

ВПЛИВ ЯКТОНУ НА ПОКАЗНИКИ МЕТАБОЛІЗМУ НО В МІОКАРДІ ЩУРІВ ПРИ ДОКСОРУБІЦИНОВІЙ І ФТОРИДНІЙ КАРДІОМІОПАТІЇ

Максимчук О.О., Чекман І.С., Горчакова Н.О., Беленічев І.Ф., Павлов С.В.

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця (м. Київ)
Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя)

Ключові слова: яктон, доксорубіцин, натрію фторид, фторурацил, оксид азоту.

Вступ

Доксорубіцин і фторурацил широко призначають в онкології для лікування злокісних пухлин. Дані препарати включені до більшості схем лікування цих захувань [22]. Разом з тим доксорубіцин і препарати фтору викликають побічний вплив – кардіоміопатію [7], яку пов’язують з стимуляцією процесів перекисного окиснення ліпідів, порушеннями ендотелію судин і енергетичного обміну, індукацією апоптозу, що обмежує їх застосування. Відомо, що порушення ціlosності ендотелію судин під впливом доксорубіцину супроводжуються змінами ендотелійрелаксуючого фактору (оксиду азоту) [24]. Зменшення рівня окисду азоту при дії антраціклінових антибіотиків може відбуватися внаслідок пригнічення синтезу NO або прискорення інактивації цієї сполуки. Дані процеси реалізуються в результаті порушення конверсії субстрату L-аргініну в оксид азоту [8], або пригнічення активності NO синтезуючого ферменту (NO-сінтази) [20], пов’язані з активацією перекисного окиснення ліпідів або вільнорадикальних процесів [6]. Відомо, що лігандом NO-сінтази є NO [4], активність ферменту змінюється узгоджено з вмістом тілових сполук (цистеїну, метіоніну), відновлених тілових груп. Низькомалекулярні тіоли здібні витіснити NO з високомалекулярних S-нітрозотіолів і під час цих реакцій NO здатний переноситися до гуанілатциклази та іншим мішеням [3, 23]. NO регулює збудливість нервових клітин внаслідок S нітрозування в складі білків. [21]. Тому при патологічних станах таких як моделювання доксорубіцинової та фторидній кардіоміопатії можна очікувати координовані зміни активності NO-сінтази, тілових сполук, відновних тілових груп та нітрозильованих метаболітів.

В практичній стоматології широко застосовують фторвміщуючу сполуку – натрію фторид, який при попаданні в організм в значних дозах може також мати негативний вплив на міокард, в першу чергу, внаслідок блокади гліко-лізу [15].

Відомо, що для попередження токсичного впливу антраціклінових антибіотиків на міокард були запропоновані різні лікарські засоби, які мають антиоксидантну дію – нікотинамід, тіогриазолін, кверцетин, флавоноїди, похідне янтарної кислоти – суфан та інші [1, 5, 16, 17, 25]. Зменшення негативного впливу фторидних сполук на міокард можна досягти введенням тваринам похідного янтарної

кислоти – суфана [15]. Похідні янтарної кислоти швидко накопичують багаті енергією сполуки і мають антиоксидантну дію, що спостерігається при введенні терапевтичної концентрації і реалізують кардіопротекторний ефект [14].

Проведеними попередніми дослідженнями встановлено, що сукцинвмісна сполука яктон, яка синтезована в Інституті органічної хімії НАН України, академіком М.О. Лозинським, має протекторні властивості при доксорубіциновій і фторидній кардіоміопатії, щодо показників гемодинаміки в експериментах на кролях [9, 10].

Метою роботи було визначення протекторної дії яктона щодо біохімічних показників синтезу, метаболізму і транспорту оксиду азоту при доксорубіциновій і фторидній кардіоміопатії в експериментах на щурах.

