
АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ БЛОКАТОРА АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА В ПОЧКАХ

Ю.А. Белоус

Кафедра психотерапии и наркологии ФПКМР
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 21, корп. 3, Москва, Россия, 117198

И.А. Комаревцева, Е.В. Комаревцева

Кафедра медицинской химии ЛГМУ
Квартал 50-летия Оборона Луганска, Луганск, Украина, 19104

В статье изложены результаты изучения антиоксидантной активности ингибитора АПФ каптоприла в тканях почек и возможности его использования в комплексном лечении острой почечной недостаточности.

Исследования проведены на белых крысах-самцах 16—18-недельного возраста. ОПН формировали двумя моделями — ишемической и «глицерольной».

Выявлена высокая интенсивность свободнорадикальных процессов в почках как в ишемической, так и в «глицерольной» моделях ОПН. Показано, что каптоприл обладает прямой антиоксидантной активностью и вызывает в почечной ткани крыс достоверное снижение интенсивности свободнорадикальных процессов и повышение активности системы антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: ангиотензинпревращающий фермент, каптоприл, свободнорадикальные процессы, ОПН.

Усиление свободнорадикальных процессов и развитие состояния окислительного стресса (ОС) являются одним из патогенетических звеньев воспалительных процессов любого генеза, онкозаболеваний, сердечно-сосудистых и почечных патологий и т.д. К свободнорадикальной патологии относится острая почечная недостаточность (ОПН), так как в условиях ишемии/ реперфузии и гипоксии существует целый ряд факторов, способствующих интенсификации свободнорадикальных процессов, особенно на фоне развивающейся депрессии системы антиоксидантной защиты [3].

Это создает необходимость использования антиоксидантов в комплексном лечении ОПН и изучения возможностей коррекции свободнорадикальных процессов препаратами различных групп. При изучении влияния каптоприла на показатели свободнорадикального гомеостаза однозначного подтверждения его антиоксидантной активности не получено. Способность каптоприла ингибировать свободнорадикальные процессы, описанная некоторыми авторами [8, 9], в ряде других исследований отсутствовала.

Материалы и методы. Исследования проведены на белых крысах-самцах 16—18-ти недельного возраста. Острую почечную недостаточность формировали двумя моделями. I модель — ишемическая — путем пережатия почечной ножки на 30 минут. Операция проводилась под тиопенталовым наркозом в дозе 10 мг/мл. II модель — «глицерольная» — при помощи внутримышечной инъекции 50% раствора глицерола в дозе 10 мл/кг. Контрольным животным вводили физиологический раствор, после чего в обеих моделях животных наблюдали в течение трех

первых стуки. В I модели была выделена контрольная группа № 2 — группа 30-минутной постишемии. Животных забивали путем декапитации. Извлекали почки, готовили гомогенат для дальнейших исследований.

Свободнорадикальные процессы в почках крыс исследовали по протеолитической активности, по активности антиоксидантного фермента — супероксиддисмутазы и по активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS).

Состояние протеолитической активности по отношению к разным белковым фракциям оценивали по реакциям с азоказеином и азоколом (Simko Ltd, Львов). Активность СОД определяли в митохондриальной фракции [4]. Об активности iNOS судили по накоплению стабильных метаболитов оксида азота — нитрит- и нитрат-анионов. Содержание NO_2^- и NO_3^- определяли высокоспецифичным спектрофотометрическим методом по цветной реакции с реактивом Грисса (нитрат-анионы предварительно восстанавливали в нитрит-анионы) [5].

Каптоприл вводили внутривнутрибрюшинно в дозе 1,5 мг/кг за 20 мин до формирования ОПН, однократно в течение одних, двух и трех суток.

Статистическую обработку проводили с помощью программы «Excel 2000», достоверность различий определяли при помощи критерия t-Стьюдента.

