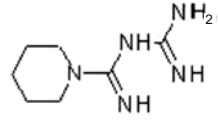
Б). Получение свободных оснований. 15 ммоль натрия растворяют в 10 мл метанола, в полученный раствор метилата вносят 10 ммоль гидрохлорида бигуанида I или II, перемешивают при комнатной температуре 20–30 мин. Выпавший осадок хлорида натрия отфильтровывают на фильтре Шота, метанольный раствор упаривают на роторном испарителе, выпавшие кристаллы отфильтровывают на фильтре Шота, перекристаллизовывают из метанола.

В ходе работы исследованы физико-химические характеристики и получены данные ЯМР-спектроскопии (табл. 2) синтезированных соединений.

Экспериментальная биологическая часть

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 150–200 г, содержащихся на стандартном рационе питания в виварии. Ишемию головного мозга у животных опытных групп осуществляли путем 30-минутной окклюзии обеих общих сонных артерий [17], реперфузия достигалась снятием окклюдоров, восстановление кровотока контролировали визуально. Спустя 3 сут животные были умерщвлены под наркозом и головной мозг извлечен из полости черепа по стандартной методике. Извлеченный из полости черепа мозг замораживали в

Характеристика бигуанидов, отобранных для дальнейшего исследования

Структурная формула бигуанида	Наиболее вероятная активность	Вероятность
 I	Противоишемическая, кардио-, церебропротекторная	0,79 – 0,96
 II	Противоишемическая, кардио-, церебропротекторная, ангиопротекторная Н ₂	0,77 – 0,92

жидком азоте и гомогенизировали в трехкратном объеме охлажденной среды выделения (0,05 M Tris-HCl-буфер (рН 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА и 1 % β-меркаптоэтанола). Гомогенат центрифугировали при 7000 об/мин в течение 10 мин. Забор крови осуществляли из сердца животного. Кровь помещали на 0,5 ч в термостат при 37 °С, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Сыворотку крови и гомогенат ткани головного мозга использовали для дальнейших исследований.

Для определения интенсивности СРП применяли метод индуцированной биохемилуминесценции (БХЛ) H₂O₂ с сульфатом железа. Принцип метода основан на каталитическом разложении пероксида ионами металла с переходной валентностью (Fe²⁺) в соответствии с реакцией Фентона. Образующиеся при этом свободные радикалы (СР) вступают в процесс инициации свободнорадикального окисления (СО) в исследуемом биологическом субстрате. Рекомбинация радикалов RO₂ приводит к образованию неустойчивого тетроксидов, распадающегося с выделением кванта света. Интенсивность СРП определяли на БХЛ-07 с программным обеспечением. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали в течении 30 с и определяли следующие параметры: светосумму хемилуминесценции (S), интенсивность вспышки (I_{max}), характеризующие интенсивность СРП, и величину тангенса угла наклона кривой (tg α₂), отражающую общую антиоксидантную активность. Среда для определения интенсивности БХЛ имела следующий состав: 0,4 мл 0,02 моль/л калий-фосфатного буфера (рН 7,5); 0,4 мл

0,01 ммоль/л FeSO₄, 0,2 мл 2 % раствора H₂O₂ (вносимого непосредственно перед измерением). Исследуемый материал вносили в количестве 0,1 мл перед измерением. Концентрацию глутатиона определяли спектрофотометрически при длине волны 412 нм с помощью реакции с 5,5-дитиобис-(2-нитробензойной) кислотой [18].

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 ИРГМ интраперитонеально вводили I в дозах 12,5; 25; 50 и 75 мг/кг внутривентриально, 1 раз в сутки в течение 3 дней эксперимента; в 7, 8, 9 и 10 группах крысам с постишемической реперфузией головного мозга вводили II в дозах 12,5; 25; 50 и 75 мг/кг, внутривентриально 1 раз в сутки в течение 3 дней эксперимента. Состояние энергообмена в ткани головного мозга оценивали по содержанию лактата и пирувата [19].

Развитие ИРГМ у крыс сопровождается повышением содержания лактата в гомогенате мозга (более чем в 3 раза) и снижением уровня пирувата (в 2,4 раза) относительно первой группы животных. Причем 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 [20]. Установлено, что развитие патологии сопряжено с увеличением параметров БХЛ ткани мозга и сыворотки крови животных. Так, величины S, I_{max} и tg α₂ в мозге возрастают в 2,3; 2,1; 2,5 раза и в сыворотке в 1,8; 2,2; 2,4 раза соответственно (рис. 1). Очевидно, значительное увеличение S и I_{max} при ишемии-реперфузии головного мозга, как в ткани мозга, так и в сыворотке крови экспериментальных животных с патологией, свидетельствует о возрастании интенсивности СО биомолекул. Увеличение значения tg α₂, характеризующего общую антиоксидантную активность, указывает на то, что в условиях патологии

Таблица 2

Характеристики синтезированных бигуанидов

Соединение	Брутто-формула	Т. пл., °С	Выход, %	Химический сдвиг δ, м.д.
I	C ₆ H ₁₃ N ₅ O	165 – 167	56	3,44 (м, 4Н, 2 CH ₂), 3,67 (м, 4Н, 2 CH ₂), 8,98 (уш.с, 5Н, бигуанид)
II	C ₇ H ₁₅ N ₅	184 – 185	52	1,84 – 2,05 (м, 6Н, 3 CH ₂), 3,41 (м, 4Н, 2 CH ₂), 8,95 (уш.с, 5Н, бигуанид)

происходит мобилизация компенсаторных механизмов, направленных на снижение уровня СРП.