Матеріали і методи дослідження

Досліди виконані на щурах лінії Вістар масою 220-240 г, отриманих з віварію Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця. Досліджуваних тварин утримали на однакових раціонах, в звичайних умовах віварію. Їх утримання відповідало правилам, прийнятим Європейською конвенцією по захисту хребетних тварин, використовуваних для наукових цілей, згідно Методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України [5].

Тканини серця гомогенізували на холоду, в сольовому ізотонічному середовищі ($0,15 \text{ M KCl}$) при температурі $+4^\circ\text{C}$, за допомогою скляного гомогенізатора, в співвідношенні тканина – сольовий розчин 1 : 40. Безбільковий екстракт отримували додаванням гомогената тканини серця в хлорну кислоту ($0,6 \text{ M}$) з подальшою нейтралізацією $5,0 \text{ M}$ калію карбонатом [11].

Продукцію, метаболізм і транспорт NO визначали за активністю NO-сінтази (NOS), вмісту нітротирозину, нітратів, аргініну, метіоніну, цистеїну, рівню сумарних SH-груп. Стабільні метаболіти NO визначали по рівню нітратів в реакції Грісса, активність NOS визначали по різниці між швидкістю окислення NADPH, реєстрованою флюорометрично, в двох паралельних зразках, як не вміщуючому, так і що містить інгібітор NOS – N – нітро – L – аргінін [2].

Нітротирозин визначали в гомогенаті серця твердофазним імуносорбентним методом за набором фірми ELISA і виражали в нм/г тканині [11]. Концентрацію аргініну, метіоніну, цистеїну визначали методом тонкошарової

хроматографії з подальшою спектрофотометрією елюату. Вміст сумарних SH-груп визначали спектрофотометрично за реакцією з 5,5-дитіобіс-7-нітробензойною кислотою. Концентрацію білка оцінювали за методом Бредфорда [11]. Доксорубіцин вводили внутрішньоочеревинно протягом 4 тижнів в дозі 5 мг/кг 1 раз на день [12]. Натрію фторид вводили внутрішньоочеревинно в дозі 10 мг/кг [15], фторурацил – внутрішньоочеревинно в дозі 180 мг/кг [19], якton вводили в дозі 357 мг/кг протягом 4 тижнів за 1 годину до введення доксорубіцину [17, 18], а також за 1 годину до введення натрію фториду та фторурацилу. Експозиція фторидів 70 хвилин. Декапітацію тварин проводили під легким ефірним наркозом. Вірогідність результатів оцінювали за допомогою t-критерію Ст'юдента, застосовуючи стандартний пакет програм статистичної обробки результатів версії Microsoft Office Excel 2003.

Результати та їх обговорення

При розвитку доксорубіцинової кардіоміопатії і інтоксикації фторидами за даними порушень вмісту біохімічних показників, які характеризують синтез, метаболізм та транспорт оксиду азоту можна стверджувати про розвиток змін, які обумовлюють розвиток кардіо- та системної доксорубіцинової кардіоміопатії, інтоксикації фторурацилом, натрієм фторидом. Спостерігалося пригнічення процесів синтезу оксиду азоту, внаслідок зменшення активності NO-сінтази. При доксорубіциновій кардіоміопатії активність ферменту NO-сінтази понижувалася на 55%, при інтоксикації фторурацилом на 41%, при інтоксикації натрію фторидом на 29%. Відмічено зниження продукції стабільних метаболітів оксиду азоту – нітратів на тлі вираженого дефіциту синтезу L-аргініну. При доксорубіциновій кардіоміопатії відмічалося також падіння рівня L-аргініну в 1,9 рази, при інтоксикації фторурацилом на 27%, при інтоксикації натрію фторидом на 22%. Паралельно реєструвалося порушення транспорту оксиду азоту – зниження рівня тіовміщуючих амінокислот і сумарної кількості відновлених тіолів білкових молекул. При доксорубіциновій кардіоміопатії рівень цистеїну понижувався на 52%, метіоніну на 36%, загальних відновлених тіогруп в 1,8 рази. На фоні інтокси-

кації фторурацилом спостерігалося падіння рівня цистеїну на 33%, метіоніну на 27%, загальних відновлених тіогруп на 34%. В умовах інтоксикації натрію фторидом константували пониження вмісту цистеїну на 20%, метіоніну на 21%, загальних відновлених тіогруп на 22%.

