

Клименко О.В.¹,
Чехман І.С.¹,
Павлов С.В.²

ВПЛИВ КАРДІОТРИЛУ, ЙОГО МЕТАБОЛІТУ ТА АТФ-ЛОНГ НА МЕТАБОЛІЗМ ОКСИДУ АЗОТУ В МІОКАРДІ ЩУРІВ ПРИ ГІПОКСІЇ, ВИКЛИКАНІЙ НАТРІЮ ФТОРИДОМ

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (м.Київ)

²Запорізький державний медичний університет2 (м.Запоріжжя)

Резюме. Фторидна інтоксикація призводить до зниження процесів метаболізму оксиду азоту в міокарді щурів. Похідні триазолу та АТФ-лонг, введені за 30 хвилин до застосування натрію фториду, нормалізують показники синтезу, метаболізму оксиду азоту.

Ключові слова: оксид азоту, фторидна інтоксикація, кардіотрил, метаболіт, АТФ – лонг

Вступ

Ішемічна хвороба серця (ІХС) – найбільш поширене захворювання серцево-судинної системи, яке охоплює 10–25 % дорослого населення. Ця патологія є головним фактором ризику розвитку ускладнень та смертності в усіх країнах світу [10]. В Україні ІХС виявляють у більше 10 млн осіб, що потребує детального вивчення усіх патогенетичних механізмів розвитку хвороби та розробки ефективних методів лікування цієї патології [23].

Ендотеліальна дисфункція – одна з ланок патофізіологічних механізмів, в основі яких лежить прогресуюче ураження судин, що погіршується дією факторів ризику, зокрема, артеріальною гіпертензією, гіпоксією, стресовими чинниками, які призводять до загострення серцево-судинних захворювань [2, 24].

Токсичний вплив фторидів супроводжується суттєвими змінами метаболічних процесів в міокарді. Натрію фторид викликає переважно блокаду гліколізу, менше – окислювального фосфорилування [4, 5, 14, 16, 36].

В якості кардіопротекторів увагу дослідників привертають похідні 1,2,4-триазолу. Однією з таких сполук є кардіотрил (1-(β-фенилетил)-4-аміно-(п-диметиламінобензальдегід)-1,2,4-триазоліа бромід) [3, 21]. В організмі він метаболізується в активний метаболіт (МТ).

Фармакологічна активність АТФ реалізується тільки в комплексі з іонами Mg²⁺ [18, 19, 20, 32], що слугувало основою для розробки нового кардіотропного препарату АТФ-лонг. На відміну від натрієвої солі АТФ, АТФ-лонг являє собою у хімічному складі координа-

ційну сполуку АТФ- Mg²⁺-гістидин-К⁺ [12]. Посилення її біологічної активності пов'язано зі збільшенням стабільності АТФ до дезаміназ [8] і посиленням тропності до пуринорецепторів. Попередніми дослідженнями встановлено, що АТФ-лонг, понижуює токсичний вплив фториду натрію [9].

Мета даної роботи – дослідити вплив кардіотрилу та його метаболіту, а також АТФ-лонг на метаболізм оксиду азоту при гіпоксії, викликаній фторидом натрію.

Об'єкт і методи дослідження

Дослідження проведені на 30 білих безпородних щурах лінії Wistar обох статей масою 210,0 – 250,0, які отримані з віварію Запорізького державного медичного університету. Всі експерименти виконані згідно з «Методичними рекомендаціями ДФЦ МОЗ України» [7]. Фторид натрію вводили внутрішньоочеревинно в дозі 10 мг/кг [22]. Досліджувані препарати вводили внутрішньоочеревинно за 30 хвилин до введення фториду в дозах: кардіотрил – 5 мг/кг [3], МТ – 5 мг/кг [3], АТФ-лонг – 10 мг/кг [12]. Експозиція – 60 хвилин. Метаболізм NO оцінювали по активності NO-синтази (NOS), вмісту нітратів, рівню сумарних SH-груп і активності глутатіонредуктази (ГР). Стабільні метаболіти NO визначали за рівнем нітратів в реакції Грісса, активність NOS – за різницею між швидкістю окислення NADPH, реєстрували флюорометричним методом [6, 15]. Вміст сумарних SH-груп визначали спектрофотометричним методом за реакцією з 5,5 – дитіобіс - 7 - нітробензойною кислотою [17]. Концентрацію білка оцінювали за методом Бредфорда. Нітротирозин визначали в гомогенаті серця твердофазним імуносорбентним методом за допомогою на-

бору фірми ELISA (№4513K19). Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента [11].

