

УДК 616.12-008.331.1:616-092.4]-085:615.225.2:615.036.6

Нагорна О.О., Чекман І.С., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О.

ВПЛИВ АНГІОЛІНУ, ІРБЕСАРТАНУ, КВІНАПРИЛУ ТА ЇХ КОМБІНАЦІЙ НА ВМІСТ АДЕНІЛОВИХ НУКЛЕОТИДІВ, БІЛКІВ ТЕПЛООВОГО ШОКУ ТА МІТОХОНДРІАЛЬНУ ФУНКЦІЮ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ

Запорізький державний медичний університет

При спонтанній артеріальній гіпертензії порушення скорочувальної функції міокарду пов'язане з метаболічними і морфологічними змінами, які формуються при виникненні оксидативного стресу. У роботі використовували 8 нормотензивних білих безпородних щурів-самців масою 220-270 г і 48 щурів-самців зі спонтанною артеріальною гіпертензією (SHR) масою 220-300 г. Перед введенням препаратів у щурів всіх груп вимірювали артеріальний тиск методом плетизмографії. У міокарді нормотензивних щурів, а також тварин зі спонтанною артеріальною гіпертензією, визначали ступінь відкриття мітохондріальної пори (МП), вміст аденілових нуклеотидів, концентрацію білку теплового шоку HSP70 в мітохондріальній і цитозольній фракціях міокарда щурів згідно з методичними вказівками ДЕЦ МОЗ України. Впродовж 3 місяців тваринам вводили ангіолін, квінаприл, ірбесартан та їх композиції під контролем АТ. В міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією (SHR) зареєстровано відкриття МП; в мітохондріальній фракції гомогенату серця щурів при спонтанній артеріальній гіпертензії відзначено достовірне зменшення рівня АТФ в мітохондріальній і цитозольній фракціях кардіоміоцитів вмісту білка HSP70. Таким чином, в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією лінії SHR виявлено формування мітохондріальної дисфункції кардіоміоцитів, причиною якої є окислювальна модифікація білкових структур мітохондрій в умовах активації оксидативного стресу, що було встановлено нами в попередніх дослідженнях, а також відзначений дефіцит енергоутворення. Виявлено зниження рівня HSP70 в цитозольній і мітохондріальній фракціях міокарда щурів зі спонтанною гіпертензією, що є однією з причин формування мітохондріальної дисфункції. Ангіолін і, більшою мірою, його поєднання з квінаприлом і ірбесартаном зменшують явище мітохондріальної дисфункції, нормалізують оптичну щільність суспензій мітохондрій. У мітохондріальній і цитоплазматичній фракціях кардіоміоцитів ангіолін і його поєднання з квінаприлом і ірбесартаном підвищують рівень АТФ і концентрацію білка HSP70, що підтверджує реалізацію мітопротекторного ефекту ангіоліну та його комбінацій з інгібітором АПФ квінаприлом і блокатором рецепторів ангіотензину-II - ірбесартаном при артеріальній гіпертензії.

Ключові слова: ангіолін, квінаприл, ірбесартан, гіпертензія, білки теплового шоку, аденілові нуклеотиди, мітохондрії.

Дана робота є фрагментом НДР «Експериментальне обґрунтування комбінованого застосування кардіотропних препаратів» № держ. реєстрації 011U009417.

Вступ

Артеріальна гіпертензія є одним з найпоширеніших захворювань у світі та в Україні [10, 14, 20]. Незважаючи на пошук та впровадження ефективних антигіпертензивних препаратів [27, 28], адекватного контролю артеріального тиску [АТ] можна досягти приблизно у 1/3 європейців [20]. Саме тому продовжуються експериментальні та клінічні дослідження для уточнення патогенезу та, в першу чергу, біохімічних показників, що характеризують енергозбереження, показники окислювальної модифікації білків, білки теплового шоку та стан дисфункції мітохондрій.

Інгібітори ренін-ангіотензинової системи (іАПФ) та блокатори рецепторів ангіотензину II (БРА) широко ввійшли до клінічної практики для лікування артеріальної гіпертензії, інших серцево-судинних та супутніх захворювань (цукровий діабет, нефропатія та ін.) [14, 19]. Відносно ступеня зниження артеріального тиску ці дві групи препаратів практично не відрізняються [9]. Разом з тим, поряд з органопротекторною активністю, у деяких препаратів відзначають ендотеліопротективну дію. Подібна властивість відмічена у іАПФ-квінаприлу та БРА-ірбесартану [18, 31].

Наявність ендотеліопротективного ефекту

підвищує антигіпертензивну активність препаратів та їх органопротекцію [3]. В останні роки створений вітчизняний ендотеліопротектор – ангіолін, у якого при порушеннях мозкового кровообігу та при підвищенні артеріального тиску відмічають органопротекторну дію [14, 17]. Тому важливим було оцінити вплив ангіоліну, ірбесартану, квінаприлу та їх комбінацій на показники метаболізму та структури мітохондрій, що може допомогти пояснити їх механізм дії.

Мета дослідження

Вивчення впливу ангіоліну, квінаприлу, ірбесартану та їх комбінацій на вміст аденілових нуклеотидів, показники окислювальної модифікації білків, білків теплового шоку та мітохондріальну функцію в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією.

