

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГИПОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОРИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Балашов В. П., Исаева И. А., Кузьмичева Л. В., Кабаева Г. Н., Балашов А. В.,
Чистяков С. И., Курмышева Т. В.

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева», Саранск, Россия (430032, Саранск, ул. Ульянова, 26а), e-mail: bvp63@yandex.ru

В работе показано, что производные фосфорилуксусной кислоты ХС 3587, ХС 3567 и ХС 3635 в дозах 10^{-5} моль/кг, в отличие от КАПАХ, проявляют выраженные антигипоксические свойства на модели гиперкапнической гипоксии у мышей. Эффективность ХС 3587, ХС 3567 и ХС 3635 в условиях данной экспериментальной патологии примерно равнозначна. Методом спектроскопии комбинационного рассеивания в опытах *in vitro* доказана способность вещества ХС 3635 в диапазоне концентраций 5,0 – 50,0 мкг/мл повышать содержание оксигемоглобина в эритроцитах периферической крови и увеличивать способность дезоксигемоглобина связывать кислород. Выявленные эффекты исследуемых веществ могут частично объяснять кардиопротекторные, нейропротекторные и стресспротекторные свойства производных фосфорилуксусной кислоты, продемонстрированные в ранее опубликованных работах.

Ключевые слова: гипоксия, фосфорилуксусная кислота, гемопорфирин, спектроскопия комбинационного рассеивания.

INVESTIGATION OF ANTIHIPOKSIC ACTIONS PHOSPHORILACETAT ACIDI DERIVATIVES

Balashov V. P., Isayeva I. A., Kuzmicheva L. V., Kabaeva G. N., Balashov A. V.,
Chistyakov S. I., Kurmysheva T. V.

Mordovia State University n.a. N. P. Ogarev, Saransk, Russia (430032, Saransk, street. Ulyanov, 26a), e-mail: bvp63@yandex.ru

The article reports on displaying of the antihypoxic properties of derivatives of phosphorilacetat acidi KS 3587 and KS 3635 in 10^{-5} mol/kg doses, in contrast to the КАПАК according to the hypercapnic hypoxia model. The effectivity of the KS 3587, KS 3567 and KS 3635 in experimental pathology condition roughly equivalent. Raman spectroscopy method *in vitro* experiments proved the ability of KS 3635(5,0-50,0 mkg/ml) a substance to increase the contain of oxygenated hemoglobin in red blood cells and the ability of deoxyhemoglobin to bind oxygen. The identified effects of the substances can partly explain the cardioprotective, neuroprotective and stress-derived properties of phosphorilacetat acid.

Key words: hypoxia, phosphorilacetat acid, gemoporfirin, Raman spectroscopy.

Введение. Химические соединения, обладающие антигипоксическими свойствами, представляют важный резерв для создания потенциальных противоишемических и церебропротекторных средств. В связи с этим в программах доклинических исследований потенциальных представителей данных лекарственных групп тестирование веществ на способность пролонгировать выживаемость экспериментальных животных на различных моделях гипоксий занимает важное, часто решающее место. Интересный ряд химических соединений представляют собой производные фосфорилуксусной кислоты [9]. Согласно ранее полученным данным, некоторые из этих веществ проявляют кардиопротекторные [6], противоаритмические [10] и стресспротекторные [3] свойства. Однако остается невыясненным, имеет ли место в их фармакодинамике антигипоксическая составляющая.

Цель исследования. В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение антигипоксических свойств наиболее эффективных представителей производных фосфорилуксусной кислоты.

Материал и методы. Работа выполнена на 50 половозрелых мышах обоего пола массой 18–20 г и крови доноров (5 проб по 4 серии в трех повторностях). Антигипоксическая активность изучена на модели гиперкапнической гипоксии, при помещении животных в сосуды объемом 200 мл определяли время положения мышей «на бок». Исследованию подвергли 4 химических соединения – производных фосфорилуксусной кислоты – под лабораторными шифрами: КАПАХ, ХС 3587, ХС 3567 и ХС 3635. Вещества синтезированы в Казанском государственном технологическом университете к.х.н., ведущим научным сотрудником Тарасовой Р. И. и любезно были предоставлены нам автором. Фармакологическую активность всех соединений оценивали в дозах соответствующих 10^{-5} Моль/кг. Вещества вводили за 5 минут до моделирования гипоксии, ХС 3635 – за 20 минут.

