ВЛИЯНИЕ НА ПРОЦЕСС ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКОВ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ГИДРОКСИПИРИДИНА

УДК 577.158:612.015.348
Поступила 11.03.2010 г.

© **О.Ю. Чечет,** соискатель кафедры общей и клинической фармакологии;
А.Л. Барсук, к.м.н., ассистент кафедры общей и клинической фармакологии;
В.Б. Кузин, д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической фармакологии

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Цель исследования — изучить влияние на процесс окислительной модификации белков сыворотки крови новых производных 3-гидроксипиридина (3-ОП): 3-ОП оксалата, 3-ОП малоната, 3-ОП адипината, 3-ОП малеата и 3-ОП гемисукцината.

Материалы и методы. Исследование проводилось на белых беспородных крысах; в качестве фактора, активирующего процесс перекисного окисления белков, выбран иммобилизационный стресс. Для оценки интенсивности процесса перекисного окисления белков сыворотки крови использовался метод определения окислительной модификации белков по уровню карбонильных производных. Исследуемые вещества вводили непосредственно перед иммобилизацией в дозах 1 и 10% от средней летальной дозы ($ЛД_{50}$). Результаты сравнивали с показателями, полученными в контрольных группах — группе интактных животных и группе животных, подвергнутых иммобилизации без введения веществ.

Результаты. Изученные новые производные 3-ОП демонстрируют различное ингибирующее действие на процесс окислительной модификации белков, индуцированный иммобилизационным стрессом. Данное действие зависит от химической структуры и, по-видимому, от биологической роли компонентов молекул изучаемых соединений в организме, а также от дозы вводимых веществ. Антиоксидантной активностью в отношении процесса перекисного окисления белков обладают 3-ОП адипинат в дозе 1% от $ЛД_{50}$, 3-ОП оксалат в дозе 1% от $ЛД_{50}$, 3-ОП гемисукцинат в дозе 10% от $ЛД_{50}$, в меньшей степени — 3-ОП малонат в дозе 10% от $ЛД_{50}$. 3-ОП малеат не продемонстрировал антиоксидантного действия.

Ключевые слова: перекисное окисление белков, иммобилизационный стресс, 3-гидроксипиридин.

English

Influence of the new derivatives of a 3-hydroxyperidine on the protein peroxidation process

O.Yu. Chechet, submitter of a general and clinical pharmacology chair;
A.L. Barsuk, c.m.s., assistant of a general and clinical pharmacology chair;
V.B. Kuzin, M.D., professor, head of a general and clinical pharmacology chair

Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod

Aim of investigation is a study of the new 3-oxypyridine (3-OP): 3-OP of oxalate, 3-OP of malonate, 3-OP of adipinate, 3-OP of maleate and 3-OP of a hemisuccinate derivatives influence on a process of the blood serum protein oxidative modification.

Materials and methods. An investigation was conducted on the white breedless rats; an immobilization stress is selected as a factor, activating a process of the protein peroxidation. A method of the protein oxidative modification according to the carbonyl derivative level was used for assessment of the blood serum protein peroxidation process intensity. The investigating substances were directly infused before immobilization in 1 and 10% doses of an average lethal dose (LD_{50}). The results were compared to the values, received in control groups — a group of intact animals and in a group of animals, undergoing immobilization without the substance infusion.

Results. The studied new derivatives of a 3-OP demonstrate a different inhibiting effect to a process of the protein oxidative modification, induced by immobilization stress. The given effect depends on a chemical structure and, apparently, on a biological role of the studied compound molecule components in the organism, and on a dose of infusing substances as well. The 3-OP adipinate in a dose of 1% of LD_{50}, 3-OP oxalate in a dose of 1% of LD_{50}, 3-OP hemisuccinate in a dose of 10% of LD_{50}, 3-OP malonate in a dose of 10% of LD_{50} to a lesser extent possess of the antioxidant activity relating to a process of the protein peroxidation. 3-OP maleate has demonstrated no antioxidant effect.

Key words: protein peroxidation, immobilization stress, 3-hydroxypyridine.

