

© Нагорна О. О., Беленічев І. Ф., Горчакова Н. О., Мазур І. А., Чекман І. С.

УДК 616.12-008.331.1:616-092.41-085:615.225.2:615:036.6

¹Нагорна О. О., ²Беленічев І. Ф., ¹Горчакова Н. О., ²Мазур І. А.,

¹Чекман І. С.

ВПЛИВ АНГІОЛІНУ НА ПОКАЗНИКИ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ В МІОКАРДІ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ХРОНІЧНОЮ СЕРЦЕВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця (м. Київ)

²Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя)

gorchakovan@ukr.net

Представлена робота є фрагментом НДР «Експериментальне обґрунтування комбінованого застосування кардіотропних препаратів», № державної реєстрації 0111U009417.

Вступ. Відомо, що серцева недостатність супроводжується не тільки змінами метаболізму і функцій міокарду, але також ендотеліальною дисфункцією [11,12].

До ендотеліальної дисфункції веде дисбаланс між вазодилататорами і вазоконстрикторами. Вазодилатуючим фактором є оксид азоту, що утворюється з L-аргініну під впливом NO-синтаз [4, 10].

Важливе значення у формуванні ендотеліальної дисфункції є пониження початкового рівня аргініну та біологічно активного оксиду азоту або його biodоступності. Ендотеліальна NO-синтаза (eNOS) присутня в ендотеліальних клітинах і головним чином забезпечує вазодилатацію. В той же час індукцибельна NO-синтаза (iNOS) екскретується і функціонує при патологічних станах, пов'язаних з ендотоксинами і прозапальними цитокінами [2]. Порушення утворення оксиду азоту відбувається паралельно з пониженням рівня його стабільних метаболітів та підвищенням маркера окислювального стресу – нітритозину [9]. Попередніми дослідженнями визначена пряма ендотеліопротекторна дія ангіоліну [3].

Непряма кардіопротекція встановлена у мьельдо-ню завдяки впливу на накопичення гама-бутиробетайну і зменшенню інтенсивності його вільнорадикальної інактивації [1]. Разом з тим, не проводили порівняльні дослідження впливу прямого та непрямого ендотеліопротектору на показники системи оксиду азоту при експериментальній хронічній недостатності у щурів в дозах, які застосовували в попередніх експериментах.

Мета дослідження – довести вплив ангіоліну на показники системи оксиду азоту в міокарді щурів з хронічною серцевою недостатністю (ХСН).

Об'єкт і методи дослідження. Експерименти проведені на білих безпородних щурах-самцях масою 180-200 г, які включали 10 інтактних тварин, 20 щурів-самців з ХСН, 20 щурів з ХСН, яким внутрішньошлунково вводили ангіолін в дозі 100 мг/кг, 20 щурів з ХСН, яким внутрішньошлунково вводили мілдронат в дозі 250 мг/кг. Спочатку щурів утримували в умовах віварію протягом

20 днів відповідно до правил, які були прийняті Європейською конвенцією з захисту хребетних тварин, а також Методичних рекомендацій ДЕЦ МОЗ України. Хронічну серцеву недостатність моделювали за допомогою доксорубіцину (внутрішньоочеревинно в кумулятивній дозі 15 мг/кг, поділеної на 6 ін'єкцій протягом 14 днів), застосовуючи препарат фірми «Ебеве», Австрія. Ангіолін вводили в дозі 100 мг/кг, а мілдронат в дозі 250 мг/кг внутрішньошлунково, як було зазначено в попередніх дослідженнях [5].

Тварин виводили з експерименту на 35 добу під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). Ендотеліопротективну дію оцінювали за змінами біохімічних маркерів, які характеризують систему оксиду азоту. Попередньо тканини серця гомогенізували на холоді в сольовому ізотонічному середовищі (0,15МКCl) при температурі 4°C за допомогою скляного гомогенізатора у співвідношенні тканина-сольовий розчин 1:40. Безбілковий екстракт одержували додаванням гомогенату тканин серця у хлорну кислоту (0,6 М). Стабільні метаболіти NO визначали за реакцією з реактивом Грису при утворенні стійкого забарвленого комплексу, що має спектрофотометричний максимум поглинання при довжині хвилі 540 нм. Загальну активність NOS визначали за різницею між швидкістю окиснення NADPH, що реєструється флюорометрично в двох паралельних зразках, які як містять, так і не містять, інгібітор NOS – N-нітро-L-аргінін [7].

