



в динаміці формування патологічного процесу, яке розвивалось внаслідок інтегральної антиоксидантної недостатності в ранні строки експерименту (3 тижні) і зберігалось до 40-го дня. Виходячи з цього, для профілактики розвитку вільнорадикального патологічного процесу при ЕПОА й підвищення ефективності його лікування доцільно використовувати лікарські засоби з антиоксидантним типом фармакологічної дії.

2. Плацебо у динаміці 24-денного застосування для лікування порушень у прооксидантно-антиоксидантній рівновазі організму у кролів на фоні ЕПОА, що вже сформувався, поглиблювало їх за рахунок свого вірогідного прооксидантного впливу на організм, що призводило до зміни ліпідного складу плазми крові й токсичного ураження тканини печінки. Застосування у кролів з ЕПОА у цей строк експерименту ТТАЗ у дозі 0,24 г/кг внутрішньом'язово супроводжувалося реалізацією його значного надлишкового антиоксидантного ефекту, внаслідок чого виявлялось пригнічення активності системи ВРПОЛ у плазмі крові.

Доцільно провести додаткові аналогічні дослідження з використанням менших доз ТТАЗ для лікування порушень у прооксидантно-антиоксидантній рівновазі організму у кролів з ЕПОА й з обов'язковим тестуванням їхнього впливу на інтактних (не оперованих) кролів.

3. Застосування ТТАЗ у дозі 0,24 г/кг внутрішньом'язово протягом 40 днів для профілактики порушень окислювального гомеостазу у кролів після моделювання ЕПОА супроводжувалося суттєвою нормалізацією прооксидантно-антиоксидантної рівноваги й підвищеної активності системи ВРПОЛ у плазмі крові, у порівнянні з тваринами, які його не отримували. Аналогічний ефект ТТАЗ виявлявся й у порівнянні з кролями з ЕПОА, що отримували плацебо, яке здійснювало прооксидантний вплив. Зіставляючи виявлені особливості впливу ТТАЗ і плацебо на активність системи ВРПОЛ у плазмі крові кролів з ЕПОА й систему АОЗ організму в динаміці 40 днів їхнього застосування, можна констатувати наявність слабого надлишкового антиоксидантного ефекту у ТТАЗ і прооксидантного впливу у плацебо.

УДК: 616.72-002-08-039.71-085

О.В. Клименко¹, І.С. Чекман¹, Н.О. Горчакова¹, Л.І. Кучеренко², І.А. Мазур², С.В. Павлов², Н.В. Бухтіярова²

ВПЛИВ КАРДІОТРИЛУ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТУ НА МЕТАБОЛІЗМ ОКСИДУ АЗОТУ В МІОКАРДІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГЕМІЧНОЇ ГІПОКСІЇ

¹Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ,

²Запорізький державний медичний університет,

НПО «Фарматрон», м. Запоріжжя

Ключові слова: кардіотрил, АТФ-лонг, NO, міокард, гемічна гіпоксія.

Ключевые слова: кардиотрил, АТФ-лонг, NO, миокард, гемическая гипоксия.

Key words: Cardiotryl, ATP-long, NO, myocardium, haemic hypoxia.

Встановлено вплив кардіотрилу та його метаболіту на метаболізм NO в міокарді щурів за умов гемічної гіпоксії.

Установлено влияние кардиотрила и его метаболита на метаболизм NO в миокарде крыс при условии гемической гипоксии.

In the work influence of Cardiotryl and its metabolite on the nitric oxide in rats' myocardium under the condition of haemic hypoxia was determined.

Гіпоксія є основним або супутнім патологічним процесом у патогенезі багатьох захворювань. Цей стан виникає в умовах дефіциту кисню в зовнішньому середовищі й внаслідок різноманітних патологічних процесів, пов'язаних з порушенням дихальної, серцево-судинної систем, транспортної функції крові, обміну речовин. У сучасних умовах зростає розповсюдженість ішемічних уражень серця, артеріальної гіпертензії, що потребують лікування у стаціонарі й подальшої реабілітації. У структурі загальної летальності рівень смертності від захворювань серцево-судинної системи посідає перші місця [2,5,8].

При гіпоксії транспорт кисню до тканин або його утилізація знижуються до рівня, недостатнього для підтримки метаболізму, структури й функції клітин. Це зумовлює необхідність пошуку засобів з антигіпоксичною

дією для профілактики й патогенетичної терапії при загальній або локальній гіпоксії та ішемії.