Для контактов: Чечет Олег Юрьевич, тел. моб. +7 915-949-28-97; e-mail: olegchechet@mail.ru.

Для профилактики и лечения различных патологических состояний в медицинской практике широкое применение получили препараты-антиоксиданты мексидол и эмоксипин [1, 2]. Эмоксипин (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина хлорид) и мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) являются производными одного вещества — 3-гидроксипиридина (3-ОП), различающимися только кислотой в составе соли. Кислоты обусловливают различия в фармакологических свойствах данных препаратов [3], поэтому логичен поиск новых лекарственных средств среди других солей 3-ОП. Так как препараты эмоксипин и мексидол являются антиоксидантами, наиболее важным представляется изучение влияния новых производных 3-ОП на свободно-радикальные процессы, в частности на перекисное окисление белков.

Окислительная модификация белков — один из ранних и наиболее надежных индикаторов поражения тканей при свободно-радикальной патологии. Имеются исследования, подтверждающие, что при ряде патологических состояний именно белки, а не липиды или нуклеиновые кислоты являются эффективными ловушками генерируемых активных форм кислорода, и их окислительная модификация рассматривается как один из ранних и надежных маркеров окислительного стресса [4, 5]. Продукты окисления белков при окислительных повреждениях в тканях появляются раньше и более стабильны по сравнению с продуктами перекисного окисления липидов [6—8], в частности, белки плазмы, подвергшиеся окислительной деструкции, имеют довольно большой период полураспада [9].

Цель исследования — изучить влияние на интенсивность окислительной модификации белков сыворотки крови новых производных 3-гидроксипиридина: 3-ОП оксалата, 3-ОП малоната, 3-ОП адипината, 3-ОП малеата, 3-ОП гемисукцината.

Материалы и методы. Исследование проводилось на 96 белых беспородных крысах-самцах, средней массой 307,48±3,69 г, содержавшихся в стандартных условиях вивария ЦНИЛ НижГМА.

Все исследуемые вещества синтезированы в Институте биохимической физики им. академика Н.М. Эмануэля РАН.

В качестве фактора, активирующего процесс свободно-радикального окисления белков в организме экспериментальных животных, был выбран острый иммобилизационный стресс [10], который моделировали по общепринятой методике (В.П. Пошивалов, 1978). Иммобилизация создавалась путем жесткой фиксации крыс в положении на спине за 4 конечности без ограничения подвижности головы. Экспозиция животных составляла 12 ч.

В ходе эксперимента было сформировано 12 групп животных: интактные животные (n=15), контрольная группа (n=11) — животные, подвергнутые иммобилизации без введения веществ, а также 10 групп с введением исследуемых веществ в дозах 1 и 10% от средней летальной дозы ($ЛД_{50}$) на фоне иммобилизации в каждой из 10 групп по 7 животных. $ЛД_{50}$ для 3-ОП оксалата, 3-ОП малоната, 3-ОП адипината, 3-ОП малеата, 3-ОП гемисукцината были определены в других исследованиях [11, 12]. Исследуемые вещества вводили внутрибрюшинно непосредственно перед иммобилизацией. Взятие материала для исследования проводилось по окончании иммобилизации и выведения животных из эксперимента в CO_2-камере.

Для оценки интенсивности процесса перекисного окисления белков использовался метод определения окислительной модификации белков по уровню карбонильных производных [9, 13]. Его принцип основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера, которые регистрируются спектрофотометрически. Оптическую плотность образовавшихся алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера регистрировали на спектрофотометре Apel PD 303 (Япония) при длинах волн 356, 363, 370 нм, основного характера — при 430 и 530 нм. Содержание карбонильных производных окисленных белков выражали в единицах оптической плотности, отнесенных на 1 г белка (ед. опт. пл./г общего белка).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием лицензионного статистического пакета STADIA 7.0/prof на ПК IBM PC с определением M±m и оценкой уровня значимости различий между двумя выборками с помощью параметрических и непараметрических критериев.