Об'єкт і методи дослідження

В роботі використовували 8 нормотензивних білих безпородних щурів-самців масою 220-270 г та 10 щурів-самців зі спонтанною артеріальною гіпертензією (SHR) в якості контролю, а також 40 щурів з SHR, яким вводили препарати протягом 3 місяців. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європей-

ської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Перед дослідженням щурів утримували в умовах віварію впродовж 20 днів. На 20-й день досліджень у щурів всіх груп тварин вимірювали артеріальний тиск методом плетизмографії за допомогою Transonі K Animal Research Flowmeter T-106 Series (USA). Пізніше вимірювали АТ через 3 місяці. Оскільки при артеріальній гіпертензії порушується не лише функція, а й метаболізм та морфологія міокарду, важливим було виявлення мітохондріальної дисфункції кардіоміоцитів, можливі зміни при цьому енергопродукції та рівня білків теплового шоку [13]. На 30-й день дослідження впливу препаратів тварин декапітували під тіопенталовим наркозом та вилучали серце для біохімічних досліджень. Серце промивали в охолоджену фізіологічному розчині та гомогенізували в рідкому азоті у ступці. Точну навіску розміщували в 0,15M KCl (кінцеве розведення 1:10). Цитоплазматичну фракцію виділяли методом диференційованого центрифугування на рефрижераторній центрифугі Sigma 3-30 K (Німеччина) при температурі (+4°C) в 10-кратному об'ємі середовища, що містить (в ммольях) сахарози 250, трис-HCl-буфера 20, ЕДТА-1 (рН 7,4). Для очистки мітохондріальної фракції від крупних клітинних фрагментів попередньо проводилось центрифугування протягом 7 хв при 1000 g, а потім супернатант повторно центрифугували протягом 20 хв при 17000g. Осад мітохондрій ресуспендували в середовище виділення, що містить бичий сироватковий альбумін (0,5 мг/мл) та знову осаджували протягом 10 хв при 17000g. Мітохондрії суспендували в середовищі виділення, суспензія містила 0,8-1,0 мг білка/мл. Безбілковий екстракт отримували додаванням точної навіски гомогената серця в хлорну кислоту (0,6M) з наступною нейтралізацією 5,0M калію карбонатом. В безбілковому екстракті проводилось кількісне визначення вмісту аденілових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) методом тонкошарової хроматографії на пластині «Силуфол». Після розділення в рухливій фазі, що складається з діоксану, ізопропанолу, води та аміаку в співвідношенні 4:2:4:1, нуклеотиди ідентифікували в ультрафіолетовому світлі (260 нм) по світопоглинанню елюатів. Результат розраховували по калібрувальній кривій та виражали в ммоль/г тканини.

Оскільки ознакою мітохондріальної дисфункції є порушення бар'єрних функцій їх мембран – нами проводилось дослідження процесу відкриття гігантських мітохондріальних пор (МП) в мітохондріях, виділених з тканин серця експериментальних тварин. Відкриття мембранної пори, тобто зміни бар'єрної функції мітохондріальних мембран визначали спектрофотометрично, як

зниження світопоглинання при 540 нм, викликане набуханням мітохондрій. Зміни оптичної щільності суспензії мітохондрій після впливу препаратів та при патології виражали показником ΔE . Процес індукували внесенням в інкубаційне середовище 50 мкмоль Ca^{2+} у позамітохондріальний простір. Після Ca^{2+} -перевантаження (ΔE) в досліджуваних зразках характеризувало інтенсивність процесу. Концентрацію білку теплового шоку HSP70 в цитоплазматичній та мітохондріальній фракціях гомогенату серця визначали методом Вестерн-блотаналізу. Білки розділяли в 10% поліакриламідному гелі (ПААГ). Перенос білків з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану здійснювали електроелюацією протягом 45 хв. Преінкубацію Вестерн-блотів проводили в розчині TBST з 5% знежиреним молоком протягом 1 години, потім Вестерн-блоти інкубували в присутності первинних моноклональних антитіл (SantaCruzBiotechnology), кон'югованих з пероксидазою Хрепа (розведення 1:1000) протягом 1 години. Детекцію HSP70 здійснювали за допомогою декситометрії в програмі Adobe Photoshop. Біохімічні дослідження проводили згідно Методичним рекомендаціям ДЕЦ МОЗ України[13]. Експериментальні тварини були розділені на 7 груп: 1 група нормотензивні щури; 2 група – щури з SHR, 3 група – щури з SHR, яким вводили ангіолін (50 мг/кг); 4 група – щури з SHR, яким вводили квінаприл (10 мг/кг); 5 група – щури з SHR, яким вводили квінаприл (10 мг/кг) та ангіолін (50 мг/кг); 6 група – щури, яким вводили ірбесартан (30 мг/кг); 7 група – щури, яким вводили ірбесартан (30 мг/кг) та ангіолін (50 мг/кг).

Результати досліджень оброблені із застосуванням статистичного пакету ліцензійної програми "STATISTICA® for Windows 6.0" (StatSoftIncNAXXR712D833214FANS), а також "SPSS 16.0", "Microsoft Excel 2003". Окремі статистичні процедури та алгоритми реалізовані у вигляді спеціально написаних макросів у відповідних програмах. Дані представлені у вигляді вибіркового середнього значення \pm стандартної помилки середнього значення. Аналіз нормальності розподілу оцінювали по критеріям Колмогорова-Смирнова (D) та Lilliefors, а також Shapiro-Wilk (W), якому надавали перевагу. Також в якості критеріїв згоди оцінювали величину асиметрії та ексцесу розподілу даних. Коли неможливо було відкинути нульову гіпотезу щодо статистично значимих відмінностей розподілу змінних від нормального, використовували непараметричні методи аналізу даних, а в інших випадках параметричні методи. Оцінка ступеню взаємозв'язку між парами незалежних ознак, виражених в кількісних шкалах, здійснювались за допомогою коефіцієнту рангової кореляції Pearson (r), P.Sreagman (R), в залежності від характеру розподілу змінних. Оцінку достовірності коефіцієнтів кореляції проводили, порівнюючи розраховані коефіцієнти з критичними (виходячи з властивостей коефіцієнтів кореляції та ступе-

нів свободи). Достовірність відмінностей між експериментальними групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента та U-критерію Уїтні-Манна. Для всіх видів аналізу статистично значимими вважали відмінності при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

