

ВПЛИВ АДЕМОЛУ НА ПОКАЗНИКИ ОБМІНУ NO В ЩУРІВ ІЗ МОДЕЛЛЮ ІНФАРКТУ МІОКАРДА

О. А. ХОДАКІВСЬКИЙ¹, С. В. ПАВЛОВ², Н. В. БУХТІЯРОВА²

¹Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Україна;

²Запорізький державний медичний університет, Україна;

e-mail: aleksey.hodakovskiy@bk.ru

У досліджах на щурах встановлено, що в гострий період нітритин-ізадринного інфаркту міокарда (ІМ) знижується утворення монооксиду азоту (NO) поряд із прискореним перетворенням його у пероксинітрит. Про це свідчить більш ніж двократне пригнічення активності в міокарді загальної NO-синтази та зменшення вмісту нітратів на тлі підвищення рівня маркера пероксинітриту – нітротирозину в середньому на 246,6%. Експериментальна терапія щурів адемолом (1-адамантилокси-3-морфоліно-2-пропанолом гідрохлоридом) ефективніше за корвітин (референс-препарат) нормалізує процеси синтезу NO. Встановлено, що адемолом перевершує референс-препарат за такими показниками як активність NO-синтази (36,3%), вміст нітратів (50,6%), а також він знижує рівень нітротирозину в міокарді на 12,7%. Властивість адемолу покращувати показники метаболізму в системі NO за умов ІМ дає підставу говорити про можливість створення на його основі вітчизняного кардіопротектора.

Ключові слова: адемолом, корвітин, інфаркт міокарда, нітрозативний стрес.

Незважаючи на досягнення у створенні нових лікарських засобів, дія яких спрямована на покращення результатів лікування ішемічної хвороби серця, пошук патогенетично обґрунтованих шляхів впливу на перебіг гострої коронарної ішемії залишається актуальною задачею сучасної фармакології [1]. В умовах тривалого коронарспазму в міокарді наростають прояви нітрозативного стресу та різко погіршується морфофункціональний стан ендотелію вінцевих судин (ендотеліальна дисфункція (ЕД)) [2, 3]. Основний механізм який лежить в основі ЕД – це зниження утворення та біодоступності монооксиду азоту (NO) поряд з одночасним підвищенням рівня супероксид-аніону, продукції вазоконстрикторів та зниження енергопродукції в ендотеліюцитах [4]. Відомо, що NO є ідентичним ендотеліальному фактору релаксації, який розслаблює гладенькі м'язи судин та перешкоджає агрегації тромбоцитів [5]. Накопичено достатньо даних, які свідчать, що NO в міокарді як безпосередньо, так і опосередковано впливає на вінцеві судини [6–8]. Крім того він має прямий вплив на скоротливу здатність міокарда [9, 10].

У серці в утворенні NO, поряд із конститутивними та індукційними NO-синтазами (NOS), беруть участь і нітритредуктазні системи, які зв'язані з гемвмісними протеїнами, що здатні відновлювати нітрити до NO. Лімітуючим

фактором для ензимного окислення L-Arg за участю NO-синтаз є кисень. Тому внаслідок ішемічно-гіпоксичного ураження міокарда інгібується NO-синтазний механізм [11–13]. У той самий час дефіцит кисню забезпечує активну роботу нітритредуктазних систем, що зв'язані з гемвмісними протеїнами – гемоглобіном та міоглобіном, цитохромоксидазою, цитохромом P-450. Таким чином, майже всі патологічні стани в міокарді, що протікають на тлі гіпоксії та ішемії (зокрема стенокардія та інфаркт) будуть у тій чи іншій мірі активувати нітрит- та нітратредуктазну компоненту циклу NO. Продукти перетворення NO – NO₂⁻ та NO₃⁻, в умовах дефіциту кисню знову можуть утворювати NO. Значна кількість експериментальних та клінічних робіт свідчить, що в гострий період інфаркту міокарда (ІМ) спостерігається пригнічення процесів синтезу та транспорту NO [14–16]. Причиною цього явища, насамперед, є зменшення в умовах гіпоксії активності NOS та продукування пероксинітриту. Утворення пероксинітриту обумовлено атакою NO активними формами кисню – супероксидрадикалом та гідроксилрадикалом. Одним із наслідків утворення пероксинітриту є модифікація тирозинових залишків протеїнів. Лавиноподібне накопичення пероксинітриту супроводжується деструкцією не тільки багатьох ензимних систем, а й блокадою тирозинкіназою цілої