Нітритозин визначали в цитозольній фракції гомогенату серця твердо фазним імуносорбентним сендвіч-методом ELISA, ELISAKit (CatNHH501-02) фірми Hycult Biotech та виражали в нм/г [6]. Вміст L-аргініну визначали хроматографічно, наносячи у вигляді смужки на хроматографічну пластину суміш безбілкового екстракту серця з пропанолом і концентрованим розчином аміаку. Вийняті з камери пластини висушують на повітрі і обробляють 1% розчином амоксану в дисетилформаліді. Забарвлення плями L-аргініну з'являється після нагрівання в термостаті (100°C) протягом 1-2 хв. Пляму вирізають, елюювали у 3 мл диметилформаліду при нагріванні на водяній бані. Після центрифугування при 3000 г виражають спектрофотометрично при 530 нм [7].

Інтенсивність експресії індукцибельної NO-синтази (iNOS) та ендотеліальної NO-синтази

(eNOS) проводили гістохімічні дослідження. Зрізи серця на 24 години фіксували в рідині Карнуа та за стандартною схемою заливали в блоки парапластом x100, з яких готували зрізи. iNOS та eNOS надалі виділяли з парапласту, регідрували та за методиками відмивали фосфорним буфером та інкубували протягом 24 години в вологій камері з первинними поліклональними антитілами крові, а після – відмивання фосфатним буфером з вторинними антитілами кози. Надалі після чотирьохразового відмивання фосфатним буфером (pH: 7,4) зрізи вміщували в суміш гліцерин-фосфатний буфер (9:1). На флюоресцентному мікроскопі AxioScope (Zeiss, Germany) визначали інтенсивність лізоформ NOS за щільністю (iNOS, eNOS-позитивних клітин) в системі цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Electronic Germany) [7].

Достовірність відмінностей між експериментальними групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента та U-критерію Уїтні-Манна. Для аналізу статистично значимими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

При моделюванні доксорубіцинової ХСН при 14-добовому введенні доксорубіцину встановлено, що на 35 добу експерименту пригнічується процес синтезу оксиду азоту, що при патологічних станах в міокарду грає ендотеліопротекторну та кардіопротекторну роль. Так, в цитозолі щурів з ХСН зменшується активність загальної NO-синтази на 60% на фоні пониження продукції стабільних метаболітів оксиду азоту (нітратів) на 58%, дефіциту субстрату синтезу L-аргініну (на 52,3%). При цьому спостерігається зростання вмісту нітротирозину на 19%. Паралельно в зрізах верхівки серця у щурів спостерігається зменшення щільності eNOS-позитивних клітин на 53,2% та підвищення щільності iNOS-позитивних клітин (табл.). Отримані дані свідчать про те, що моделювання ХСН пригнічує експресію eNOS, що бере участь в ендогенних механізмах кардіопротекції та посилює експресію iNOS, яка грає головну роль в реалізації програми нітрозуючого стресу. В розвитку феномену імунозапальної реакції при ХСН, що є одним з ланцюгів формування ендотеліальної дисфункції, виступають в різному напрямку зміни експресії двох лізоформ NOS-ендотеліальної (зменшення) та індукційної (зростання) [1]. iNOS, на відміну від eNOS, не потребує Ca²⁺ та кальмодуліну для свого синтезу та продукує NO в концентраціях, які значно перевищують ті концентрації, в яких утворюється під впливом eNOS. Крім того, на відміну від ендотеліальної, індукційної NO-синтаза експресується лише в патологічних умовах як відповідь на активацію прозапальними цитокінами, такими

як фактору некрозу пухлин альфа (TNF-α). Однак молекули NO, що утворюються при сприянні iNOS, під впливом активних форм кисню перетворюються в пероксинітрит [9].

