

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

Нагорна О.О., Бєленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Мазур І.А., Кучеренко Л.І., Чекман І.С.

ВПЛИВ АНГІОЛІНУ НА ПОКАЗНИКИ ТІОЛ-ДИСУЛЬФІДНОЇ СИСТЕМИ В МІОКАРДІ ЩУРІВ З ХРОНІЧНОЮ СЕРЦЕВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ

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

Вазодилатація взаємопов'язана як з показниками системи оксиду азоту, так і тіол-дисульфідної системи. Тому важливим було визначення впливу прямого ендотеліопротектору ангіоліну та непрямого мілдронату на показники тіол-дисульфідної системи в міокарді щурів з хронічною серцевою недостатністю. Дослідні групи включали інтактних щурів, щурів з хронічною серцевою недостатністю, щурів з хронічною серцевою недостатністю, яким вводили ангіолін в дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково, щурів з хронічною серцевою недостатністю, яким вводили внутрішньошлунково мілдронат в дозі 250 мг/кг. Доксорубіцинову кардіоміопатію моделювали за загальноприйнятим методом – шляхом внутрішньоочередивного введення доксорубіцину протягом 14 днів через день в дозі 15 мг/кг. В міокарді щурів на 35 день визначали показники тіол-дисульфідної системи, а саме вміст метіоніну, цистеїну, загальних відновлених суфгідрильних груп, глутатіону відновленого, глутатіону окисненого та активності глутатіонредуктази. Встановлено, що при хронічній серцевій недостатності в міокарді щурів ангіолін підвищує рівень цистеїну, метіоніну, загальних відновлених суфгідрильних груп, глутатіону відновленого, активності глутатіонредуктази на фоні падіння вмісту глутатіону окисненого. У мілдронату не визначено достовірного впливу на вищезазначені показники.

Ключові слова: ангіолін, мілдронат, хронічна серцева недостатність, показники тіол-дисульфідної системи.

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

Вступ

Широка розповсюдженість серцевої недостатності та ішемічного пошкодження міокарду вимагають впровадження в медичну практику засобів метаболічної терапії, у яких виражені як цитопротекторні, так і ендотеліопротекторні властивості [3,6,7]. Виділяєма ендотелієм NO грає важливу роль в регуляції багатьох функцій серцево-судинної системи, включаючи вазорелаксацію, міграцію и проліферацію клітин гладеньких м'язів, а також агрегацію тромбоцитів [12]. При патологічних станах порушення утворення оксиду азоту відбувається паралельно зі зміщенням показників тіол-дисульфідної системи [1]. Інтермедіати тіол-дисульфідної системи мають транспортні властивості відносно NO, підвищуючи його біодоступність [8]. Саме ендотеліопротектори прямої дії (ангіолін [2]) та непрямой дії (мельдоній [5]), завдяки впливу на показники тіол-дисульфідної системи, можуть реалізувати свій кардіопротекторний вплив при хронічній серцевій недостатності (ХСН).

Мета дослідження

встановити вплив ангіоліну на показники тіол-дисульфідної системи в міокарді щурів з хронічною серцевою недостатністю (ХСН).

Об'єкт та методи дослідження

Експерименти виконані на 70 безпородних щурах-самцях масою 180-220 г відповідно до положень Європейської конвенції про захист безхребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (2005) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (2013). Хронічну серцеву недостатність у щурів моделювали загальноприйнятим

