



Р.С. Довгань<sup>1</sup>, С.Б. Французова<sup>1</sup>, І.С. Чекман<sup>1</sup>, Л.І. Кучеренко<sup>2</sup>, І.А. Мазур<sup>2</sup>

## ЕФЕКТИВНІСТЬ ТІОТРИАЗОЛІНУ ПРИ СУМІСНОМУ ЗАСТОСУВАННІ З БІПРОЛОЛОМ У ЩУРІВ ЗІ СПОНТАННОЮ АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

<sup>1</sup>Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ,

<sup>2</sup>Запорізький державний медичний університет,

НПО «Фарматрон», м. Запоріжжя

**Ключові слова:** тіотриазолін, біпролол, спонтанна артеріальна гіпертензія, електронна мікроскопія міокарда.

**Ключевые слова:** тиотриазолин, бипролол, спонтанная артериальная гипертензия, электронная микроскопия миокарда.

**Key words:** thiotriazolin, biprolol, spontaneous arterial hypertension, electronic microscopy of myocardium.

Проаналізовано дослідження впливу тіотриазоліну, біпрололу та їх сумісного застосування на артеріальний тиск, осмотичну резистентність еритроцитів, вільно-радикальне перекисне окислення ліпідів, спонтанну хемілюмінесценцію та електронну мікроскопію міокарда у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією.

Проанализированы исследования влияния тиотриазолина, бипролола и их совместного применения на артериальное давление, осмотическую резистентность эритроцитов, свободно-радикальное перекисное окисление липидов, спонтанную хемилуминесценцию и электронную микроскопию миокарда у крыс со спонтанной артериальной гипертензией.

In the work the influence of thiotriazolin, biprolol and their combined application in rats with spontaneous arterial hypertension on blood pressure, osmotic resistance of erythrocytes, free-radical lipid peroxidation, spontaneous chemiluminescence and electronic microscopy of myocardium was studied.

Протягом останніх років за допомогою багатоцентрових рандомізованих досліджень значно поглибилось розуміння фармакодинамічних і фармакокінетичних ефектів і метаболічних впливів β-адреноблокаторів [4,10,15,16,17]. Біпролол належить до нового класу β1-кардіоселективних адреноблокаторів, його біодоступність становить 80–90%. За рекомендацією Європейського товариства кардіологів, біпролол хворим на артеріальну гіпертензію призначаються 1 раз на добу. Цей медикамент характеризується позитивними фармако-економічними параметрами, що важливо для забезпечення високої прихильності хворих до лікування [13,18–22].

Як представник групи метаболічних препаратів, тіотриазолін характеризується широким спектром фармакологічної активності, що особливо важливо для його клінічної фармакології. Препарат виявляє антиоксидантну, протигішемічну, мембраностабілізуючу, антиаритмічну, імуномодулюючу, протизапальну, гепатопротекторну, кардіопротекторну, нейропротекторну, нефропротекторну активність [2,5–8,11,12]. Такий широкий діапазон дії дає змогу застосовувати тіотриазолін у кардіології, гепатології, гінекології, неврології, педіатрії, хірургії для комплексної терапії інфаркту міокарда, стенокардії, інсульту, гепатитів різного генезу, вроджених вад розвитку нирок тощо. У спеціальній літературі відсутні дані про ефективність тіотриазоліну при сумісному застосуванні з біпрололом у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на 15 нормотензивних WKY (normotensive Wistar-Kyoto rats) і 37 щурах зі спонтанною артеріальною гіпертензією лінії НІСАГ, які утримувалися у стандартних умовах віварію Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, згідно вимогам і

рекомендаціям ФЦ МОЗ України.

Експериментальних тварин розподілено на 4 групи: 1 – інтактна (15 нормотензивних щурів); 2 – контрольна (15 щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією); 3 – тварини зі спонтанною артеріальною гіпертензією, яким вводили біпролол в дозі 20 мг/кг (11 щурів); 4 – тварини зі спонтанною артеріальною гіпертензією, яким вводили біпролол 20 мг/кг + тіотриазолін 50 мг/кг (11 щурів).