NO є нестабільним радикалом з коротким життям і можливо для його стабілізації потрібні тіолові сполуки. Порушення транспорту NO пов'язано з активацією ліпідної пероксидації, вільнорадикальних процесів. При накопиченні активних форм кисню, утворенні супероксидрадикалу та гідроксирадикалу вони можуть перетворюватися в пероксинітрит, про що свідчить підвищення маркера пероксинітриту нітротирозину на 193% [8]. При курсовому введенні ангіоліну спостерігається незначна дія засобу на активність загальної NOS, що зростає на 20% та вміст L-аргініну (підвищення на 14,7%), що можливо свідчить про непрямий, а опосередкований вплив ангіоліну, а саме про його антиоксидантну активність. Адже, як було нами встановлено раніше, ангіолін знижує окислювальну модифікацію білкових молекул, в тому числі ферментів, зберігаючи їх активність. Це підтверджується результатами гістохімічного аналізу, який дозволяє встановити підвищення щільності eNOS-позитивних клітин на 17% та зменшення iNOS-позитивних клітин на 30%. Крім того, ангіолін викликає підвищення рівня стабільних метаболітів NO на 54,5%, в цитозолі міокарду тварин з ХСН.

Отримані дані свідчать про те, що ангіолін попереджає перетворення NO під дією активних форм кисню в пероксинітриту, про що свідчить пониження рівня нітротирозину на 42%, зберігаючи його ендотеліопротективні властивості. Це відрізняє ангіолін від мілдронату, який в запропонованій дозі не має достовірного впливу на показники системи оксиду азоту.

Висновки

1. При хронічній серцевій недостатності в міокарді щурів знижується активність загальної NO-синтази на 60%, продукція стабільних метаболітів оксиду азоту на 58% на фоні дефіциту L-аргініну (-52,3%), а підвищення рівня нітротирозину на

Таблиця.

Вплив ангіоліну та мілдронату на показники синтезу, метаболізму системи оксиду азоту в міокарді щурів при хронічній серцевій недостатності на 35 добу експерименту

Досліджувані показники	Інтактні тварини	ХСН (контроль)	ХСН+ангіолін, 100 мг/кг	ХСН+мілдронат, 250 мг/кг
Загальна NOS, нмоль/мг білку/хв	36,7±2,31	14,8±1,23*	17,8±1,35**	14,2±1,67*
Щільність eNOS-позитивних клітин	477,3±21,7	223,1±18,5*	231,2±22,0*	217,2±24,2
Щільність iNOS-позитивних клітин	125,2±16,2	247,8±20,3*	173,7±14,3**	251,3±27,3
Метаболіти NO (нітрати), мкмоль/г тканини	28,7±2,25	12,1±1,12*	18,7±1,21**	11,8±1,12
Нітротирозин, нмоль/г тканини	21,2±2,11	62,1±4,51	27,1±2,18**	53,1±6,34
L-аргінін, мкмоль/г тканини	12,8±1,4	6,1±0,48*	7,0±0,52**	5,1±0,43

Примітка: *P<0,05 щодо контролю; **P<0,05 щодо ХСН.

193%. Спостерігалось зменшення щільності eNOS-позитивних клітин на 53,2% та підвищення щільності iNOS-позитивних клітин на 98%.

2. Курсове введення ангіоліну збільшує щільність eNOS-позитивних клітин на 17% та зменшення iNOS-позитивних клітин на 30%. Достовірно підвищується рівень стабільних метаболітів NO на 54,8%, вміст аргініну на 14,7%, активність загальної NOS на

20%, а також знижується вміст нітротирозину в 2,2 рази.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження повинні бути спрямовані на визначення впливу ангіоліну на показники тиол-дисульфідної системи в міокарді щурів при хронічній серцевій недостатності, що взаємопов'язано з системою оксиду азоту.