Результаты и обсуждение. Анализ уровней окислительной модификации белков сыворотки крови крыс, подвергнутых 12-часовой иммобилизации (см. таблицу), показал, что по сравнению с группой интактных животных статистически значимо увеличивается уровень алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера, регистрируемых при длинах волн 356, 363 и 370 нм. Данный факт свидетельствует об увеличении интенсивности процесса окислительной деструкции белков под влиянием иммобилизационного стресса.

3-ОП оксалат в дозе 1% от $ЛД_{50}$ статистически значимо снижает уровень алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера, определяемых при длинах волн 356, 363, 370 и 530 нм. Введение 3-ОП оксалата в дозе 10% от $ЛД_{50}$ не продемонстрировало значимого снижения уровней динитрофенилгидразонов ни при одной длине волны. Аналогичные данные получены при введении 3-ОП адипината в условиях иммобилизации.

Введение 3-ОП малоната в дозе 1% от $ЛД_{50}$ не вызвало значительного снижения концентрации динитрофенилгидразонов, а в дозе 10% статистически значимое снижение содержания по сравнению с контролем установлено только у динитрофенилгидразонов основного характера, определяемого при длине волны 530 нм.

В отличие от этого, 3-ОП малеат в обеих исследованных дозах не продемонстрировал статистически значимого снижения содержания динитрофенилгидразонов по сравнению с контрольной группой животных.

Уровни окислительной модификации белков (ед. опт. пл./г общего белка)

Группа животных	Длина волны, нм				
	356	363	370	430	530
Интактные	14,94±0,82	15,67±0,83	16,00±0,84	7,41±0,43	1,07±0,11
Иммобилизация	17,45±1,57 $p_и$<0,05	18,37±1,62 $p_и$<0,05	18,93±1,65 $p_и$<0,05	8,42±0,93	1,18±0,18
3-ОП оксалат (1% $ЛД_{50}$)	13,05±0,93 $p_к$<0,05	13,87±0,99 $p_к$<0,05	14,40±1,05 $p_к$ <0,05	6,57±0,52	0,75±0,17 $p_к$<0,05
3-ОП оксалат (10% $ЛД_{50}$)	16,92±1,47	18,05±1,61	18,52±1,70	8,79±0,94	1,27±0,17
3-ОП малонат (1% $ЛД_{50}$)	15,18±1,57	16,11±1,60	16,67±1,60	7,73±0,61	0,96±0,07
3-ОП малонат (10% $ЛД_{50}$)	15,62±1,62	16,42±1,70	16,90±1,74	7,39±0,78	0,69±0,14 $p_к$ <0,05
3-ОП адипинат (1% $ЛД_{50}$)	12,20±1,31 $p_к$<0,01	13,02±1,32 $p_к$<0,01	13,66±1,27 $p_к$<0,01	6,38±0,58	0,77±0,14 $p_к$ <0,05
3-ОП адипинат (10% $ЛД_{50}$)	13,77±1,83	14,82±1,89	15,48±1,90	7,48±0,96	1,06±0,24
3-ОП малеат (1% $ЛД_{50}$)	15,04±1,56	15,93±1,63	16,47±1,67	7,36±0,54	0,71±0,16
3-ОП малеат (10% $ЛД_{50}$)	17,17±2,80	18,33±2,87	18,85±3,02	8,63±1,68	0,88±0,22
3-ОП гемисукцинат (1% $ЛД_{50}$)	15,44±1,90	16,44±1,98	17,09±2,03	7,85±0,92	0,77±0,21
3-ОП гемисукцинат (10% $ЛД_{50}$)	12,48±0,98 $p_к$<0,05	13,06±0,91 $p_к$<0,05	13,97±1,02 $p_к$<0,05	6,55±0,64	0,73±0,20

Примечание: $p_и$ — уровень значимости различий по сравнению с группой интактных животных; $p_к$ — уровень значимости различий по сравнению с группой контроля.