Результаты и обсуждение. При ишемической и глицерольной моделях ОПН происходит активация свободнорадикальных процессов на фоне снижения активности антиоксидантной защиты в клетках почек (табл. 1, табл. 2). В течение времени наблюдения после моделирования ОПН наблюдалось достоверное увеличение протеолитической активности в клетках почек по отношению к основным белковым фракциям. Протеолитическая активность в клетках почек по отношению к высокомолекулярным белкам по реакции с азоказеином значительно повышалась с максимумом на 2-е сутки развития ОПН в I и II моделях — в 2 раза и в 1,5 раза, соответственно. Активация протеолиза относительно коллагена в группах I модели возросла на 1-е и 2-е сутки на 24%, а на 3-и сутки и в контроле № 2 — на 19,3%. Аналогичной была тенденция и для экспериментальных групп II модели по сравнению с контролем.

Таблица 1

Изменения активности свободнорадикальных процессов в почках крыс при ишемической модели ОПН (I) под влиянием каптоприла

До введения каптоприла				
Период наблюдений	Протеолиз, $E_{440}/г/ч$		СОД, % ингиб.	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, мкг/г
	по азоказеину	по азоколу		
Контроль, n = 10	$15,9 \pm 0,3$	$8,3 \pm 0,4$	$33,9 \pm 0,8$	$34,0 \pm 1,6$
Контроль-2, n = 10	$16,3 \pm 0,2$	$9,9 \pm 0,3^*$	$21,3 \pm 0,8^*$	$65,6 \pm 5,1^*$
ОПН:				
1-е сутки, n = 6	$17,3 \pm 0,3^*$	$10,2 \pm 0,2^*$	$12,5 \pm 1,8^*$	$83,7 \pm 10^*$
2-е сутки, n = 6	$24,2 \pm 0,9^*$	$10,3 \pm 0,8^*$	$7,5 \pm 1,1^*$	$90,0 \pm 10,3^*$
3-и сутки, n = 6	$17,8 \pm 1,0^*$	$9,8 \pm 0,3^*$	$14,8 \pm 1,0^*$	$86,9 \pm 10,0^*$
После введения каптоприла				
Контроль-2, n = 10	$17,2 \pm 0,3^{**}$	$9,1 \pm 0,2$	$21,7 \pm 1,2$	$43,5 \pm 4,3^{**}$
ОПН:				
1-е сутки, n = 6	$16,1 \pm 0,3^{**}$	$9,3 \pm 0,2^{**}$	$26,8 \pm 2,4^{**}$	$55,7 \pm 4,7^{**}$
2-е сутки, n = 6	$17,4 \pm 0,8^{**}$	$9,5 \pm 0,2$	$23,2 \pm 2,8^{**}$	$70,9 \pm 6,8^{**}$
3-и сутки, n = 6	$16,2 \pm 0,3^{**}$	$8,9 \pm 0,2^{**}$	$29,3 \pm 2,5^{**}$	$69,8 \pm 5,4^{**}$

Примечание: * — результаты достоверны относительно контроля ($p < 0,05$); ** — результаты достоверны относительно групп ОПН ($p < 0,05$).

Изменения активности свободнорадикальных процессов в почках крыс при «глицерольной» модели ОПН (II) под влиянием каптоприла

Период наблюдений	До введения каптоприла		СОД, % инг.	NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻ , мкг/г
	Протеолиз, E ₄₄₀ /г/ч			
	по азоказеину	по азоколу		
Контроль, n = 10	15,9 ± 0,3	8,3 ± 0,4	33,9 ± 0,8	34,0 ± 1,6
ОПН:				
1-е сутки, n = 6	22,9 ± 1,4	10,5 ± 0,3*	12,5 ± 1,5*	67,8 ± 7,1*
2-е сутки, n = 6	32,7 ± 0,5*	10,8 ± 0,3*	6,6 ± 0,8*	82,3 ± 6,8*
3-и сутки, n = 6	24,7 ± 0,4*	10,3 ± 0,2*	13,1 ± 0,9*	51,9 ± 9,3*
	После введения каптоприла			
ОПН:				
1-е сутки, n = 6	19,3 ± 1,2**	8,9 ± 0,2	25,5 ± 1,6**	50,9 ± 3,9**
2-е сутки, n = 6	20,7 ± 1,5**	9,1 ± 0,2**	22,7 ± 2,1**	70,2 ± 4,2**
3-и сутки, n = 6	16,1 ± 0,4**	8,8 ± 0,2	26,8 ± 2,8**	43,4 ± 6,1**

Примечание: * — результаты достоверны относительно контроля ($p < 0,05$); ** — результаты достоверны относительно групп ОПН ($p < 0,05$).

