

ТЕОРЕТИЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

УДК 615.272.4.014.425:616.27.47

Клименко О.В.,
Чекман І.С.,
Горчакова Н.О.,
Павлов С.В.

ЕНЕРГОМОДУЛЮЮЧА ДІЯ ПРЕПАРАТІВ РІЗНИХ ХІМІЧНИХ СТРУКТУР ПРИ КАРДІОТОКСИЧНІЙ ДІЇ НАТРІЮ НІТРОПРУСИД У ЩУРІВ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (м.Київ)
Запорізький державний медичний університет¹ (м.Запоріжжя)

Ключові слова. АТФ-лонг, кардіотрил, метаболіт, натрію нітропрусид, мітохондріальна дисфункція.

Вступ

Незважаючи на стрімкий розвиток методів діагностики, удосконалення профілактики і лікування в Україні хвороби серцево-судинної системи займають перше місце в структурі захворюваності і смертності, обумовлюють більше половини всіх випадків смерті і третину причин інвалідності [6]. Підвищений інтерес фармакологів, фармацевтів і клініцистів до метаболітичних та метаболіто-тропних кардіопротекторів обумовлено доказовістю раціонального фармакологічного захисту міокарду при різних патологічних станах [1, 3, 12, 18].

Актуальним напрямом медицини і фармації є пошук, синтез, створення і впровадження в медичну практику кардіопротекторів – препаратів, що усувають порушення клітинного метаболізму, іонного гомеостазу і функцій мембран кардіоміоцитів, попереджаючи розвиток незворотніх метаболічних змін в міокарді [17].

Метою роботи є вивчення впливу препаратів метаболітного типу дії – кардіотрилу, метаболіту кардіотрилу (МТ) і АТФ-лонгу на показники енергопродукуючої функції мітохондрій міокарду у щурів при дії натрію нітропрусиду.

Матеріали та методи

Досліди проведені на білих безпорідних щурах обох статей лінії Wistar масою 210,0 – 250,0, що утримувались у віварії НМУ. Всі експерименти проведені згідно «Методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України» [5]. На-

трію нітропрусид вводили внутрішньоочеревинно в дозі 20 мг/кг. Досліджувані препарати вводили за 30 хвилин до натрію нітропрусиду внутрішньоочеревинно в дозах – кардіотрил – 5 мг/кг, МТ – 5 мг/кг, АТФ-лонг – 10 мг/кг. Експозиція 60 хвилин після застосування натрію нітропрусиду.

Вміст малату визначали за методом Хорста по зменшенню НАДН при 340 нм, ізоцитрату – за методом Зиберта за пониженню НАДН при 340 нм, пірувату – за методом Цоха-Лампрехту за падінням НАДН при 340 нм, лактату – за методом Хохорту за підвищенням НАДН при 340 нм. Активність КФК-цт та КФК-мх в міокарді визначали після хроматографічного розділення за оптичним тестом Варбурга. Активність малатдегідрогенази визначали спектрофотометрично з застосуванням оптичного тесту Васбурга [14]. Для визначення функції мітохондрій встановили відкриття мітохондріальної пори (поглинання 540 нм) та мембранний потенціал заряду [18].

Статистичну обробку результатів проводили методами математичної статистики з застосуванням пакетів прикладних програм «Біостатика для Windows, версія 4.03» та «Microsoft Excel 2002». Отриману різницю співставляємих величин оцінювали з застосуванням t-критерію Стьюденту [8].

Результати дослідження та їх обговорення

Натрію нітропрусид призводить до зниження активності мітохондрій міокарду щурів, про що свідчить відкриття мітохондрі-