У дослідженні оцінювався функціональний стан мітохондрій кардіоміоцитів щурів при спонтанній артеріальній гіпертензії, які активно залучаються в складну мережу внутрішньоклітинної регуляції метаболічних процесів, та зміни структури яких є головною причиною клітинної дегенерації. При патологічних процесах (артеріальна гіпертензія, ішемічна хвороба серця, серцева недостатність), які супроводжуються оксидативним стресом, мітохондрії можуть пошкоджуватись метаболітами, що утворюються під впливом активних форм кисню; при цьому можливо також вивільнення апоптичних факторів, що ініціюють клітинну загибель. Існує доказ, що, в свою чергу, центральна роль в продукції активних форм кисню (АФК) та подальший розвиток апоптозу належить мітохондріям, змінам проникності їх мембран в результаті формування дисфункції, утворення комплексу мітохондріальних пор та ініціюванню мітоптозу [2]. Розвиток міто-

хондріальної дисфункції веде до порушення зворотнього захоплення медіаторів, генерації та проведення імпульсу, синтезу білку, процесів трансляції та транскрипції, при яких активізуються паразитарні енергопродуруючі реакції [30]. Під дією гідроксилрадикалу відбувається відкриття мітохондріальних пор, з експресією та виходом в цитозоль проапоптичних білків [25]. Відкриття пор відбувається за рахунок окиснення тіольних груп цистеїнзалежного білку внутрішньої мембрани мітохондрій, що попереджує його проникнення у неспецифічний канал [3]. У щурів з SHR існують генетичні особливості клітинних мембран мітохондрій, ініціюючих виникнення недостатності мембранної регуляції внутрішньоклітинного кальцію з накопиченням в цитоплазмі високих концентрацій вільних іонів кальцію. Швидкість відкриття мітохондріальних пор тісно поєднана з інтенсивністю окислювальної модифікації білків мітохондрій та концентрацією кальцію всередині мітохондрій, які прискорюють пошкодження мітохондрій (відкриття пор). У щурів з SHR нами зареєстровано підвищення швидкості спонтанного відкриття МП та набрякання мітохондрій міокарду щурів з артеріальною гіпертензією, що свідчить про їх пошкодження (табл. 1).

Таблиця 1

Реєстрація ступеню відкриття мітохондріальної пори у щурів з артеріальною гіпертензією

Група тварин	ΔE
Нормотензивні щури (інтактні, n=8)	0,018±0,001
Щури з SHR (n=10)	0,146±0,012*
Щури з SHR+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	0,087±0,005**
Щури з SHR+квінаприл (10мг/кг) (n=8)	0,117±0,018**
Щури з SHR+Квінаприл (10мг/кг)+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	0,047±0,003**
Щури з SHR+ірбесартан (30мг/кг) (n=8)	0,103±0,011**
Щури з SHR+ірбесартан (30мг/кг)+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	0,022±0,002**

Примітка: в даній та наступних таблицях

* $P \leq$ зміни достовірні по відношенню до тварин інтактної групи

** $P \leq$ зміни достовірні щодо щурів з SHR.

Препарати ангіолін, квінаприл, ірбесартан, а також їх комбінації зменшують оптичну щільність суспензії мітохондрій. Так, у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією відмічено зростання оптичної щільності суспензії мітохондрій щурів (ΔE зростає у 8 раз), що свідчить про підвищення набрякання мітохондрій та відкритті МП.

Ангіолін зменшує ΔE на 40%, квінаприл на 19%, квінаприл з ангіоліном – на 67%, ірбесартан – на 23%, ірбесартан з ангіоліном – в 6,6 раз. Отримані експериментальні дані свідчать про наявність мітопротекторної активності у всіх препаратів, однак ця активність більш виражена при застосуванні ірбесартану з ангіоліном.

Механізми закриття/відкриття МП діють у функціональній єдності, здійснюючи перетворення та посилення сигналів, що надходять при активації інозитолу–1,4,5–трифосфат–спряжених рецепто-

рів, опосередковуючи регуляцію зв'язку між функціональним відділом та енергетичними процесами клітини [24]. У щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією (SHR щурів) підвищується показник, що характеризує набрякання мітохондрії, що, в свою чергу, має призвести до енергодефіциту [15,22]. Зміни рівня аденілових нуклеотидів в мітохондріальній та цитозольній фракціях при цьому характеризуються пониженням рівня АТФ: в цитозольній фракції на 39%, в мітохондріальній фракції на 35%. В цитозольній фракції також зростає рівень АМФ на 30%, в мітохондріальній фракції знижується рівень АДФ на 43%.

Джерелом енергодефіциту тканин при артеріальній гіпертензії вважають формування мітохондріальної дисфункції, можливе накопичення кальцію та окислювальна модифікація білків [11,12].

Таблиця 2
Вміст аденілових нуклеотидів в цитозольній фракції гомогенату серця щурів

Групи тварин	АТФ мкмоль/г тканини	АДФ мкмоль/г тканини	АМФ мкмоль/г тканини
Нормотензивні щури (n=8)	3,49±0,15	0,53±0,02	0,16±0,01
Щури з SHR (n=10)	2,12±0,09	0,32±0,03	0,23±0,01
Щури з SHR+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	2,34±0,01*	0,41±0,03*	0,17±0,01
Щури з SHR+квінаприл (10мг/кг) (n=8)	2,11±0,01	0,30±0,04	0,23±0,02
Щури з SHR+квінаприл(10мг/кг)+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	3,37±0,10**	0,46±0,02**	0,18±0,02**
Щури з SHR+ірбесартан(30мг/кг) (n=8)	2,17±0,01	0,32±0,02	0,22±0,01
Щури з SHR+ірбесартан(30мг/кг)+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	3,48±0,12**	0,50±0,03**	0,17±0,01**

Ангіолін інтенсифікує енергоутворення як в цитозольній, так і в мітохондріальній фракціях, що підтверджує раніше вказані дані щодо його здатності інтенсифікувати процеси енергоутворення (табл. 2, 3) [4]. Ірбесартан та квінаприл не здійснюють достовірний вплив на вміст аденілових нуклеотидів в цитозольній та мітохондріаль-

ній фракціях, проте в поєднанні з ангіоліном відновлюють рівень АТФ, що пояснює властивість ангіоліну пригнічувати продукцію маркерів окислювальної модифікації білкових фрагментів іонних, зокрема кальцієвих каналів, пониженню кальцієвого перенавантаження мітохондрій та відновленню їх енергопродукуючої функції [6].