В дозе 1% от $ЛД_{50}$ 3-ОП гемисукцинат не показал статистически значимого изменения концентрации динитрофенилгидразонов, а в дозе 10% от $ЛД_{50}$ — снижения содержания альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера.

Таким образом, новые производные 3-ОП проявили различное влияние на интенсивность процесса перекисной модификации белков, индуцированного иммобилизационным стрессом. Это влияние, по-видимому, связано с особенностями их химического строения. Четыре из исследованных веществ — 3-ОП оксалат, 3-ОП адипинат, 3-ОП малонат и 3-ОП гемисукцинат — продемонстрировали ингибирующее действие на процесс окислительной модификации белков. Наиболее выражены антиоксидантные свойства у 3-ОП оксалата в дозе 1% от $ЛД_{50}$, 3-ОП адипината и 3-ОП гемисукцината в дозах 10% от $ЛД_{50}$. Вещество 3-ОП малеат данных свойств не продемонстрировало.

Анализ полученных результатов свидетельствует о взаимосвязи между дозой вводимых веществ и их влиянием на интенсивность процесса перекисного окисления белков. Так, 3-ОП оксалат в дозе 1% от $ЛД_{50}$ показал ингибирующее действие на процессы окислительной модификации белков, а в дозе 10% — тенденцию к усилению перекисной деструкции, проявившуюся в увеличении содержания альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов основного характера, т.е. продемонстрировал тенденцию к проявлению прооксидантных свойств. Тенденция к увеличению содержания динитрофенилгидразонов основного характера, регистрируемых при длине волны 430 нм, наблюдается и при введении 3-ОП малеата в дозе 10% от $ЛД_{50}$. 3-ОП адипинат проявил антиоксидантные свойства только в дозе 1% от $ЛД_{50}$, а 3-ОП малонат и 3-ОП гемисукцинат — только в дозах 10% от $ЛД_{50}$.

Наиболее изученным представителем группы соединений 3-ОП является препарат мексидол. Обширные биологические свойства мексидола обусловлены суммированием свойств фрагментов его молекулы: 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и остатка янтарной кислоты [3, 14, 15]. Очевидно, что в отношении новых производных 3-ОП действует тот же принцип: активность вещества зависит от биологической роли компонентов его молекулы. Так, щавелевая кислота и ее соли (оксалаты) сами по себе отличаются токсичностью [16, 17], чем, по-видимому, может быть объяснена тенденция к усилению перекисной деструкции белков при введении 3-ОП оксалата в большей дозе. При изучении токсического действия новых производных 3-ОП наибольшая токсичность установлена у 3-ОП оксалата, 3-ОП малеата и 3-ОП гемисукцината [12]. Данный факт, скорее всего, объясняет непродемонстрированное 3-ОП малеатом ингибирующее действие на процессы перекисного окисления белков. В то же время 3-ОП гемисукцинат проявил антиоксидантную активность, по-видимому, в связи с обширным биологическим действием сукцината, входящего в состав его молекулы (сукцинат является субстратом в цикле трикарбоновых

кислот, участвует в пентозофосфатном пути расщепления глюкозы [18], экзогенное его введение способно поддерживать энергетику клетки при гипоксии [19]). Обратным действием обладает малонат, являющийся давно известным конкурентным ингибитором фермента сукцинатдегидрогеназы в цикле Кребса [18]; показано, что в нейронах головного мозга при введении малоната возникает оксидативный стресс [20]. Наименее токсичное соединение — 3-ОП адипинат [12] — проявило отчетливый антиоксидантный эффект.

Заключение. Изученные новые производные 3-ОП (3-ОП оксалат, 3-ОП малонат, 3-ОП адипинат, 3-ОП малеат, 3-ОП гемисукцинат) в эксперименте демонстрируют различное ингибирующее действие на процесс окислительной модификации белков, индуцированный иммобилизационным стрессом. Данное действие зависит от химической структуры и, по-видимому, от биологической роли компонентов молекул изучаемых соединений в организме, а также от дозы вводимых веществ. Антиоксидантной активностью в отношении процесса перекисного окисления белков обладают 3-ОП адипинат в дозе 1% от $ЛД_{50}$, 3-ОП оксалат в дозе 1% от $ЛД_{50}$, 3-ОП гемисукцинат в дозе 10% от $ЛД_{50}$, в меньшей степени — 3-ОП малонат в дозе 10% от $ЛД_{50}$. 3-ОП малеат не продемонстрировал антиоксидантного действия.

