

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ NHE-1 ЗОНИПОРИДА И ВМА-1321 НА УРОВЕНЬ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА ЖИВОТНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

В.Н. Перфилова, Н.А. Гурова, Т.А. Попова, В.В. Вишневская, А.А. Озеров, М.В. Кустова, Н.В. Овсянкина

*ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

Ингибиторы NHE-1 зонипорид (1 мг/кг, внутривентрально, 13 дней) и ВМА-1321 (0,92 мг/кг, внутривентрально, 13 дней) у животных с хронической изопроterenоловой интоксикацией в митохондриях миокарда снижали уровень малонового диальдегида (МДА) на 18 ($p < 0,05$) и 11 % ($p < 0,05$) соответственно и повышали активность супероксиддисмутазы (СОД) на 87,5 ($p < 0,05$) и 38,1 % соответственно.

Ключевые слова: экспериментальная хроническая сердечная недостаточность (ХСН), окислительный стресс, малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза, ингибиторы натрий-водородного обменника (NHE-1).

DOI 10.19163/1994-9480-2019-3(71)-62-65

EFFECT OF THE NHE-1 INHIBITORS ZONIPORIDE AND VMA-1321 ON THE LEVEL OF LIPID PEROXIDATION PRODUCTS AND ENZYMES OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN MITOCHONDRIA OF ANIMALS WITH CHRONIC HEART FAILURE

V.N. Perfilova, N.A. Gurova, T.A. Popova, V.V. Vishnevskaja, A.A. Ozerov, M.V. Kustova, N.V. Ovsjankina

FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation

Inhibitors of NHE-1 zoniporide (1 mg/kg intraperitoneally for 13 days) and VMA-1321 (0,92 mg/kg intraperitoneally for 13 days) in rats with chronic isoproterenol intoxication in myocardial mitochondria reduced the level of malonic dialdehyde (MDA) by 18 ($p < 0,05$) and 11 % ($p < 0,05$), respectively, and increased superoxide dismutase (SOD) activity by 87,5 ($p < 0,05$) and 38,1 %, respectively.

Key words: experimental chronic heart failure (CHF), oxidative stress, malonic dialdehyde, superoxide dismutase, Na^+/H^+ exchanger inhibitors (NHE-1).

Одним из установленных факторов патогенеза хронической сердечной недостаточности (ХСН) является окислительный стресс, возникающий в результате избыточной продукции активных форм кислорода (АФК), инициирующих цепные химические реакции, происходящие внутри липидного бислоя мембран клеток, в ядрах и митохондриях. АФК способствуют открытию пор наружной мембраны митохондрий, выходу в цитозоль цитохрома С и других факторов, приводящих к апоптозу. Влияя на пролиферацию фибробластов и синтез коллагена, свободные кислородные радикалы модулируют функции межклеточного матрикса, активируя и увеличивая экспрессию матриксных металлопротеиназ и снижая уровень их тканевых ингибиторов. В условиях окислительного стресса активируется большое количество сигнальных киназ и транскрипционных факторов гипертрофии миокарда. Перечисленные события приводят к ремоделированию миокарда [3, 5, 6, 9].

При формировании экспериментальной сердечной недостаточности, вызванной введением изопроterenолола (ИЗО), происходит активация многих медиаторных систем, в том числе адренергической, ренин-ангиотензин-альдостероновой [5, 9, 10]. Происходит рост прогипертрофических факторов, которые, в свою очередь, индуцируют рецептор

эпидермального фактора роста (EGFR), что приводит к активации NADPH-оксидазы (NOX). NOX способствует образованию супероксид-аниона (O_2^-), который инактивируется супероксиддисмутазой (СОД) в перекись водорода. Молекула окислителя вызывает открытие митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) с последующим усилением продукции митохондриального O_2^- электронно-транспортной цепью. Митохондриальные АФК высвобождаются в цитозоль и стимулируют редокс-чувствительные MAPкиназы ERK 1/2 и p90^{PCK} , которые, в свою очередь, активируют натрий-водородный обменник 1 изоформы (NHE-1) и $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -котранспортер (NBC) [5, 7, 9].

NHE-1 имеет длину 815 аминокислот и состоит из мембранного домена, осуществляющего транспорт ионов, и цитоплазматического хвоста, который участвует в регуляции активности обменника, в том числе MAPкиназами ERK 1/2 и p90^{PCK} [5, 7, 9].

