

АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ ТА ЖЕЛАТИНАЗ ЗА УМОВ АДРЕНАЛІНОВОЇ ІШЕМІЇ МІОКАРДА В ЩУРІВ

В експерименті на щурах досліджували активність антиоксидантних ферментів та желатиназ за адреналінової ішемії міокарда, а також вплив на ці показники корвітину (К) та доксицикліну (Д). Встановлено, що введення адреналіну в дозі 0,2 мг/100 г маси впродовж 10 днів призводить до зростання інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів, активності ферментів антиоксидантної системи та желатиназ у крові й серці. Під впливом К та Д активність досліджуваних ензимів знижується, причому найбільш суттєво зменшується активність желатиназ і супероксиддисмутази в серцевому м'язі. Отримані дані свідчать про здатність досліджуваних препаратів пригнічувати кардіотоксичний ефект високих доз адреналіну завдяки їх спроможності зв'язувати вільні радикали та інгібувати активність матрикс-деградуючих ферментів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: адреналінова ішемія міокарда, антиоксидантна система, желатинази А і В, корвітин, доксициклін.

ВСТУП. Ішемічна хвороба серця (ІХС) є однією з найбільш серйозних проблем сучасної медицини. Незважаючи на численні дослідження, молекулярні механізми розвитку цієї хвороби та виникнення її ускладнень залишаються до кінця не з'ясованими. Одним із факторів ризику розвитку ІХС вважають тривале психоемоційне навантаження, яке призводить до підвищення рівня катехоламінів, накопичення активних форм кисню (АФК), активації пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і ушкодження мембран кардіоміоцитів [10]. Ступінь ураження клітин серцевого м'яза залежить не тільки від кількості АФК, але й від активності внутрішньоклітинних ферментів антиоксидантної системи. Баланс між оксидантною та антиоксидантною системами, або редокс, зумовлює значну кількість сигнальних шляхів і метаболічних процесів у клітинах, а його порушення призводить до серцево-судинних захворювань, в тому числі й ІХС [8, 12].

Останнім часом велику увагу приділяють дослідженню металопротеїназ ММП₂ та ММП₉, або желатиназ А і В, при серцево-судинній патології. Ці матрикс-деградуючі ферменти відіграють важливу роль у процесах утворення та руйнування атеросклеротичної бляшки, розвитку гострого коронарного синдрому і постішемічного ремоделювання серцевого

© В. А. Паронік, О. Е. Шаульська, В. І. Жилюк, А. І. Шевцова, 2015.

м'яза [7, 11]. Активність желатиназ залежить від багатьох факторів, у тому числі й кількості АФК, здатних різними шляхами активувати дані ензими [13]. Отже, оксидативний стрес та деградація екстраклітинного матриксу в серцевому м'язі пов'язані між собою, але їх взаємодію за умов адреналінового стресу практично не досліджено.

Симптоадреналова система відіграє велику роль у розвитку хронічної серцевої недостатності – найбільш частого ускладнення ІХС, тому актуальним є обґрунтування персоналізованого призначення препаратів, що попереджують розвиток цієї хвороби. Препаратами, які здатні обривати ланцюг реакцій ПОЛ або безпосередньо руйнувати молекули пероксидів, є антиоксиданти. Серед речовин цієї групи особливе значення має флавоноїд кверцетин. Окрім виражених антиоксидантних властивостей, даний препарат здатний впливати на активність протеолітичних ферментів [2]. Іншим препаратом, що може попереджувати ускладнення ІХС, є доксициклін. За даними літератури, цей антибіотик тетрациклінового ряду зменшує постінфарктне ремоделювання і проявляє захисну дію при ішемії/реперфузії міокарда. Крім того, цей препарат має властивості інгібітора матриксних металопротеїназ, причому найбільш потужний пригнічувальний ефект стосується желатиназ [9]. Однак вплив зазначених препаратів на стан антиоксидантної та протеолітичної си-