альної пори (поглинання 540 нм – знизилось з $137,4 \pm 5,2$ до $48,7 \pm 1,8$), зниження мембранного потенціалу заряду (ψ) з $58,2 \pm 4,1$ до $15,4 \pm 1,1$, а також гальмування транспорту і утилізації енергії (зниження активності креатинфосфокінази мітохондріальної (мх-КФК) з $0,787 \pm 0,05$ мкм/мг/хв до $0,418 \pm 0,01$ мкм/мг/хв і креатинфосфокінази цитозольної (цт-КФК) з $1,147 \pm 0,02$ мкм/мг/хв до $0,900 \pm 0,01$ мкм/мг/хв. Токсичний ефект натрію нітритиду характеризується дискоординацією циклу Кребса (зниження рівня малату з $0,72 \pm 0,02$ мкм/г до $0,35 \pm 0,01$ мкм/г, ізоцитрату з $0,546 \pm 0,03$ мкм/г до $0,330 \pm 0,01$ мкм/г, активності мітохондріальної малатдегідрогенази (МДГ) з $7,54 \pm 0,38$ мкм/г/хв до $3,10 \pm 0,18$ мкм/г/хв.), а також змінами показників гліколізу: рівня пірувату з $0,15 \pm 0,02$ мкм/г до $0,10 \pm 0,01$ мкм/г і підвищенням рівня лактату з $2,56 \pm 0,20$ мкм/г до $5,45 \pm 0,12$ мкм/г в міокарді.

Ішемія міокарду характеризується недостатнім постачанням тканини киснем, виснаженням запасу АТФ і креатинфосфату в клітині, «переключенням» гліколізу з аеробного на анаеробний шлях для компенсаторної продукції макроергів в мітохондріях, посиленням внутріклітинного ацидозу, виникненням дисфункції іонних каналів, підвищенням рівня натрію, кальцію і зниженням калію в цитоплазмі кардіоміоцитів [17].

Гліколіз відбувається в різних тканинах, його значення для різних тканин різне. Цей головний і унікальний шлях утилізації кисню протікає як в присутності кисню - аеробні умови, так і при його відсутності - анаеробні умови. Для утворення АТФ шляхом гліколізу в анаеробних умовах (ішемія, гіпоксія) необхідна більша кількість глюкози, ніж в аеробних умовах [9, 21]. Цей процес здійснюється в результаті окислювального фосфорилування в піруватдегідрогеназному циклі трикарбонових кислот, внаслідок якого утворюється піруват, що призводить до синтезу незначної (менше 10 %) кількості АТФ в кардіоміоцитах. Конверсія пірувату в ацетил-коензим А відбувається в мітохондріях за допомогою ферменту піруватдегідрогенази. Подальше окислення двох моль пірувату в загальних шляхах катаболізму супроводжується синтезом 30 моль АТФ. Аеробний гліколізмом з погляду кількості енергії, що синтезується. Анаеробний розпад включає реакції розпаду глюкози до пірувату, але з подальшим перетворенням пірувату в лактат (молочну кислоту) [9].

Особливо важливою стає роль гліколізу в утворенні АТФ у відсутності кисню. Тканини з підвищеною гліколітичною активністю здатні зберегати активність і в період кисневого голодування, тому в умовах ішемії активація гліколітичних шляхів утворення АТФ має першочергове значення [1, 16]. Під час енергодефіцитного стану кардіоміоцити починають використовувати глюкозу з ендogenous глікогену, оскільки вона вже фосфорильована (на відміну від екзогенної глюкози, що транспортується в клітину), і її утилізація не вимагає витрат АТФ для початкової активації. Проте запаси глікогену в кардіоміоцитах виснажуються достатньо швидко, тому виникає необхідність активації резервних шляхів утворення АТФ. Для короточасної підтримки енергетичного стану серця, в умовах обмеженого постачання кисню, має значення реакція розпаду однієї молекули глюкози до двох молекул пірувату за допомогою фосфогліцераткіназної і піруваткіназної реакцій, в результаті яких АДФ фосфорилується до АТФ [7]. Активність піруватдегідрогенази вважається головним чинником в гліколітичному шляху утворення енергії. З однієї молекули глюкози при трансформації в піруват утворюються дві молекули АТФ, а при подальшому окисленні пірувату в циклі трикарбонових кислот – 34 молекули АТФ [23].