Литература

1. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. М: ООО «РИА Новая Волна»; 2000; 608 с.
2. *Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д.* Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. М; 1995; 272 с.
3. *Лукьянова Л.Д., Романова В.Е., Чернобаева Г.Н. и др.* Особенности антигипоксического действия мексидола, связанные с его специфическим влиянием на энергетический обмен. Химико-фармацевтический журнал 1990; 8: 9—11.
4. *Caraceni P., De Maria N., Ryu H.S., Colantoni A., Roberts L., Maidt M.L., Pye Q., Bernardi M., Van Thiel D.H., Floyd R.A.* Proteins but not nucleic acids are molecular targets for the free radical attack during reoxygenation of rat hepatocytes. Free Radic Biol Med 1997; 23(2): 339—344.
5. *Halliwell B.* Reactive oxygen species and the central nervous system. In: Packer L., Philipko L., Christen Y., editors. Free radical in the brain. Aging, neurological and mental disorders. Berlin, N.-Y., London; Springer-Verlag; 1992; p. 21—40.
6. *Agarwal S., Sohal R.S.* Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging. Mech Ageing Dev 1995; 85(1): 55—63.
7. *Forster M.J., Dubey A., Dawson K.M., Stutts W.A., Lal H., Sohal R.S.* Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(10): 4765—4769.
8. *Friguet B., Bulteau A.L., Chondrogianni N., Conconi M., Petropoulos I.* Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. Ann NY Acad Sci 2000; 908: 143—154.
9. *Дубинина Е.Е.* Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб: Медицинская пресса; 2006; 400 с.
10. *Зорькина А.В., Костина Я.В., Инчина В.И.* Антиокислительные и гиполипидемические свойства мексидола и эмоксипина при длительном иммобилизационном стрессе. Химико-фармацевтический журнал 1998; 5: 3—5.
11. *Чечет И.В., Чечет О.Ю., Кузин В.Б.* Исследование острой токсичности новых производных 3-гидроксипиридина. Нижегородский мед журнал 2008; 1: 119—121.
12. *Чечет И.В.* Исследование антиоксидантного действия новых производных 3-гидроксипиридина в эксперименте. Дис. … канд. биол. наук. Нижний Новгород; 2009.
13. *Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Методы ее определения. Вопросы медицинской химии 1995; 41(1): 24—26.
14. *Гацура В.В., Пичугин В.В., Сернов Л.Н. и др.* Противоишемический кардиопротекторный эффект мексидола. Кардиология 1996; 11: 59—62.
15. *Котляров А.А., Смирнов Л.Д.* Влияние оксиметилэтилпиридина сукцината на электрофизиологические параметры сердца при торакотомии и при острой ишемии миокарда в эксперименте. Экспериментальная и клиническая фармакология 2004; 67(3): 14—17.
16. *Guo C., Cenac T.A., Li Y., McMartin K.E.* Calcium oxalate, and not other metabolites, is responsible for the renal toxicity of ethylene glycol. Toxicol Lett 2007; 173(1): 8—16.
17. *Tracy C.R., Pearle M.S.* Update on the medical management of stone disease. Curr Opin Urol 2009; 19(2): 200—204.
18. *Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др.* Молекулярная биология клетки. М: Мир; 1994.
19. *Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Цыбина Т.А. и др.* Энерготропное действие сукцинатсодержащих производных 3-оксипиридина. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2009; 148(10): 388—392.
20. *Moy L.Y., Wang S.P., Sonsalla P.K.* Mitochondrial stress-induced dopamine efflux and neuronal damage by malonate involves the dopamine transporter. J Pharmacol Exp Ther 2007; 320(2): 747—756.