УДК 616.127 : 616.74: 576.311.347 : 796. 015 : 615.036

В.П. Корж

ОСОБЛИВІСТЬ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ЕКЗОГЕННОГО ФОСФОКРЕАТИНУ ПРИ ІНТЕНСИВНИХ ФІЗИЧНИХ НАВАНТАЖЕННЯХ

Харківський національний медичний університет

Ключові слова: *апоптоз, метаболізм, міокард, мітохондрія, скелетна мускулатура, фізичне навантаження, фосфокреатин*
Key words: *apoptosis, metabolism, myocardium, mitochondrion, skeletal muscles, physical loading, kreatinphosphate*

Резюме. *Изучено состояние обмена веществ у лабораторных животных при интенсивных физических нагрузках. Выявлены нарушения метаболизма в тканях миокарда и скелетной мускулатуры. Назначение экзогенного фосфокреатина вызывало позитивный эффект. К возможным механизмам действия фосфокреатина можно отнести нормализацию путей синтеза и транспорта макроэргических фосфатов, оптимизацию работы митохондриальных $K_{АТФ}$-каналов, лимитирование образования митохондриальной поры и развития апоптоза.*
Summary. *The state of metabolism in laboratory animals is investigated during intensive physical loadings. Infringements of metabolism in myocardium tissues and skeletal muscles are revealed. Administration of exogenic kreatinphosphate caused positive effect. Normalization of ways of synthesis and transport of macroergic phosphates, optimization of the work of K_{APF}-channels of mitochondrium, limitation of time of formation of PPT and apoptosis development are the possible mechanisms of kreatinphosphate action.*

Виснажливі фізичні навантаження, які є характерними для сучасного спорту високих досягнень, можуть мати негативні наслідки для стану здоров’я спортсменів. Як свідчать результати багатьох досліджень, очевидним фактом є те, що однією з необхідних умов, як для оптимізації функціонального стану спортсменів, так і для збереження здоров'я атлетів у спорті вищих досягнень, є розробка адекватної системи медико-біологічного забезпечення тренувально-змагальної діяльності. При виникненні й зростанні в процесі м'язової роботи кисневого боргу організму доводиться виконувати роботу в умовах гіпоксії. Відомо, що гіпоксично-ішемічна інгібіція окремих метаболічних шляхів призводить до порушень функціонування реакцій синтезу та інтрацелюлярного транспорту продуктів вуглеводно-енергетичного обміну [7], накопичення в ішемізованих тканинах іонів Ca^{2+}, вільних жирних кислот, ацидозу тощо. Подібна спрямованість метаболізму призводить перш за все до зниження в організмі рівня сполук з енергетично багатим фосфорним зв'язком, що може мати доволі негативні наслідки, а саме призвести до розвитку некробіозу, пригнічення фізіологічної активності органів [8]. В одній із перших класичних робіт, що присвячені механізмам розвитку незворотних ушкоджень міокарда при його ішемії, вказувалось на два основні причинні фактори, які визначають незворотність ушкодження серцевого м’яза - це різке зменшення вмісту макроергічних фосфатів (<10 % вихідного) та пошкодження клітинних мембран [10]. Своєчасне і адекватне поповнення загального пулу макроергічних фосфатів сприяє збереженню мембранних структур клітин та повноцінності перебігу метаболізму. Найбільш простим і логічним способом поповнення зменшеної кількості макроергічних фосфатів могла бути, наприклад, індукція екзогенних аденозинтрифосфорної кислоти або фосфокреатину у вигляді солі. Дійсно, в окремих роботах наводяться дані щодо протективної дії призначення екзогенних аденілових нуклеотидів або фосфокреатину при ішемічному пошкодженні м’язів серця, скелетної мускулатури, печінки, нирок тощо. [5, 14]. Однак до цього часу немає одностайної думки щодо доцільності застосування даних сполук при інтенсивних фізичних навантаженнях, не в достатньо повній мірі визначені принципи призначення цієї групи препаратів, що мали регламентувати науково обґрунтований вибір препаратів, режим дозування, раціональне комбінування тощо.

Креатинфосфат (КФ) у високій концентрації міститься в міокарді, скелетній мускулатурі, гладеньких м’язах, сітківці, клітинах нервової тканини, сперматозоїдах [14]. КФ здійснює внутрішньоклітинний транспорт енергії від місця утворення (мітохондрії) до місць використання (окремі структури в цитоплазмі) та відіграє важливу роль в енергетичному забезпеченні м’язового скорочення [15]. З вихолощенням запасів КФ клітини втрачають здатність скорочуватися

навіть при наявності достатньої кількості АТФ [14]. При ішемії тканини м'язів зміст ФК у міоцитах швидко знижується, що і є однією з вагомих причин щодо депресії скоротності [2].