Артеріальний тиск вимірювали на хвостовій артерії тварин за допомогою спеціального приладу (плетизмограф) і реєстрували у міліметрах ртутного стовпчика (мм рт. ст.). Осмотичну резистентність еритроцитів (ОРЕ) визначали за методом Дейсі. Гемоліз еритроцитів встановлювали на фотометрі. Найменш стійкі клітини лізуються у 0,5–0,45%-них розчинах, а найстійкіші – у 0,35–0,1%. Функціональний стан системи вільнорадикального перекисного окислення ліпідів (ВРПОЛ) досліджували у змішаній артеріально-венозній плазмі крові й гомогенаті міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією. Для цього використовували метод реєстрації спонтанної хемілюмінесценції (СХЛ) за допомогою хемілюмінометра ХЛМ1Ц-01. Рівень СХЛ біологічного субстрату визначали за показниками хемілюмінометра протягом 1 хв (імп./хв). У гомогенатах тканини міокарда щурів встановлювали вміст сполук, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБКАС) й виражали в наномоль/г тканини за 30 хв.

Для патоморфологічного дослідження міокард фіксували у 10% нейтральному формаліні й заливали у парафін. Парафінові зрізи забарвлювали гематоксиліном й еозином і за методикою Ван Гізона. Основні гістохімічні показники досліджено на свіжозаморожених криостатних зрізах міокарда завтовшки 10 мкм. Оцінку енергетичного обміну



в тканинах міокарду проведено на підставі з'ясування активності комплексу ферментів.

Для електронномікроскопічних досліджень матеріалом слугував міокард лівого шлуночка серця. Фрагменти міокарда фіксували 1% розчином чотириокису за Колфільдом й обробляли згідно із загальноприйнятою методикою. Ультратонкі зрізи контрастували 2% розчином уранілацетату й цитратом свинцю. Препарати досліджували під електронним мікроскопом ПЕМ-125К.

Отримані результати оцінювали на підставі статистичної обробки методом варіаційної статистики на ПК за допомогою спеціалізованої програми «STATISTICA». Вірогідність різниці між досліджуваними показниками оцінювали за критерієм t Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично вірогідною за  $P \leq 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як видно з *табл. 1*, в інтактних щурів артеріальний тиск до початку експерименту становив  $104,4 \pm 5,5$  мм рт. ст. Через 90 днів він майже не змінився й дорівнював  $108,5 \pm 5,6$  мм рт. ст. У щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією на початку експерименту артеріальний тиск фіксували у межах  $152 \pm 5,6$  мм рт. ст., а через 90 діб –  $157,3 \pm 5,4$  мм рт. ст.

Таблиця 1

Артеріальний тиск у щурів із САГ

Групи тварини	Артеріальний тиск в мм рт. ст	
	Початок експерименту	Через 90 днів
Нормотензивні щури (контроль)	$104,4 \pm 5,5$	$108,5 \pm 5,6$
Щури з САГ	$152 \pm 5,6^*$	$157,3 \pm 5,4^*$
Щури з САГ, що отримували біпролол	$148 \pm 6,5^*$	$121 \pm 5,3^{***}$
Щури з САГ, що отримували біпролол і тіотриазолін	$145 \pm 5,3^*$	$119 \pm 6,1^{**}$
Щури з САГ, що отримували тіотриазолін	$147 \pm 6^*$	$142 \pm 5,6^*$

Примітка:  $P \leq 0,05$  в порівнянні з інтактними щурами.

У щурів із САГ, які отримували біпролол, артеріальний тиск на початку експерименту дорівнював у середньому  $148 \pm 6,5$  мм рт. ст., а через 90 діб знизився до  $121 \pm 5,3$  мм рт. ст., що статистично ймовірно нижче показника до лікування.

