

УДК 616. 13–004.6–085.547–092: 615.225

БИС(μ-ТАРТРАТО)ДИ(μ-ГИДРОКСО) ГЕРМАНАТА (IV) ТРИЭТАНОЛАММОНИЯ КАК ИНГИБИТОР ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ A₂ МОНОНУКЛЕАРОВ

© 2021 г. Академик РАН П. А. Стороженко¹, М. М. Расулов^{1*}, И. В. Жигачёва², В. П. Барышок³

Поступило 25.07.2020 г.

После доработки 07.09.2020 г.

Принято к публикации 11.09.2020 г.

Изучено ранее неизвестное свойство бис(μ-тарtrato)ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония влиять на активность основной фосфолипазы A₂. Выявлено, что введение животным водного раствора бис(μ-тарtrato)ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония ежедневно в течение 2 мес в дозе активного вещества 10 мг/кг массы животного приводит к угнетению общей активности основной фосфолипазы A₂ моноклеаров. Результаты исследования могут быть использованы для коррекции липидного обмена при развитии нарушений в условиях гиперлипидемий. Это позволяет расширить область применения бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония и создать на его основе новые фармакологические препараты для предотвращения и угнетения развития гиперлипидемий.

Ключевые слова: гиперлипидемии, бис(μ-тарtrato)ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония, атеросклероз, щелочная фосфолипаза A₂

DOI: 10.31857/S2686738921010224

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что на раннем этапе атерогенеза активируется эндотелий, который экспрессирует на своей поверхности адгезионные молекулы для моноцитов (Мц), нейтрофилов и лейкоцитов крови и продуцирует хемоаттрактанты, привлекающие Мц в интиму сосудов. Мц, попав в субэндотелиальное пространство, дифференцируются в макрофаги, которые ускоряют образование окисленных липопротеидов низкой плотности (ЛНП). Частицы модифицированных ЛНП захватываются макрофагами, после чего последние трансформируются в пенные клетки и играют ключевую роль в развитии атеросклеротических нарушений [1, 2]. При этом известно, что струк-

турная и функциональная целостность Мц и их нуклеиновых кислот определяются состоянием сосудистого русла как на макро, так и на микроциркуляторном уровне [3–5].

Исследования эффектов химических соединений, изменяющих активность фосфолипазы A₂ (ФЛА₂) (КФ 3.1.1.14) – лизосомального липолитического фермента, имеющего оптимум действия при щелочных значениях рН и участвующего в атерогенезе, привлекают особое внимание, поскольку изменение активности ФЛА₂ под влиянием тех или иных средств может служить критерием эффективности антиатеросклеротических препаратов. При этом существует потребность в поиске и внедрении в практику новых диагностических и лекарственных средств, обладающих указанной активностью и тем самым обеспечивающих торможение атерогенеза. В этом плане особо интересным представляется класс протатранов, в том числе – герматранов, обладающих биологической активностью [6]. Тем не менее вопросы о биохимических свойствах ряда герматранов и их механизмов действия остаются малоизученными. В этой связи задачей настоящего исследования явилось изучение влияния на активность основной (щелочной) фосфолипазы A₂ моноклеаров нового вещества – бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония (далее – вигетан). Это биоло-

¹ Государственный научный центр РФ “Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений”, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования “Иркутский государственный технический университет”, Иркутск, Россия

*e-mail: maksud@bk.ru

гически активное соединение, имеет следующую формулу: $[(\text{НОСН}_2\text{СН}_2)_3\text{NH}^+]_2[\text{Ge}_2(\mu\text{-Tart})_2(\mu\text{-OH})_2]^2$, где: Tart – остаток винной кислоты – $\text{ОС}(\text{O})\text{СН}(\text{O}-)\text{СН}(\text{O}-)\text{С}(\text{O})\text{O}-$.

МЕТОДИКА

Исследование проводили на кроликах Шиншилла с исходной массой 1.8–2.0 кг в соответствии с “Правилами лабораторной практики в Российской Федерации”. Правила утверждены приказом Министерства здравоохранения РФ от 19.06.2003 г № 267 (Правила лабораторной практики в Российской Федерации Министерства здравоохранения РФ Приказ от 19 июня 2003 г. № 267 <http://www.kodeks.ru> (24 апреля 2010 г.)). По окончании эксперимента животным проводили эвтаназию цервикальной дислокацией 5-го позвонка, соблюдая правила “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986).

Гиперлипидемию у кроликов вызывали стандартным методом Аничкова-Халатова [5].

Кроликов разделяли на следующие группы (по 10 голов):

1) группа опыта, которым вводили внутримышечно свежеприготовленный водный раствор бис(μ -тарtrato) ди(μ -гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония в дозе активного вещества 10 мг/кг веса животного, в течение 2 мес.