Метою нашого дослідження є вивчення окремих ланок метаболізму, які мають місце при виснажливих фізичних навантаженнях, та ефективності впливу на зміни терапевтичного використання екзогенного фосфокреатину.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проведено на білих щурах лінії Вістар, вагою 200-220 г., які утримувалися на стандартному раціоні віварію. Дослідження починали після звикання лабораторних тварин до роботи, а саме: тиждень – щоденне, активне плавання при температурі (t) води 28°С, протягом 5 хв. Щурів було розподілено на три піддослідні групи по 10 тварин у кожній: перша – інтактні, друга – щури, які плавали «до відмови», третя - щури, які плавали «до відмови» і яким за 30 хв. до фізичного навантаження внутрішньочеревно вводили фосфокреатин (препарат «Неотон», CSC, Італія) із розрахунку 250 мг/кг маси тіла. Щури плавали з вантажем, який складав 8 % від маси тіла. Тварин виводили із експерименту згідно із загальновизначеними правилами. Для дослідження виділяли тканини міокарда та скелетних м'язів. Тканини промивали охолодженим 0^0С - -4^0С фізіологічним розчином та містили у рідинний азот. Тканини гомогенізували до консистенції порошку з відповідною подальшою обробкою. У безбілковому перхлорному екстракті 1 : 4 (0,6 М $HClO_4$), нейтралізованому 5М K_2CO_3, визначали вміст аденозинтрифосфорної, аденозиндифосфорної та аденозинмонофосфорної кислот (АТФ, АДФ, АМФ) [3] та фосфокреатину [1].

Для визначення активності ферментів тканини, що підлягали дослідженню, швидко вносили до охолодженого 0^0С - -4^0С 0,15М КСІ в співвідношенні 1:40. Тканини гомогенізували за допомогою скляного гомогенізатору. Гомогенати центрифугували протягом 10 хв. при 1000g (центрифуга К24, Німеччина). Рідину, що знаходилася над осадом, заново центрифугували при 14000g (центрифуга VAC25, Німеччина) протягом 20 хв. Відмитий осад суспензували, мембрани мітохондрій руйнувались за допомогою іонного детергенту тритону Х 100. В отриманих фракціях досліджували активність наступних ферментів: сукцинатдегідрогенази (СДГ), цитохром оксидази (ЦО) [6]; мітохондріальної та цитоплазматичної КФК [4].

Математичну та статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою комп'ютера з використанням програмних пакетів Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США) та Excel 2003 (Microsoft Corp., США). Відповідно до експериментальних установок, різниці між середніми арифметичними в експериментах зі спортсменами тестували за допомогою парного t-тесту. Р значення <0,05 було прийняте як достовірне. Результати відображені як середнє арифметичне ± середньоквадратичне відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Призначення фосфокреатину збільшувало час плавання лабораторних тварин. Так, загальна тривалість плавання підвищувалась на 32%. Таким чином, можна вважати, що для даного препарату притаманний актопротективний ефект.

У результаті дослідження було встановлено, що призначення фосфокреатину підвищувало вміст ендогенних макроергічних фосфатів у тканинах міокарда та скелетних м'язів у лабораторних тварин, до яких були застосовані виснажливі фізичні навантаження. Слід зазначити, що вміст аденілових нуклеотидів змінювався в незначній мірі, проте суттєво підвищувалася кількість ендогенного креатинфосфату (вірогідне, $p < 0,05$, підвищення на 141% і 65% в тканинах міокарда та скелетних м'язів відповідно). Отримані результати є відбитком фармакокінетичних та фармакодинамічних особливостей фармакологічної дії фосфокреатину.

Досить малоймовірним є те, що ендогенний макроергічний пул збільшувався за рахунок безпосереднього включення екзогенного ФК. Доводиться, що фармакологічні ефекти екзогенного фосфокреатину (препарат «Неотон») зумовлені накопиченням його у позаклітинному середовищі, що у свою чергу зменшує дефосфорилювання клітинних мембран і знижує ступінь їхнього ішемічного пошкодження.

За умов позитивної дії щодо мембранних утворень клітин, при призначенні фосфокреатину, можна припустити, що при таких умовах стабілізуються внутрішньоклітинні шляхи метаболізму. Так, було встановлено, що в мітохондріях клітин міокарда та скелетових м'язів у лабораторних тварин, яким призначали перед плаванням фосфокреатин, підвищувалася активність ЦО та СДГ, лімітування активності яких чітко визначалося серед тварин, які складали другу групу. В тканинах міокарда активність ЦО збільшувалася на 38%, а СДГ – на 28%. У тканинах скелетних м'язів активність ЦО підвищувалася на 31%, а СДГ – на 17%. Подібна спрямованість, вірогідно, була зумовлена нормалізацією функціонування окремих шляхів син-

тезу енерговмісних сполук. Так, підвищення активності кінцевого ферменту дихального ланцюга – ЦО свідчила на користь нормалізації сполученого з диханням ресинтезу АТФ, а СДГ активізації функціонування комплексу II електроннотранспортного ланцюга.