Загальновідомо, що NO є нестабільним, короткоживучим радикалом, і для його стабілізації та подальшого транспортування передбачені такі механізми, як утворення з тіовміщуючими низькомалекулярними сполуками (глутатіон, цистеїн, метіонін) стійких тіонітрозольних комплексів [13].

Рівень нітротирозину підвищується при доксорубіциновій кардіоміопатії в 2,6 раза, при інтоксикації фторурацилом в 2,3 раза, при інтоксикації натрію фторидом в 2,1 раза. В умовах дефіциту тіольних сполук (оксидативний стрес, ішемія, інтоксикації, печінкова недостатність тощо) порушується транспорт NO, оскільки ця фізіологічно активна речовина метаболізується супероксидрадикалом і гідроксилрадикалом з перетворенням на цитотоксичний продукт – пероксинітрит. При цьому спостерігається посилення ішемічного пошкодження кардіоміоцитів, інтенсифікація оксидативного і нітрозуючого стресу. Рівень тіолів регулюється ферментом глутатіонредуктазою. Якton при доксорубіциновій і фторидній кардіоміопатії відновлював деякою мірою активність NO-сінтази і рівень L-аргініну, а також надавав захисну дію відносно транспорту NO, за рахунок збереження відновлених тіолів (таблиця 1). Так було встановлено, що якton при доксорубіциновій і фторидній кардіоміопатії підвищував рівень відновлених тіолових груп, як в результаті прямої антиоксидантної дії, і внаслідок підвищення активності антиоксидантних ферментів. Крім того, можна припустити, що якton сам може переносити NO, утворюючи з ним стабільні тіонітрозильні комплекси, якton запобігає також перетворенню NO під дією вільних радикалів кисню. Тобто, отримані дані стверджують про захисну роль якtonу при доксорубіциновій і фторидній кардіоміопатіях (фторурацилом та натрію фторидом) щодо синтезу, метаболізму і транспорту оксиду азоту в міокарді щурів.

Таблиця 1

Вплив якtonу на показники синтезу, метаболізму і транспорту NO в міокарді щурів при внутрішньоочеревинному введенні щурам в умовах доксорубіцинової і фторидної кардіоміопатіях (M±m)

Досліджувані показники	Інтактні	ДР	ФУ	НФ	Др+якton	Фу+як ton	НФ+якton
Активність NO-сінтази, мкм/мг/хв.	34,3±1,2	15,2±0,9*	20,1±0,4*	24,2±0,6*	25,2±0,5**	27,0±0,5**	31,2±1,7**
L-аргинін, мкм/г	10,0±0,7	5,2±0,3*	7,3±0,2*	7,8±0,3*	8,1±0,25**	10,0±0,4**	9,1±0,2**
Метіонін, мкм/г	5,2±0,11	3,3±0,08*	3,8±0,04*	4,1±0,03*	4,6±0,07**	5,1±0,03**	5,0±0,12**
Цистеїн, мкм/г	2,1±0,06	1,0±0,08*	1,4±0,03*	1,67±0,08*	1,8±0,03**	1,9±0,04**	2,2±0,03**
Загальні відновлені SH-групи, мкм/г	151,3±6,2	80,1±3,4*	100,7±5,28	118±3,4*	128±3,1**	135,1±6,2**	145±3,5**
Нітротирозин, нмоль/г	17,2±0,7	45,0±4,1*	40,2±3,8*	36,1±3,3*	28±2,4**	26±2,2**	25±2,4**