Таблиця 3
Вміст аденілових нуклеотидів в мітохондріальній фракції гомогенату серця щурів

Групи тварин	АТФ мкмоль/г тканини	АДФ мкмоль/г тканини	АМФ мкмоль/г тканини
Нормотензивні щури (n=8)	2,78±0,11	0,55±0,016	0,20±0,02
Щури з SHR (n=10)	1,81±0,06*	0,31±0,04*	0,27±0,015
Щури з SHR+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	2,17±0,03*	0,43±0,011	0,24±0,05
Щури з SHR+квінаприл (10мг/кг) (n=8)	1,80±0,04	0,33±0,011	0,7±0,02
Щури з SHR+квінаприл (10мг/кг)+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	2,50±0,06**	0,50±0,015*	0,22±0,01
Щури з SHR+ірбесартан (30мг/кг) (n=8)	1,93±0,03	0,33±0,011	0,26±0,05
Щури з SHR+ірбесартан (30мг/кг)+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	2,63±0,05**	0,51±0,012**	0,21±0,02

Таблиця 4
Концентрація HSP70 в гомогенаті серця експериментальних тварин

Групи тварин	HSP70, у.о./г білку	
	Цитозольна фракція	Мітохондріальна фракція
Нормотензивні щури (n=8)	8,782±0,304	6,515±0,264
Щури з SHR (n=10)	2,326±0,32*	0,758±0,304*
Щури з SHR+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	5,242±0,301**	2,783±0,172**
Щури з SHR+квінаприл (10мг/кг) (n=8)	2,450±0,213	0,783±0,354
Щури з SHR+квінаприл (10мг/кг)+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	6,671±0,288**	2,821±0,115**
Щури з SHR+ірбесартан (30мг/кг) (n=8)	2,438±0,172	0,811±0,464
Щури з SHR+ірбесартан (30мг/кг)+ангіолін (50мг/кг) (n=8)	7,114±0,241**	3,241±0,141**

Певним показником дисфункції мітохондрій є встановлене зниження білку теплового шоку 70 в цитозольній (в 6,3 рази) та мітохондріальній фракціях (в 8,1 рази) гомогенату серця SHR щурів у порівнянні із нормотензивними тваринами. Порушення проникності внутрішньоклітинних мембран мітохондрій, що веде до утворення МП, прогнозує вихід ряду матриксних білків [3]. Нами вперше виявлено зниження вмісту білку теплового шоку HSP70 в цитозольній та мітохондріальній фракціях гомогенату серця SHR щурів порівняно з нормотензивними тваринами (табл. 4).

Відома індукція білків теплового шоку у відповідь на дію багатьох стресових факторів [5,7], у тому числі на гіпоксію, що може супроводжувати артеріальну гіпертензію. Більшість захисних функцій HSP70 пов'язані з їх шаперогенною активністю [23], тобто здатністю виявляти пошкоджені або знову синтезовані поліпептиди та виправляти їх структуру АТФ– опосередкованим шляхом, а також видаляти білки, що не підляга-

ють виправленню, через протеосомний апарат. В останній час з'явилися дані щодо регуляції дії HSP70 на явище мітохондріальних дисфункцій, що розвиваються і при ішемічному ураженні головного мозку [3]. Було також встановлено в умовах *in vitro*, що HSP70 здатний попереджувати фрагментацію окислювальних пошкоджень [25] глутатіон-S-трансферази, глутатіонредуктази, супероксиддисмутази, лактатдегідрогенази, малатдегідрогенази, регулювати тіолдисульфідну рівновагу. Крім того, однією з основних функцій HSP70 є індукція, а також збільшення тривалості життя стабільної форми HIF-1a, що включає подальші пристосувальні реакції в клітині [29]. Нами встановлено, що HSP70, «продовжує» дію HIF-1a, а також самостійно регулює експресію НАД-малатдегідрогенази мітохондрій, тим самим довготривало підтримуючи активність компенсаторного механізму вироблення АТФ – малат-аспартатного човникового механізму [16]. Дефіцит HSP70 – одна з причин

формування мітохондріальної дисфункції з усіма впливаючими наслідками для життєдіяльності клітини. Дефіцит HSP70 в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією може бути пов'язаний з мітохондріальною дисфункцією [31,32,33], порушенням прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, підвищенням маркерів окислювальної модифікації білків, що встановлено нами в попередніх дослідженнях. Можливо, відбувається підвищення продукції активних форм кисню, цитотоксичних форм оксиду азоту, що веде до модифікації (зворотньої та незворотньої) макромолекул, в тому числі і самого HSP70, зниженню експресійної активності генів, що знижують синтез даного білку.

В міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією лінії SHR виявлено формування мітохондріальної дисфункції кардіоміоцитів, причиною якої є окислювальна модифікація білкових структур мітохондрій в умовах активації окислятивного стресу, що було встановлено в попередніх дослідженнях [6]. В свою чергу, виявлений дефіцит HSP70 в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією є однією з причин формування мітохондріальної дисфункції.