2) группа плацебо – контроля, которым вводили внутримышечно эквивалентное количество официального 0.9% раствора натрия хлорида в течение 2 мес.

Эталоном служили данные, полученные у 10 интактных кроликов.

В конце экспериментов в крови животных стандартными методами определяли содержание липидов, триацилглицеринов, β -липопротеинов и холестерина.

Мононуклеары (моноциты – Мц) выделяли из крови путем последовательного центрифугирования в градиенте фикол-верографин [7]. Гепаринизированную кровь разводили 0.9% официальным раствором натрия хлорида в соотношении 1:1 и осторожно наслаивали раствор фикола с 76% верографинном, центрифугировали 45 мин при 600 g. После центрифугирования отбирали Мц и вновь центрифугировали их 30 мин при 1200 g. Полученные в виде осадка Мц троекратно отмывали физиологическим раствором в соотношении 5:1, центрифугируя по 10 мин при 1200 g. Осадок гомогенизировали в 2 мл 0.25M раствора сахарозы рН 7.4 с 0.001M ЭДТА. Активность ФЛА₂ определяли радиометрическим методом с использованием в качестве субстрата синтезированного ра-

нее 1-ацил-2(13-Н) арахидоноил-глицеро-3sn-фосфорилхолина [7]. Инкубационная смесь содержала 150 нмоль меченого лецитина, 8 ммоль СаCl₂ при рН 8.0 и источник ферментов (исследуемые Мц) в конечном объеме 1.3 мл. Инкубацию проводили на водяной вибробане в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 3 мл смеси хлороформ: метанол (1:2 об/об) и немедленно экстрагировали по методу Клайера и Дайера. Продукты реакции разделяли тонкослойной хроматографией в закрепленном слое силикагеля (“Chemapol”) на стеклянных пластинах размером 20 × 20 см в системе растворителей хлороформ: метанол:вода (65:25:4). Фракции лизолецитина, лецитина и жирных кислот экстрагировали смесью хлороформ:метанол (1:2 об/об). Экстракты помещали во флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости, содержащей в 100 мл толуола особой чистоты 5 г 2.5-дифениллоксазола и 300 мг 1.4-бис-(5-фениллоксазол-2)-бензола. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике “Rackbeta 1215” ЛКБ (Швеция). Об активности ФЛА₂ судили по образованию меченой жирной кислоты, получившейся в результате воздействия этих ферментов на 1-ацил-2(13-Н)-арахидонил-глицеро-3sn-фосфорилхолин.

Активность ФЛА₂ выражали в микромолях образовавшихся продуктов в минуту на 1 г белка.

Статистическую обработку данных проводили определением средних арифметических и их стандартных ошибок. Достоверность различий между вариантами со значимостью $p \leq 0.05$. Обработка результатов проводилась с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Прежде всего отметим, что для природных и синтетических биологически активных веществ (БАВ) необходим подбор концентраций, обладающих наибольшей эффективностью в проявлении биологической активности, поэтому в эксперименте применялся бис(μ -тарtrato) ди(μ -гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония в виде раствора разных концентраций. Дозовые эффекты вигетана изучались при введении количества вещества в диапазоне 5–20 мг/кг животного. Влияние вещества в каждой дозе изучалось в отдельной группе кроликов. Наряду с этим, принимая во внимание важность путей введения и их зависимость от растворителя, были проведены специальные, дополнительные исследования с раствором вигетана в официальном 0.9% растворе NaCl (физиологическом растворе) и введением в количествах только 5 и 10 мг/кг массы животного. При этом наиболее выраженными оказались данные, полученные в группах животных, получав-

ших водный раствор вигетана из расчета 10 мг/кг. Именно эти результаты привлекают, на наш взгляд, наибольший интерес, и именно они будут представлены далее.

Выявлено, что при применении бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония в виде водного 10% раствора в моноцитах (Мц) снижается уровень холестерина и общих липидов (табл. 1).

Результаты ферментативного анализа свидетельствуют, что развитие атеросклероза сопровождается значительным увеличением суммарной активности ФЛА₂ в Мц по сравнению с эталоном (табл. 2). При введении вигетана достоверно снижается активность ФЛА₂ в Мн по сравнению с контролем, что, вероятно, сопровождается и снижением интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) [8].