Література

1. Верткин А.Л. Мельдоний: эффективная точка применения / А.Л. Верткин, Н.О. Ховасова, В.В. Пшеничникова [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2013. – № 2. – С. 94-97.
2. Возка Х.І. Ендотелій: функціональні властивості та його дисфункція (огляд літератури з матеріалами власних досліджень) / Х.І. Возка, В.Д. Москаль, В.Д. Сорохан // Клінічна та експериментальна патологія. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 209-214.
3. Горбачева С.В. Механизмы эндогенной нейротекции при использовании модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения / С.В. Горбачева, И.Ф. Беленичев, Л.И. Кучеренко // Фармакология та лікарська токсикологія. – 2016. – № 1. – С. 23-28.
4. Дзучков С.Г. Механизмы развития эндотелиальной дисфункции и перспективы коррекции / С.Г. Дзучков, И.В. Можаяева, Е.А. Такоева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 3. – С. 198-203.
5. Нагорна О.О. Вплив ангіоліну на показники енергетичного обміну в міокарді щурів з експериментальною хронічною серцевою недостатністю / О.О. Нагорна, І.Ф. Беленічев, Н.О. Горчакова [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». – 2016. – Т. 26, Вип. 4, № 1. – С. 273-275.
6. Чекман И.С. Тиол-дисульфидное равновесие – определяющий фактор резистентности нейронов к нитрозирующему стрессу в условиях ишемии мозга / И.С. Чекман, Ю.М. Колесник, И.Ф. Беленичев [и др.] // Журнал НАМН України. – 2013. – Т. 19, № 1. – С. 3-11.
7. Чекман И.С. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції. Методичні рекомендації / І.С. Чекман, І.Ф. Беленічев, О.О. Нагорна [та ін.]. – Київ, 2016. – 92 с.
8. Aviram M. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular disease / M. Aviram // Free Radic. Res. – 2012. – Vol. 33. – P. 85-95.
9. Belenichev I.F. The thiol-disulfide balance and the nitric oxide system in the brain tissue of rats' subjected to experimental acute impairment of cerebral bloodflow: the therapeutic effects of nootropic drugs / I.F. Belenichev, S.V. Gorbacheva, N.V. Bukhtiyarova // Neurochemical journal. – 2014. – Vol. 8, № 1. – P. 24-27.
10. Ghisi G.L. Physical exercise and endothelial dysfunction / G.L. Ghisi, A. Durieux, R. Pinho, H. Benetti // Arg. Bras. Cardiol. – 2010. – Vol. 95, № 5. – P. 130-137.
11. Gogiraju R. Endothelial p53 deletion improves angiogenesis and prevent cardiac fibrosis and heart failure induced by pressure and overload in mice / R. Gogiraju, X. Xu, M. Bolchenek [et al.] // J. Amheart Assoc. – 2015. – Vol. 4. — doi:10.1161/jaha. 115.01770.
12. Maupoint J. Selective Vascular Endothelial Protection Reduces Cardiac Dysfunction in Chronic Heart Failure / J. Maupoint, M. Besnier, E. Gomez [et al.] // Circ Heart Fail. – 2016. – Vol. 9, e002895. — doi:10.1161/circheartfailure. 115.002895.

УДК 616.12-008.331.1:616-092.41-085:615.225.2:615:036.6

ВПЛИВ АНГІОЛІНУ НА ПОКАЗНИКИ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ В МІОКАРДІ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ХРОНІЧНОЮ СЕРЦЕВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ

Нагорна О. О., Беленічев І. Ф., Горчакова Н. О., Мазур І. А., Чекман І. С.

Резюме. У щурів при моделюванні хронічної доксорубіцинової серцевої недостатності за загальноприйнятим методом протягом 14 днів визначали вплив прямого ендотеліопротектора ангіоліну та непрямого – мельдонію на показники системи оксиду азоту в міокарді. Ангіолін вводили в дозі 100 мг/кг, мілдронат в дозі 250 мг/кг внутрішньошлунково, паралельно з введенням доксорубіцину. Щурів виводили з експерименту на 35 добу під тіопенталовим наркозом. В міокарді щурів при хронічній серцевій недостатності визначили пониження активності загальної NO-синтази, продукції стабільних метаболітів оксиду азоту, вмісту L-аргініну та підвищення рівня нітротирозину. Спостерігалось зменшення щільності позитивних клітин ендотеліальної NOS та підвищення щільності індукбельної NOS. Курсове введення ангіоліну підвищує активність загальної NOS на 20%, вміст L-аргініну на 14,7%, рівень стабільних метаболітів на 54,5%, щільність eNOS позитивних клітин на 17%. При цьому зменшується щільність iNOS-позитивних клітин на 17% та падає вміст нітротирозину в 2,2 рази. Мілдронат в дозі 250 мг/кг не мав достовірного впливу на вищезазначені біохімічні показники в міокарді.

Ключові слова: хронічна серцева недостатність, ангіолін, мілдронат, показники системи оксиду азоту.

УДК 616.12-008.331.1:616-092.41-085:615.225.2:615:036.6

ВЛИЯНИЕ АНГИОЛИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА В МИОКАРДЕ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Нагорная Е. А., Беленичев И. Ф., Горчакова Н. А., Мазур И. А., Чекман И. С.