Выявлено, что введение соединения I в дозах 12,5; 25; 50 и 75 мг/кг животным с патологией приводит к снижению величин S в ткани головного мозга в 1,3; 2,5; 2,2 и 1,2 раза соответственно. Снижение данного параметра было зарегистрировано и в сыворотке крови животных, которым вводили бигуанид (в концентрации 12,5 и 25 мг/кг — в 2,2 раза, в концентрации 50 и 75 мг/кг в 2,0 и 1,7 раза соответственно (рис. 1, а) по сравнению с животными с постишемической реперфузией головного мозга. Наряду с этим при воздействии данного бигуанида было выявлено снижение значений I_{\max} в мозге (в 1,5; 2,0; 1,8 и 1,5 раза) в сыворотке (в 1,6; 2,5; 2,3 и 1,8 раза) (рис. 1, б). Установлено также, что введение I в указанных дозах на фоне ИРГМ вызывает уменьшение значения $\text{tg}\alpha_2$ в мозге (в 1,3; 2,4; 1,6 и 1,5 раза), в сыворотке (в 1,1; 2,9; 2,7; 1,3 раза) (рис. 1, в).

Введение II также приводит к снижению параметров БХЛ в мозге и сыворотке крови животных с постишемической реперфузией головного мозга. Установлено, что значения S в ткани мозга 7, 8, 9, 10 групп животных уменьшаются в 1,1; 2,3; 2,1 и 1,8 раза, в сыворотке в — 1,6; 2,0; 1,9 и 1,7 раза (рис. 1, а) соответственно. Под влиянием II в используемых дозах выявлено снижение величин I_{\max} в мозге на 27; 35; 28 и 11 %. Введение этого бигуанидинового производного в дозах 12,5; 25 и 50 мг/кг приводит к снижению исследуемого параметра в сыворотке крови на 25; 55; 53 % соответственно, по сравнению с животными второй опытной группы (рис. 1, б). Соединение II в дозе 75 мг/кг не вызывает достоверного изменения светосуммы БХЛ. Сходная тенденция выявлена и в отношении $\text{tg}\alpha_2$, данный параметр уменьшался на 26; 33; 26 % в мозге и на 13; 46; 39 % в сыворотке крови в условиях введения данного вещества в дозах 12,5; 25 и 50 мг/кг соответственно. Введение бигуанидинового производного в концентрации 75 мг/кг не сопровождается достоверным изменением исследуемого параметра в исследуемых тканях крыс (рис. 1, в).

На фоне развития ишемического повреждения мозга наблюдается двукратное увеличение содержания восстановленного глутатиона в мозге, в сыворотке крови — в 2,2 раза (рис. 2). Установлено, что введение I в дозах 25 и 50 мг/кг приводит к снижению уровня восстановленного глутатиона в мозге в 1,6 и 1,2 раза, в концентрации 12,5 и 75 мг/кг — в 1,1 раза (рис. 2, а), в сыворотке крови (в 1,1 раза в дозах 12,5 и 50 мг/кг, в 1,4 и 1,6 раза в дозах 25 и 75 мг/кг, соответственно (рис. 2, б). Воздействие II также сопровождается уменьшением концентрации глутатиона в мозге при введении данного бигуанида в дозах 12,5 и 25 мг/кг на 26 и 32 % соответственно, в дозах 50 и 75 мг/кг на 15 % (рис. 2, а). В сыворотке крови животных установлено 34 % снижение этого параметра только при введении бигуанида в дозе 25 мг/кг (рис. 2, б). Вероятно, выявленное изменение уровня исследуемого антиоксиданта в сторону нормы может быть сопряжено

со снижением активности глутатионредуктазы, катализирующей реакцию восстановления данного тиола [20]. По-видимому, снижение активности фермента может быть следствием уменьшения антиоксидантной нагрузки на глутатионовый редокс-цикл при введении бигуанидов, проявляющих свои антиоксидантные свойства [21]. Данное предположение подтверждается изменением значений параметров БХЛ: снижением S и I_{\max} , отражающих интенсивность СО биосубстратов, а также $\text{tg}\alpha_2$, характеризующего общую антиоксидантную активность, в мозге и сыворотке крови животных с ИРГМ, которым вводили бигуанидиновые производные.