Крім позитивної дії призначення фосфокреатину щодо шляхів синтезу макроергічних сполук, спостерігалося покращення роботи внутрішньоклітинних шляхів транспорту енергії. Так, серед лабораторних тварин третьої групи в тканинах, які були досліджені, підвищувалась активність внутрішньоклітинної креатикіназної транспортної системи. Так, у цитоплазмі клітин міокарда активність КФК підвищувалася на 36%, а скелетних м'язів – на 28%. Активність мітохондріальної КФК підвищувалася на 32% і 30% відповідно в тканинах міокарда та скелетних м'язів.

Таким чином, підвищення вмісту макроергічних сполук у тканинах міокарда та скелетної мускулатури серед лабораторних тварин, яким перед експериментальною пробою з плаванням «до відмови» призначали екзогенний фосфокреатин, можна пояснити нормалізацією окремих внутрішньоклітинних шляхів синтезу та транспорту цих сполук.

Аналіз отриманих результатів дозволяє припустити ще декілька можливих механізмів щодо протективної дії при призначенні фосфокреатину.

Зміни показників вуглеводно-енергетичного обміну в тканинах міокарда та скелетних м'язів білих щурів при плаванні «до відмови» (M±m)

Показники	Групи лабораторних тварин					
	контр.	експ.	Е + ФК	контр.	експ.	Е + ФК
	тканини міокарда			скелетні м'язи		
	Активність					
Креатинкіназа (мітохондрії)	0,489 ± 0,021	0,354 ± 0,036	0,469 ± 0,048	0,501 ± 0,031	0,316 ± 0,024	0,412± 0,037
Креатинкіназа (цитоплазма)	0,486 ± 0,022	0,324 ± 0,038	0,442 ± 0,032	0,482 ± 0,024	0,312 ± 0,018	0,399 ± 0,031
Цитохромоксидаза	1,764 ± 0,084	1,119 ± 0,046	1,547 ± 0,062	1,777 ± 0,132	1,179 ± 0,093	1,587 ± 0,112
Сукцинатдегідрогеназа	2,508 ± 0,142	1,702 ± 0,156	2,181 ± 0,114	2,536 ± 0,066	2,008 ± 0,089	2,347 ± 0,124
	Вміст					
АТФ	4,702 ± 0,064	4,223 ± 0,034	4, 313 ± 0,026	4,604 ± 0,082	4,240 ± 0,037	4, 320 ± 0,022
АДФ	1,182 ± 0,020	1,206 ± 0,022	1,184 ± 0,021	0,803 ± 0,069	0,887 ± 0,042	1,212 ± 0,018
АМФ	0,246 ± 0,018	0,394 ± 0,033	0,332 ± 0,029	0,293 ± 0,031	0,424 ± 0,024	0,398 ± 0,037
КФ	5,124 ± 0,135	2,533 ± 0,187	3,953 ± 0,209	6,456 ± 0,201	2,403 ± 0,185	3,967 ± 0,248

Так, СДГ є однією з 5 складових мітохондріального $К_{АТФ}$-каналу [11]. Збільшення активності СДГ у лабораторних тварин, яким призначали фосфокреатин, вірогідно, може свідчити щодо активізації $К_{АТФ}$-каналу внутрішньої мембрани мітохондрій. Даними окремих авторів доводиться, що активація мітохондріальних $К_{АТФ}$-каналів має протективний ефект за рахунок зниження перенавантаження матриксу мітохондрій Ca^{2+} [16], інгібіції мітохондріальної пори [9], зниження продукції вільних радикалів [12], регуляції об'єму матриксу мітохондрій [9], активації білка Bcl2, інгібіції білка Bax та вивільнення до цитоплазми цитохрому *c* [8].

