

INHIBÍCIA PEROXIDÁCIE LIPIDOV V ERYTHROCYTOCH DIABETICKÝCH POTKANOV AMINOGUANIDÍNOM, REZORCYLIDÉNAMINOGUANIDÍNOM A ICH KYSLÍKOVÝMI A SÍRNYMI ANALÓGMI

HRNČIAROVÁ M., ČÁRSKY J., JAKUŠ V., ZLATOŠ L., KUCHARSKÁ J., GVOZDJÁKOVÁ A.

INHIBITION OF ERYTHROCYTE LIPID PEROXIDATION IN DIABETIC RATS BY AMINOGUANIDINE, RESORCYLIDENEAMINOGUANIDINE AND THEIR OXYGEN AND SULPHUR ANALOGS

This study examined the effect of aminoguanidine (AG) and its structural analogs semicarbazide (SK) and thiosemicarbazide (TSK), as well as their condensation products with 2,4-dihydroxybenzaldehyde — resorcylidene aminoguanidine (RAG), resorcylidene thiosemicarbazone (RTSKon), and resorcylidene semicarbazone (RSKon) on erythrocyte lipid peroxidation in rats with diabetes mellitus induced by hydrogen peroxide. All of the tested compounds at concentrations 1 mmol.l⁻¹ in incubation mixture significantly inhibited the formation of malondialdehyde (MDA), an end product of lipid peroxidation, as assessed by its thiobarbituric acid reactivity. AG and RAG were the most effective inhibitors of lipid peroxidation (90 %). It was also found, that RSKon and RTSKon were more potent inhibitors of lipid peroxidation (70 and 80 %) compared to SK and TSK (50 %). We suppose that this increase of inhibitory effect by compounds with resorcylidene group may be due to the formation of quinone structure. (Fig. 1, Schemas 3, Ref. 24.)

Key words: lipid peroxidation, erythrocytes, diabetes mellitus, aminoguanidine, resorcylideneaminoguanidine, Schiff's bases.

Bratisl Lek Listy 1998; 99: 364–367

Sledovali sme účinok aminoguanidínu (AG) a jeho štruktúrnych analógov semikarbazidu (SK) a tiosemikarbazidu (TSK), ako aj ich kondenzátov s 2,4-dihydroxybenzaldehydom — rezorcylidénaminoguanidínu (RAG), rezorcylidéntiosemikarbazónu (RTSKon) a rezorcylidésemikarbazónu (RSKon) na peroxidom vodíka indukovanú peroxidáciu lipidov v erythrocytoch potkanov s diabetes mellitus. Zistili sme, že všetky testované látky s koncentráciou 1 mmol.l⁻¹ v inkubačnej zmesi významne inhibovali tvorbu malondialdehydu (MDA), koncového produktu lipoperoxidácie kvantifikovaného jeho TBA-reaktívou, pričom AG a RAG boli najúčinnšie (90 %). Ďalej sa zistilo, že RSKon a RTSKon boli efektívnejšie inhibitory peroxidácie lipidov (70 a 80 %) ako SK a TSK (50 %). Výrazný príspevok rezorcylidénového zoskupenia na inhibíciu peroxidácie vysvetľujeme možnosťou tvorby oxidačnej chinoidnej štruktúry. (Obr. 1, schémy 3, lit. 24.)

Kľúčové slová: peroxidácia lipidov, erythrocyty, diabetes mellitus, aminoguanidín, rezorcylidénaminoguanidín, Schiffove zásady.

Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 7, s. 364–367

Štruktúrna modifikácia bielkovín pri diabete, ktorá sa všeobecne pripisuje neenzýmovej glykácii, môže byť spojená s oxidáciou glukózy a polynenasýtených karboxylových kyselín pri katalytic-

kom účinku iónov prechodných kovov (Cerami a spol., 1979; Monnier, 1981). Glykácia a oxidácia sa takto prejavujú ako spojené patobiochemické procesy.

Vo vývoji pretrvávajúcej diabetických komplikácií je zahrnutý aj oxidačný stres. Je veľa dôkazov o zvýšenej peroxidácii lipidov a akumulácii dialdehydu kyseliny malónovej (MDA) pri diabete (Sato a spol., 1979; Nishigaki a spol., 1981; Noberasco a spol., 1991; Uzel a spol., 1987; Jain a spol., 1989; Gvozdjaková a spol., 1997; Kupčová a spol., 1993; Ďuračková, 1997).