Ангіолін збільшує кількість HSP70 як в цитозольній, так і в мітохондріальній фракціях кардіоміоцитів, що свідчить про здатність препарату зменшувати прояви мітохондріальної дисфункції та підвищувати стійкість організму до пошкоджуючих факторів. Квінаприл та ірбесартан практично не впливали на рівень HSP70 в обох фракціях, однак при введенні даних сполук їх дія у відношенні концентрації HSP70 реалізувалось, можливо, в результаті потенціювальних ефектів інгібіторів АПФ та БРА з ендотеліопротектором, що ймовірно буде попереджати пригнічування активності антиоксидантних ферментів та компонентів малат-аспартатного шунта. При цьому найбільш виражений нормалізуючий ефект відносно змін оптичної щільності мітохондрій, рівня АТФ та концентрації білку в цитозольній та мітохондріальній фракціях кардіоміоцитів має квінаприл та ірбесартан, поєднанні з ангіоліном, що є підставою для їх спільного застосування.

Висновки

1. В міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією (SHR) зареєстровано відкриття МП на підставі збільшення оптичної щільності суспензії мітохондрій, зниження рівня АТФ та білку HSP70 в цитозольній та мітохондріальній фракціях кардіоміоцитів.

2. Ангіолін, а також його поєднання з квінаприлом та ірбесартаном при внутрішньошлунковому введенні шурам зі спонтанною артеріальною гіпертензією попереджає відкриття мітохондріальної пори та нормалізує вміст аденілових нуклеотидів та білку HSP70 в цитозольній та мітохондріальній фракціях кардіоміоцитів.

Перспективи подальших досліджень

У подальшій роботі ми плануємо дослідити вплив Ангіоліну, Ірбесартану, Квінаприлу та їх комбінацій на показники тіол-дисульфідної системи та системи оксиду азоту.

Література

1. Беленичев И.Ф. Соединение L-лизина в фармакокоррекции нарушенной энергетического метаболизма головного мозга при моделировании геморрагического инсульта / И.Ф. Беленичев, А.А. Егоров // Фармакология та лікарська токсикологія. – 2013. – № 6. – С. 3-8.
2. Беленичев И.Ф. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция Цереброкурином / И.Ф. Беленичев, Ю.М. Колесник, С.В. Павлов [и др.] // Международный неврологический журнал. – 2008. – № 4 (20). – С. 23–29.
3. Беленичев И.Ф. Нейропротекция и нейропластичность / [И.Ф. Беленичев, В.И. Черный, Е.А. Нагорная и др.]. – К. : Логос, 2015. – 512 с.
4. Егоров А.А. Состояние энергетического обмена при остром нарушении мозгового кровообращения и его модуляция производными L-лизина / А.А. Егоров, И.Ф. Беленичев, И.А. Мазур [и др.] // Патология. – 2010. – Т. 7, № 1. – С. 50–52.
5. Камышный А.М. Белки теплового шока: структура, шаперогенные функции, антиапоптотические эффекты, механизмы участия в патогенезе аутоиммунных заболеваний / А.М. Камышный, Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов [и др.] // Запорозький медичинський журнал. – 2008. – Т. 51, № 6. – С. 39–47.
6. Нагорна О.О. Вплив ангіоліну, ірбесартану, квінаприлу та їх сполучення на показники окислювальної модифікації білків кардіоміоцитів щурів при артеріальній гіпертензії / О.О. Нагорна, І.С. Чекман, І.Ф. Беленичев [та ін.] // Вісник проблем біології та медицини. – 2015. – Вип.2, Т.4 (121). – С. 161–164.
7. Никитин К.Д. Белки теплового шока: биологические функции и перспективы применения / К.Д. Никитин // Клиническая онкогематология. – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 125–130.
8. Постнов Ю.В. Недостаточность образования АТФ в связи с кальциевой перегрузкой митохондрий как источник повышения артериального давления при первичной гипертензии / Ю.В. Постнов // Кардиология. – 2005. – Т. 55, № 10. – С. 4–11.
9. Радченко А.Д. Нужны ли споры на тему: лучше сартаны или ингибиторы АПФ? (часть 1) / А.Д. Радченко // Артериальная гипертензия. – 2014. – № 2. – С. 97–111.
10. Сиренко Ю.М. Гіпертонічна хвороба і артеріальні гіпертензії / Ю.М. Сиренко. – Донецьк : Видавець Заславський О.Ю., 2011. – 304 с.
11. Струтинська Н.А. Підвищена чутливість мітохондріальної пори до Ca²⁺ у серці щурів зі спонтанною гіпертензією / Н.А. Струтинська, Н.О. Дорофеева, Г.Л. Вавилова, В.Ф. Сагач // Фізіол. журнал. – 2012. – Т. 52, № 6. – С. 3–8.
12. Судяков Н.П. Митохондриальная дисфункция в механизмах атерогенеза / Н.П. Судяков, С.Б. Никифоров, Ю.М. Константинов [и др.] // Бюллетень ВКНЦ СО РАМН. – 2007. – № 2 (54). – С. 119–123.
13. Чекман И.С. Доклиническое изучение активности потенциальных нейропротективных препаратов. Методические рекомендации / [И. С. Чекман, Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев и др.]. – К, 2010. – 81 с.
14. 2013ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. The task force for management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) // Journal of hypertension. – 2013. – Vol. 31. – P. 1281–1357.
15. Ajith T.A. Mitochondria-targeted agents: Future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases / T.A. Ajith, T.G. Jayakumar // World J. Cardiol. – 2014. – Vol. 6, № 10. – P. 1091–1099.
16. Belenichev I.F. Malate-aspartate shuntin neuronal adaptation to ischemic conditions: molecular-biochemical mechanisms of activation and regulation / I.F. Belenichev, Yu.M. Kolesnik, N.V. Bukhtiyrova, S.V. Pavlov // Neurochemical Journal. – 2012. – Vol. 29, №1. – P. 28–34.
17. Belenichev I.F. The endothelium-protective effect of 3-methyl-1,2,4-triazol-5-thioacetate (S)-2,6-diaminohexanic acid (Lysinium): effect in the expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and the characteristics of the endotheliocytes of the cerebral vessels of animals with cerebral ischemia / I.F. Belenichev, I.A. Mazur, A.V. Abramov [et al.] // Neuro-chemical journal. – 2013. – Vol. 7, № 4. – P. 296–302.
18. Bramlage P. The value of irbesartan in the management hypertension / P. Bramlage, J. Durand-Zaleski, N. Desai [et al.] // Expert. Opin. Pharmacother. – 2009. – Vol.10. – P. 1817–1831.
19. Davis L.L. Hypertension guidelines: Evidence-based treatments for maintaining blood pressure control / L.L. Davis // Nurs Pract. – Vol. 40, № 6. – P. 32–37.