NHE-1 играет ключевую роль в регуляции внутриклеточного pH и уровня Na^+ , что способствует реверсивной работе натрий-кальциевого обмена (NCX), вызывая приток Ca^{2+} в клетку [3, 5–8]. Перегрузка Ca^{2+} в кардиомиоцитах вызывает повреждение не только в самой клетке, но и в митохондриях [5–7, 9].

Ингибиторы NHE-1 в настоящее время рассматриваются в качестве потенциальных кардиопротекторов в условиях ишемии/реперфузии и ХСН [3, 6–8, 10]. При проведении анализа химической структуры известных ингибиторов NHE-1 было отмечено, что большинство из них содержит свободную гуанидиновую группировку. В исследованиях *in silico* методом ансамблевого дискриминантного анализа выявлены зависимости NHE-1-ингибирующей активности циклических гуанидинов от центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров [1].

Наиболее активным производным гуанидина ингибитором NHE-1 является зонипорид ([1-(хинолин-5-ил)-5-циклопропил-1Н-пиразол-4-карбонил] гуанидина гидрохлорид моногидрат, Pfizer, США) [7].

В ВолГМУ синтезировано пиримидиновое производное гуанидина – N-[2-[6-бром-4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]-пропионил]гуанидин – соединение ВМА-1321 (Озеров А.А., ВолГМУ, Россия). В исследованиях *in vitro* по методу [2] была показана его высокая NHE-1-ингибирующая активность [8].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияние ингибиторов NHE-1 зонипорида и ВМА-1321 на уровень продуктов перекисного окисления (ПОЛ) и активность ферментов антиоксидантной системы в митохондриях миокарда крыс с экспериментальной сердечной недостаточностью.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 29 белых крысах весом 250–300 г. (ООО «НПК БиоТех», ветеринарное свидетельство 250 № 0728190 от 05.02.2018).

ХСН моделировали с помощью хронической изопротереноловой интоксикации (подкожное введение L-изопротеренола (ИЗО) (Sigma-Aldrich, США) по 1 мг/кг 1 раз в сутки в течение 10 дней [10]).

Были сформированы 4 группы: I – интактные животные ($n = 9$), которые получали растворитель 0,1 мл на 100 г веса внутривентриально 1 раз в сутки в течение 13 дней; II – контрольная группа «ХСН»: животные ($n = 6$), получавшие ИЗО; III – опытная группа «ИЗО + зонипорид» ($n = 6$): животные с изопротереноловой сердечной недостаточностью, которым вводили зонипорид («Sigma», США) 1 мг/кг, внутривентриально, за 3 дня до и весь период модели ХСН; IV – опытная группа животных «ИЗО + ВМА-1321» ($n = 7$) крысы с ХСН, получавшие лечение ВМА-1321 (Озеров А.А., ВолГМУ, Россия) в дозе 0,92 мг/кг аналогично группе с зонипоридом.

По окончании изопротереноловой интоксикации у животных под наркозом (хлоралгидрат, 350 мг/кг, внутривентриально) забирали сердца, тщательно их промывали холодным физиологическим раствором, гомогенизировали (охлажденный гомогенизатор Поттера – Эльвейема объемом 20 мл) с добавлением в соотношении 1:5 сахарозной среды выделения (220 мМ маннита, 100 мМ сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 4 мМ KH_2PO_4 , 20 мМ HEPES; pH = 7,3).

Митохондрии получали стандартным методом дифференциального центрифугирования в сахарозной среде [4]. Для осаждения дебриса и неразрушенных клеток полученные гомогенаты

центрифугировали 10 минут с охлаждением при 600 g. Забирали надосадочную жидкость и центрифугировали 20 минут при 8000 g. Полученный осадок ресуспендировали и использовали в качестве митохондриальной фракции, в которой определяли концентрацию конечного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) малонового диальдегида (МДА) и активность антиоксидантных ферментов [4].

Уровень МДА определяли на основе реакции между продуктом ПОЛ и тиобарбитуровой кислотой с образованием триметинового комплекса (Стальная И.Д., 1977) спектрофотометрически с максимумом поглощения при $\lambda = 532$ нм. Расчет производили по молярному коэффициенту экстинкции $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \times \text{M}^{-1}$, с учетом концентрации белка выражали в мкМ/мг белка.

Суммарную активность СОД оценивали по степени торможения реакции окисления кверцетина (Костюк В.А., 1990). Активность фермента рассчитывали по формуле: % подавления = $(\Delta\text{Допыта} / \Delta\text{Дконтроля}) \times 100$ % и выражали в усл.ед./мг белка спектрофотометрически при $\lambda = 406$ нм.