Октамер мітохондріальної КФК, який здійснює вихід наново синтезованого АТФ з матриксу і зворотне перенесення АДФ, знаходиться у контактних сайтах мітохондрій, місцях зближення внутрішньої і зовнішньої мембран. У нормі ця структура виконує функції щодо перенесення наново синтезованого АТФ з мітохондріального матриксу до креатинкінази, ферменту, який у свою чергу фосфорилює креатин, що надходить із цитоплазми. За патологічних умов є можливим утворення з контактного сайту мітохондріальної пори (мРРТ), що пов'язане насамперед з дисоціацією октамерної структури креатинкінази. Виникнення мРРТ призводить до розвитку подальших змін, маніфестація та генералізація яких спричиняє смерть клітин за так званим мітохондріальним шляхом розвитку апоптозу. Нормалізація роботи мітохондріальної КФК під впливом фосфокреатину, вірогідно, свідчить на користь того, що його призначення лімітує утворення мРРТ і може запобігати загибелі клітин за рахунок апоптозу, розвиток

якого, за результатами досліджень багатьох науковців, має негативні наслідки для тканин, особливо в постреперфузіонний або постгіпоксичний періоди.

Наведені механізми щодо дії екзогенного фосфокреатину, враховуючи їх протективний ефект при розвитку ішемічно-аноксичних пошкоджень тканин організму, спровокованих виснажливими фізичними навантаженнями, потребують більш детального вивчення, що зумовлює необхідність проведення подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

1. При виснажливих фізичних навантаженнях функціонування окремих метаболічних шляхів у тканинах організму є лімітованим, що призводить до суттєвих негативних наслідків. Використання екзогенного фосфокреатину має протективний ефект при розвитку ішемічно-аноксичних пошкоджень тканин організму, спровокованих виснажливими фізичними навантаженнями.
2. У лабораторних тварин, яким перед експериментальною пробою з плаванням «до відмови» призначали екзогенний фосфокреатин, підвищувався вміст макроергічних сполук у тканинах міокарда та скелетної мускулатури, що можна пояснити позитивним впливом даного препарату на окремі внутрішньоклітинні шляхи синтезу та транспорту цих сполук.
3. До можливих механізмів щодо протективної дії при призначенні фосфокреатину можна віднести вплив на функціональну активність мітохондріального $K_{АТФ}$-каналу, гальмування утворення мітохондріальної пори та мітохондріального шляху розвитку апоптозу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексеева А.М. К вопросу о превращениях креатинфосфата в креатин и о новом методе определения креатина // Биохимия.- 1951. - Т.16, вып. 2. – С.97.
2. Голиков А.П., Рябинин В.А., Крыжановский С.А. Фосфокреатин: Физиологическая роль и практическое применение в кардиологии // Физиология человека. – 1998. – Т. 24, № 5. – С.85 – 91.
3. Захаров Н.Б., Рубин В.Н. Тонкослойная хроматография нуклеотидов эритроцитов на пластинках «Силуфол» // Лабораторное дело. – 1980. - № 12. – С.733 – 738.
4. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М: Высшая школа, 1980. – 272 с.
5. Применение фосфадена для лечения больных хронической ишемической болезнью сердца / Кукес В.Г., Буриан Э.Ф., Секамова С.М. и др. // Кардиология. – 1979. - №10. – С. 73 – 75.
6. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 392 с.
7. Тишкин В.С. Клинико-экспериментальное исследование эффективности средств метаболической коррекции в комбинированной терапии острого инфаркта миокарда: Автореф. дис. … доктора мед. наук. – М., 1990. – 48 с.
8. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии сердца / Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. и др. – К.: Наукова думка, 2008. - 520 с.
9. Dunne M.J., Aynsley-Green A., Lindley K. J. Nature's KATP cannels knockout // News Physiol.Sci. – 1997. – N 12. – P. 197 – 203.
10. Jennings R.B., Reimer K.A. Letal myocardial ischemic injury // Amer. J. Patol. – 1981. – Vol. 102, N 2. – P. 241 – 255.
11. Multiprotein complex containing succinate degydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K+ channel activity / Ardehaly H., Chen Z., Ko Y. et al. // PNAS. – 2004. – Vol. 101, N 32. – P. 11880 – 11885.
12. O'Rourke B. Myocardial KATP cannels in preconditioning // Circ. Res. –2000. – Vol. 87. – P. 1156 – 1165.
13. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition / Hausenloy D.J., Yellon D.M., Mani-Babu S. et al. // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – Vol. 287, N 2. – P. 841 – 849.
14. Saks V.A., Bobkov Y.G., Strumia E. Creatine phosphate: biochemistry. Pharmacology and clinical efficiency. – Torino: Edizioni Minerva media, 1987. – 270p.
15. Satolli F., Marchesi G. Creatine phosphate in the rehabilitation of patients with muscle hypotonotrophy of the lower extremity // Curr. Ther. Res. – 1989. – Vol. 46. – P. 67-73.
16. Wang Y., Ashraf M. Role of protein kinase C in mitochondrial KATP cannel-mediated protection against Ca2+ overload injure in rat myocardium // Circ. Res. – 1999. – Vol. 84. – P. 1156 – 1165.