* P<0,05 при порівнянні впливу доксорубіцину, фторурацилу, натрію фториду з інтактними тваринами

** P<0,05 при порівнянні впливу якtonу на ефект доксорубіцину, фторурацилу, натрію фториду

ДР – доксорубіцин; ФУ – фтор урацил; НФ – натрію фторид

Висновки

- При доксорубіциновій кардіоміопатії в міокарді щурів спостерігається пониження активності NO-сінтази, рівня L-аргініну, цистеїну, метіоніну, загальних відновлених тіогруп, підвищення вмісту нітротирозину.
- При інтоксикації фторурацилом в міокарді щурів спостерігали зниження активності NO-сінтази, рівня L-аргініну, цистеїну, метіоніну, загальних відновлених тіогруп. При натрію фторидній кардіоміопатії відмічено зростання вмісту нітротирозину.
- Яктон, введений внутрішньоочеревинно щурам до моделювання доксорубіцинової кардіоміопатії та фторидних інтоксикацій (фторурацилом та натрію фторидом) проявляв протективний ефект щодо показників синтезу, транспорту та метаболізму оксиду азоту.

Рецензент: д.фарм.н., професор Волох Д.С.

ЛІТЕРАТУРА:

- Вигівська О.А., Загородний М. І., Горчакова Н. О., Чекман І. С. Клініко – фармакологічні властивості флавонайду кверцетину // Ліки. – 2004. – № 1 – 2 – С. 8-13.
- Викторов І. В. Роль оксида азота и других свободных радикалов при ишемии головного мозга // Вестн. Рос. акад. мед. наук. – 2000. – № 4. – С. 5-9.
- Волик М. С., Дэвидсон К. А., Камински П. М. и др. Механизмы передачи сигнала оксидант – оксид азота в сосудистой ткани // Биохимия. – 1998. – Вып. 7. – С. 958-965.
- Голиков П. П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. – М.: ИД Медпрактика – М. 2004. – 180 с.
- Доклинические исследования лекарственных средств. Методические рекомендации / Под ред. член – корр. АМН Украины А. В. Стефанова. – К. : Авиценна, 2007. – 568 с.
- Калинкина И. В., Кетинг Е. В., Резникова И. Г. Изменения в азотрегулирующей функции эндотелия под влиянием антрациклинов в низких дозах // Укр. тер. журнал – 2000. – Т 2, №1 – С. 63-65.
- Коваленко В. Н., Калинкина Н. В., Ватутин Н. Т. Повреждения сердца цитостатиками. – Донецк : издво Укр. НТЭК, – 2002. – 350 с.
- Корж А. Н. Эндотелий как мишень для медикаментозной коррекции сердечно – сосудистых заболеваний // Метод. мед. журнал. – 1999. – № 1. – С. 147-151.
- Максимчук О. О. Вплив якtonу на показники кардіо- та системної гемодинаміки у кролів // Наук. вісник Нац. мед. унів. ім. О. О. Богомольця – 2007. – №4 – С. 59-61.
- Максимчук О. О. Вплив фторурацилу та якtonу на показники кардіо- та системної гемодинаміки у кролів при доксорубіциновій кардіоміопатії // Ліки України. – 2009. №3. – С. 124-126.
- Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований (литийный и энергетический обмен). – Л : Изд-во Ленинградского университета. – 1989. – 272 с.
- Трофимова Т. С., Чекман І. С., Горчакова Н. О., Авраменко М. О. Кардіотоксичність доксорубіцину та шляхи корекції тіотриазоліном // Запоріж. мед. жернал – 2004. – №5 – С. 153-156.
- Чекман І. С., Беленичев І. Ф., Мазур А. И. и др. Сравнительная оценка влияния тиотриазолина, PBN, N-ацетилцистеина на повреждающее действие нитрозирующего стресса *in vitro* // Ліки. – 2007. – №3-4 – С. 69-75.
- Чекман І. С., Горчакова Н. О. Кардіологічні властивості суфану – нового неглікозидного кардіотоніка // Ліки. – 1997. – №6. – С. 17-22.
- Чекман І. С., Горчакова Н. О. Дяченко В. Ю., Максимчук О. О. Біохімічні моделі оцінки кардіотонічної дії біологічно активних сполук // Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник Укр. мед. стомат. акад. – 2009. – Т. 9. – Вип. 2. – С. 134-136.
- Чекман І. С., Горчакова Н. О., Нагорна О. О., Небесна Т. Ю. Нікотинамід. – К : Поліграф плюс, 2008. – 112 с.
- Чекман І. С., Горчакова Н. О., Французова С. Б., Нагорная Е. А. Метаболитные и метаболитотропные препараты в системе кардио- и органопротекции – К : Полиграф плюс, 2009. – 155 с.
- Яковлєва І. Ю., Беленичев І. Ф. Нейропротектива дія якtonу // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2009. – Вип. 1. – С. 145-150.
- Arellano M., Malet Mauko M., Martino R., Gires P. The anticancer drug 5-fluorouracil is metabolized by the isolated perfused rat liver and in rats into highly toxic fluoroacetate // Br. J. Cancer. – 1998. – Vol. 77. – P. 79-86.
- Endothelial all signaling and endothelial dysfunction // Am. J. Hypertens. – 1995. – Vol. 8. – P. 285-415.
- Gomez R., Cuballero R., Bazana A. et al. Nitric oxide cardiac ikl by 1 nitrosylation of cisteine 76 of Kir. 2.1. Channels // Circ. Res. – 2009. – Vol. 105. – P. 383-392.
- Kolaric K., Bradamante V., Cervek Ch. et al. A phase 11 trial cardioprotection with cardioxane (ICRF – 187) in patients with advanced breast cancer receiving 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide // Oncology – 1995. – Vol. 52. – P. 251-255.
- Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily asar S-nitrosoadduct of serum alhimiik // Proc. Nation. Acad. Sciush. – 1999. – Vol. 89 – p. 7674-7677.