Активацию лизосомального липолиза можно рассматривать как компенсаторную реакцию ферментных систем на фоне преобладания неспецифического нерегулируемого эндоцитоза модифицированных ЛНП или надмолекулярных ЛНП-содержащих комплексов. При этом в условиях субстратного насыщения может возникнуть относительная недостаточность отдельных лизосомальных ферментов, в частности ФЛА₂. ФЛА₂ секретируется в виде профермента, и для ее активации требуется гидролиз специфических пептидных связей. Для проявления каталитической активности ФЛА₂ необходим Ca²⁺ в миллимолярных концентрациях. При этом активация ФЛА₂ происходит в результате индуцированного свободными радикалами ПОЛ мембран, которое характерно для многих патологических процессов, в том числе и для атерогенеза.

Рост активности ФЛА₂ приводит к гидролизу мембранных фосфолипидов Мц и высвобождению свободных жирных кислот, включая арахидоновую кислоту (АрК), предшественника эйкозаноидов [9]. АрК имеет ключевое значение в продукции провоспалительных медиаторов — арахидоновой кислоты (АрК) и эйкозаноидов, т.е. всех метаболитов АрК.

АрК образуется из фосфолипидов мембран лейкоцитов и/или тромбоцитов. Существует два основных пути метаболизма АрК — циклоксигеназный и липоксигеназный. Конечными продуктами циклоксигеназного пути являются простагландины и тромбоксаны, а липоксигеназного — гидроксизайкозатриеновая кислота и лейкотриены. Помимо циклоксигеназы и липоксигеназы, выявлен третий фермент — эпоксигеназа, который окисляет АрК в эпоксиэйкозатриеновую кислоту и дигидроксиэйкозатриеновую кислоту. Высвобождение АрК происходит преимущественно через активацию ФЛА₂, а фосфатидилхо-

Таблица 1. Показатели липидного обмена при применении бис(μ-тарtrato)ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония в физиологическом растворе

Показатели	Сыворотка крови
Эталон – интактные	
Липиды общие (моль/л)	4.3 ± 0.4
Холестерин (моль/л)	3.5 ± 0.3
Триацилглицерины (моль/л)	1.7 ± 0.2
β-липопротеины (моль/л)	0.78 ± 0.09
Контроль – нелеченые	
Липиды общие (моль/л)	72.4 ± 4.9 **
Холестерин (моль/л)	34.5 ± 1.9 **
Триацилглицерины (моль/л)	16.2 ± 2.1 **
β-липопротеины (моль/л)	3.8 ± 0.3 **
Опыт – вигетан, 10 мг/кг	
Липиды общие (моль/л)	30.1 ± 1.9* **
Холестерин (моль/л)	17.9 ± 0.8* **
Триацилглицерины (моль/л)	6.2 ± 0.32* **
β-липопротеины (моль/л)	0.89 ± 0.07* **

Примечание. * $p < 0.05$ по отношению к контролю;

** $p < 0.05$ по отношению к эталону.

Таблица 2. Изменения активности ФЛА₂ в моноцитах кроликов (мкмоль/мин на 1 г белка) при применении бис(μ-тарtrato)ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония в физиологическом растворе

Объект	Эталон	Контроль	Опыт
Моноциты	1.85 ± 0.03*	3.1 ± 0.1**	1.9 ± 0.06* **

Примечание. * $p < 0.05$ по отношению к контролю;

** $p < 0.05$ по отношению к эталону.

лин является первичным субстратом. Высвобождаемые ФЛА₂ АрК и докозагексаеновая кислота (ДГК) подвержены перекисному окислению свободными радикалами кислорода, что приводит к образованию 4-гидроксиноненалей (4-ГН) из ФЛА₂ и 4-гидроксигексеналей (4-ГГН) из ДГК [10]. Эти алкенальные электрофилы являются реактивными и способны образовывать аддукты с белками, фосфолипидами и нуклеиновыми кислотами. Воспринимаемые цитотоксические и гормональные эффекты этих гидроксикаленалей влияют на клеточные сигнальные пути, метаболизм глюкозы и функции митохондрий при хронических и воспалительных заболеваниях. Можно предположить, что защитный эффект препарата обусловлен снижением интенсивности ПОЛ, что влечет за собой снижение активности ФЛА₂ [9, 10]. Следовательно, ФЛА₂ принимает участие в многочисленных физиологических процессах, включая иммунные реакции, воспаление, пролиферацию, вазо- и бронхоконстрикцию и т.д. [10, 11].