Сумісне введення біпрололу й тіотриазоліну протягом 90 днів у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією спричинювало найбільш помітне зниження артеріального тиску – з  $145 \pm 5,3$  мм рт. ст. до  $119 \pm 6,1$  мм рт. ст., що статистично ймовірно не відрізняється від показників монотерапії біпрололом, але має тенденцію до зниження артеріального тиску.

Відомо, що при спонтанній гіпертензії підвищується рівень ангіотензину II, який викликає дисфункцію ендотелію, секрецію активних форм кисню, цитокінів, молекул адгезії, активацію перекисного окислення ліпідів і ненасичених жирних кислот [21]. Дослідження процесів перекисного окислення ліпідів у міокарді й крові щурів із САГ показало, що спонтанна хемолюмінісценція зростала на 47%. Підтвердженням інтенсифікації процесу ПВЛ було

підвищення маркера інтенсивності – сполук, що реагують з тіобарбітуратом кислотою на 35%.

Біпролол понижував спонтанну хемолюмінісценцію (СХЛ) в плазмі крові й міокарді на 22%, вміст сполук, що реагують з тіобарбітуратом кислотою (ТБКАС) – на 14%. Сумісне застосування біпрололу й тіотриазоліну призводило до нормалізації активності перекисного окислення ліпідів у міокарді й плазмі крові щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією. Тіотриазолін більш виражено від біпрололу знижував спонтанну хемолюмінісценцію в плазмі крові й міокарді та вміст сполук, що реагують з тіобарбітуратом кислотою (*табл. 2*).

Таблиця 2

Активність системи ВРПОЛ у плазмі крові й міокарді щурів із САГ до та після лікування

Групи тварин	СХЛ імп./хв	ТБКАС наномоль/г тканини за 30 хв
Нормотензивні щури (контроль)	$312 \pm 39$	$21,3 \pm 1,5$
Щури із САГ	$460 \pm 61^*$	$28,7 \pm 1,6^*$
Щури із САГ, що отримували біпролол	$361 \pm 24^{**}$	$24,6 \pm 0,4^{**}$
Щури із САГ, що отримували біпролол з тіотриазоліном	$270 \pm 15^{*,**}$	$22,2 \pm 0,7^{**}$
Щури із САГ, які отримували тіотриазолін	$355 \pm 25^{**}$	$25,1 \pm 0,6^{**}$

Примітки: \* – статистично достовірна різниця, у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ); \*\* – статистично достовірна різниця, у порівнянні з групою щурів із САГ ( $P < 0,05$ ).

У підтриманні цілісності й метаболічної активності мембранних структур і здійсненні енергетичних функцій клітини, поруч з показниками прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, важливу роль відіграють жирні кислоти [1,14]. Їх метаболізм у організмі є однією з найшвидших реакцій, що реагує на патологічні зміни метаболізму й функції [9]. У міокарді щурів із САГ у жирнокислотному спектрі ліпідів спостерігається перерозподіл вмісту НЖК і ННЖК. Статистично значуще, більш ніж на 25%, зменшується вміст в міокарді пальмітинової ЖК-НЖК кислоти, яка, окислюючись в мітохондріях, виробляє АТФ. Це свідчить про суттєві розлади в енергетичному постачанні клітин. Одночасно збільшується відсоток арахідонової кислоти, похідні якої відіграють важливу роль у будові й проникності клітинних мембран. Разом з тим, суттєве збільшення рівня арахідонової кислоти, що належить до сімейства омега-6, супроводжується зміною співвідношення кислот омега-6 і омега-3 у бік дефіциту останніх, необхідного для нормального функціонування організму.