Активность глутатионпероксидазы (ГП) (мм восстановленного глутатиона/мин/мг белка) находили по убыли восстановленного глутатиона в реакции с гидроперекисью третбутила (Моин В.И., 1986) спектрофотометрически при $\lambda = 412$ нм.

Активность каталазы определяли по методике, основанной на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс (Королюк М.А., 1988) с максимумом поглощения при $\lambda = 410$ нм (в мг H_2O_2 /мин/мг белка).

Концентрацию белка определяли с использованием коммерческого набора «Pierce™ BCA Protein Assay Kit» (ThermoScientific, США). Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре ПЭ-5400В «Экрос», Россия.

Обработка результатов выполнена в программе GraphPadPrism 5.0. с использованием непараметрических критериев U-критерия Манна – Уитни и Краскела – Уоллиса с посттестом Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро – Уилка.

Животных содержали в условиях вивария в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». На момент проведения исследований животные были здоровыми, без изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования.

Исследование проведено в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986); Приказом МЗ РФ №199Н от 01 апреля 2016 г., Principles of Good Laboratory Practice (OECD, ENV/ MC/ CUEM (98)17, 1997); ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (идентичен GLPOECD); Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies (21 CFR Part 58, 1978, USA, FDA); Good Laboratory Practice Standards (Ordinance №21, 1997, Japan, MHW), со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении

лекарственных средств» (ред. от 22.10.2014); «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. Миронова А.Н. (Москва, 2012).

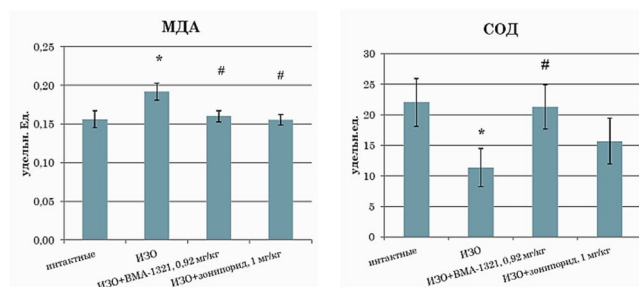
Исследования одобрены Этическим комитетом ВолгГМУ (протокол № 2086-2018, 20.12.18).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях хронического изопротеренолового повреждения на ранней стадии возникает диффузный интерстициальный отек из-за повышенной проницаемости сосудов, инфильтрации лейкоцитов и утолщения стенок артерий. Далее наблюдается гипертрофия сердца, сопровождающаяся фиброзом, что в дальнейшем приводит к диастолической дисфункции левого желудочка, связанной с нарушением Ca^{2+} -обмена. Наряду с этим развивается окислительный стресс. Происходит окислительное повреждение, инактивация NO и редокс-сигнализация, что приводит к эндотелиальной дисфункции, фиброзу, энергетическому дефициту, гипертрофии и гибели клеток [4, 5, 7, 9, 10].

В наших исследованиях уровень конечного продукта ПОЛ МДА в митохондриях кардиомиоцитов у животных интактной группы составил 0,16 мкМ/мг белка. У крыс с изопротереноловой сердечной недостаточностью данный показатель вырос на 19 % и составил $(0,19 \pm 0,01)$ мкМ/мг ($p < 0,05$). При этом активность фермента антиоксидантной защиты СОД снижалась на 51,5 %, по сравнению с интактной группой $(11,36 \pm 3,11)$ усл.ед./мг белка и составила $(22,04 \pm 3,92)$ усл.ед./мг белка.

Соединение ВМА-1321 (в дозе 0,92 мг/кг) и зонипорид (в дозе 1 мг/кг) при курсовом введении в течение 13 дней способствовали статистически значимому снижению уровня МДА по сравнению с контрольными животными. Данный показатель уменьшился по отношению к результатам у животных с ХСН без лечения на 11 % в группе животных, получавших соединение ВМА-1321, и на 18 % в группе животных, получавших зонипорид. Активность СОД у животных с ХСН при введении соединения ВМА-1321 и зонипорида повышалась по сравнению с контрольными крысами на 87,5 % ($p < 0,05$) и 38,1 % соответственно (рис.).



Различия статистически значимы:

*U-критерий Манна – Уитни ($p < 0,05$);

#Краскела – Уоллиса с посттестом Данна ($p < 0,05$).