Одна із форм гіпоксії (немічна) пов'язана з токсичною метгемоглобінемією – утворенням в еритроцитах метгемоглобіну (MtHb) під впливом метгемоглобінутворювачів, таких як нітрати й нітрити. Кількість нітратно-нітритних токсичних метгемоглобінемій зростає з різних причин: екстремальних (катастрофи, аварія хімічна або при транспортуванні), залежних від діяльності людини (порушення правил зберігання, технології використання чи вимог техніки безпеки, нерациональний прийом медикаментів), природних (зливи) тощо.

Серед метаболітних сполук, що вивчаються з метою зменшення токсичного впливу нітритів і нітратів, – похідні 1,2,4-триазолу і препарати аденілових нуклеотидів. Одним із представників таких органічних сполук є кардіотрил



(1-(β-фенилэтил)-4-амино-(п-диметиламинобензальдегид)-1,2,4-триазолия бромид), який проявляє протишемічну, вазодилатуючу, мембраностабілізуючу й фібринолітичну дію [3]. В організмі кардіотрил метаболізується в активний метаболіт (МТ). З арсеналу препаратів аденілових нуклеотидів в дослідженнях антигіпоксичної дії медикаментів інтерес представляє координаційний препарат АТФ-лонг [7, 16].

МЕТА РОБОТИ

Встановити вплив кардіотрилу та його метаболіту на метаболізм NO в міокарді щурів за умов гемічної гіпоксії.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проведено на 30 білих безпорідних щурах лінії Wistar обох статей масою 210–250 г, що утримувались у віварії Запорізького державного медичного університету. Тривалість карантину для тварин становила 14 днів. Всі експерименти здійснювали згідно «Методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України» [4]. Нітрит натрію вводили внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг [4]. Досліджувані препарати застосовували внутрішньоочеревинно за 30 хв до введення нітриту натрію в дозах: кардіотрил – 5 мг/кг [3], МТ – 5 мг/кг [3], АТФ-лонг – 10 мг/кг [7]. Метаболізм NO визначали за активністю NO-синтази (NOS), вмісту нітратів, рівню сумарних SH-груп й активністю глутатіонредуктази. Стабільні метаболіти NO визначали за рівнем нітратів в реакції Грісса, активність NOS – за різницею між швидкістю окислення NADPH, реєстрованою флюорометричним методом. Активність глутатіонредуктази (ГР) визначали спектрофотометричним методом [12]. Вміст сумарних SH-груп визначали спектрофотометричним методом за реакцією з 5,5-дігібіс-7-нітробензойної кислотою [12], нітротирозин визначали в гомогенаті серця твердофазним імуносорбентним методом набором фірми ELISA (№4513K19). Статистичну обробку результатів проводили методами математичної статистики із застосуванням пакетів прикладних програм «Біостатистика для Windows, версія 4.03» і «Microsoft Excel 2002». За умови відповідності нормальності розподілу достовірність отриманих відмінностей зіставляваних величин оцінювали з використанням t-критерія Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності з рівнем значущості більше 95% ($p < 0,05$) [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У процесі взаємодії нітритів з гемоглобіном (Hb) виділяються активні форми кисню: супероксидний аніон – радикал (O_2^-), перекис водню (H_2O_2), нітратні (NO_3^-) й нітритні (NO_2^-) йони, NO і NO_2 , а також проміжні продукти окислення гемоглобіну. NO легко витісняє кисень з оксигемоглобіну й утворює Hb-NO-комплекси, у процесі розпаду яких Hb окислюється в MtHb. Накопичення Hb-NO-комплексів сприяє прогресуванню гіпоксії, тому що Hb-NO і MtHb не здатні переносити кисень. Навіть незначний вміст MtHb у крові (до 10%) приводить до функціональних змін в органах і системах організму. Поряд з MtHb-емією, утворення NO викликає цитотоксичні ефекти, пошкодження клітинних структур, інтенсивний апоптоз, пору-

шення процесів регуляції гемодинаміки й нейроклітинної сигналізації, що проявляються порушенням функцій серця, мозку й інших органів [11, 15].

Останнім часом збільшився негативний вплив нітратів і нітритів на здоров'я людини й тварин [1]. В основі системних механізмів цього впливу лежить реакція перетворення нітрит-іонів на NO. Ця ланка визначає здатність нітрит-іонів окислювати гемоглобін й утворювати комплекси Hb-NO, впливати на активність розчинної гуанілатциклази і рівень цГМФ, а також на внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію. NO є одним з універсальних регуляторів клітинного й тканинного метаболізму [13].

Нині активно досліджується роль оксиду азоту в регуляції функціонування найважливіших систем організму: нервової, серцево-судинної, дихальної, імунної тощо. Незважаючи на велику кількість робіт, присвячених дослідженню NO, поки не визначені всі аспекти його застосування. Відомо, що синтез оксиду азоту de novo здійснюється за участю різних ізоформ NO-синтаз (eNOS, iNOS, nNOS). Відомо також [13], що оксид азоту за зниженого вмісту кисню у клітинах може відігравати регуляторну роль акцептора електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій, підтримуючи тим самим їхню функціональну активність.