стем у серцевому м'язі при гіперпродукованні катехоламінів практично не вивчали, тому метою даної роботи було визначити активність ферментів антиоксидантної системи і желатиназ у щурів за умов адреналініндукованої ішемії міокарда на фоні введення корвітину та доксицикліну.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження виконували на щурах-самцях лінії Вістар масою (195 ± 4) г за схемою, запропонованою Л. Д. Хідіровою, відповідно до якої адреналін ($0,2$ мг/100 г маси) вводили підшкірно впродовж 10 днів [6]. Усіх тварин було поділено на чотири групи: 1-ша – контрольна ($n=8$); 2-га – з адреналіновою ішемією міокарда (AIM, $n=10$); 3-тя і 4-та – щури, які після закінчення курсу адреналінових ін'єкцій отримували корвітин (К) та доксициклін (Д), відповідно. Корвітин вводили впродовж 5 днів внутрішньочеревно згідно з рекомендованою виробником схемою: 1-й день – $5,2$ мг/100 г; 2-й та 3-й дні – по $3,5$ мг/100 г; 4-й та 5-й дні – по $1,8$ мг/100 г маси тварини. Доксициклін вводили перорально в дозі $3,5$ мг/кг. Тварин утримували у стандартних умовах віварію Дніпропетровської медичної академії (температура повітря: (22 ± 2) °С, світло/темрява: 12/12 год). Упродовж експерименту тварин зважували на початку, після набуття AIM та після лікування. Функціональний стан міокарда оцінювали наприкінці експерименту в II стандартному відведенні за допомогою голчатих електродів та комп'ютерного кардіографічного комплексу CardioLab2000. Виводили тварин з експерименту відповідно до вимог Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами. Як знеболювальний препарат використовували тіопентал натрію (40 мкг/кг).

В дослідженні використовували плазму, еритроцити та екстракт водорозчинних білків серцевого м'яза, який отримували шляхом гомогенізації серця у $0,05$ М трис-НСІ буфері, рН=7,2, з подальшим центрифугуванням протягом 30 хв при 8000 g. Ці процедури проводили при температурі 4 °С. Для аналізу застосовували супернатант, який зазначали як фракцію розчинних білків серцевого м'яза. У дослідних зразках визначали концентрацію ТБК-активних продуктів і активність каталази, в гемолізаті еритроцитів оцінювали активність ферментів антиоксидантної системи, а саме: супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР), використовуючи загальноприйняті методи. Активність желатиназ визначали методом желатин-зимографії в нашій модифікації [5].

Отриманий цифровий матеріал аналізували за допомогою програм Excel і програмного продукту Statistica та Sorbfil TLC.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Встановлено, що введення адреналіну протягом 10 днів призводило до короткочасного погіршення фізичного стану тварин (дисфункція сечового міхура, потовиділення, заміління задніх кінцівок), хоча маса піддослідних щурів упродовж експерименту збільшувалась на $1-2$ % у всіх групах. Смертність серед тварин під час введення адреналіну склала 18 %. Лише у 60 % щурів спостерігали набуту ішемію міокарда за даними ЕКГ. Після введення адреналіну частота серцевих скорочень (ЧСС) вірогідно підвищувалась ($p \leq 0,01$) і становила ($421,4 \pm 10$) уд./хв, тоді як у контрольній групі цей показник дорівнював (368 ± 12) уд./хв. Після застосування К та Д він становив (378 ± 13) уд./хв у 3-й і (398 ± 18) уд./хв у 4-й групах відповідно, що вказує на повернення значень ЧСС до показників групи інтактних тварин.

Визначення ТБК-активних продуктів показало їх вірогідне підвищення в плазмі крові та серцевому м'язі тварин 2-ї групи відносно інтактних щурів. Застосування К та Д не призводило до суттєвих змін їх вмісту в плазмі крові, однак у фракції розчинних білків серцевого м'яза цей показник був нижчим від значень контрольної групи (табл.).

Активність всіх досліджуваних антиоксидантних ферментів у плазмі крові та гемолізаті еритроцитів за умов AIM достовірно зростала, за винятком каталази, активність якої в плазмі крові знижувалась у $1,6$ раза. Отже, адреналінова ішемія призводить до активації ферментів антиоксидантної системи в еритроцитах та серцевому м'язі. Під впливом К активність ланки ГП-ГР вірогідно зменшувалась порівняно з 2-ю групою, але залишалась підвищеною відносно контрольної групи (табл.).

Слід відзначити парадоксальну реакцію каталази та СОД на тлі застосування К. Активність СОД після його використання знижувалась в $1,8$ раза відносно нормальних значень, а каталази, навпаки, значно підвищувалась, особливо у плазмі крові. Аналогічну ситуацію спостерігали і в 4-й групі тварин, які отримували Д: активність СОД зменшувалась у $8,5$ раза порівняно з 2-ю групою і була в $2,1$ раза нижчою від норми. Отримані в нашій роботі дані, на перший погляд, суперечать результатам досліджень, в яких показано підвищення активності СОД на тлі зниження активності каталази та рівня ТБК-активних продуктів після застосування К у дозі 150 мг/кг [3]. Однак в інших роботах стверджується, що основ-