20. Franklin S.S. Masked hypertension: a phenomenon of measurement / S.S. Franklin, E.O. Brien, L.Things [et.al.] // *Hypertension*. – 2015. – Vol. 65. – P. 16–20.
21. Grassi G. Blood pressure control and cardiovascular risk profile in hypertensive patients from central and eastern European countries: results of the BP-CARE study / G. Grassi, R. Ciflova, S. Lattrent [et.al.] // *Eur. Heart J.* – 2011. – Vol. 32. – P. 218–225.
22. Hammerling B.C. Mitochondrial quality control in the myocardium: cooperation between protein degradation and mitophagy / B. C. Hammerling, Å. B. Gustafsson // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2014. – Vol. 75. – P. 122–130.
23. Harada Y. Sulfatide-HSP70 interaction promotes HSP70 clustering and stabilizes binding to unfolded protein / Y. Harada, C. Sato, K. Kitajima // *Biomolecules*. – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 958–973.
24. Hollander J.M. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies / J. M. Hollander, D. Thapa, D. L. Shepherd // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2014. – Vol. 307, № 1. – P. 1–14.
25. Milane L. Mitochondrial biology, targets, and drug delivery / L. Milane, M. Trivedi, A. Singh [et al.] // *J. Control. Release*. – 2015. – Vol. 207. – P. 40–58.
26. Mogk A. Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation / Mogk A., Kummer E., Bukau B. [et al.] // *Front. Mol. Biosci.* – 2015. – Vol. 2. – e22.
27. Oparil S. New approaches in the treatment of hypertension / S. Oparil, R. E. Schmieder // *Circ. Res.* – 2015. – Vol. 116, № 6. – P. 1074–1079.
28. Pérez-Escamilla B. Identification of validated questionnaires to measure adherence to pharmacological antihypertensive treatments / B. Pérez-Escamilla, L. Franco-Trigo, J.C. Moullin [et al.] // *Patient Prefer Adherence*. – 2015. – Vol. 9. – P. 569–578.
29. Ran R. HSP70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling / R. Ran, A. Lu, L. Zhang [et al.] // *Genes Develop.* – 2004. – № 18. – P. 1466–1481.
30. Roy M. Mitochondrial division and fusion in metabolism / M. Roy, P.H. Reddy, M. Iijima, H. Sesaki // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 111–118.
31. Stassen J.A. Evidence that new antihypertensives are superior to older drugs / J.A. Stassen, W.H. Birkenhager // *lancet*. – 2005. – Vol. 36. – P. 869–871.
32. Zhang Y. Dendritic-tumor fusion cells derived heat shock protein70-Peptide complex has enhanced immunogenicity / Y. Zhang, Y. Zhang, J. Chen // *PLoSOne*. – 2015. – Vol. 10, № 5. – e0126075.
33. Zhang Y. Enhanced antitumor immunity of nanoliposome-encapsulated heat shock protein 70 peptide complex derived from dendritic tumor fusion cells / Y. Zhang, W. Luo, Y. Wang [et al.] // *Oncol.Rep.* – 2015. – Vol. 33, № 6. – P. 2695–2702.
10. Sirenko Ju.M. Gipertonichna hvoroba i arterial'ni gipertenzii / Ju.M. Sirenko. – Donec'k : Vidavec' Zaslavsk'ij O.Ju., 2011. – 304 s.
11. Strutins'ka N.A. Pidvishhena chutlivist' mitohondrial'noi pori do Ca2+ u serci shhuriv iz spontannoju gipertenzieju / N.A. Strutins'ka, N.O. Dorofeeva, G.L. Vavilova, V.F. Sagach // *Fiziol. zhurnal*. – 2012. – T. 52, № 6. – S. 3–8.
12. Sudakov N.P. Mitohondrial'naja disfunkcija v mehanizmah aterogeneza / N.P. Sudakov, S.B. Nikiforov, Ju.M. Konstantinov [i dr.] // *Bjulleten' VKNC SO RAMN*. – 2007. – № 2 (54). – S. 119–123.
13. Chekman I.S. Doklinicheskoe izuchenie aktivnosti potencial'nyh nejroprotektivnyh preparatov. Metodicheskie rekomendacii / [I. S. Chekman, Ju.I. Gubskij, I.F. Belenichev i dr.]. – K, 2010. – 81 s.
14. 2013ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. The task force for management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) // *Journal of hypertension*. – 2013. – Vol. 31. – P. 1281–1357.
15. Ajith T.A. Mitochondria-targeted agents: Future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases / T.A. Ajith, T.G. Jayakumar // *World J. Cardiol.* – 2014. – Vol. 6, № 10. – P. 1091–1099.
16. Belenichev I.F. Malate-aspartate shuntin neuronal adaptation to ischemic conditions: molecular-biochemical mechanisms of activation and regulation / I.F. Belenichev, Yu.M. Kolesnik, N.V. Bukhtiyrova, S.V. Pavlov // *Neurochemical Journal*. – 2012. – Vol. 29, №1. – P. 28–34.
17. Belenichev I.F. The endothelium-protective effect of 3-methyl-1,2,4-triazol-5-thioacetate (S)-2,6-diaminohehexanic acid (Lysinium): effect in the expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and the characteristics of the endothelocytes of the cerebral vessels of animals with cerebral ischemia / I.F. Belenichev, I.A. Mazur, A.V. Abramov [et al.] // *Neuro-chemical journal*. – 2013. – Vol. 7, № 4. – P. 296–302.
18. Bramlage P. The value of irbesartan in the management hypertension / P. Bramlage, J. Durand-Zaleski, N. Desai [et al.] // *Expert. Opin. Pharmacother.* – 2009. – Vol.10. – P. 1817–1831.
19. Davis L.L. Hypertension quidelines: Evidence-based treatments for maintaining blood pressure control / L.L. Davis // *Nurs Pract.* – Vol. 40, № 6. – P. 32–37.
20. Franklin S.S. Masked hypertension: a phenomenon of measurement / S.S. Franklin, E.O. Brien, L.Things [et.al.] // *Hypertension*. – 2015. – Vol. 65. – P. 16–20.
21. Grassi G. Blood pressure control and cardiovascular risk profile in hypertensive patients from central and eastern European countries: results of the BP-CARE study / G. Grassi, R. Ciflova, S. Lattrent [et.al.] // *Eur. Heart J.* – 2011. – Vol. 32. – P. 218–225.
22. Hammerling B.C. Mitochondrial quality control in the myocardium: cooperation between protein degradation and mitophagy / B. C. Hammerling, Å. B. Gustafsson // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2014. – Vol. 75. – P. 122–130.
23. Harada Y. Sulfatide-HSP70 interaction promotes HSP70 clustering and stabilizes binding to unfolded protein / Y. Harada, C. Sato, K. Kitajima // *Biomolecules*. – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 958–973.
24. Hollander J.M. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies / J. M. Hollander, D. Thapa, D. L. Shepherd // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2014. – Vol. 307, № 1. – P. 1–14.
25. Milane L. Mitochondrial biology, targets, and drug delivery / L. Milane, M. Trivedi, A. Singh [et al.] // *J. Control. Release*. – 2015. – Vol. 207. – P. 40–58.
26. Mogk A. Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation / Mogk A., Kummer E., Bukau B. [et al.] // *Front. Mol. Biosci.* – 2015. – Vol. 2. – e22.
27. Oparil S. New approaches in the treatment of hypertension / S. Oparil, R. E. Schmieder // *Circ. Res.* – 2015. – Vol. 116, № 6. – P. 1074–1079.
28. Pérez-Escamilla B. Identification of validated questionnaires to measure adherence to pharmacological antihypertensive treatments / B. Pérez-Escamilla, L. Franco-Trigo, J.C. Moullin [et al.] // *Patient Prefer Adherence*. – 2015. – Vol. 9. – P. 569–578.
29. Ran R. HSP70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling / R. Ran, A. Lu, L. Zhang [et al.] // *Genes Develop.* – 2004. – № 18. – P. 1466–1481.
30. Roy M. Mitochondrial division and fusion in metabolism / M. Roy, P.H. Reddy, M. Iijima, H. Sesaki // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 111–118.
31. Stassen J.A. Evidence that new antihypertensives are superior to older drugs / J.A. Stassen, W.H. Birkenhager // *lancet*. – 2005. – Vol. 36. – P. 869–871.
32. Zhang Y. Dendritic-tumor fusion cells derived heat shock protein70-Peptide complex has enhanced immunogenicity / Y. Zhang, Y. Zhang, J. Chen // *PLoSOne*. – 2015. – Vol. 10, № 5. – e0126075.
33. Zhang Y. Enhanced antitumor immunity of nanoliposome-encapsulated heat shock protein 70 peptide complex derived from dendritic tumor fusion cells / Y. Zhang, W. Luo, Y. Wang [et al.] // *Oncol.Rep.* – 2015. – Vol. 33, № 6. – P. 2695–2702.