Glykácia proteínov je hlavnou príčinou vývoja diabetických komplikácií (Brownlee a spol., 1988). V následných procesoch spontánne dochádza k tvorbe intermediárnych a koncových produktov glykácie (AGE-produkty). AGE-produkty s následnou tvorbou kyslíkových radikálov podnecujú oxidačné poškodenie in vivo. Zistilo sa, že v erythrocytoch diabetických pacientov dochádza k pe-

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, ¹Ústav patologickej fyziológie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, ²Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky LF UK v Bratislave Department of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, ¹Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, ²Pharmacobiochemical Laboratory, IIIrd Internal Clinic, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava

Address for correspondence: M. Hrnčiarová, RND, PhD, Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovakia.

Phone: +421.7.5357 412, Fax: +421.7.5357557 Internet: chemia@fmed.uniba.sk

roxidácii lipidov a akumulácii MDA a že stupeň tejto peroxidácie odpovedal stupňu hyperglykémie (Jain a spol., 1989). Tí istí autori (Jain a spol., 1997) študovali aj účinok oxidačného stresu indukovaného peroxidom vodíka a vitamínu E na glykáciu hemoglobínu v erythrocytoch v prítomnosti glukózy. Tvorba glykovaného hemoglobínu (GHb) bola signifikantne zvýšená v prítomnosti peroxidu vodíka. Zvýšenie tvorby GHb bolo blokované v erythrocytoch predinkubovaných vitamínom E, ktorý tiež inhiboval tvorbu MDA, koncového produktu peroxidácie lipidov. Z týchto zistení je zrejmé, že zvýšená aktivita voľných kyslíkových radikálov môže iniciovať peroxidáciu lipidov a akumuláciu MDA, ktoré ďalej môžu stimulovať glykáciu proteínov v podmienkach diabetu. Vitamín E teda blokuje proces neenzýmovej glykácie proteínov inhibíciou tvorby MDA. V pokusoch in vivo sa zistilo, že arginín — zlúčenina reagujúca efektívne s aldehydmi redukuje tvorbu produktov peroxidácie lipidov u pacientov s diabetes mellitus (Lubec a spol., 1997). Ukazuje sa, že redukovanie oxidačného stresu môže spomaliť vývin chronických komplikácií diabetu.

Aminoguanidín — zlúčenina podobnej štruktúry ako arginín má antiradikálovú aktivitu, eliminuje účinok voľných kyslíkových radikálov vznikajúcich rádiolýzou vody (Lisfi a spol., 1997) a výrazne inhibuje následné procesy glykácie proteínov (Reguena a spol., 1993; Khatami a spol., 1988). Ďalej je známe, že aminoguanidín ako farmakologický inhibítor tvorby AGE-produktov znižuje aj hladinu modifikovaných cirkulujúcich LDL-lipoproteínov u ľudí a in vitro inhibuje niektoré oxidačné reakcie. Pri štúdiu reakcie aminoguanidínu s 4-hydroxynonenalom a MDA (oxidačnými produktmi lipidov) sa zistilo, že aminoguanidín je efektívnym vychytávačom α -nenasýtených a β -nenasýtených aldehydov (Al Abed a Bucala, 1997). Predpokladá sa, že mechanizmus účinku aminoguanidínu in vivo je v ochrane tkanivových zložiek pred škodlivými účinkami oxidačného poškodenia.

Reaktívne karbonylové zlúčeniny, ktoré sa izolovali pri diabete, sú nielen toxické, ale po reakcii s voľnými aminoskupinami spôsobujú zosieťovanie proteínov s následnou tvorbou krížových väzieb (crosslinks) intramolekulových (schéma 1), ako aj inter-