Таблиця – Вплив корвітину та доксицикліну на активність ферментів антиоксидантного захисту за умов адреналінової ішемії міокарда

Показник	Група тварин			
	1-ша контроль	2-га AIM	3-тя AIM+K	4-та AIM+Д
ТБК-активні продукти у плазмі крові, мкмоль/л	4,06±0,05	12,69±0,8***	11,13±0,54***	11,60±0,91***
ТБК-активні продукти у гомогенаті серця, мкмоль/л/мг білка	1,84±0,15	2,80±0,61	1,42±0,19 [§]	1,28±0,20 [§]
Каталаза у плазмі крові, мкмоль/с·л	4,06±0,58	2,62±0,63	10,76±0,85*** ^{§§§}	7,96±0,65*** ^{§§§}
Каталаза у фракціях розчинних білків серцевого м'яза, мкмоль/с·л/мг білка	0,42±0,03	0,58±0,02	0,79±0,08*	0,51±0,08
ГП у гемолізаті еритроцитів, МО/г/Нб	83,42±7,16	123,7±3,91**	97,13±7,18 ^{§§}	102,86±3,59*
ГР у гемолізаті еритроцитів, МО/л·хв/Нб	0,22±0,02	0,89±0,02***	0,53±0,06*** ^{§§§}	0,60±0,06*** ^{§§§}
СОД у гемолізаті еритроцитів, нг/мл/Нб	3,11±0,38	11,45±0,83 ^{§§§}	1,68±0,2*** ^{§§§}	1,35±0,14*** ^{§§§}

Примітки. Тут і на рисунках:

- * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ – вірогідність різниці порівняно з показниками контрольної групи.
- § – $p \leq 0,05$; §§ – $p \leq 0,01$; §§§ – $p \leq 0,001$ – вірогідність різниці відносно групи AIM.

ний компонент К – кверцетин є “пасткою” вільних радикалів і здатен зменшувати їх кількість та пошкоджувальну дію [4]. Імовірно, саме цей механізм зумовлює зниження кардіотоксичного ефекту високих доз адреналіну.

Дослідження активності ММП_{2/9} показало, що в плазмі крові щурів 2-ї групи підвищувалась активність проферментних та активних форм означених ензимів. Під дією К активність усіх форм желатиназ знижувалась, причому активність ММП₉ була вірогідно меншою від контрольних значень. Найбільш суттєві зміни активності желатиназ у плазмі крові відзначено за дії Д: активність проММП₂ зростала на тлі зникнення желатиналітичної активності ММП₉ (рис. 1).

Інші зміни спостерігали у фракції розчинних білків серцевого м'яза. По-перше, за умов проведення нашого експерименту ММП₉ не визначено в жодній групі. По-друге, при AIM вірогідно підвищувалась активність латентної форми ММП₂. По-третє, під впливом К та Д рівень активності проММП₂ зменшувався до значень, що були вірогідно нижчими, ніж у контрольній групі, а желатиналітична дія ММП₉ зовсім не фіксувалась у групі щурів, які отримували Д (рис. 2).

Отримані результати не суперечать даним інших дослідників про наявність позитивного кореляційного зв'язку між активністю желатиназ та інтенсивністю вільнорадикального окиснення [1]. Зниження ТБК-активних продуктів у

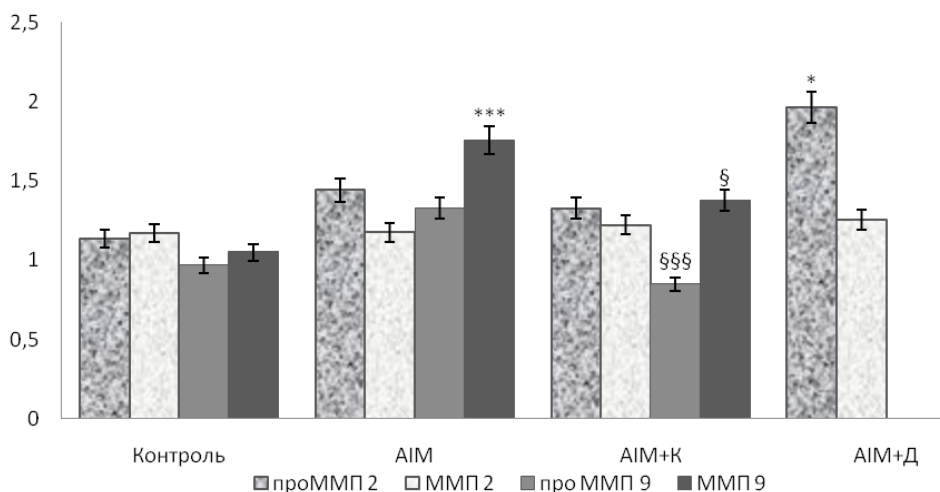


Рис. 1. Активність ММП₂ та ММП₉ (ум. од./мг білка) в плазмі крові експериментальних тварин.