References

1. Belenichev I.F. Soedinenie L-lizina v farmakokorrekcii narushenij jenergeticheskogo metabolizma golovnogo mozga pri modelirovanii gemorragicheskogo insul'ta / I.F. Belenichev, A.A. Egorov // *Farmakologija ta likars'ka toksikologija*. – 2013. – № 6. – S. 3-8.
2. Belenichev I.F. Mitohondrial'naja disfunkcija pri cerebral'noj patologii. Nejroprotekcija Cerebrokurinom / I.F. Belenichev, Ju.M. Kolesnik, S.V. Pavlov [i dr.] // *Mezhdunarodnyj nevrologicheskij zhurnal*. – 2008. – № 4 (20). – S. 23–29.
3. Belenichev I.F. Nejroprotekcija i nejroplastichnost' / [I.F. Belenichev, V.I. Chernyj, E.A. Nagornaja i dr.]. – K. : Logos, 2015. – 512 s.
4. Egorov A.A. Sostojanie jenergeticheskogo obmena pri ostrom narushenii mozgovogo krovoobrashhenija i ego moduljacija proizvodnymi L-lizina / A.A. Egorov, I.F. Belenichev, I.A. Mazur [i dr.] // *Patologija*. – 2010. – T. 7, № 1. – S. 50–52.
5. Kamyshnyj A.M. Belki teplovogo shoka: struktura, shaperogennye funkcii, antiapopticheskie jeffekty, mehanizmy uchastija v patogeneze autoimunnyh zabolevanij / A.M. Kamyshnyj, Ju.M. Kolesnik, A.V. Abramov [i dr.] // *Zaporozhskij medicinskij zhurnal*. – 2008. – T. 51, № 6. – S. 39–47.
6. Nagorna O.O. Vpliv angiotinu, irbesartanu, kvinaprilu ta ih spoluchennja na pokazniki okslijuval'noi modifikacii bilkiv kardiomiocitiv shhuriv pri arterial'nij gipertenzii / O.O. Nagorna, I.S. Chekman, I.F. Belenichev [ta in.] // *Visnik problem biologii ta medicini*. – 2015. – Vip.2, T.4 (121). – S. 161–164.
7. Nikitin K.D. Belki teplovogo shoka: biologicheskie funkcii i perspektivy primenenija / K.D. Nikitin // *Klinicheskaja onkogematologija*. – 2008. – T. 1, № 2. – S. 125–130.
8. Postnov Ju.V. Nedostatocnost' obrazovanija ATF v svjazii s kal'cievoj peregruzkoj mitohondrij kak istochnik povyshenija arterial'nogo davlenija pri pervichnoj gipertenzii / Ju.V. Postnov // *Kardiologija*. – 2005. – T. 55, № 10. – S. 4–11.
9. Radchenko A.D. Nuzhny li spory na temu: luchshe sartany ili ingibitory APF? (chast' 1) / A.D. Radchenko // *Arterial'naja gipertenzija*. – 2014. – № 2. – S. 97–111.