низки механізмів клітинної сигналізації, тому що нітротирозин, що утворюється, дуже нагадує необхідний для цього фосфотирозин [17]. Пероксинітрит відіграє не останню роль у посиленні ішемічного пошкодження кардіоміоцитів, інтенсифікує реакції оксидативного та нітрозативного стресу, а маркером його надмірної кількості може слугувати збільшення продукції нітротирозину (НТЗ). При цьому, паралельно зменшується рівень нітратів та нітритів, що може бути пов'язано, як зі зменшенням синтезу NO, так і з активацією нітратредуктазної компоненти циклу NO.

На відновлювальному етапі у хворих після перенесеної серцево-судинної катастрофи кількість NO поступово підвищується. Це може відбуватись, по-перше, за рахунок підвищення функціонування антиоксидантних систем, внаслідок чого гальмується процес його претворення у пероксинітрит. А, по-друге, внаслідок поліпшення енергозабезпечення NO починає вироблятися переважно з L-Arg за участю NO-синтаз, що в динаміці виявляється підвищенням концентрації нітритів та нітратів [18, 19].

Основними патогенетичними ланками впливу на розвиток та формування стенокардії та ІМ є застосування препаратів, що покращують кровопостачання серцевого м'яза або зменшують його потребу в кисні [20].

На сьогодні відомий широкий арсенал сучасних лікарських засобів, таких як нітрати, β -адреноблокатори, антигіпоксанти та антиоксиданти. Поміж інших можна виділити принаймні дві групи препаратів, які в цих умовах можуть мати істотний вплив на метаболізм NO – це органічні нітрати, що виконують роль донорів NO та антиоксиданти, які за рахунок нейтралізації вільних радикалів спроможні зберігати пул того NO, що вже утворився [21, 22].

Саме тому пошук нових речовин, які могли б стати основою для створення нового вітчизняного кардіопротекторного засобу, є актуальним завданням фармакології. Однією з таких перспективних сполук, на нашу думку, може стати адемом – 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанол гідрохлорид (похідне адамантану). Поштовхом для дослідження кардіопротекторної дії адемоу стали дані літератури щодо наявності в нього актопротекторних властивостей [23]. Було встановлено, що адемом, поряд із актопротекторними властивостями, захищає ішемізований міокард, а саме знижує показники летальності шурів

в умовах гострої адреналінової кардіоміопатії та діатермокоагуляційного некрозу міокарда, а також стимулює вінцевий кровообіг [24, 25]. Враховуючи патофізіологічні зміни в циклі NO в умовах ІМ та наявність в адемоу антиоксидантних властивостей метою роботи було оцінити коригувальний вплив адемоу на розвиток дисбалансу в системі NO ішемізованого міокарда шурів.

Матеріали і методи

Досліди проведено на 40 білих шурах-самцях з масою тіла 160–170 г. Дрібновогнищевий ІМ моделювали шляхом введення протягом 3 діб коронароспастичного агента пітуїтрину (1 од./кг, підшкірно), а потім β -адреноміметика ізопреналіну (ізадрину, 200 мг/кг, внутрішньом'язово). Адемом та препарат порівняння – корвітин – вводили через 20 хв після введення ізадрину також протягом 3 діб в однаковій дозі (10 мг/кг, внутрішньочеревинно) [26]. Для оцінки показників нітрозативного стресу в міокарді шурів через 60 хв після останньої ін'єкції у декапітованих тварин під пропофоловим наркозом вилучали серце. Тканини серця гомогенізували при 4 °С за допомогою скляного гомогенізатора в сольовому ізотонічному розчині у співвідношенні 1 : 40. Безпротеїновий екстракт одержували шляхом додавання точної наважки (0,5 мл) гомогенату тканин серця в хлорну кислоту (0,6 М) з наступною нейтралізацією 5 М розчином калію карбонату.