Результати та обговорення

Вперше про роль ендотелію в регуляції судинного тонуусу було висвітлено в статті R.F. Furchgott и J.W. Zawadzki, яка опублікована в журналі «Nature» в 1980 році [31]. Реалізація функції ендотелію відбуваються завдяки речовині, що виділяється ендотеліальними клітинами. Речовину названо ендотелій-залежним релаксуючим фактором (ЕЗРФ), ідентифікованим як оксид азоту (NO). Ускладнення, що пов'язані з дефіцитом даної сполуки є: гострий інфаркт міокарду, нестабільна стенокардія, фібриляція передсердь, тромбогенні захворювання судин, тромболітична мікроангіопатія, тромботична тромбоцитопенічна пурпура, преекламсія, тромбемболічні цереброваскулярні захворювання [26, 29, 30, 33]. В організмі NO синтезується клітинами із амінокислоти L-аргінін [35, 37]. Цей процес представляє собою комплексну окислювальну реакцію, що каталізується ферментом NO-синтазою (NOS). Крім NO утворюється одночасно сполука L-цитролін, що знову рециркулюється, поповнюючи внутрішньоклітинні запаси аргініну [37]. Синтезувати NO здатні більшість клітин організму людини. Найбільш вивчені три основні ізоформи NOS: нейрональна, макрофагальна та ендотеліальна. Нейрональна і ендотеліальна ізоформи ферменту постійно присутні в клітині та називаються конститутивними (інгредієнтними), а макрофагальна – є індукційною і синтезується у відповідь на зовнішню дію на клітину [28]. Індукційна ізоформа NOS проявляє активність після

зовнішньої дії на клітину, як правило, через 6-8 годин – час необхідний для активації генів і початку синтезу ферментів та здатна продукувати в 100-1000 раз більше NO, ніж конститутивні ізоформи [25, 28]. На відміну від класичних медіаторів, NO не депонується в клітині, а вільно і швидко транспортується із місць утворення. Будучи ліпофільним, NO вільно та швидко переходить через поверхневі мембрани в гладко-м'язеві клітини судин, здійснюючи необхідну міжклітинну комунікацію та регуляцію в тканинах [34].

Фторид натрію призводить до розвитку гіпоксії в міокарді внаслідок чого в активному центрі NO-синтази відбувається окислювальна модифікація NO і його дериватів. В результаті стресу, викликаного фторидом натрію, реалізується окислення, нітрузування відновлених тіолів і пригнічення активності глутатіонредуктази [13, 27].

Як видно із таблиці, фторид натрію призводить до порушень в системі метаболізму ендогенного NO міокарду. Даний блокатор гліколізу пригнічує активність NO-синтази (з $37,8 \pm 3,0$ мкм/мг/хв до $8,2 \pm 1,1$ мкм/мг/хв.), підвищує рівень маркера нітрузуючого стресу – нітротирозину (з $16,2 \pm 0,9$ нмоль/г до $34,5 \pm 3,8$ нмоль/г), що характерно для розвитку гіпоксії. Паралельно реєструвалось зниження основних показників тіолдисульфідної системи – відновлених тіолів (з $154,3 \pm 10,3$ мкм/г до $31,2 \pm 5,0$ мкм/г) і активність глутатіонредуктази (з $31,2 \pm 2,0$ мкм/мг/хв до $8,1 \pm 1,3$ мкм/мг/хв) в міокарді.