Как указано в таблицах 1 и 2, активность СОД в клетках почек уменьшалась уже в первые 30 мин. после ишемии (I модель) и продолжала понижаться от первых ко вторым и третьим стукам развития ОПН (I и II модели).

Было отмечено накопление в почечной ткани стабильных метаболитов NO. Максимум активности iNOS приходился на группы двухсуточных животных как в I, так и во II моделях (см. табл. 1, 2).

Известно, что при чрезмерном накоплении активных форм кислорода (O₂⁻, H₂O₂, NO, OH) проявляется их токсическое действие, которое сопровождается усилением процессов окислительной деструкции липидов, белков, нуклеиновых кислот, углеводов [6]. В настоящее время большое внимание уделяется изучению окислительной модификации белков (ОМБ). ОМБ сопровождается нарушением не только первичной, но вторичной и третичной структур белка. Сегодня известна большая группа ферментов, которые могут подвергаться металлокатализированному окислению [1], к ним относится и СОД. Следует отметить, что окисленным белкам присуща повышенная чувствительность к протеолизу, и фактически в организме протеолитическому расщеплению подвергаются окисленные белки, а не нативные. Также выявлено, что избыточная продукция NO индуцибельной формой NO-синтазы оказывает цитотоксическое действие при ишемии/реперфузии ткани [7]. Нерегулируемое нагромождение метаболитов АФК и взаимодействие их с оксидом азота с образованием пероксинитрита могут проявлять повреждающее действие на субклеточные и клеточные структуры.

Следовательно, мы наблюдали интенсивность свободнорадикальных процессов в почках в обеих моделях ОПН.

Введение животным каптоприла сопровождалось снижением протеолитической активности по азоказеину по сравнению с группами ОПН в I и II моделях (см. табл. 1, 2). Также значительно понизилось содержание нитрит- и нитрат-анионов по сравнению с группами ОПН без блокады АТ II, но уровень стабильных метаболитов не достигал контрольных значений. Активность СОД значительно

повышалась от первых к 3-м суткам, в I модели — на 52,2%, на 67,7%, на 49,5%; во II модели — на 50,9%, на 70,9%, на 51,2%, соответственно, по сравнению с группами чистой ОПН. Таким образом, снижение интенсивности свободнорадикальных процессов под влиянием каптоприла сопровождалось увеличением активности СОД в почечной ткани.

Интерес к изучению антиоксидантных свойств ингибиторов АПФ, в частности каптоприла, объясняется участием АТ II в увеличении продукции супероксида посредством активации НАДФН, ксантиноксидазы и наличием в молекуле каптоприла сульфгидрильной группы, придающей ему свойства скавенджера свободных радикалов. Имеются данные о том, что каптоприл угнетает перекисное окисление липидов и предотвращает снижение активности супероксиддисмутазы и каталазы. В нашем исследовании отмечено снижение протеолитической активности, что указывает на ингибирование окислительной модификации белков на фоне повышения активности антиоксидантной защиты. Однако некоторые авторы не подтверждают антиоксидантные свойства данного препарата. Так, С. Winterbourn и соавт. [10] не выявили влияния каптоприла на генерацию супероксида в системе ксантиноксидазы и гипоксантина и в реакции с перекисью водорода.

В большинстве исследований антиоксидантная активность каптоприла изучалась *in vitro* или в опытах на перфузируемом сердце, в то время как о влиянии антиоксидантного эффекта данного препарата на почки при ОПН известно мало. Существует ряд факторов, способствующих интенсификации свободнорадикальных процессов в условиях ишемии и гипоксии, характерных для развития ОПН. Нарушение процесса окислительного фосфорилирования, накопление внутриклеточного кальция, избыточная генерация NO, снижение активности антиоксидантных ферментов, с одной стороны, приводят к неспособности клетки утилизировать уже имеющийся кислород, а с другой, вызывают дополнительное образование большого количества АФК.