Рис. Влияние зонипорида и соединения ВМА-1321 на уровень малонового диальдегида (МДА) и активность супероксиддисмутазы (СОД) в митохондриях сердца животных с экспериментальной сердечной недостаточностью

Активности ГП и каталазы внутри экспериментальных групп не изменялись.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспериментальная ХСН, вызванная подкожным введением животным изопротеренола в дозе 1 мг/кг в течение 10 дней, активирует процессы ПОЛ и способствует снижению активности антиоксидантных ферментов, о чем свидетельствует увеличение концентрации МДА и уменьшение активности СОД в гомогенате митохондрий клеток сердца. Вероятно, стимуляция адренергической нервной системы изопротеренолом через каскад реакций приводит к активации NOX и образованию АФК, которые, в свою очередь, запускают выработку митохондриальных АФК. Кроме того, митохондриальные АФК, высвобождаемые в цитозоль, потенциально могут дополнительно активировать АФК-индуцированное высвобождение АФК митохондриями. В условиях ишемии/реперфузии на активацию дыхательной цепи митохондрий и образование АФК оказывают влияние умеренное набухание и подщелачивание матрикса и деполяризация внутренней мембраны. Открытие $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ играет главную роль при стимулировании продукции АФК дыхательной цепью [4, 5, 9, 10].

Ингибиторы NHE-1 зонипорид и ВМА-1321 снижали уровень МДА и повышали активность СОД в митохондриях миокарда животных с изопротереноловой интоксикацией.

В литературе обсуждаются различные возможные механизмы защитного действия ингибиторов NHE-1 на митохондрии в условиях окислительного стресса [5, 9].

1. Существует мнение, что блокаторы NHE-1 ингибируют NOX-зависимое увеличение митохондриальной продукции O_2^- , тем самым предотвращают фосфорилирование ERK1 / 2 и p90^{RSK} и активацию NHE-1.

2. Было продемонстрировано, что ингибирование NHE-1 предотвращает открытие mPTP (Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры – mitochondrial permeability transition pore, mPTP) во время первых минут реперфузии (задерживает восстановление pH во время реперфузии), что приводит к улучшению функции митохондрий, а также к ослаблению активности проапоптотических факторов.

3. Ингибиторы NHE-1 снижают повышенную продукцию O_2^- , вызванную открытием митохондриальных АТФ-чувствительных калиевых (mK_{ATP}) каналов.

4. Тем не менее большинство авторов склоняются к тому, что основной протекторный эффект ингибиторов NHE-1 связан с кальцийзависимыми механизмами и опосредован предотвращением перегрузки цитозольным и митохондриальным Ca^{2+} через ингибирование сарколеммального и митохондриального NHE-1. Нормализация концентрации Ca^{2+} , H^+ и АТФ в матриксе митохондрий

способствует снижению интенсивности реакций ПОЛ и повышению активности ферментов антиоксидантной защиты [3, 5, 6, 9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев П.М., Спасов А.А., Муравьева В.Ю. и др. Ансамблевый дискриминантный анализ зависимости NHE-1-ингибирующей активности циклических гуанидинов от центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2016. – № 2 (58). – С. 87–90.
2. Гурова Н.А., Спасов А.А., Питерсен А.С. Метод изучения влияния новых соединений на активность натрий/водородного обменника // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – № 2 (38). – С. 17–19.
3. Гурова Н.А., Спасов А.А., Тимофеева А.С. и др. Кардиопротекторные свойства зонипорида на модели ишемического и реперфузионного повреждения миокарда у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – № 8 (76). – С. 17–19.
4. Попова Т.А., Музыко Е.А., Кустова М.В. и др. Влияние густого экстракта из травы первоцвета весеннего на развитие оксидативного стресса и функциональное состояние митохондрий кардиомиоцитов крыс с экспериментальной хронической сердечной недостаточностью // Биомедицинская химия. – 2018. – № 4 (64). – С. 334–343.
5. De Giusti V.C., Caldiz C.I., Ennis I.L., et al. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules of intracellular pathways triggered by the cardiac renin-angiotensin II-aldosterone system (RAAS) // Frontiers in physiology. – 2013. – Vol. 4 (126). – P. 1–9.
6. Jung I.S., Lee S.H., Yang M.K., et al. Cardioprotective effects of the novel Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitor KR-32560 in a perfused rat heart model of global ischemia and reperfusion: Involvement of the Akt-GSK-3 β cell survival pathway and antioxidant enzyme // Archives of pharmacol research. – 2010. – № 8 (33). – P. 1241–1251.
7. Orłowski J., Grinstein S. Na⁺/H⁺ exchangers // Compr Physiol. – 2011. – № 1 (4). – P. 2083–100.
8. Ozerov A., Novikov M., Spasov A., Iezhitsa I., Gurova N., Gurova V. Pyrimidine derivatives of n-acetylguanidine: Novel inhibitors of sodium-hydrogen exchanger 1 // Heterocycles. – 2018. – № 6 (96). – P. 1101–1107.
9. Seddon M., Looi Y.H., Shah A.M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure // Heart. – 2007. – № 8 (93). – P. 903–907.
10. Shibata M., Takeshita D., Obata K., Mitsuyama S., Ito H., Zhang G.X., Takaki M. NHE-1 participates in isoproterenol-induced downregulation of SERCA2a and development of cardiac remodeling in rat hearts // American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology. – 2011. – № 5 (301). – P. 2154–2160.