Реферат

ВЛИЯНИЕ АНГИОЛИНА, ИРБЕСАРТАНА, КВИНАПРИЛА И ИХ КОМБИНАЦИЙ НА СОДЕРЖАНИЕ АДЕНИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ, БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА И МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ

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

Ключевые слова: ангиолин, квинаприл, ирбесартан, гипертензия, белки теплового шока, адениловые нуклеотиды, митохондрии.

При спонтанной артериальной гипертензии нарушение сократительной функции миокарда связано с метаболическими и морфологическими изменениями, которые формируются при возникновении оксидативного стресса. В работе использовали 8 нормотензивных белых беспородных крыс-самцов массой 220-270 г и 48 крыс-самцов со спонтанной артериальной гипертензией (SHR) массой 220-300 г. Перед введением препаратов у крыс всех групп измеряли артериальное давление методом плетизмографии. В миокарде нормотензивных крыс, а также животных со спонтанной артериальной гипертензией, определяли степень открытия митохондриальной поры (МП), содержание адениловых нуклеотидов, концентрацию белка теплового шока HSP70 в митохондриальной и цитозольной фракциях миокарда крыс согласно методическим указаниям ДЭЦ МОЗ Украины. В течение 3 месяцев животным вводили ангиолин, квинаприл, ирбесартан и их комбинации под контролем АД. В миокарде крыс со спонтанной артериальной гипертензией (SHR) зарегистрировано открытие МП; в митохондриальной фракции гомогената сердца крыс при спонтанной артериальной гипертензии отмечено достоверное уменьшение уровня АТФ и содержания белка HSP70 в митохондриальной и цитозольной фракциях кардиомиоцитов. Таким образом, в миокарде крыс со спонтанной артериальной гипертензией линии SHR выявлено формирование митохондриальной дисфункции кардиомиоцитов, причиной которой является окислительная модификация белковых структур митохондрий в условиях активации оксидативного стресса, что было установлено нами в предыдущих исследованиях, а также отмечен дефицит энергообразования. Обнаружено снижение уровня HSP70 в цитозольной и митохондриальной фракциях миокарда крыс со спонтанной гипертензией, что является одной из причин формирования митохондриальной дисфункции. Ангиолин и в большей степени его сочетание с квинаприлом и ирбесартаном уменьшают явление митохондриальной дисфункции, нормализуя оптическую плотность суспензий митохондрий. В митохондриальной и цитоплазматической фракциях кардиомиоцитах ангиолин и его комбинации с квинаприлом и ирбесартаном повышают уровень АТФ и концентрацию белка HSP70, что подтверждает реализацию митопротекторного эффекта ангиолина и его сочетания с ингибитором АПФ квинаприлом и блокатором рецепторов ангиотензина-II-ирбесартаном при артериальной гипертензии.

Summary

INFLUENCE OF ANGIOLIN, IRBESARTAN, QUINAPRIL AND ITS COMBINATION ON ADENYL NUCLEOTIDES AND HEAT SHOCK PROTEINS CONTENTS, AND MITOCHONDRIAL FUNCTION

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

Key words: angiolin, quinapril, irbesartan, hypertension, heat shock proteins, adenine nucleotides, the mitochondria.

In spontaneous hypertension the disorders of myocardial contractility are often associated with metabolic and morphological changes, which develop due to oxidative stress. We used 8 normotensive albino male rats weighing 220-270 g and 48 male rats with spontaneous hypertension (SHR) weighing 220-300 g. Before the introduction of drugs we measured blood pressure by plethysmography in rats of all groups. In the myocardium of normotensive rats and animals with spontaneous hypertension we assessed the degree of opening of mitochondrial pore (MP), the content of adenine nucleotides, concentration of HSP70 protein in the mitochondrial and cytosolic fractions of rat myocardium according to methodical instructions of the Ministry of the Health of Ukraine. Within three months the animals were administered angiolin, quinapril, irbesartan and their combinations under the blood pressure control. In the myocardium of rats with spontaneous hypertension (SHR) we found MP; the mitochondrial fraction of homogenate of rat heart in spontaneous hypertension showed a significant decrease in the level of ATP and protein HSP70 in the mitochondrial and cytosolic fractions of cardiomyocytes. Thus, we found the mitochondrial dysfunction of cardiomyocytes developed in the myocardium of the rats with spontaneous SHR line hypertension that was caused by oxidative modification of protein structure in terms of activation of mitochondrial oxidative stress as our previous reports demonstrated. We also found out a decrease in the level of HSP70 in the cytosolic and mitochondrial fractions of myocardial spontaneously hypertensive rats that was one of the causes of mitochondrial dysfunction. Angiolin and, more often, its combinations with irbesartan and quinapril reduce the phenomenon of mitochondrial dysfunction, normalizing the optical density of suspensions of mitochondria. In the mitochondrial and cytoplasmic fractions of cardiomyocytes angiolin and its combination with irbesartan and quinapril raise the level of ATP and a protein concentration of HSP70 that confirms the mitoprotective effect produced by angiolin and its combinations with ACE inhibitor, quinapril, and angiotensin-receptor blocker of irbesartan-II in arterial hypertension.