методом завдяки внутрішньоочередивному введенню доксорубіцину в дозі 1,5 мг/кг 1 раз на 2 доби протягом 14 днів. Ангіолін вводили внутрішньошлунково в дозі 100 мг/кг, а мілдронат в дозі 250 мг/кг паралельно з доксорубіцином [4]. Щурів декапітували під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) на 35 добу. Щурів поділили на 4 групи: 1) 10 інтактних щурів, 2) 20 щурам моделювали хронічну серцеву недостатність, 3) 20 щурам з патологією вводили ангіолін, 4) 20 щурам з патологією вводили мілдронат. В міокарді щурів визначали вміст відновленого і окисненого глутатіону – принцип методу базується на взаємодії орто-фтолієвого ангідриду з відновленим глутатіоном, внаслідок чого утворюється флуоресцентний комплекс. При визначенні окисненого глутатіону в пробірку, що містить 2 мл 0,5 М фосфатного буфера (РН 8), додають 0,1 мл гомогенату міокарду і 0,5 мл 1% орто-фтолієвого ангідриду. При визначенні відновленого глутатіону в пробірку з 2 мл 0,5М фосфатного буфера (РН 12,0) додають 0,1 мл гомогенату міокарду. Реєструють окиснений та відновлений глутатіон, флуорометрично при Ex/Em 340-420 нм проводять розрахунки за калібровочною кривою [9]. Визначення активності глутатіонредуктази базується на вимірюванні швидкості окиснення НАДФН, які реєструються спектрофотометрично за зменшенням оптичної щільності при довжині хвилі 340 нм [9]. Вміст сумарних SH-груп визначали спектрофотометрично за реакцією з 5,5-дитіобіс-7-нітробензойною кислотою [9]. Дослідження вмісту метіоніну і цистеїну проводять методом тонкошарової хроматографії, наносячи на лінію старту 0,1г гомогенату міокарду та стандарти 10,5М цистеїну та 10,5М метіоніну, спектрофотометрують при довжині хвилі 530 нм [13].

Вірогідність результатів оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента, застосовуючи стандартний пакет програм статистичного оцінювання результатів версії Microsoft Office Excel 2003.

Результати дослідження та їх обговорення

Попередньо були підтверджені порушення системи оксиду азоту. На підставі того, що інтегративні тіол-дисульфідної системи грають важливу роль в транспорті і біодоступності оксиду азоту при хронічній серцевій недостатності, визначали саме ці показники. Так, в цитозолі міокарду щурів з ХСН встановлено пониження рівня тіолвміщуючих амінокислот – цистеїну на 74,8%, метіоніну на 58,4%, а також сумарної кількості відновлених тіолів білкових молекул на 47,1%. В цитозолі клітин міокарду цієї групи щурів визначено порушення показників глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи – пониження активності глутатіонпероксидази (ГР) на 64%, зменшення концентрації відновленого глутатіону на 73,9% на фоні підвищення рівня його окисненої форми (табл.) на 19%.

В зв'язку з тим, що оксид азоту є нестабіль-

ним короткоіснуючим радикалом, для його стабілізації та транспорту передумовлені такі механізми, як утворення з тіолвміщуючими низькомолекулярними сполуками (цистеїн, метіонін, глутатіон) стійких S-нітрозильних комплексів [2]. В умовах дефіциту тіольних сполук (оксидативний стрес, ішемія, інтоксикація та ін.) порушується транспорт NO, тому що при надмірній кількості активних форм кисню можливо утворення пероксинітриду [10,13].

При курсовому введенні ангіоліну спостерігається відновлення показників тіол-дисульфідної системи. Встановлено, що ангіолін у тварин з ХСН підвищує вміст відновлених тіольних груп на 66,3%, метіоніну на 43%, цистеїну на 85%. Найбільш виражений вплив ангіоліну проявляється по відношенню до глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи – підвищується активність глутатіонредуктази на 97,7%. Зростає концентрація відновленого глутатіону на 118,7% та зменшується вміст його окисненої форми на 46,7% в цитозолі міокарду експериментальних тварин.

Таблиця

Вплив ангіоліну та мілдронату на показники тіол-дисульфідної системи 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
Метіонін, мкмоль/г тканини	7,2±0,21	3,0±0,11*	4,3±0,21**	3,0±0,15
Цистеїн, мкмоль/г тканини	3,7±0,16	0,93±0,05*	1,72±0,14**	0,91±0,08
Загальні відновлені SH-групи, мкмоль/г тканини	167,8±11,4	88,7±7,2*	147,5±11,2**	81,2±6,1
ГР, мкмоль/мг/хв	24,7±3,43	8,9±0,77*	17,6±1,1**	8,2±0,02
Глутатіон відновлений, мкмоль/г тканини	3,7±0,21	0,97±0,08*	2,8±0,11**	0,94±0,09
Глутатіон окиснений, мкмоль/г тканини	0,11±0,02	0,32±0,01*	0,17±0,02**	0,31±0,01

Примітка: *P≤ 0,05 щодо контролю, **P≤ щодо ХСН.