«Глицерольная» модель ОПН рассматривается как модель геминдуцированного повреждения почек [2]. Накопление в клетках свободного гема — прооксиданта приводит к активации процессов свободнорадикального окисления и к развитию ОС. АФК взаимодействуют с липидными компонентами мембраны, белками, нуклеиновыми кислотами, что приводит к повреждению этих структур: от повышения проницаемости мембраны до лизиса клеток [3].

Таким образом, при ишемии и гем-интоксикации почек формируется порочный круг: ишемия и накопление гема в ткани вызывают усиление свободнорадикальных процессов, что, в свою очередь, приводит к усугублению ишемии и гем-интоксикации, индуцирующих дальнейшее образование АФК. Разорвать эту цепь могут антиоксиданты — ингибиторы АПФ.

Наше исследование показало, что каптоприл обладает прямой антиоксидантной активностью и вызывает в почечной ткани крыс достоверное снижение интенсивности свободнорадикальных процессов и повышение активности системы антиоксидантной защиты.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Дубинина Е.Е.* Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // *Вопр. мед. хим.* — 2001. — № 6. — С. 561—581.
- [2] *Калиман П.А., Стрельченко Е.В., Никитченко И.В. и др.* Гемоксигеназная активность и некоторые показатели антиоксидантной защиты в печени и почках крыс при глицерольной модели рабдомиолиза // *Бюлл. экспер. биол. и мед.* — 2003. — № 1. — С. 45—48.
- [3] *Коган А.Х.* Фагоцитзависимые кислородные и свободнорадикальные механизмы аутоагрессии в патогенезе внутренних болезней // *Вестник РАМН.* — 1999. — № 2. — С. 3—10.
- [4] *Орлова Е.А.* Влияние даларгина на активность супероксиддисмутазы и лактатдегидрогеназы у крыс в условиях гиперпродукции оксида азота // *Мед. альманах.* — 2002. — № 4. — С. 101—104.
- [5] *Орлова Е.А.* Анализ нитритов и нитратов в ткани при экспериментальной острой почечной недостаточности // *Укр. журнал экстрем. медицины.* — 2002. — № 1. — С. 79—82.
- [6] *Санрин А.Н., Калиман Е.П.* Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // *Усп. биол. хим.* — 1999. — Т. 39. — С. 289—326.
- [7] *Серая И.П., Нарциссов Я.Р.* Современные представления о биологической роли оксида азота // *Усп. совр. биол.* — 2002. — № 3. — С. 249—258.
- [8] *Cavanogh E., Inserra F., Ferder U. et al.* Enalapril and captopril enhance glutathione-dependent antioxidant defenses in mouse tissues // *Am. J. Physiol. Regul. Integr.* — 2000. — № 4. — P. 347—352.
- [9] *Gurer H., Neal R., Yang P. et al.* Captopril as an antioxidant in lead-exposed Fischer 344 rats // *Hum. Exp. Toxicol.* — 2000. — № 1. — P. 27—32.
- [10] *Winterbourn C., Metodiewa D.* Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide // *Free Radic. Biol. Med.* — 1999. — № 3—4. — P. 322—328.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF INHIBITOR OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME IN KIDNEY

Y.A. Belous

Department of psychotherapy and narcology FIPMS
Peoples' Friendship University of Russia
Mikluho-Maklaya str., 21, k. 3, Moscow, Russia, 117198

I.A. Komarevtseva, K.V. Komarevtseva

Department of medical chemistry LGMU
50 let Oboroni Luganska boulevard, Lugansk, Ukraina, 91045

The influence of inhibition of angiotensin-converting enzyme on free-radical processes in kidney cell is investigated at different models of acute renal failure. It is established antioxidant effect of captopril in kidneys of rats.

Key words: angiotensin-converting enzyme, captopril, free-radical processes, nitric oxide.