Отримані результати свідчать, що протекторна дія АТФ-лонг не реалізується внаслідок позитивного впливу на зміни в системі NO і

ТАБЛИЦЯ

ВПЛИВ ПОХІДНИХ ТРИАЗОЛУ ТА АДЕНІЛОВИХ НУКЛЕОТИДІВ НА МЕТАБОЛІЗМ NO В МІОКАРДІ ЩУРІВ ПРИ ІНТОКСИКАЦІЇ ФТОРИДОМ НАТРІЮ (ФН)

Показники	Інтактні тварини	ФН (контроль)	ФН + кардіотрил	ФН+МТ	ФН+ АТФ-лонг
Активність NO-синтази, мкм/мг/хв	$37,8 \pm 3,0$	$8,2 \pm 1,1$	$15,2 \pm 2,0^*$	$25,4 \pm 3,4^{**}$	$8,5 \pm 1,3$
Нітротирозин, нмоль/г	$16,2 \pm 0,9$	$34,5 \pm 3,8$	$21,2 \pm 2,6^*$	$18,5 \pm 2,1^{**}$	$31,6 \pm 2,0$
Відновлені SH-групи, мкм/г	$154,3 \pm 10,3$	$31,2 \pm 5,0$	$58,8 \pm 6,3^*$	$86,7 \pm 3,2^{**}$	$33,1 \pm 4,2$
ГР, мкм/мг/хв	$31,2 \pm 2,0$	$8,1 \pm 1,3$	$11,3 \pm 0,95^*$	$17,5 \pm 1,6^{**}$	$9,2 \pm 1,7$

Примітка: * - $p \leq 0,05$ по відношенню до контролю;

** - $p \leq 0,05$ по відношенню до кардіотрилу та АТФ-лонгу

тіол-дисульфідної системи, а обумовлена підвищенням ресурсів в міокарді, нормалізацією показників прооксидантно - антиоксидантного гомеостазу та активності іонтранспортних систем.

Кардіотрил та його метаболіт обмежували стресорну дію фториду натрію. Про це свідчить зниження рівня маркера нітрозуючого стресу – нітротирозину (кардіотрил - з $34,5 \pm 3,8$ нмоль/г до $21,2 \pm 2,6$ нмоль/г, метаболіт - з $34,5 \pm 3,8$ нмоль/г до $18,5 \pm 2,1$ нмоль/г) на фоні поліпшення показників тіол-дисульфідної системи: відновлені тіоли (кардіотрил - з $31,2 \pm 5,0$ мкм/г до $58,8 \pm 6,3$ мкм/г, метаболіт - з $31,2 \pm 5,0$ мкм/г до $86,7 \pm 3,2$ мкм/г) та активність глутатіонредуктази (кардіотрил - з $8,1 \pm 1,3$ мкм/мг/хв до $11,3 \pm 0,95$ мкм/мг/хв, метаболіт - з $8,1 \pm 1,3$ мкм/мг/хв до $17,5 \pm 1,6$ мкм/мг/хв) в групах тварин, які отримували похідні тріазолу. Препарати викликали активуючий ефект по відношенню NO – синтази (кардіотрил - з $8,2 \pm 1,1$ мкм/мг/хв до $15,2 \pm 2,0$ мкм/мг/хв., метаболіт - з $8,2 \pm 1,1$ мкм/мг/хв до $25,4 \pm 3,4$ мкм/мг/хв.), кардіопротекторна дія [22] реалізується завдяки пригніченню оксидативного стресу та усуненню мітохондріальної дисфункції.

Отримані дані константують наявність у похідних тріазолу – кардіотрилу та його метаболіту кардіопротекторної дії при блокаді гліколізу та розвитку гіпоксії, викликаній фторидом натрію.

Перспективи подальших досліджень полягають у доцільності вивчення механізмів захисної дії АТФ-лонг, кардіотрилу та його метаболіту при різних видах гіпоксії.

Висновки

1. Фторид натрію призводить до пригнічення активності NO-синтази на 20%, підвищення нітротирозину на 20%. Блокатор гліколізу знижує основні показники тіол-дисульфідної системи – відновлених тіолів на 20% і активність глутатіонредуктази на 25% в міокарді шурів.

2. Кардіотрил та його метаболіт обмежували стресорну дію фториду натрію завдяки пригніченню оксидативного стресу та усунення мітохондріальної дисфункції.

3. Кардіопротекторна дія АТФ-лонг реалізується шляхом нормалізації показників прооксидантно - антиоксидантного гомеостазу та активності іонтранспортних систем.