Найбільш максимальне співвідношення встановлено в глутатіонової ланці тіол-дисульфідної системи під дією ангіоліну, так підвищується активність глутатіонредуктази на 97,7%, зростає концентрація відновленого глутатіону на 118,7% та зменшується вміст його окисненої форми на 46,7% в цитозолі міокарду експериментальних тварин. Встановлено, що під дією ангіоліну спостерігається найбільш оптимальне співвідношення між рівнями відновлених і окиснених тіольних груп, а також глутатіону свідчить про активну мобілізацію тіол-дисульфідної системи в нейтралізації продуктів нітрозуючого стресу. Підвищення функціональності тіол-дисульфідної системи міокарду під впливом ангіоліну сприяє підвищенню біодоступності оксиду азоту, а також зменшує цитотоксичність NO і його дериватів. Ангіолін може бути переносником NO, утворюючи з ним стабільні S-нітрозильні комплекси, попереджаючи перетворення NO в пероксинітрид, зберігаючи його ендотеліопротекторні властивості, що вигідно відрізняє його від мілдронату, який в застосованій дозі не має подібних властивостей.

Висновки

1. При хронічній серцевій недостатності в міокарді щурів порушується вміст показників тіол-дисульфідної системи, а саме знижується вміст метіоніну на 58,4%, цистеїну на 74,8%, загальних відновлених сульфгідрильних груп на 47,1%. При цьому також падає активність глутатіонредуктази на 64%, вміст глутатіону відновленого на 73,8% на фоні підйому вмісту окисненого глутатіону на 191%.

2. Курсове введення ангіоліну щурам в дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково при хронічній серцевій недостатності протягом 35 діб підвищує рівень тіолвміщуючих амінокислот – цистеїну на 85% та метіоніну на 43% на фоні зростання загальних відновлених сульфгідрильних груп на 66,3%. Також підвищується активність глутатіонредуктази на 97,7%, вмісту глутатіону відновленого на 188,7% при падінні рівня глутатіону окисненого на 46,7%.

Перспективи подальших досліджень

Представляється доцільним визначити вплив ангіоліну на морфо-функціональні характеристики ендотеліоцитів.

Література

1. Беленичев И.Ф. Рациональная нейропротекция / И.Ф. Беленичев, В.И. Черный, Ю.М. Колесник. – Донецк : изд. дом Заславский, 2009. – 261 с.
2. Колесник Ю.М. Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції та пошук ендотеліопротекторів / Ю.М. Колесник, І.С. Чекман, І.А. Мазур [та ін.] // Журнал НАМН України. – 2014. – Т. 20, № 3. – С. 289-299.
3. Михин В.П. Цитопротекция в кардиологии: достигнутые успехи и перспективы / В.П. Михин // Кардиология. – 2015. – Т. 55, № 10. – С. 90-95.
4. Нагорна О.О. Вплив ангиоліну на показники енергетичного обміну в міокарді щурів з експериментальною хронічною серцевою недостатністю / О.О. Нагорна, І.Ф. Беленичев, Н.О. Горчакова [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія». – 2016. – Т. 16, Вип. 4, ч. 1. – С. 273-276.
5. Нецаева Г.М. Эффекты мельдония в раннем постинфарктном периоде / Г.М. Нецаева, Е.Н. Желтикова // Кардиология. – 2015. – Т. 55, № 8. – С. 35-42.
6. Резван В.В. Роль метаболической терапии в современной кардиологии / В.В. Резван, И.С. Васильева // Кардиология. – 2016. – Т. 56, № 5. – С. 78-80.
7. Савина Н.М. Возможности применения миокардиального цитопротектора тиотриазолина в кардиологической практике / Н.М. Савина // Кардиология. – 2016. – Т. 56, № 1. – С. 86-92.
8. 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, Л.И. Кучеренко // Журн. НАМН України. – 2013. – Т. 19, № 1. – С. 3-11.
9. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції. Методичні рекомендації / [І.С. Чекман, І.Ф. Беленичев, О.О. Нагорна та ін.]. – Київ, 2016. – 92 с.
10. 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.
11. 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 blood flow: the therapeutic effects of nootropic drugs / I.F. Belenichev, S.V. Gorbacheva, N.V. Bukhtiyarova // Neurochemical Journal. – 2014. – Vol. 8, № 1. – P. 24-27.
12. Torregrossa A.C. Nitric oxide and geriatrics: implicators in diagnostics and treatment of the elderly / A.C. Torregrossa, M. Aranke, N.S. Bryan // Journal of Geriatric Cardiology. – 2011. – Vol. 8. – P. 230-242.
13. Warner T.D. Relationships between the endothelium and nitric oxide pathways / T.D. Warner // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2009. – Vol. 26, № 3. – P. 247-252.