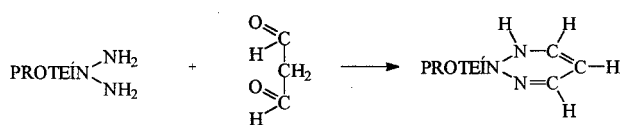


Schéma 1. INTRAMOLEKULOVÁ KRÍŽOVÁ VÄZBA

Scheme 1. INTRAMOLECULAR CROSSLINK

molekulových (schéma 2). Tieto AGE-medziprodukty sú potom menej citlivé na katabolizmus, čo môže spôsobiť akumulovanie proteínov na stenách malých ciev. Aminoguanidín prednostne reaguje s reaktívnymi karbonylovými skupinami ako napríklad 3-de-

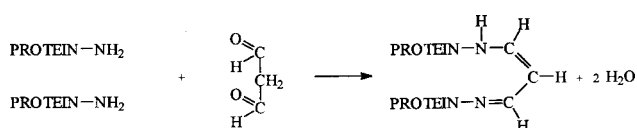
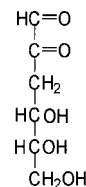


Schéma 2. INTERMOLEKULOVÁ KRÍŽOVÁ VÄZBA

Scheme 2. INTERMOLECULAR CROSSLINK

oxyglukozón (vzorec 1) a výrazne redukuje tvorbu crosslinkov odvodených od glukózy (Brownlee, 1994).



3-DEOXYGLUKOZÓN
3-DEOXYGLUCOSONE

V našej práci sme sledovali účinok aminoguanidínu (AG) a jeho štruktúrnych analógov semikarbazidu (SK) a tiosemikarbazidu (TSK), ako aj ich kondenzátov s 2, 4-dihydroxybenzaldehydom — rezorcylidénaminoguanidínu (RAG), rezorcylidéntiosemikarbazónu (RTSKon) a rezorcylidénsemikarbazónu (RSKon) na peroxidom vodíka indukovanú peroxidáciu lipidov v erythrocytoch potkanov s diabetes mellitus.

Materiál a metódy

Pokusy sme robili na potkanoch—samcoch kmeňa Wistar. Novonarodeným potkanom sme na 2. a 9. deň života intraperitoneálne injikovali streptozotocín (Calbiochem) v dávke 45 mg.kg⁻¹ hmotnosti tela. Streptozotocín bol krátko pred podaním rozpustný v 0,1 mol.l⁻¹ citrátovom tlmivom roztoku s pH 4,5. Celkový objem roztoku injikovaného 2-dňovým zvieratám nepresiahol hodnotu 10 μ l a 9-dňovým potkanom 30 μ l. Kontrolným zvieratám sme v uvedených dňoch postnatálneho života intraperitoneálne injikovali rovnaký objem citrátového tlmivého roztoku. Potkany sme od matky odstavili na 24. deň po narodení. Chovali sme ich po 5 v jednej kletke a krmili štandardnou Larsenovou stravou. Ich prístup k jedlu a vode bol voľný (ad libitum).

Zvieratá sme pred koncom 2. mesiaca postnatálneho života odvážili a potom usmrtili dekapitáciou. Pred usmrtením zvieratá nehladovali. Pri dekapitácii sme krv zachytili do skúmavky. Erythrocyty sme separovali centrifugáciou heparinizovanej krvi, pri 1200 g, 10 minút a premývali trikrát studeným roztokom 0,15 mol.l⁻¹ NaCl, pH 7,4.

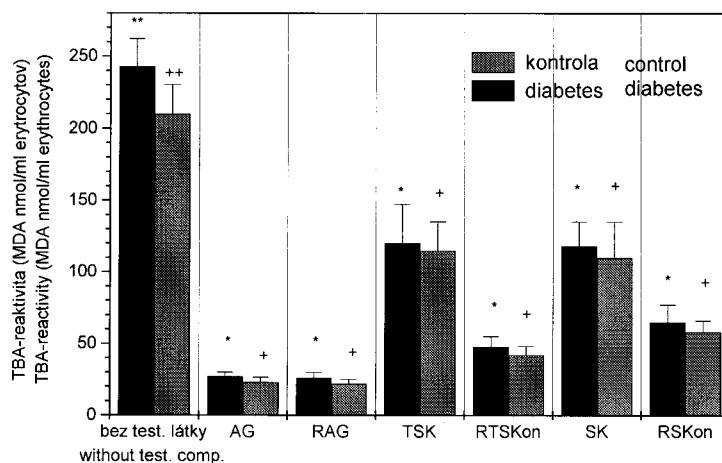
Pokusy sme robili v skupine 8 potkanov s diabetes mellitus a v skupine 8 kontrolných potkanov.