Резюме. У крыс при моделировании хронической доксорубициновой сердечной недостаточности общепринятым методом в течение 14 дней определяли влияние прямого эндотелиопротектора ангиолина и непрямого – мельдония на показатели системы оксида азота в миокарде. Ангиолин вводили в дозе

100 мг/кг, милдронат в дозе 250 мг/кг внутривенно параллельно с введением доксорубина. Крыс выводили из эксперимента на 35 день под тиопенталовым наркозом. В миокарде крыс при хронической сердечной недостаточности установлено понижение активности общей NO-синтазы, продукции стабильных метаболитов оксида азота, содержания L-аргинина и повышение уровня нитротирозина. Наблюдалось уменьшение плотности позитивных клеток эндотелиальной NOS и повышение плотности позитивных клеток индуцибельной NOS. Курсовое введение ангиолина повышает активность общей NOS на 20%, содержание L-аргинина на 14,7%, уровень стабильных метаболитов на 54,5%, плотность eNOS-позитивных клеток на 17%. При этом уменьшается плотность iNOS-положительных клеток на 17% и падает содержание нитротирозина в 2,2 раза. Милдронат в дозе 250 мг/кг не имеет достоверного влияния на вышеуказанные биохимические показатели в миокарде.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, ангиолин, милдронат, показатели системы оксида азота.

UDC 616.12–008.331.1:616-092.41–085:615.225.2:615:036.6

ANGIOLIN INFLUENCE ON THE NITRIC OXIDE SYSTEM MARKERS IN THE RATS' MYOCARDIUM WITH THE EXPERIMENTAL CHRONIC CARDIAC INSUFFICIENCY

Nagornaya E. A., Belenichev I. F., Gorchakova N. A., Mazur I. A., Chekman I. S.

Abstract. Cardiac insufficiency is accompanied by metabolite function changes and endothelial dysfunction. The endothelial dysfunction causes the disbalance between the vasodilators and vasoconstrictors. The nitric oxide is a vasodilator factor that is formed from the aminoacid L-arginin under the NO-synthase influence. Earlier it was shown the influence of the direct endothelioprotector angiolin and indirect endothelioprotector meldonium on the energetic, metabolism, prooxidant-antioxidant homeostasis in the rats' myocardium in the conditions of chronic cardiac insufficiency.

The aim of the study was to investigate angiolin influence on the nitric oxide system markers in the rats' myocardium with the experimental chronic cardiac insufficiency.

The material and methods of the research. The experiments were conducted on the 10 intact rats, 20 rats with doxorubicin cardiac insufficiency, 20 rats with doxorubicine cardiac insufficiency treated by angiolin, 20 rats with doxorubicine cardiac insufficiency treated by mildronat. The doxorubicin cardiac insufficiency has been created by intraperitoneally doxorubicin injection (in the cumulative dose 15 mg/kg divided into 6 injections during 14 days). Angiolin was injected intragastrically together with doxorubicine in the dose 100 mg/kg. Mildronat also was injected intragastrically in the dose 250 mg/kg by the same scheme. The animals were decapitated under thiopentalum injection. In the rats hearts it was determined the markers of the nitric oxide system – the activity of the total NO-synthase, L-arginine, nitrotyrosine and stable metabolite levels, the density of eNOS positive cells, the density of iNOS positive cells.

The results of the research. In the conditions of cardiac insufficiency in the rats myocardium it was stated the decrease of L-arginine content on 52,3%, oxide nitric oxide metabolites on 58%, the density of eNOS positive cells on 53,2%. It was shown the increase of nitrotyrosine level on 193% and the density of iNOS positive cells on 98%. Angiolin injected during the course raised the density of eNOS positives cells on 17% stable no metabolites level on 54,5%, L-arginine content on 14,7%. Angiolin also diminished the nitrotyrosine level in 2,2 times, the density of iNOS positive cells on 30%. Mildronat hasn't the reliable influence on the markers of nitric oxide system in the rats' myocardium during cardiac insufficiency.

Conclusion. It was stated the angiolin normalize influence on the markers of the nitric oxide system in the rats' myocardium during the chronic cardiac insufficiency.

Keywords: chronic cardiac insufficiency, angiolin, mildronat, nitric oxide system markers.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 27.11.2016 року