ВЛИЯНИЕ КАРДИОТРИЛА, ЕГО МЕТАБОЛИТА И АТФ-ЛОНГ НА МЕТАБОЛИЗМ ОКСИДА АЗОТА В МИОКАРДЕ КРЫС ПРИ ГИПОКСИИ, ВЫЗВАННОЙ НАТРИЯ ФТОРИДОМ

О.В.Клименко, И.С.Чекман, С.В.Павлов

Резюме. Фторидная интоксикация приводит к снижению процессов метаболизма оксида азота в миокарде крыс. Производные триазола и АТФ – лонг, введенные за 30 минут до применения натрия фторид, нормализуют показатели синтеза, метаболизма оксида азота.

Ключевые слова: оксид азота, фторидная интоксикация, кардиотрил, метаболит, АТФ – лонг.

CARDIOTRYL, ITS METABOLITH AND ATP – LONG INFLUENCE ON THE AZOT OXID IN THE RATS MYOCARDIUM UNDER HYPOXIA CAUSED SODIUM FLUORIDE

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

Abstract. Flourine intoxication brings to the reduction of azot oxid metabolith process in the rats myocardium. Tryazol derivations and ATP – long introduced in 30 minutes sodium floride application have normalized synthesis indices of metabolith oxide azot.

Key words: azot oxide, flourine intoxication, cardiotryl, metabolith, ATP – long.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Амосова К.М., Конопльова А.Ф., Мхітарян Л.С. і співав. Клінічна ефективність нового препарату метаболічного типу дії АТФ-лонг та його вплив на фізичний стан хворих з початковими формами ІХС // Ліки України. – 1999. – №6. – С. 57–58.
2. Галенко А.С., Шуленін С.Н. Способи немедикаментозної і фармакологічної корекції ендотеліальної дисфункції. // «ФАРМіндекс-Практик». – 2006. – №10. – С. 2–10.
3. Георгиевский Г.В., Куликов А.Ю. Определение примесей в отечественных субстанциях – производных 1,2,4-триазола методом ОФ ВЭЖХ // Фармаком. – 2009. – №2. – С. 87–98.
4. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Нарушения биоэнергетических процессов. Общие механизмы токсического действия. – Л.: Наука, 1986. – 289 с.
5. Головацкий И.Д., Ивасик Б.Д. Влияние внутривенного введения натрия фторида на гликолиз и пентозный цикл в крови // Докл. АН УССР. – 1963. – №1. – С. 504–507.
6. Горбунов Н.В. Активация образования окиси азота, опосредованная метаболитными глутаматными рецепторами в первичных культурах клеток–зерен мозжечка // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1995. – №7. – С. 40–48
7. Доклинические исследования лекарственных средств. Методические рекомендации. // Под ред. член-кор. АМН Украины А.В. Стефанова – Киев: Авицена, 2002. – 568 с.
8. Кава Т.В., Клименко О.В., Чекман І.С. Клініко – фармакологічні властивості АТФ і АТФ-лонг // Фітотерапія. – 2007. – №1. – С.3–14.
9. Клименко О.В., Чекман І.С., Горчакова Н.О. Антитоксичні властивості препарату АТФ-лонг // Ліки. – 2005. – №3-4 – С. 4–11.
10. 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.
11. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистика в науке и бизнесе. – Киев.: Изд-во «Морион». – 2002. – 639 с.
12. Липкан Г.Н., Мхітарян Л.С., Кутняк В.П. «АТФ-ЛОНГ» - представитель нового класса кардиотропных препаратов // Журнал практичного лікаря. – 1999. – №4. – С. 56–59.
13. Лук'янчук В.Д., Савченкова Л.В., Немятих О.Д., Радионов В.М. Пошук і експериментальне вивчення потенційних протигіпоксичних засобів. Медичні рекомендації. – К., 2002. – 27 с.
14. Окунев В.Н., Мирошніченко Э.Н., Рымарь-Шербина Н.Б. и др. Влияние фтористого натрия на некоторые показатели энергетического и азотистого обмена // Рацион. питание – 1974. – Вып. 10. – С. 59–62.
15. Патент № 13132 (Україна), МПК J01N 33/48.- (UA). - №200509119 / Колесник Ю.М., Беленічев І.Ф., Абрамов А.В., Павлов С.В. / Спосіб визначення активності ферменту NO- синтетази в гомогенатах тканин. – Заявл. 27.09.2005.
16. Потяшенко М.М. Влияние фторидов на некоторые энергетические и пластические показатели функции миокарда // Врачеб. дело. – 1979. – № 9. – С. 53–56.
17. Прохорова М.И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) – Л.: Изд-во Ленинградского университета. – 1982. – 272 с.
18. Тринус Ф.П. Фармакология пуринергических систем// Вестн. АМН СССР. – 1982. – №5. – С. 69–72.
19. Чекман І.С. Биохимическая фармакология. К.: 1991. – 199 с.
20. Чекман І.С., Кава Т.В., Потёмкина Н.Н., Туманов В.А. Клиническая фармакология адениловых нуклеотидов // Врач. дело. – 1985. – №4. – С. 12–16.
21. Чекман І.С., Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Кучеренко Л.І., Мазур І.А., Бухтіярова Н.В., Савченко Н.В., Горбачова С.В. Магнієвісні препарати: фармакологічні властивості, застосування. – Запоріжжя, Київ: Вид-во ЗДМУ, 2007. – 124 с.
22. Чекман І.С., Клименко О.В., Горчакова Н.О. та інші. Вивчення похідних тріанолу на перебіг гіпоксичних станів // Рациональна фармакотерапія в геріатрії: Мат. наук.-практ. конф. – К., 2009. – С. 64.
23. Яковлева В.А., Чепель А.И. Ишемическая болезнь сердца (факторы риска и профилактика). // Врачебные ведомости. – 2003. – №2. – С. 22–27.
24. Brunner, Charlotte A., Earl E et al. Shipboard Scientific Party: Range table from benthic foraminifera in Hole. // College Station. – 2005. – Vol. 139. – P. 1026.