Použité chemikálie a príprava testovaných látok:

2,4-dihydroxybenzaldehyd, AG, TSK a SK — p.a., firmy Sigma.

RTSKon a RSKon boli pripravené podľa všeobecného postupu syntézy (Miyatake, 1952). RAG bol pripravený kondenzačnou reakciou AG a 2,4-dihydroxybenzaldehydu (Čársky a spol., 1978). Použili sme roztoky AG, RAG, TSK a SK v 0,15 mol.l⁻¹ NaCl a roztoky RTSK a RSK v dimetylsulfoxide.

TBA-reaktivita: Stupeň peroxidácie lipidov sa určoval meraním koncentrácie MDA, koncového produktu peroxidácie lipidov, na základe jeho reaktivity s tiobarbiturovou kyselinou podľa metódy Stocka a Dormandyho (1971) v modifikácii Biddera a Jaegera (1982). Konečné zloženie inkubačnej zmesi bolo: 6,5 mmol.l⁻¹ H₂O₂, 1,6 mmol.l⁻¹ azid sodný, Immol.l⁻¹ test látky a 5 % suspenzia erythrocytov v roztoku 0,15 mol.l⁻¹ NaCl, pH 7,4.



Obr. 1. Účinnok AG, RAG, TSK, RTSKon, SK, RSKon s koncentráciou 1 mmol.l⁻¹ na peroxidáciu lipidov v erythrocytoch potkanov indukovanú peroxidom vodíka (6.5 mmol.l⁻¹). Čas inkubácie bol 3 hodiny. Hodnoty sú dané ako priemer±SD.

Štatisticky významne (Studentov test) zvýšené je ** oproti ++ (p<0,01), významne znížené * oproti ** a + oproti ++ (p<0,001).

Fig. 1. Effect of AG, RAG, TSK, RTSKon, SK, RSKon (1 mmol.l⁻¹) on hydrogen peroxide (6.5 mmol.l⁻¹) induced lipid peroxidation in erythrocytes of rats after 3 h incubation. The given values are mean±SD.

Statistically significant are differences between ** and ++ (p<0.01), between * and **, + and ++ (p<0.001).

Suspenszia erythrocytov preinkubovaných s azidom sodným a s testovanými látkami s koncentráciou 1 mmol.l⁻¹, počas 45 minút, bola inkubovaná, s 6,5 mmol.l⁻¹ H₂O₂ v termomixéri (Eppendorf) pri teplote 37 °C, počas 3 hodín.

V krvi sa stanovil glykovaný hemoglobín (Flückiger a Winterhalter, 1976) a glukóza (testom Lachema).

Výsledky sme hodnotili Studentovým testom.

Výsledky

Koncentrácia glukózy v krvi diabetických potkanov (15,89±2,55 mmol.l⁻¹) bola signifikantne vyššia (p<0,001) oproti potkanom kontrolnej skupiny (5,98±0,26). Aj hodnota glykovaného hemoglobínu (GHbA_{1c}) u diabetických potkanov (4,68±0,28) bola štatisticky významná (p<0,01) oproti kontrolám (3,62±0,28).

Obrázok 1 prezentuje výsledky sledovania účinku aminoguanidínu (AG) a jeho štruktúrnych analógov SK a TSK, ako aj ich kondenzátov s 2,4-dihydroxybenzaldehydom — rezorcylidénaminoguanidínom, rezorcylidénsemikarbazónom a rezorcylidéntiosemikarbazónom na tvorbu MDA v erythrocytoch inkubovaných s 6,5 mmol.l⁻¹ H₂O₂, počas 3 hodín. Všetky testované látky v koncentrácii 1 mmol.l⁻¹ v oboch skupinách potkanov, t.j. kontrolnej i diabetickej, signifikantne (p<0,001) redukovali hladinu MDA oproti erythrocytom inkubovaných len s H₂O₂ bez testovaných látok. Najúčinnější bol AG a RAG s 90 % inhibíciou. RSKon a RTSKon, s inhibíciou 70 a 80 % sa ukázali efektívnejšie inhibitory peroxidácie lipidov ako TSK a SK s 50 % inhibíciou.