Біпролол змінював ліпідний склад міокарда щурів САГ, що виявлялось у зниженні вмісту арахідонової кислоти й зменшенні вмісту ненасичених жирних кислот. Ці показники наближалися до контрольних, але все ж їх не досягали. Біпролол при сумісному застосуванні з тіотриазоліном проявляв більш виражений нормалізуючий вплив на склад ліпідів міокарду щурів із САГ: кількісний вміст ЖК стати-



стично не відрізнявся від того, що спостерігався у нормотензивних тварин (табл. 3).

Таблиця 3

**Стан осмотичної резистентності еритроцитів щурів із САГ в умовах дії біпрололу та його сумісного застосування з тіотриазоліном**

Групи тварин	Концентрація NaCl (%)				
	0,5	0,45	0,4	0,35	0,1
	Процент гемолізу				
Нормотензивні щури (контроль)	2,6±1,1	8±2,1	36,2±5,4	74,4±4,2	100
Щури із САГ	4,7	37,5±3,4*	70,7±6,4*	100±0*	100
Щури із САГ, що отримували біпролол і тіотриазолін	0	0	21,5±6,8**	80,3±4,4	100
Щури із САГ, що отримували біпролол	7,1±1,8	38,6±4	67±5,8	97,8±2,3	100
Щури зі САГ, що отримували тіотриазолін	4,5±2**	22,5±4,5**	52,8±5,6**	88±6**	100

*Примітки:* \* – статистично достовірна різниця, у порівнянні з контролем (P<0,05); \*\* – статистично достовірна різниця, у порівнянні з групою щурів із САГ (P<0,05).

Зміни ліпідного спектру посилюють мембранну проникність, що поглиблює порушення внутрішньоклітинного метаболізму [3]. У щурів із САГ спостерігалось порушення осмотичної резистентності еритроцитів, а саме підвищення проникності мембран стосовно рівня контрольних тварин. Зміни відсотка гемолізу еритроцитів за цієї патології спостерігалися вже в 0,4% і 0,35 % розчинах (табл. 3). Біпролол знижує гемоліз еритроцитів, проникність мембран, що, можливо, є наслідком пониження глікозилювання еритроцитарних білків і пригнічення функції мембран ліпідів, яке зумовлено зростанням стійкості еритроцитів до гіпотонічного гемолізу. Подібну захисну дію мають сполучення біпрололу з тіотриазоліном (табл. 3), який стабілізує клітинні мембрани внаслідок антиоксидантного впливу. Застосування тіотриазоліну впродовж 90 днів зменшило проникність мембран щодо рівня гіпертензивних щурів.

Гістологічні й гістохімічні дослідження показали, що метаболізм і структура міокарду серця щурів із САГ відрізняється від нормотензивних розвитком ознак гіпертрофії частин кардіоміоцитів, тенденцією до посилення колагеноутворення у міжм'язовому й периваскулярному інтерстиції, осередковим розширенням просвітів і гіперемію міжм'язових мікросудин і потовщенням стінок інтрамулярних коронарних артерій. Змінювалися показники енергетичного обміну: зростала активність лактатдегідрогенази, зумовлена активізацією гліколітичних процесів, що, можливо, є наслідком помірної тканинної гіпоксії, хоча активність ферментів термінального окиснення НАД НДГ і НАДФ НДГ вірогідно не змінюється.

Ультраструктурний аналіз лівого шлуночка серця щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією показав, що структурні компоненти міокарда – кардіоміоцити й гемомікроциркуляторне русло – зазнають суттєвих змін, у порівнянні з контролем. У кардіоміоцитах на перший план виступають порушення скоротливого (лізис і дезінтеграція міофібрил, їх перескорочення) та енергетичного (зміни форми, розміру, електронної щільності мітохондрій, лізис їх матриксу, внутрішніх і зовнішніх мембран) апаратів. Зміни вставних дисків свідчать про порушення як механічних, так і електричних зв'язків у кардіоміоцитах. Про залучення до порушень скоротливої функції не тільки розладів у кальцієвому обміні, а й провідної системи серця свідчить кластерне розташування перескорочених кардіоміоцитів. Характерною особливістю міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією є розповсюдженість набряку в кардіоміоцитах, ендотеліальних клітинах гемомікросудин й інтерстиційному просторі.