Для выявления некоторых аспектов влияния тестируемых производных фосфорилуксусной кислоты на процессы транспорта кислорода гемоглобином использовали метод спектроскопии комбинационного рассеивания (СКР) [8]. Измерения проводили на рамановском спектрометре *in via Basis* фирмы Renishaw с короткофокусным высокосветосильным монохроматором (фокусное расстояние не более 250 мм). Для возбуждения рамановских спектров использовали лазер с длиной волны излучения 532 нм, мощностью излучения 100 мВт. Регистратор данных – ССD детектор (1024x256 пикселей) с решеткой 1800 штр/мм. Оцифрованные спектры обработаны в программе WIRE 3.3. Исследовали мазки крови доноров. В контрольных опытах в мазок добавляли каплю 0,9 % раствора хлорида натрия, а в опытных сериях – растворы ХС 3635 в конечных концентрациях 5, 50 и 500 мкг/мл.

Для анализа конформации гемопорфирина и O_2 -связывающих свойств гемоглобина использовали определенные характерные полосы спектра КР: 1355, 1375, 1548–1552, 1580–1588. Полосы 1355 и 1375 cm^{-1} опосредованы симметричными колебаниями пиррольных колец в молекулах дезоксигемоглобина и оксигемоглобина, соответственно. Определяли соотношение интенсивностей $I_{1375} / (I_{1355} + I_{1375})$, отражающее относительное количество оксигемоглобина в крови. Полосы 1548–1552 и 1580–1588 cm^{-1} связаны с колебанием метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина с растянутым и деформированным гемопорфирином, соответственно. Отношение интенсивностей I_{1355} / I_{1550} свидетельствует об относительной способности всего гемоглобина в пробе связывать O_2 , а соотношение I_{1375} / I_{1580} – об относительной способности гемоглобина освобождать O_2 [4, 7].

Полученные данные обработаны с использованием t-теста Стьюдента [5].

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты экспериментов на модели гиперкапнической гипоксии представлены в таблице 1. Нами выявлена различная эффективность исследуемых соединений в условиях данной экспериментальной патологии. КАПАХ не оказывал статистически достоверного влияния на регистрируемый показатель, тогда как ХС 3587, ХС 3567 и ХС 3635 проявили заметные антигипоксические свойства. Выраженность фармакологического эффекта всех соединений была примерно одинакова и статистически не различалась между собой.

Таблица 1

Активность производных фосфорилуксусной кислоты (в дозах 10^{-5} моль/кг) на модели гиперкапнической гипоксии у мышей

Исследуемое соединение (доза мг/кг)	Количество животных в опыте	Время «положения на бок», мин
контроль	10	26,3±1,74
КАПАХ (3,19)	10	24,2±0,95
ХС 3587 (3,6)	10	32,4±2,11*
ХС 3567 (2,89)	10	32,8±2,37*
ХС 3635 (4,3)	10	33,1±0,85*

Примечание: * – отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$.

Согласно ранее полученным нами данным, КАПАХ проявляет наименее выраженные противоишемические и противоаритмические свойства [10], тогда как высокая антигипоксическая активность трех других исследуемых соединений хорошо согласуется с их заметными кардиопротекторными [6], нейропротекторными [1] и стресспротекторными свойствами [2]. На основании полученных данных можно высказать предположение, что одним из аспектов фармакодинамики ХС 3587, ХС 3567 и ХС 3635 является способность веществ повышать устойчивость органов и тканей животных к дефициту кислорода.

Механизм антигипоксической активности теоретически может быть объяснен влиянием веществ на различные звенья транспорта кислорода кровью, его проникновения через аэрогематический барьер и утилизации на уровне тканей, а также повышением устойчивости периферических тканей к дефициту кислорода. В рамках нашего исследования мы изучили влияние производных фосфорилуксусной кислоты на характеристики гемоглобина периферической крови подопытных животных на примере ХС 3635 в условиях *in vitro* методом КР. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Соотношение интенсивностей полос спектра комбинационного рассеяния

ХС 3635 (мкг/мл)	$I_{1375} / (I_{1355} + I_{1375})$ относительное количество	I_{1355} / I_{1550} способность дезоксигемоглобина	I_{1375} / I_{1580} способность оксигемоглобина

	оксигемоглобина	связывать кислород	освобождать кислород
Контроль	0,613±0,032	0,996±0,076	0,650±0,095
5	0,622±0,050	1,070±0,022*	0,592±0,017*
50	0,590±0,046*	1,060±0,086	0,579±0,024*
500	0,582±0,016*	1,011±0,028	0,603±0,013*

Примечание: * – отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$.