При посиленні ішемії єдиною можливим механізмом синтезу АТФ стає анаеробний гліколіз з утворення АТФ і лактату. Утворення молочної кислоти не є кінцевим продуктом обміну речовин. Під дією лактатдегідрогенази молочна кислота може окислюватись знову, утворюючи піруват, який і бере участь в подальших перетвореннях. Надлишок молочної кислоти формує тканинний лактатацидоз, який роз'єднує окислювальне фосфорилування і викликає перевантаження кардіоміоцитів Ca^{2+} [15, 16]. В результаті формується гіпоксичний тип метаболізму. Тому зниження вмісту внутріклітинного лактату за рахунок трансформації його в піруват є ключовим моментом метаболічної терапії [18].

В патологічній дії окислених білків на клітину, є їх властивість знижувати функцію білків в ланцюзі переносників електронів, активності АТФ-ази, вибірковості дії транспортних пір [4]. Зміна Red/Ox – потенціалу мітохондріальної мембрани відображається на дисфункції каскаду дихального ланцюга, порушуючи метаболізм кардіоміоциту. Це призводить до порушення окислювального метаболізму в клітині, а також до розвитку

ТАБЛИЦЯ

ВПЛИВ АТФ-ЛОНГ, КАРДІОТРИЛУ ТА МЕТАБОЛІТУ НА ПОКАЗНИКИ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ МІОКАРДУ ПРИ ІНТОКСИКАЦІЇ НАТРІЮ НІТРОПРУСИДОМ (НН)

Досліджувані показники	Інтактні тварини	НН	НН+кардіотрил	НН+МТ	НН+АТФ-лонг
Лактат, мкм/г	2,56±0,20	5,45±0,12*	3,68±0,21**	3,88±0,11**	3,68±0,11**
Піруват, мкм/г	0,15±0,02	0,10±0,01*	0,14±0,02**	0,15±0,01**	0,12±0,01**
Ізоцитрат, мкм/г	0,546±0,03	0,330±0,01*	0,581±0,01**	0,538±0,01**	0,489±0,01**
Малат, мкм/г	0,72±0,02	0,35±0,01*	0,68±0,02**	0,81±0,01**	0,42±0,01**
МДГ-мх, мкм/г/хв.	7,54±0,38	3,10±0,18*	7,68±0,41**	8,58±0,22**	4,23±0,31**
КФК-цт, мкм/мг/хв.	1,147±0,02	0,900±0,01*	1,068±0,01**	1,288±0,03**	1,008±0,01**
КФК-мх, мкм/мг/хв	0,787±0,05	0,418±0,01*	0,521±0,01**	0,675±0,01**	0,480±0,01**
Відкриття мітохондріальної пори (поглин., 540 нм)	137,4±5,2	48,7±1,8*	95,1±1,5**	115,4±2,1**	56,5±1,3**
Мембранний потенціал заряду (ψ)	58,2±4,1	15,4±1,1*	30,4±3,1**	43,7±1,8**	16,3±1,4**

Примітка: * - $p \leq 0,05$ по відношенню до інтактних тварин** - $p \leq 0,05$ по відношенню до НН

мітохондріальної дисфункції [2, 19]. При дії на клітину різних токсичних агентів мітохондріальна дисфункція супроводжується зміною проникності внутрішньої мембрани, яка пов'язана з відкриттям мітохондріальної пори (МП) (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) – мультибілкового мегаканалу неспецифічної проникності. Індукція МП є провідною ланкою патогенезу такого стану як ішемічна хвороба серця. Серед причин розвитку МП-залежної мітохондріальної дисфункції розрізняють порушення біосинтезу оксиду азоту (NO) та виникнення дефіциту енергетичних запасів клітини [24].

Заключення

Введення експериментальним групам тварин кардіотрилу, його метаболіту та АТФ-лонгу в різному ступені проявляє енергомодулюючу дію. АТФ-лонг (10 мг/кг) в меншій мірі не призводить до вірогідних змін відносно відкриття мітохондріальної пори, мембранного потенціалу заряду мітохондрій, транспорту енергії, окиснення в циклі Кребсу, активності гліколізу. Кардіотрил і його активний метаболіт на фоні інтоксикації натрію

нітропрусидом мали більш виражений порівнянно з АТФ_лонг енергомодулюючий ефект. В групах тварин одержуючих ці препарати реєстрували зниження прояву мітохондріальної дисфункції – гальмування відкриття мітохондріальної пори, збільшення заряду мітохондрій, збільшення макроергічних фосфатів в мітохондріях міокарду, підвищення активності КФК-мх і КФК-цт.