REFERENCES

1. Vassiliev P.M., Spasov A.A., Muravyova V.U., et al. Ansambleviy diskriminannyuy analis savisimosti NHE-1-inchibiruuruushey aktivnosti cyclicheskich guanidinov ot

centrirovannuux na gyanidinovuuy fragment elektronnuuch parametrov [Ensemble discriminant analysis of relationships between NHE-1 inhibitory activity of cyclic and the electronic parameters of guanidine fragment]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Volgograd State Medical University], 2016, no. 2 (58), pp. 87–90. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Gurova N.A., Spasov A.A., Pitersen A.S. Metod izucheniya vliyaniya novyh soedineniy na aktivnost natrij/vodorodnogo obmennika [Method of studying the effect of new compounds on the activity of the sodium / hydrogen exchanger]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Volgograd State Medical University], 2011, no. 2 (38), pp. 17–19. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Gurova N.A., Spasov A.A., Timofeeva A.S., et al. Cardioprotectornye svoystva zoniporida na modeli ishemicheskogo i reprefusionnogo povrejdeniya miokarda u kryс [Cardioprotective properties of zoniporide studied on experimental ischemia and reperfusion models in rat myocardium]. *Ekspериментальная i klinicheskaya farmacologiya* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2013, no. 8 (76), pp. 17–19. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. Popova T.A., Muzyko E.A., Kustova M.V., et al. Vliyanie gustogo extracta is travy pervocveta vesennego na razvitie oksidativnogo stressa i funkcionalnoe sostoyanie mitohondriy cardiomyocytov kryс s eksperimentalnoy hronicheskoy serdecnoy nedostatochnosti [Influence of the dense extract from herb of Primula veris L. on the oxidative stress development and the functional state of the cardiomyocytes mitochondria of rats with experimental chronic heart failure]. *Biomedicinskaya himiya* [Biomedical chemistry], 2018, no. 4 (64), pp. 334–343. (In Russ.; abstr. in Engl.).

5. De Giusti V.C., Caldiz C.I., Ennis I.L., et al. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules of intracellular pathways triggered by the cardiac renin-angiotensin II-aldosterone system (RAAS). *Frontiers in physiology*, 2013, Vol. 4 (126), pp. 1–9.

6. Jung I.S., Lee S.H., Yang M.K., et al. Cardioprotective effects of the novel Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitor KR-32560 in a perfused rat heart model of global ischemia and reperfusion: Involvement of the Akt-GSK-3 β cell survival pathway and antioxidant enzyme. *Archives of pharmacol research*, 2010, no. 8 (33), P. 1241–1251.

7. Orłowski J., Grinstein S. Na⁺/H⁺ exchangers. *Compr Physiol*, 2011, no. 1 (4), pp. 2083–100.

8. Ozerov A., Novikov M., Spasov A., Iezhitsa I., Gurova N., Gurova V. Pyrimidine derivatives of n-acetylguanidine: Novel inhibitors of sodium-hydrogen exchanger 1. *Heterocycles*, 2018, no. 6 (96), pp. 1101–1107.

9. Seddon M., Looi Y.H., Shah A.M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart*, 2007, no. 8 (93), pp. 903–907.

10. Shibata M., Takeshita D., Obata K., Mitsuyama S., Ito H., Zhang G.X., Takaki M. NHE-1 participates in isoproterenol-induced downregulation of SERCA2a and development of cardiac remodeling in rat hearts. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 2011, no. 5 (301), pp. 2154–2160.

Контактная информация

Перфилова Валентина Николаевна – д. б. н., доцент, профессор кафедры фармакологии и биофармации ФУВ, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: vnperfilova@volgmed.ru