Оцінюючи роль ендogenous NO за умов гострої гіпоксії, можна помітити, ця сполука сприяє розвитку клітинних ушкоджень й активації ПОЛ, у той час як за умов адаптації, навпаки, знижує вміст активних форм кисню й підвищує здатність мітохондрій до економнішого його використання. Останнє особливо чітко виявляється в період впливу гострої гіпоксії на щурів. При цьому, протилежні ефекти NO на фоні гіпоксії на тварин поки що не з'ясовано. Можливо, в цих випадках має значення дозозалежність ефектів дії оксиду азоту: періодичне зростання продукції NO в період адаптації щурів до дефіциту кисню в повітрі виявляє виражений протекторний ефект, а гіперпродукція його за гострої гіпоксії зумовлює шкідливий ефект. Це узгоджується з тим, що важка гіпоксія індукує експресію гена iNOS, тоді як адаптація не впливає на цей процес, збільшуючи в мозку й судинах експресію гена eNOS [9].

Нітрит натрію в токсичних концентраціях призводить до стійких порушень у системі синтезу й транспорту ендogenous NO міокарду.

Отримані результати виявили зниження активності NO-синтази з $37,8 \pm 3$ мкм/мг/хв до $12 \pm 1,3$ мкм/мг/хв, підвищення рівня маркера нітрозуючого стресу – нітротирозину – з $16,2 \pm 0,9$ нмол/г до $56,2 \pm 3,7$ нмол/г. Паралельно реєструвалось зниження основних показників тіол-дисульфідної системи – відновлених тіолів – з $154,3 \pm 10,3$ мкм/г до $65,7 \pm 6,2$ мкм/г й активність глутатіонредуктази (ГР) – з $31,2 \pm 2$ мкм/мг/хв до $11,2 \pm 1,5$ мкм/мг/хв у міокарді *табл. 1*. Введений нітрит натрію призводить до розвитку нітрозуючого стресу в міокарді, мішенню якого є і NO-синтаза, активний центр якої піддався окислювальній модифікації з боку NO і його дериватів, що й призвело до зниження їх активності. У результаті нітрозуючого стресу, викликаного нітритом натрію, відбулося окислення або нітразування відновлених



Таблиця 1

Вплив похідних триазолу й АТФ-лонг на метаболізм NO в міокарді щурів при інтоксикації нітритом натрію

Показники	Інтактні тварини	Нітрит натрію (контроль)	Нітрит натрію+кардіотрил	Нітрит натрію+АТФ-лонг	Нітрит натрію+МТ
Активність NO-синтази, мкм/мг/хв	37,8±3	12±1,3	17,2±1,5*	14,2±1,6	30,1±2,8**
Нітротирозин, нмол/г	16,2±0,9	56,2±3,7	32,8±1,7*	53,8±3,1	21,4±2,1**
Відновлені SH-групи, мкм/г	154,3±10,3	65,7±6,2	96,2±5,8*	66,2±4,2	120,8±5,7**
ГР, мкм/мг/хв	31,2±2	11,2±1,5	18,5±2,4*	13,2±1,9	20,4±3,5*

Примітки: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; ** – $p \leq 0,05$ відносно до кардіотрилу й АТФ-лонгу.

тіолів і пригнічення активності ГР [14,17].

АТФ-лонг не проявляв позитивних змін у NO й тіолдисульфідній системах. МТ і кардіотрил призводили до зменшення негативної дії нітрозуючого стресу, викликаного введенням нітриту натрію. Так, у групах тварин, що отримували ці препарати, відзначалось достовірне зниження нітротирозану (кардіотрил – з 56,2±3,7 нмол/г до 32,8±1,7 нмол/г, а метаболіт – з 56,2±3,7 нмол/г до 21,4±2,1 нмол/г) на фоні покращення показників тіолдисульфідної системи: відновлені тіоли (кардіотрил – з 65,7±6,2 мкм/г до 96,2±5,8 мкм/г, метаболіт – з 65,7±6,2 мкм/г до 120,8±5,7 мкм/г) й активність глутатіонредуктази (кардіотрил – з 11,2±1,5 мкм/мг/хв до 18,5±2,4 мкм/мг/хв, метаболіт – з 11,2±1,5 мкм/мг/хв до 20,4±3,5 мкм/мг/хв). Кардіотрил не проявляв активуючого ефекту у відносно NO-синтази, на відміну від метаболіту, що підвищував її активність з 12±1,3 мкм/мг/хв до 30,1±2,8 мкм/мг/хв.