Кардіотрил і його метаболіт призводять до вірогідної активації гліколізу та циклу трикарбонових кислот, а саме збільшення продукції ізоцитрату і малату і підвищення активності МДГ-мх.

Внаслідок цього можна стверджувати, що енерготропна дія МТ і кардіотрилу реалізується через активуючий вплив на компенсаторний малат - аспартатний шунт.

Отримані результати, свідчать, що енерготропна замісна терапія призводить до зменшення проявів мітохондріальної дисфункції, викликаної натрію нітропрусидом. Перспективним можна вважати використання метаболітних препаратів, що впливають на ланки формування мітохондріальної дисфункції і

активності компенсаторних шунтів енергії в мітохондріях.

Висновки

1. Натрію нітропруссид знижує в міокарді рівень пірувату на 33 %, ізоцитрату - на 40 %, малаату - на 51 %, активність МДГ-мх - в 2,4 рази, КФК-цт - на 21 %, КФК-мх - на 47%.

2. Спостерігалось відкриття мітохондріальної пори і при цьому зменшувалось погли-

нання в 2,8 рази, мембранний потенціал заряду в 3,8 рази та підвищення рівня лактату в 2,1 рази.

3. Кардіотрил та його метаболіт в більшому ступеню, а також АТФ-лонг, що були введені за 30 хвилин до натрію нітропрусиду запобігали змінам показників енергопродуруючої функції міокарду щурів при введенні натрію нітропрусиду.

ЭНЕРГОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ РАЗНЫХ ХИМИЧЕСКИХ СТРУКТУР ПРИ КАРДИТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ НАТРИЯ НИТРОПРУССИДА У КРЫС

Клименко О.В., Чекман И.С., Горчакова Н.А., Павлов С.В.

Резюме. В экспериментах на крысах установлено, что натрия нитропруссид понижает активность митохондрий, тормозит транспорт и утилизацию энергии, нарушает содержание интермедиаторов цикла Кребса и компонентов гликолиза. АТФ-лонг, кардиотрил, метаболит, введенные перед применением натрия нитропруссида уменьшают проявление митохондриальной дисфункции и активируют компенсаторные пути выработки энергии в митохондриях.

Ключевые слова: АТФ-лонг, кардиотрил, метаболит, натрия нитропруссид, митохондриальная дисфункция.

ENERGOMODULATION ACTION OF DIFFERENT CHEMICAL STRUCTURE DRUGS UNDER CONDITIONS OF NATRII NITROPRUSSIDE TOXIC ACTION

Klymenko O.V., Chekman I. S., Gorchakova N.O., Pavlov S.V.

Summary. It is determined that natrii nitroprusside decreases mitochondrial activity, brakes the energy transport and utilization, disturbs Krebs cycle intermediates and glycolysis components content. ATP-long, cardiotryl, its metabolite administered before natrii nitroprusside reduce mitochondrial dysfunction manifestation and activate compensative ways of energy output in mitochondria.

Key words: ATP-long, cardiotryl, metabolite, natrii nitroprusside, mitochondrial dysfunction.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Амосова Е.Н. Метаболическая терапия поврежденных миокарда, обусловленного ишемией. Новый подход в лечении ишемической болезни сердца и сердечной недостаточности // Укр. кардиол. журн. - 2000. - № 4. - С. 86-92.
2. Беленичев И.Ф., Колесник Ю.М., Павлов С.В. и др. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином // Международный неврологический журнал. - 2008. - № 4 (20). - С. 20-26.
3. Галенко-Ярошевский П.А., Чекман И.С., Горчакова Н.А. Очерки фармакологии средств метаболической терапии. - М.: Медицина, 2001. - 240 с.
4. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Павлов С.В. и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) // Сверх. пробл. токсикол. - 2005. - №3. - С. 20-26.
5. Доклинические испытания лекарственных средств. Методические рекомендации под ред. член-кор. АМН Украины А.В. Стефанова // Киев: Авиценна, 2002. - 568 с.