Порівняльний мікроскопічний аналіз ефективності моно- й комплексної фармакотерапії показав, що одночасне застосування біпрололу й ТТЗ виявилось найбільш ефективнішим. Комплексна фармакотерапія САГ біпрололом і тіотриазоліном призводить до вірогідного зменшення ділянок перескорочення міофібрил, що свідчить про нормалізацію скоротливої функції кардіоміоцитів. Енергетичний апарат кардіоміоцитів – мітохондрії – зазнають деякого покращення при застосуванні біпрололу, але найкраща збереженість ультраструктури цих органел спостерігається у щурів, які отримували біпролол у комбінації з тіотриазоліном. Сумісне застосування тіотриазоліну й біпрололу призводить до найсуттєвіших зменшень показників кількісної щільності й площі ядер і наближення їх до контрольних. Це, в свою чергу, може бути непрямою ознакою зменшення гіпертрофії кардіоміоцитів після лікування біпрололом і тіотриазоліном. Ця медикamentозна комбінація призводила до найістотнішого накопичення РНК як у ядрах кардіоміоцитів, так і в їх цитоплазмі.

Ці результати узгоджуються з даними про тіотриазолін як антиоксидантний, мембраностабілізуючий, стимулюючий регенерацію клітин препарат (І.А. Мазур та ін., 2005). Проведені дослідження показали, що тіотриазолін сприяє не тільки клітинній регенерації, а й внутрішньоклітинному відновленню ультраструктур в кардіоміоцитах і ендотеліоцитах. Активізація біосинтетичної активності, морфологічні прояви якої спостерігаються у групі тварин, лікованих біпрололом з тіотриазоліном, підсилює регенерацію міофібрил.

### ВИСНОВКИ

1. При спонтанній артеріальній гіпертензії у щурів мають місце порушення фізіологічних, біохімічних і морфологічних показників міокарду й еритроцитів.
2. Тіотриазолін нормалізує осмотичну резистентність еритроцитів, жирнокислотний склад ліпідів, морфологічну структуру серцевого м'язу, перекисне окислення ліпідів.
3. Біпролол знижує артеріальний тиск у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією, викликає позитивні зміни досліджуваних показників.