Реферат**ДЕЙСТВИЕ ANGIOLINA НА ПОКАЗАТЕЛИ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ В МИОКАРДЕ КРЫС С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ**

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

Ключевые слова: ангиолин, милдронат, хроническая сердечная недостаточность, показатели тиол-дисульфидной системы.

Вазодилатация взаимосвязана как с показателями системы оксида азота, так и тиол-дисульфидной системы. Поэтому важным было установление влияния прямого эндотелиопротектора ангиолина и непрямого милдроната на показатели тиол-дисульфидной системы в миокарде крыс с хронической сердечной недостаточностью. Исследуемые группы включали интактных крыс, крыс с хронической сердечной недостаточностью, крыс с хронической сердечной недостаточностью, которым вводили ангиолин в дозе 100 мг/кг внутривенно, крыс с хронической сердечной недостаточностью, которым вводили внутривенно милдронат в дозе 250 мг/кг. Доксорубициновую кардиомиопатию моделировали общепринятым методом – путём внутривенного введения доксорубицина на протяжении 14 дней через день в дозе 15 мг/кг. В миокарде крыс на 35 день определяли показатели тиол-дисульфидной системы, а именно содержание метионина, цистеина, восстановленных сульфгидрильных групп, глутатиона восстановленного, глутатиона окисленного и активность глутатионредуктазы. Установлено, что при хронической сердечной недостаточности в миокарде крыс ангиолин повышает уровень цистеина, метионина, общин восстановленных сульфгидрильных групп, глутатиона восстановленного, активность глутатионредуктазы на фоне падения содержания глутатиона окисленного. У милдроната не определено достоверное влияние на вышеуказанные показатели.

Summary**ANGIOLIN ACTION ON MARKERS OF THIOL-DISULFIDE SYSTEM IN MYOCARDIUM RATS WITH CHRONIC IMPAIRED CARDIAL FUNCTION**

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

Key words: angiolin, mildronat, chronic impaired cardiac function, markers of thiol-disulfide system.

Nitric oxide system plays the important role in regulating many functions of cardio-vascular system including vasorelaxation, inhibition of leukocyte adhesion to the endothelium, migration and proliferation of the smooth muscles, thrombocytes aggregation. Pathologically, the disturbances of nitric oxide formation are associated with the changes of thiol-disulfide system markers. Mediators of the thiol-disulfide system have the transport properties connected with the nitric oxide and increase its bioavailability. The direct endothelioprotector angiolin and indirect endothelioprotector mildronat may have cardioprotective influence due to its action on the markers of thiol-disulfide system in the myocardium under chronic cardiac insufficiency. The aim of this study is to investigate the angiolin action on the markers of thiol-disulfide system in the myocardium of rats with chronic heart insufficiency. The experiments were conducted on the 70 white rats weighed 180-220 g. The test animals were divided into several groups: 10 normotensive rats, 20 rats with doxorubicin cardiac insufficiency, 20 rats with doxorubicin cardiac insufficiency treated by angiolin, 20 rats with doxorubicin cardiac insufficiency treated by mildronat. Angiolin was injected intragastrically in the dose 100 mg/kg with doxorubicin (in the dose 15 mg/kg intraperitoneally). Mildronat was injected intragastrically in the dose 250 mg by the same scheme. The animals were decapitated under thiopental injection. In the myocardium of the rats we identified the following markers of the thiol-disulfide system: cysteine, methionine, glutathione reduced, glutathione oxidative, as well as the general reestablishment of sulphhydryl groups, the activity of glutathione reductase. We also found out the decrease of methionine, cysteine, and re-establish thiol groups, the activity of glutathione reductase and increase in the glutathione oxidative content. Angiolin normalized

the content of the markers of thiol-disulfide system and the activity of glutathione reductase in the myocardium of rats with chronic heart insufficiency. Angiolin normalized all markers of the thiol-disulfide system, while mildronat had no reliable influence on the markers of the myocardium of the test animals.