6. Коваленко В.М. Стан здоров'я народу України у зв'язку із хворобами системи кровообігу та можливі шляхи його покращення: Аналітично-статистичний посібник для лікарів-кардіологів, ревматологів, терапевтів загальної практики. — Київ, 2008. — 124 с.
7. Кольман Я., Рем К.Г. Наглядная биохимия. — М.: Мир, 2000. — 469 с.
8. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистика в науке и бизнесе. — Киев: Изд-во «Моррион», 2002. — 639 с.
9. Лупырь А.В. Активность основных ферментов гликолиза (гексокиназы, лактатдегидрогеназы) в полипозной ткани у больных полипозным риносинуситом // Укр. мед. Альманах — 2007. — Т. 10, № 6 — С. 107.
10. Лугай М.И. Медикаментозное лечение стабильной стенокардии: доказательная эффективность и нерешенные проблемы // Доказова медицина та огляд консенсусів в лікуванні хвороб органів кровообігу: Вибрані лекції Української кардіологічної школи ім. М.Д. Стражеска. — К.: Максимов, 2003. — С. 138-168.
11. Мазур И.А., Волошин Н.А., Чекман И.С. и др. Тиотриазолин: фармакологические аспекты и клиническое применение — Запорожье, 2006. — 154 с.
12. Мазур И.А., Чекман И.С., Беленичев И.Ф. и др. Метаболитотропные препараты. — Запорожье, 2007. — 309 с.
13. Пархоменко А.Н. Метаболические подходы к лечению острых и хронических форм ишемической болезни сердца и сердечной недостаточности // Журн. практ. Врача. — 1999. — № 1. — С. 22-25.
14. Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). — Л.: Изд-во Ленинградского университета. — 1982. — 272 с.
15. Хомазюк А.И., Гончар И.В. Энергетический метаболизм миокарда // Укр. кард. журн. — 1999. — № 2. — С. 88-95.
16. Чекман И.С. Метаболічні препарати в сучасній експериментальній та клінічній фармакології // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики: Зб. наук. ст. — Запоріжжя, 2002. — Вип. 8. — С. 11-17.
17. Чекман И.С., Горчакова Н.О., Французова С.Б., Минцер В.О. Кардиопротекторы — клинико-фармакологические аспекты // Український мед. часопис. — 2003. — № 6 (38). — С. 18-25.
18. Чекман И.С., Горчакова Н.А., Французова С.Б., Нагорная Е.А. Метаболитные и метаболитотропные препараты в системе кардио- и органопротекции. — К.: Полиграф плюс, 2009. — 155 с.
19. Cadenas E., Davies K.J.A. Mitochondrial Free Radical Generation Oxidative Stress and Aging // Free Radic. Biol. Med. — 2000. — Vol.29, №3-4. — P. 222-230.
20. Guidelines on management stable angina pectorals — The Task Force on the Management of stable angina pectorals on the European Society Cardiology // Eur. Heart. J. — 2006. — Vol.27. — P. 1341-1381.
21. Opie L., King L. Glucose and glycogen utilization in myocardial ischemia change in metabolism and consequence for myocyte // Mol. Cell. Biochem. — 1998. — Vol. 180. — P. 3-26.
22. Pastorino J.G., Shulga N., Hock J.B. Mitochondrial Bindiny of Hexokinase II inlribits II Bax-induced cytichrome C relase and apoptosis // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277. — P. 7610 — 7618.
23. Sirover M.A. New nucler fuvetions of the glyrolytic protein, glyceraldehyde — 3 — phosphate dehydrogenase, in mammalvan cells // J. Cell. Biochem. — 2005. — Vol. 95. — P. 45-52.
24. Xie Y.W., Wolin M.A. Role of nitric oxide and its interaction with superoxide in the suppression of cardiac muscle mitochondrial resperation. Involvement in response to hypoxia/reoxygenation // Circulation. — 1996. — 94. — P. 2580-2586.