4. Тіотриазолін при застосуванні з біпрололом виявляє більш виражений вплив на ультраструктуру міокарда, осмотичну резистентність мембран еритроцитів і перекисне окислення ліпідів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Афони́на Г.Б.* Липиды и радикалы – иммунный ответ / *Г.Б. Афони́на, Л.А. Куюн* – К.: НМУ, 2000 – 285 с.
2. *Беленичев И.Ф.* Классификация, механизмы действия и перспективы создания антиоксидантных средств / *И.Ф. Беленичев, С.И. Коваленко, И.А. Мазур* // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: Зб. наук. ст. – Запоріжжя, 1999. – Вип. IV. – С. 61–75.
3. *Барабой В.А.* Биоантиоксиданты / *В.А. Барабой*. – К.: Книга плюс, 2006. – 324 с.
4. *Березин А.Е.* Современные перспективы клинического применения блокаторов бета-адренорецепторов у пациентов с артериальной гипертензией, расширение или сужение терапевтического диапазона? / *А.Е. Березин* // Укр. мед. часопис. 2007. – Т.62, №6. – С. 3–16.
5. *Визир А.Д.* Отчет о противоишемическом и кардиопротекторном действии тиотриазолина / *А.Д. Визир, В.В. Дунаев, И.А. Мазур*. – Запорожье, 1992. – 34 с.
6. *Визир А.Д.* Толерантность к физической нагрузке у больных стабильной стенокардией напряжения III Ф.К. при применении тиотриазолина / *А.Д. Визир, В.А. Евтушенко* // Современные аспекты создания, исследования и апробации лекарственных средств. – Х., 1995. – С. 74–77.
7. Тиотриазолин в терапии ишемической болезни сердца у лиц старшего возраста / *В.В. Дунаев, О.В. Крайдашенко, Н.П. Красько, В.С. Коробейник* // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики: Зб. наук. ст. – Запоріжжя, 2002. – Вип. 8. – С. 158–162.
8. Фармако-биохимические аспекты противоишемического действия препарата «Тиотриазолин» в условиях эксперимента / *В.В. Дунаев, И.Ф. Беленичев, И.А. Мазур, В.Р. Стец* // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики: зб. наук. ст. – Запоріжжя, 2002. – Вип. 8. – С. 73–81.
9. *Ефремов А.В.* Особенности липидного обмена при наследственной стресс-индуцированной артериальной гипертензии / *А.В. Ефремов, А.В. Антонов* // Клини. лаб. диагностика. – 2000. – №12. – С. 14–16.
10. Артериальная гипертензия у особых категорий больных / *Под. ред. В.П. Коваленко, Е.П. Свищенко* – К.: МОРИОН, 2009. – 376 с.
11. *Мазур И.А.* Тиотриазолин / *И.А. Мазур, Н.А. Волошин, И.С. Чекман*. – Л.: Наутилус, 2005. – 156 с.
12. Клінічні аспекти застосування в офтальмологічній практиці нового протиішемічного антиоксидантного препарату «Тиотриазолін» при гострій судинній оптичній нейропатії / *И.А. Мазур, С.Ф. Максименко, І.Ф. Бєленічев, Д.А. Тараненко* // Ліки. – 1995. – №5–6. – С. 133–135.
13. *Стаднюк Л.А.* Кардіоселективний β-адреноблокатор біспролол / *Л.А. Стаднюк, О.В. Лапишин* // Здоров'я України. – 2003. – №11. – С. 10–11.
14. *Тумов В.Н.* Атеросклероз как патология полиеновых ЖК / *В.Н. Тумов*. – М.: Медицина, 2002. – 205 с.
15. CIBIS Investigators and committee. A randomized trial of beta-blockade in heart failure // *Circulation*. – 1994. – Vol. 90. – P. 1765–1773.
16. MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure. Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF) // *Lancet*. – 1999. – Vol. 353. – P. 2001–2007.
17. SIBIS-II Investigators. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomized trial // *Lancet*. – 1999. – Vol. 353. – P. 9–13.
18. *Ichihara S.* Attenuation of oxidative stress and cardiac dysfunction by bisoprolol in an animal model of dilated cardiomyopathy / *S. Ichihara, Y. Yamada, G. Ichihara* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 350. – P. 105–113.
19. *Istvan C.* Comparison of the New Cardiosselective Beta-Blocker Nebivolol with Bisoprolol in Hypertension: The Nebivolol, Bisoprolol / *C. Istvan, R. Igor, B. Juraj* // Multicenter Study (NEBIS) Cardiovascular Drugs and Therapy Publisher: Springer Netherlands. – 2003. – Vol. 17, №3. – P. 257–263.
20. Bisoprolol Improves Echocardiographic Parameters of Left Ventricular Diastolic Function in Patients with Systemic Hypertension / *T.F. Ilgenli, F. Kilicaslan, A. Kirilmaz, M. Uzun* // *Cardiology*. – 2006. – Vol. 106. – P. 127–131.
21. Antiarrhythmic Effect of Bisoprolol, a Highly Selective β1-Blocker, in Patients With Paroxysmal Atrial Fibrillation / *I. Haruhisa, I. Takanori, A. Atsuko, T. Takehiro* // *Int Heart J*. – 2008. – Vol. 49, №3. – P. 281–293.
22. *Flather M.D.* Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS) / *M.D. Flather, M.C. Shibata, A.J. Coats* // *Eur. Heart J*. – 2005. – Vol. 26. – P. 215–225.