Zistili sme aj významne zvýšenú citlivosť erythrocytov diabetickej skupiny voči peroxidácii indukovanej peroxidom vodíka oproti kontrolnej skupine potkanov (p<0,01). Podobne sa zistila zvýšená citlivosť erythrocytov pacientov s diabetes mellitus voči peroxidu vodíka (Uzel a spol., 1987).

Diskusia

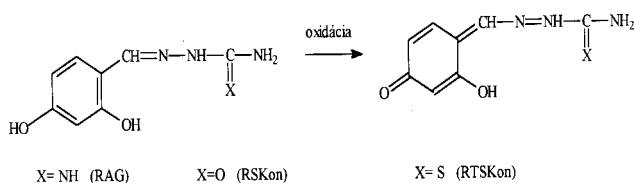
Neenzýmová glykácia významných bielkovín v podmienkach hyperglykémie sa začína kondenzáciou glukózy s ε-aminoskupinami na reverzibilný aldímín (Schiffovu zásadu), ktorá môže disociovať alebo podliehať pomalej transformácii na stabilnejší ketoamín (Amadoriho prešmyk). Amadoriho produkty potom podliehajú sérii komplexných reakcií za vzniku AGE-produktov.

Je známe, že AG môže blokovat tvorbu intermediárnych a koncových produktov glykácie proteínov pri diabete cestou kondenzácie s Amadoriho produktom (ketoamínom), glukózou alebo väzbou na reaktívne karbonylové zlúčeniny, vznikajúce v 2. stupni nenzýmovej glykácie (Brownlee, 1994).

Ako ukazujú naše výsledky, testované látky in vitro sú schopné vysoko efektívne redukovat MDA — produkt lipoperoxidácie indukovanej peroxidom vodíka v diabetickej podmienkach. V experimentoch in vivo s arginínom, látkou s podobnou štruktúrou ako aminoguanidín, sa zistila významná inhibícia peroxidácie lipidov v erythrocytoch pacientov s diabetes mellitus (Lubec, 1997).

Naše výsledky ukázali, že tvorbu MDA najefektívnejšie redukovat AG a RAG. Ďalej sa zistilo, že rezorcylidénové deriváty RSKon a RTSKon majú výrazne vyšší inhibičný účinok na peroxidáciu lipidov ako semikarbazid a tiosemikarbazid.

Z dosiahnutých výsledkov sa dá urobiť záver, že rezorcylidénové zoskupenie významne prispieva k inhibičnému účinku, čo



pravdepodobne súvisí s možnosťou tvorby chinoidnej štruktúry vznikajúcej oxidáciou rezorcyloidénového zvyšku podľa schémy 3.

Významný inhibičný účinok rezorcyloidénových derivátov testovaných látok na peroxidáciu lipidov nemožno vysvetliť blokovaním uvedených produktov glykácie bielkovín, ale poukazuje na významnú úlohu redukovania oxidačného stresu v podmienkach diabetes mellitus.*