ВЫВОДЫ

1) применение раствора химического соединения – бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидрокси) германата (IV) триэтаноламмония приводит к достоверному снижению общей активности основной (щелочной) фосфолипазы A₂ мононуклеаров (Мн);

2) полученные результаты указывают на возможность создания на основе бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидрокси) германата (IV) триэтаноламмония новые фармакологические препараты для предотвращения нарушений липидного обмена и улучшения качества жизни пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Daniel J. Rader and Alan Daugherty. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis // Nature 2008. V. 451. P. 904–913. <https://doi.org/10.1038/nature>
2. Yuan Jing-jing, Yang Jing, Sun Shi-lei, Zhang Rui, Xu Yu-ming. Endothelial Progenitor Cells' Classification // Tissue Engineering and Regenerative Medicine. August 2017. V. 14 (4). P. 327–332.
3. Bautista-Niño P.K., Portilla-Fernandez E., Vaughan D.E., Danser A.H., Roks A.J. “DNA Damage: A Main Determinant of Vascular Aging” // International Journal of Molecular Sciences. 2016. V. 17 (5). P. 748. <https://doi.org/10.3390/ijms1705074827213333>
4. Shah A.V., Bennett M.R. “DNA damage-dependent mechanisms of ageing and disease in the macro- and microvasculature” // European Journal of Pharmacology. 2017. V. 816. P. 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.03.05028347738>
5. Аничков С.В., Зводская И.С., Морева Е.В., Веденева З.И. Нейрогенные дистрофии и их фармакотерапия // Л.: Медицина, 1968. 238 с.
6. Rasulov M., Namakanov B., P. Storozenko. Adaptive processes of cardiovascular system in arterial hypertension // Lambert Academic Publishing, reha gmbh, 66111, Saarbrücken, 2017. 206 p.
7. Расулов М.М., Бобкова С.Н., Стороженко П.А. Фармакологическая коррекция и контроль течения гиперлипидотеинемий и ишемической болезни сердца // Lambert Academic Publishing, reha gmbh, 66111, Saarbrücken, 2013. 254 с.
8. Binyukov V.I, Mil' E.M., Zhigacheva I.V., Generozova I.P., Rasulov M.M. Morphological and bioenergetical characteristics of mitochondria under stress and the action of the organogermanium compounds // Journal of Nature Science & Sustainable Technology. 2015. V. 9 (2). P. 439–444.
9. Yang Bo, Fritsche K.L., Beversdorf D.Q., et al. Yin-Yang Mechanisms Regulating Lipid Peroxidation of Docosa-hexaenoic Acid and Arachidonic Acid in the Central Nervous System // Front Neurol. 2019. V. 10. P. 642.
10. Zimmer S., Grebe A., Bakke S.S., Bode N., Halvorsen B., Ulas T., Skjelland M., De Nardo D., Labzin L.I., Kerk-siek A., Hempel C., Heneka M.T., Hawxhurst V., Fitzgerald M.L., Trebicka J., Björkhem I., Gustafsson J.Å., Westertorp M., Tall A.R., Wright S.D., Espevik T., Schultze J.L., Nickenig G., Lütjohann D., Latz E. “Cyclodextrin promotes atherosclerosis regression via macrophage reprogramming” // Science Translational Medicine. April 2016. V. 8 (333). P. 333ra50. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad610027053774>
11. Tsikas D. “Combating atherosclerosis with heavy PUFAs: Deuteron not proton is the first” // Atherosclerosis. September 2017. V. 264. P. 79–82. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.07.01828756876>

BIS (μ-TARTRATO) DI (μ-HYDROXO) GERMANATE (IV) TRIETHANOLAMMONIUM AS AN ALKALINE PHOSPHOLIPASE A₂ INHIBITOR MONONUCLEARS

Academician of the RAS P. A. Storozenko^a, M. M. Rasulov^{a, #}, I. V. Zhigacheva^b, and V. P. Baryshok^c

^a State Scientific Center of the Russian Federation “State Order of the Red Banner of Labor Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds”, Moscow, Russian Federation

^b Federal State Budgetary Institution of Science “Institute of Biochemical Physics named after N.M. Emanuel”, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^c Federal State Budgetary Institution of Higher Education “Irkutsk State Technical University”, Irkutsk, Russian Federation

[#]e-mail: maksud@bk.ru

It was established that the administration of an aqueous solution of bis (μ-tartrato) di (μ-hydroxo) germanate (IV) triethanolammonium to animals daily for 2 months at a dose of the active substance of 10 mg / kg of the animal's weight leads to inhibition of the total activity of the main phospholipase A₂ of mononuclear cells. The results of the study can be used to correct lipid metabolism in the development of disorders in conditions of hyperlipidemia. This allows you to expand the scope of the studied substance and create new pharmacological preparations based on bis (μ-tartrato) di (μ-hydroxo) germanate (IV) triethanolammonium to prevent and inhibit the development of hyperlipidemia.

Keywords: hyperlipidemia, atherosclerosis, alkaline phospholipase A₂, bis (μ-tartrato) di (μ-hydroxo) germanate (IV) triethanolammonium