**ВЛИЯНИЕ ЯКТОНА НА ПОКАЗАТЕЛИ
МЕТАБОЛИЗМА NO В МИОКАРДЕ КРЫС
ПРИ ДОКСОРУБИЦИНОВОЙ И ФТОРИДНОЙ
КАРДИОМИОПАТИИ**

Максимчук О.О., Чекман И.С., Горчакова Н.А.,
Беленичев И.Ф., Павлов С.В.

Национальный медицинский университет
имени А.А. Богомольца, Киев
Запорожский государственный медицинский
университет, Запорожье

Резюме: В экспериментах на крысах при моделировании доксорубициновой и фторидной кардиомиопатии установлено нарушение синтеза, обмена и транспорта окиси азота в миокарде. Яктон при внутрибрюшинном введении предупреждает изменения биохимических показателей метаболизма оксида азота при доксорубициновой и фторидной кардиомиопатии .

Ключевые слова: якton, доксорубицин, натрия фторид, фторурацил, оксид азота.

**YAKTON INFLUENCE ON THE NO METABOLISM
DATA IN THE RATS MYOCARDIUM IN THE
CONDITIONS OF DOXORUBICINE AND FLUORIDE
CARDIOMYOPATHY**

Maximchuk O.O., Chekman I.S., Gorchakova N.O.,
Belenichev I.F., Pavlov S.V.

National O.O. Bogomolets Medical University, Kyiv
Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye

Summary: In the experiments on the rats in the conditions of doxorubicine and fluoride cardiomyopathy, nitric oxide synthesis, exchange and transport disturbances in the miocardium been stated. Yakton protects the biochemical nitric oxide metabolism' data changes during intraperitoneal administration in the case of doxorubicine and fluoride cardiomyopathy.

Key words: yakton, doxorubicine, natrii fluoride, 5-fluorouracilum, nitric oxide .