25. Busse R., Mulsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. // *FEBS Lett.* – 1990. – Vol. 275. – P.87–90.
26. Clark B., Ludmir J., Epstein F. et al. Urinary cyclic GMP, endothelin, and prostaglandin E2 in normal pregnancy and preeclampsia. // *Am. J. Perinatol.* – 1997. – Vol. 14. – P. 559–562.
27. Davies M.J., Fu S., Wang H., Dean R.T. Stable markers oxidant damage to proteins and their application in study human disease // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – Vol.27, №11-12. – P.1151–1163.
28. Forstermann U., Closs E.I., Pollock J.S. et al. Nitric oxide synthase isozymes, characterization, purification, molecular cloning function. // *Hypertension* – 1994. – Vol. 23. – P. 1121–1131.
29. Freedman J. E., Loscalzo J. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. // *J. Thromb Haemost.* – 2003. – Vol. 1, №6. – P. 1183–1188.
30. Freedman J. E., Ting B., Hankin B. Et al. Impaired platelet production of nitric oxide in patients with unstable angina. // *Circulation.* – 1998. – Vol. 98. – P. 1481–1486.
31. Furchgott R.F. и Zawadzki J.W. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of vascular smooth muscle by acetylcholine. // *Nature.* – 1980. – Vol. 286. – P. 373–376.
32. Meldrum DR, Ayala A, Chaudry IH. Energetics of lymphocyte «burn-out» following hemorrhage and resuscitation: Adjuvant treatment with ATP-MgCl2 restores energetics and decreases lethality// *J Surg Res.* – 1994. – V.53. – P.55–61.
33. Minamano T., Kitakaze M., Sato H. et al. Plasma levels of nitrite/nitrate and platelet cGMP levels are decreased in patients with atrial fibrillation. // *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* – 1997. – Vol. 17. – P.3191–3195.
34. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. // *Pharmacol. Rev.* – 1991. – Vol. 43. – P. 109–142.
35. Nathan C. Nitric oxide synthases: roles, tools and controls. // *Cell.* – 1994. – Vol. 79. – P. 915–918.
36. Sushka M. The effects of sodium fluoride on the adenine nucleotide pool in erythrocytes of Wistar rats. Conf. Metals in Eastern and Central Europe: Health Effects, Sources of Contamination and Methods of remediation, Prague 8 – 10 № 2000 // *Inf J. Occup Med and Environ. Health.* – 2001. – Vol. 14, № 4. – P. 369–373.
37. Wink D.A., Kasprzak K.S., Maragos C.M. et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. // *Science.* – 1991. – Vol. 254. – P. 1001–1003.