Как показали наши исследования, конечная концентрация ХС 3635 уровня 5 мкг/мл не изменяет содержание оксигемоглобина в пробах, но является оптимальной для поддержания кинетики диссоциации кислорода. Так, способность дезоксигемоглобина присоединять кислород статистически достоверно увеличивается с $0,996 \pm 0,076$ до $1,070 \pm 0,022$. Напротив, способность оксигемоглобина освобождать O_2 несколько снижается. Последний факт, возможно, объясняется условиями проведения эксперимента. В тканях, при значительно более низких напряжениях кислорода, его диссоциация от гемопорфирина, очевидно, будет совсем иной.

Использование вещества в более высоких дозах (50 и 500 мкг/мл) сопровождается уменьшением количества оксигемоглобина в опытных образцах эритроцитов, что, на наш взгляд, можно интерпретировать как токсический эффект испытуемого вещества. Данное предположение подтверждает отсутствие положительных изменений со стороны такого показателя, как I_{1355}/I_{1550} , который свидетельствует о степени сродства гемопорфирина дезоксигемоглобина к своему физиологическому лиганду.

Заключение. Полученные нами данные с использованием метода спектроскопии комбинационного рассеяния согласуются с результатами [7], описавшими уменьшение способности гемопорфирина в дезокси-форме связывать кислород при ишемии и постишемической реперфузии. Предполагается, что конформация гемопорфирина в наибольшей степени меняется в мембранно-связанном дезоксигемоглобине в результате изменения вязкости мембраны и нарушения белок-липидных взаимодействий. Поскольку эффекты ХС 3635 в дозах 50 и 500 мкг/мл заметно напоминают эффекты ишемии, обнаруженные в работе [7], видимо, можно утверждать о негативном действии тестируемого соединения в высоких дозах. Эффекты ХС 3635 в дозе 5 мкг/мл в некоторой степени могут служить объяснением антигипоксических свойств вещества в опытах на модели гиперкапнической гипоксии.

Список литературы

1. Балашов В. П. Ультраструктурные изменения гиппокампа мышей при стрессе и действии веществ с ноотропными свойствами. // Морфологические ведомости. – 2008. – № 3–4. – С. 4-7.
2. Балашов В. П. Морфология слизистой оболочки желудка мышей при стрессе и терапии производным фосфорилуксусной кислоты // Морфологические ведомости. – 2008. – №1–2. –

С.16-19.

3. Балашова Г. В. Новые подходы к медикаментозной коррекции стресс-индуцированных состояний // Казанский медицинский журнал. – 2007. – Т. 88, № 4. – С. 67-68.
4. Брызгалова Н. Ю. Роль цитоплазматических структур эритроцита в изменении сродства гемоглобина к кислороду // Биофизика. – 2009. – Т. 54, № 6. – С. 44–47.
5. Закс Л. Статистическое оценивание / Л. Закс. М.: Статистика, 1976. – С. 598.
6. Кулькова Н. П. Антиоксиданты и антигипоксанты в комплексном лечении нарушений сердечного ритма и проводимости // Общая реаниматология. – 2006. – Т.2, № 4-1. – С. 108-110.
7. Лунева О. Г. Изменение вязкости плазматической мембраны и конформации гемопорфирина гемоглобина эритроцитов при ишемии и реперфузии мозга крыс // Доклады академии наук. – 2005. – Т.405, №6. – С. 834–863.
8. Максимов Г. В. Использование наночастиц для исследования конформаций примембранного гемоглобина // Биофизика. – 2011. – № 6. – С. 1099–1104.
9. Тарасова Р. И. Разработка путей синтеза и изучение фармакологической активности аналогов и производных лекарственного препарата фосеназид // Тезисы доклада международной конференции по химии фосфора. – Таллин, 1989. – С. 39.
10. Тарасова Р. И. Синтез и фармакологические свойства фосфорилацетогидразонов и фосфарилацетогидразинов // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т.36, №6. – С. 17-20.

Рецензенты:

Шубина Ольга Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой биологии и спортивной медицины ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный педагогический институт им. М. Е. Евсевьева», г. Саранск.

Моисеева Инесса Яковлевна, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой фармакологии ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет», г. Пенза.