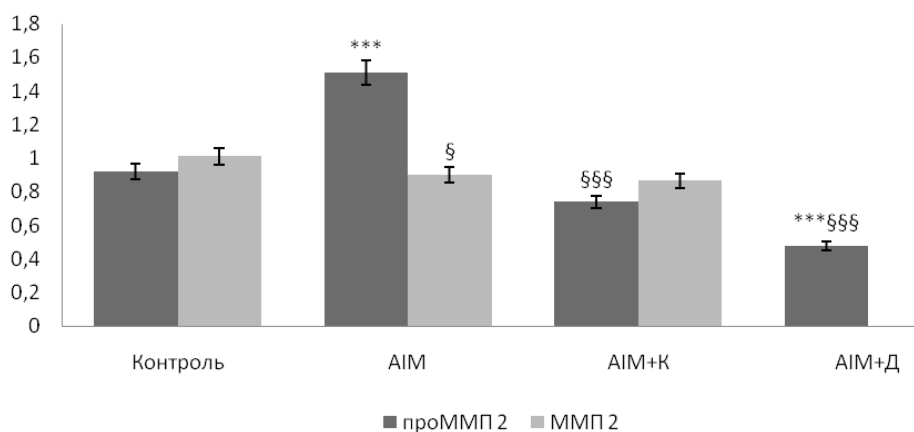


Рис. 2. Активність ММП₂ (ум. од./мг білка) у фракції розчинних білків серцевого м'яза щурів.

фракції розчинних білків серця після застосування корвітину та доксицикліну асоційоване зі зменшенням активності желатиназ. Крім цього, доксициклін проявляє властивості інгібітора желатиназ [9], тому має потужний антижелатинолітичний ефект у серцевому м'язі.

ВИСНОВКИ. Введення адреналіну впродовж 10 днів зумовлює зростання інтенсивності вільнорадикального окиснення, активності ферментів антиоксидантного захисту і желатиназ у плазмі крові та серцевому м'язі щурів. Застосування корвітину та доксицикліну призво-

дить до вірогідного зменшення концентрації ТБК-активних продуктів, активності основних ферментів антиоксидантного захисту і желатиназ, що свідчить про здатність досліджуваних препаратів знижувати кардіотоксичний ефект високих доз адреналіну завдяки їх спроможності зв'язувати вільні радикали та інгібувати активність матриксдеградуючих ферментів.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на визначення впливу корвітину та доксицикліну на показники посттрансляційної модифікації білків за умов експериментальної ішемії міокарда.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вплив комплексу попередників і модулятора біосинтезу убіхінону на систему церулоплазмін/трансферин, вільнорадикальне окиснення ліпідів і білків та активність матриксних металопротеїназ у крові тварин за введення доксирубіцину / А. П. Бурлака, О. Б. Кучменко, Д. М. Петухов [та ін.] // *Мед. хімія*. – 2012. – **14**, № 3 (52). – С. 11–15.
2. Вплив корвітину на активність протеолітичних ферментів у щурів з антрацикліновою кардіопатією / Ю. А. Гордієнко, А. О. Кулініч, О. Е. Шаульська, А. І. Шевцова // *Вчені записки Таврійського університету ім. В. І. Вернадського. Серія "Біологія, хімія"*. – 2012. – **25** (64), № 4. – С. 75–79.
3. Жильяев С. А. Экспериментальное исследование влияния корвитина и липофлавона на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и эндотоксикации при черепно-мозговой травме / С. А. Жильяев, С. Ю. Штрыголь // *Научные ведомости. Серия "Медицина. Фармация"*. – 2013. – Вып. 23, № 18 (161). – С. 146–151.
4. Лапшина Л. А. Оксидативный стресс при острой сердечной недостаточности и роль антиоксиданта кверцетина в его коррекции / Л. А. Лапшина, В. И. Золотайкина // *Международ. мед. журн.* – 2009. – **15**, № 3. – С. 45–51.