Результаты исследования свидетельствуют о наличии антиоксидантного действия у изученных производных гуанидина, представляющих значительный интерес с точки зрения фармакологической коррекции изменений метаболизма при развитии патологий мозга, сопряженных с окислительным стрессом.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. З. Ланкин, А. К. Тихадзе, Ю. Н. Беленков, *Кардиология*, № 2, 72 – 81 (2004).
2. М. В. Биленко, *Ишемические и реперфузионные повреждения органов*, Медицина, Москва (1989), сс. 135 – 137.
3. С. В. Chapleo, J. C. Doxey, P. L. Myers, *J. Med. Chem.*, **25**(7), 821 – 824 (1982).
4. S. N. Sawhney, A. Gupta, D. Vir, *Indian J. Chem. Sect. B.*, **30**(6), 584 – 588 (1991).
5. C. Dardonville, P. Goya, I. Rozas, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, № 8, 1567 – 1577 (2000).
6. D. Laeckmann, F. Rogister, J.-V. Dejardin, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, № 10, 1793 – 1804 (2002).
7. L. Sunkyung, Y. Y. Kyu, K. H. Sun, et al., *J. Med. Chem.*, **48**(8), 2882 – 2891 (2005).
8. Patent US 08 / 458,803 (1995); USPTO Patent Full-Text and Image Database 6,153,604 (2000).
9. Patent US 09 / 637,512 (2000); USPTO Patent Full-Text and Image Database 6,787,569(2004).
10. Patent US 09 / 988,819 (2001); USPTO Patent Full-Text and Image Database 6,525,077 (2003).
11. D. Kirpichnikov, S. I. McFarlane, J. R. Sowers, *Ann. Int. Med.*, № 13, 25 – 33 (2002).
12. Л. В. Кондратьева, *Эндокринология*, **13**(6), 305 (2005).
13. C. Szabo, G. Ferrer-Sueta, B. Zingarelli, et al., *J. Biol. Chem.*, **272**(14), 9030 – 9036 (1997).
14. А. В. Садым, А. А. Лагунин, Д. А. Филимонов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **36**(10), 21 – 26 (2002).
15. V. V. Poroikov, D. A. Filimonov, *J. Comput. Aid. Molec. Des.*, **16**(11), 819 – 824 (2002).
16. V. V. Poroikov and D. A. Filimonov, *PASS: Prediction of Biological Activity Spectra for Substances, Predictive Toxicology*; C. Helma (ed.), Taylor & Francis, New-York (2005), pp. 459 – 478.
17. В. В. Бульон, Л. К. Хныченко, Н. С. Сапронов, *Бюл. экспер. биол. и мед.*, **129**(2), 149 – 151 (2000).
18. В. С. Бузлама, *Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и систем антиоксидантной защиты у животных*, Воронеж (1997), сс. 10 – 21.
19. А. В. Макеева, Т. Н. Попова, *Нейрохимия*, **26**(2), 130 – 137 (2009).
20. А. В. Макеева, Т. Н. Попова, *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, № 6, 19 – 21 (2010).
21. D. Kirpichnikov, S. I. McFarlane, J. R. Sowers, *Ann. Int. Med.*, **13**, 25 – 33 (2002).

Поступила 21.02.11

SYNTHESIS AND EFFECT OF BIGUANIDE DERIVATIVES ON BIOCHEMILUMINESCENCE AND LEVEL OF REDUCED GLUTATHIONE IN RAT BLOOD SERUM AND BRAIN UNDER ISCHEMIA-REPERFUSION CONDITIONS

T. N. Popova, O. V. Sukhoveeva, A. V. Makeeva, A. A. Agarkov, E. D. Kryl'skii,
and S. M. S. Muhammad Amin

Voronezh State University, Voronezh, Russia

We have studied the effect of newly synthesized biguanides, N-[amino(imino)methyl]morpholine-4-carboximidamide (I) and N-[amino(imino)methyl]piperidine-1-carboximidamide (II), on biochemiluminescence (BCL) parameters, including (i) lightsum and maximum flash intensity, which characterize the level of free-radical processes and (ii) slope of BCL kinetic curve, which characterizes general antioxidant activity, and on reduced glutathione level in rats brain and blood serum under condition of postischemic reperfusion. It was found that the investigated parameters, which increased in response to the development of oxidative stress at brain pathology, changed toward normalization under the action of biguanides. Dose-dependent action of these substances has been established. The introduction of I and II in 25 and 50 mg/kg led to most pronounced decrease in the BCL parameters and reduced glutathione concentration, while 12.5 and 75 mg/kg doses did not lead to significant changes in the parameters studied. The results show that biguanides introduced in certain doses can decrease the free-radical oxidation level and produce neuroprotective effect.

Key words: Biguanides, brain ischemia-reperfusion