УДК 616.28-008.14-092.4

Науменко О.М., Дєєва Ю.В., Васильєв О.В., Небор І.Я.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПАТОМОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН В СТРУКТУРІ СПІРАЛЬНОГО ОРГАНА В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ СЕНСОНЕВРАЛЬНОЇ ПРИГЛУХУВАТОСТІ СУДИННОГО ҐЕНЕЗУ

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

В роботі досліджено патоморфологічні зміни в структурі спірального органа тварин (пісчанки) в умовах експериментальної сенсоневральної приглухуватості судинного ґенезу. У пісчанок зі змодельованою сенсоневральною приглухуватістю, за даними патоморфологічних досліджень, визначаються достовірні зміни в структурі спірального органа, в порівнянні з інтактними тваринами контрольної групи. Розвиток СНП судинного ґенезу у пісчанок може бути досягнуто шляхом лігування вертебральної артерії, що підтверджено результатами патоморфології. В результаті досліджень виявлено, що перфузійна фіксація є недорогим, швидким та контрольованим способом збереження досліджувальних тканин. Світлова мікроскопія підтвердила розвиток деструктивних процесів в спіральному органі у експериментальних тварин.

Ключові слова: гостра сенсоневральна приглухуватість (СНП), спіральний орган, перфузійна фіксація, патоморфологія.

Робота є фрагментом науково-дослідної тематики кафедри оториноларингології «Розробка нових методів діагностики, лікування та профілактика захворювань вуха та верхніх дихальних шляхів», № державної реєстрації 0198U003083.

Вступ

Лікування сенсоневральної приглухуватості (СНП) є однією з найбільш актуальних проблем сучасної оториноларингології [3]. Дане захворювання розвивається внаслідок ураження волоскових клітин внутрішнього вуха, етіологія цього процесу є дуже різноманітна: вірусна, судинна, токсична і травматична. Судинні порушення є однією з найбільш поширених причин виникнення даної патології і, не дивлячись на успіхи сучасної медицини, не можуть бути повноцінно усунені ні консервативним, ні хірургічним шляхом. Отже, актуальним залишається розробка нових методів лікування СНП саме судинного ґенезу [1,3,9]. Кожен новий метод лікування перед проведенням клінічних досліджень, повинен пройти апробацію в експерименті на тваринах. Тому моделювання уражень внутрішнього вуха, виділення спірального органу без пошкодження і, у тому числі, визначення його чітких патоморфологічних змін є актуальними і не до кінця вивченими питаннями сучасної науки [2,5]. Складність цієї проблеми, в першу чергу, пов'язана з особливостями анатомічної будови внутрішнього вуха у людини, і у тварин. Сенсоневральні клітини спірального органу у пісчанки розташовані в кістковій буллі, що визначає особливості підходів до приготування препаратів для дослідження внутрішнього вуха [5,7]. Звичайні патоморфологічні підходи до приготування препарату в разі препарування внутрішнього вуха є надмірно травматичними, оскільки перетинчаста частина спірального органу надто вразлива і при декальцинації фрагментується, особливо в об-

ласті мембрани текторія.

В пергу чергу, це не дає можливості відрізнити зміни, зумовлені тим чи іншим патологічним процесом, від порушень, які виникли під час приготування препарату. Саме тому метою нашого дослідження було розробити нову модель ураження спірального органу у експериментальних тварин – пісчанок.

Мета дослідження

Оцінити зміни внутрішнього вуха у експериментальних тварин зі змодельованою сенсоневральною приглухуватістю (СНП) судинного ґенезу за допомогою патоморфологічних досліджень.

Матеріали та методи дослідження

В нашому дослідженні були використані 20 пісчанок монгольських. Ми моделювали СНП судинного ґенезу за допомогою часткового лігування вертебральної артерії. Після чого проводили перфузійну фіксацію та виділення спірального органу. Патоморфологічна картина оцінювалася за допомогою світлової мікроскопії.

Експериментальне дослідження було проведено згідно 26 статті Закону України про захист тварин від насильства (N 3447-IV, 21.02.2006), і Європейської конвенції про захист хребцевих тварин, що використовуються в експериментальних дослідженнях (Strasbourg, 1986, N 12-I).

Тварини були розділені на дві групи по 10 тварин в кожній: група А включала піддослідних, яким було проведено лігування вертебральної артерії, група В складала sham-operated. Пісчанкам обох груп була проведена транскардіальна