5. Пат. 83196 Україна, МПК G 01 N 33/49. Спосіб визначення желатиназ у плазмі крові / Шевцова А. І., Гордієнко Ю. А., Шаульська О. Е., Скоромна А. С. – № у 2013 03700 ; заявл. 26.03.13 ; опубл. 27.08.13, Бюл. № 16.
6. Хидирова Л. Д. Изменение баланса между активностью перекисного окисления липидов, антиоксидантной защитой и содержанием железа у крыс при экспериментальном инфаркте миокарда / Л. Д. Хидирова // *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. – 2010. – № 6 (2). – С. 216–219.
7. Состояние оксидантного статуса и уровень матриксных металлопротеиназ у больных с различными формами ишемической болезни сердца / Е. А. Хлудеева, Н. М. Лупач, В. Н. Потапов [и др.] // *Бюл. физиологии и патологии дыхания*. – 2007. – Вып. 25. – С. 71–74.
8. Aggarwal N.T. Redox control of cardiac excitability / N. T. Aggarwal, J. C. Makielski // *Antioxid Redox Signal*. – 2013. – **18**, № 4. – P. 432–468.
9. Early short-term doxycycline therapy in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction to prevent the ominous progression to adverse remodelling: the TIPTOP trial / G. Cerisano, P. Buonamici, R. Valenti [et al.] // *European Heart Journal*. – 2014. – **35**, № 3. – P. 184–191.

10. Role of reactive oxygen species in hyperadrenergic hypertension: biochemical, physiological, and pharmacological evidence from targeted ablation of the chromogranin a (Chga) gene / J. R. Gayen, K. Zhang, S. P. Ramachandra [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2010. – 3, № 5. – P. 414–425.

11. Ghaderian S. M. Genetic polymorphisms and plasma levels of matrix metalloproteinases and their relationships with developing acute myocardial infarction / S. M. Ghaderian, R. Najjar Akbarzadeh, A. S. Panah

Tabatabaei // *Coron. Artery Dis.* – 2010. – 21, № 6. – P. 330–335.

12. An assessment of norepinephrine mediated hypertrophy to apoptosis transition in cardiac cells: a signal for cell death / A. Jain, N. Atale, S. Kohli [et al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2015. – № 225. – P. 54–62.

13. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro / P. Mukhopadhyay, M. Rajesh, S. Batkai [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – 296, № 5. – P. 1466–1483.

В. А. Пароник, О. Э. Шаульская, В. И. Жилюк, А. И. Шевцова
ДНЕПРОПЕТРОВСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ МОЗ УКРАИНЫ

АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ЖЕЛАТИНАЗ ПРИ АДРЕНАЛИНОВОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА У КРЫС

Резюме

В эксперименте на крысах исследовали активность антиоксидантных ферментов и желатиназ при адреналиновой ишемии миокарда, а также влияние на эти показатели корвитина (К) и доксициклина (Д). Установлено, что введение адреналина в дозе 0,2 мг/100 г массы в течение 10 дней приводит к повышению интенсивности пероксидного окисления липидов, активности ферментов антиоксидантной системы и желатиназ в крови и сердце. Под влиянием К и Д активность исследуемых ферментов снижается, причем наиболее существенно уменьшается активность желатиназ и супероксиддисмутазы в сердечной мышце. Полученные данные свидетельствуют о способности исследуемых препаратов угнетать кардиотоксический эффект высоких доз адреналина благодаря их способности связывать свободные радикалы и ингибировать активность матрикс-деградирующих ферментов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: адреналиновая ишемия миокарда, антиоксидантная система, желатиназы А и В, корвитин, доксициклин.

V. A. Paronik, O. E. Shaulska, V. I. Zhyliuk, A. I. Shevtsova
DNIPROPETROVSK STATE MEDICAL ACADEMY OF MPH OF UKRAINE

ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND GELATINASE IN RATS WITH EPINEPHRINE-INDUCED MYOCARDIAL ISCHEMIA

Summary

In this study we examined the activity of antioxidant enzymes and gelatinases in rats with epinephrine-induced myocardial ischemia and the impact of corvitin (C) and doxycycline (D) on these indicators. The administration of epinephrine (0.2 mg/100 g) for 10 days leads to an increase in lipid peroxidation and to the elevated activity of antioxidant enzymes and gelatinases in blood and in the heart of experimental animals. Under application of C and D activity of the enzymes was reduced, especially activity of SOD and gelatinases. Our data suggest that C and D can reduce the cardiotoxic effects of high doses of epinephrine due to their ability to bind free radicals and to inhibit the activity of matrix-degrading enzymes.

KEY WORDS: epinephrine-induced myocardial ischemia, antioxidant system, gelatinases A and B, corvitin, doxycycline.

Отримано 29.05.15

Адреса для листування: В. А. Паронік, Дніпропетровська медична академія МОЗ України, вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ, 49600, Україна, e-mail: paronik@ukr.net.