Отримані дані констатують наявність у похідних триазолу – кардіотрилу та його метаболіту – кардіопротекторної дії при метгемоглобінемії та при розвитку гіпоксії, викликаній нітритом натрію. Необхідні подальші дослідження з вивчення механізмів захисної дії АТФ-лонг, кардіотрилу та його метаболіту при різних видах гіпоксії.

ВИСНОВКИ

Нітрит натрію пригнічує активність NO-синтази, підвищує рівень нітротирозину, знижує показники тіолдисульфідної системи – відновлених тіолів й активність глутатіонредуктази в міокарді щурів.

Кардіотрил і його метаболіт зменшували стресорну дію нітриту натрію, пригнічуючи прояви оксидативного стресу й нормалізуючи мітохондріальну дисфункцію.

Кардіопротекторна дія АТФ-лонг реалізується нормалізацією показників прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу й активності іонтранспортних систем.

ЛІТЕРАТУРА

1. Агаджанян Н.А. Функции организма в условиях гипоксии и гиперкапнии / Н.А. Агаджанян, А.И. Ефимов. – М.: Медицина, 1986. – 272 с.
2. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга / И.В. Викторов // Вестн. РАМН. – 2000. – №4. – С. 5–11.
3. Георгиевский Г.В. Определение примесей в отечественных субстанциях – производных 1,2,4-триазола методом ОФ ВЭЖХ / Г.В. Георгиевский, А.Ю. Куликов // Фармаком. – 2009. – №2. – С. 87–98.
4. Доклинические испытания лекарственных средств: метод. рекомендации / Под ред. А.В. Стефанова. – К.: Авиценна, 2002. – 568 с.
5. Жданов Г.Н. Изучение содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных в остром периоде ишемического инсульта / Г.Н. Жданов, М.М. Герасимова // Цитокины и воспаление. – 2006. – Т. 5, №1. – С. 27–30.
6. Лапач С.Н. Статистика в науке и бизнесе / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2002. – 639 с.
7. Липкан Г.Н. «АТФ-ЛОНГ» – представитель нового класса кардиотропных препаратов / Г.Н. Липкан, Л.С. Мхитарян, В.П. Кутняк // Журн. практичного лікаря. – 1999. – №4. – С. 56–59.
8. Мамчур В.И. Сравнительная характеристика антиоксидантного действия церебропротекторов в условиях экспериментальной подострой ишемии головного мозга / В.И. Мамчур, В.И. Жилюк, К.А. Кравченко // Новости медицины и фармации. – 2006. – №18 (200). – С. 15–16.
9. Манухина Е.Б. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите / Е.Б. Манухина, И.Ю. Мальшиев, Ю.В. Архипенко // Вест. РАМН. – 2000. – №4. – С. 16–21.
10. Пат. №13132 Україна, МПК (2006) G01N 33/52, C12Q 1/26, C12N 9/06. Спосіб визначення активності ферменту NO-синтази в гомогенатах тканин / Колесник Ю.М., Беленічев І.Ф., Абрамов А.В., Ганчева О.В., Бухтіярова Н.В., Количева Н.Л., Павлов С.В.; заявники і патентовласники Запорізький державний медичний університет, Колесник Ю.М., Беленічев І.Ф., Абрамов А.В., Ганчева О.В., Бухтіярова Н.В., Количева Н.Л., Павлов С.В. – №u200509119; заявл. 27.09.2005; опубл. 15.03.2006, Бюл. №3.
11. Проданчук Г.Н. Токсические метгемоглобинемии: механизмы формирования и пути оптимизации / Г.Н. Проданчук, Г.М. Баллан // Современ. пробл. токсикологии. – 2007. – №1. – С. 37–45.
12. Прохорова М.И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / М.И. Прохорова. – Л.: Изд-во Ленинградского университета. – 1982. – 272 с.
13. Реутов В.П. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, Н.С. Косицын – М.: Наука, 1998. – 159 с.
14. Соколовский В.В. Тиолдисульфидные соотношения крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма / В.В. Соколовский. – СПб., 1996. – 30 с.
15. Титов В.Ю. Предполагаемый механизм развития нитритиндуцированной метгемоглобинемии / Титов В.Ю., Петренко Ю.М. // Биохимия. – 2005. – Т.70, №4. – С. 575–587.
16. Магнієвісні препарати: фармакологічні властивості, застосування / І.С. Чекман, І.Ф. Беленічев, Н.О. Горчакова [та ін.] – Запоріжжя, К.: Вид-во ЗДМУ, 2007. – 124 с.
17. Davies M.J. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease / M. J. Fu S. Davies, H. Wang, R.T. Dean // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – Vol. 27, №11–12. – P. 1151–1163.