Literatúra

- Al-Abed Y., Bucala R.:** Efficient scavenging of fatty acid oxidation products by aminoguanidine. *Chem. Res. Toxicol.*, 10, 1997, č. 8, s. 875—879.
- Bidder T.G., Jaeger P.D.:** Malondialdehyde production by erythrocytes from alcoholic and non-alcoholic subjects. *Life Sci.*, 30, 1982, s. 1021—1027.
- Brownlee M., Vlassara H., Kooney T., Ulrich P., Cerami A.:** Aminoguanidine prevents diabetes induced arterial wall protein cross linking. *Science*, 232, 1986, s. 1629—1632.
- Brownlee M., Cerami A., Vlassara H.:** Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *New Engl. J. Med.*, 318, 1988, č. 20, s. 1315—1321.
- Brownlee M.:** Lilly lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes*, 43, 1994, s. 836—841.
- Cerami A., Stevens V.J., Monnier V.M.:** Role of nonenzymatic glycosylation in the development of the sequelae of diabetes mellitus. *Metabolism*, 28, 1979, s. 431—436.
- Čársky J., Lazarová M., Beňo A.:** Study of resorcyloidene aminoguanidine. I. Spectral and acid-basic properties of the onium compounds. *Acta F.R.N. Univ. Comen.-Chimia*, 26, 1978, s. 89—102.
- Ďuračková Z.:** Antioxidanty v dobrom i zlom. *Klin. Biochem. Metab.*, 5 (26), 1997, č. 3, s. 194—199.
- Flückiger R., Winterhalter K.H.:** In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}. *FEBS Lett.*, 71, 1976, č. 1, s. 356—360.
- Gvozdjaková A., Kucharská J., Braunová Z., Kolesár P.:** Účinok DIA-Lécie Q₁₀ na antioxidačný stav a základné parametre látkovej premeny tukov a cukrov u diabetikov. *Slov. Lekár*, 7, 1997, č. 12, s. 35—39.
- Jain S.K., Mc Vie R., Duett J., Herbst J.J.:** Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes*, 38, 1989, s. 1539—1543.
- Jain S.K., Palmer M.:** The effect of oxygens radical metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Rad. Biol. Med.*, 22, 1997, č. 4, s. 593—596.
- Khatami M., Suldan, Z., David I., Li W., Rockey J. H.:** Inhibition effects of pyridoxal phosphate, ascorbate and aminoguanidine on nonenzymatic glycosylation. *Life Sci.*, 43, 1988, č. 21, s. 1725—1731.
- Kupčová V., Turecký L., Čársky J., Kolesár P., Brixová E.:** Role of free radicals in biological systems. S. 197—206. In: Fehér J., Blazovics A., Matkovics B., Mézes V. (Eds.). Budapest, Akadémiai Kiadó 1993.
- Lisfi D., Jore D., Bonnefont-Rousselot D., Delattre J., Belaraj A., Gardes-Albert M.:** Rôle antioxydant de laminoguanidine soumise a l'action des radicaux libres OH et O₂⁻ produits par radiolyse continue de l'eau. *J. Chim. Phys.*, 94, 1997, s. 283—288.
- Lubec B., Hayn M., Kitsmuller E., Vierhapper H., Lubec G.:** L-Arginine reduces lipid peroxidation in patients with diabetes mellitus. *Free Rad. Biol. Med.*, 22, 1997, č. 1/2, s. 355—357.
- Monnier V.M.:** Nonenzymatic browning in vivo. Possible processes for aging of long-lived proteins. *Science*, 211, 1981, s. 491—493.
- Miyatake K.J.:** *J. Pharm. Soc. Japan* 72, 1952, s. 1162—1168. (cit. podľa: Stankoviánsky S., Čársky J.: Kovové soli rezorcyloidén tiosemikarbazónu. *Chem. Zvesti*, 15, 1961, č. 1, s. 36—43, a Stankoviánsky S., Beňo A., Čársky J.: Studium des analytischen reagenses resorcyloidenthiosemikarbazone. *Chem. Zvesti*, 28, 1974, č. 5, s. 614—620).
- Nishigaki I., Hagihara M., Tsunekawa H., Maseki M., Yagi K.:** Lipid peroxide levels of serum lipoproteins fractions of diabetic patient. *Biochem. Med.*, 25, 1981, s. 373—378.
- Noberasco G., Odetti P., Boeri D., Maiello M., Adezati L.:** Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomed. Pharmacother.*, 45, 1991, s. 193—196.
- Requena J.R., Vidal P., Cabezas-Cerrato J.:** Aminoguanidine inhibits protein browning without extensive Amadori carbonyl blocking. *Diabet. Res. Clin. Pract.*, 19, 1993, s. 23—30.
- Sato Z., Hotta N., Sakamoto N., Matsuoka S., Ohishi N., Yagi K.:** Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem. Med.*, 21, 1979, s. 104—107.
- Stock J., Dormandy T.L.:** The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Brit. J. Haematol.*, 20, 1971, s. 95—111.
- Uzel N., Sivas A., Nysal M., Oz H.:** Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patient with diabetes mellitus. *Horm. Metabol. Res.*, 19, 1987, s. 89—90.

Do redakcie došlo 24.2.1998.

* Táto práca bola dotovaná grantovou agentúrou MŠ SR (grant č. 95/5195/641 a grant č. 1/4112/97).
Ďakujeme D. Opálenej a E. Hederovej za technickú spoluprácu.