Про кількість NO в міокарді судили за рівнем у гомогенаті серця стабільних метаболітів нітритів і нітратів. Їх суму визначали за реакцією з реактивом Грісса після відновлення нітратів зависсю цинкового порошку в розчині амоніаку [27]. Для визначення загальної активності NOS використовували спектрофотометричний метод. Виміри абсорбції проводили на спектрофотометрі Libra S 32 PC (Biosystem Ltd, Велика Британія). В основі методу визначення загальної активності NOS лежить окиснення NADPH у реакції утворення NO із L-Arg. Зменшення NADPH, яке реєстрували спектрофотометрично при λ 340 нм, є еквімолярним кількості утвореного NO [28]. Вміст НТЗ вимірювали шляхом твердофазного імуоензимного аналізу з використанням набору Nitrotyrosine ELISA Kit (Wako Pure Chemical Industry Ltd, США). Результати обробляли статистично за допомогою програми Statistika 6.0 із використанням *t*-критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Систематичне введення шурам корона-роспастичного агента призводило до поступового, прогресуючого ішемічно-гіпоксичного ураження кардіоміоцитів. Оскільки достатня кількість кисню є лімітуючим фактором для нормального функціонування NOS, розвиток модельного ІМ супроводжується пригніченням її активності. Так, на 4-ту добу ІМ у щурів відмічається зниження активності NOS у міокарді на 62,6% (табл.). Закономірним результатом такого більш ніж двократного зменшення активності цього ензиму стало зменшення в серці вмісту NO, який в умовах ІМ виконує функцію ендogenousного ендотеліопротекторного та кардіопротекторного фактора. Згідно з даними літератури, зменшення кількості NO в цих умовах може відбуватись за рахунок порушень його синтезу і транспорту [15, 29, 30]. NO є нестабільним, короткоживучим радикалом, який атакується активними формами кисню і перетворюється в пероксинітрит [16]. Під час моделювання ІМ встановлено підвищення в міокарді експериментальних тварин вмісту нітротирозину на 264,6% (табл.). На користь твердження про зменшення вмісту NO в ранній період ІМ опосередковано може свідчити і низький вміст у гомогенаті міокарда стабільних метаболітів NO (табл.). Рівень цих метаболітів є меншим відносно показника інтактних тварин на 58,0%. Його зменшення в умовах гострої кардіальної ішемії може відбуватись не тільки за рахунок пригнічення активності NOS, а й внаслідок активації

нітратредуктазної компоненти циклу NO. Показано [18, 19], що активація нітратредуктаз у гострий період ІМ супроводжується утворенням невеликої кількості NO, однак зростання в цих умовах вмісту супероксидрадикала забезпечує перетворення майже усього NO в пероксинітрит, який у значній кількості накопичується в серці. Не дивлячись на те, що кількість нітратів може поповнюватись аліментарно, їх зменшення вочевидь може вказувати на гіпопродукцію NO та його подальше перетворення в пероксинітрит [13, 29].

Експериментальна терапія щурів із ІМ адемолом, так само як і лікування корвітином, сприяє нормалізації процесів синтезу NO та зменшенню проявів нітрозативного стресу. Так, на тлі введення обох речовин активність NOS вірогідно зростає відносно групи з моделлю ІМ (контроль) відповідно на 103,9 та 49,6%, вміст нітратів на 44,7 та 4,0%, поряд із зменшенням продукції НТЗ на 32,6 та 24,0%. При цьому, адемолом за здатністю підвищувати активність NOS і вміст нітратів, а також знижувати НТЗ у міокарді, вірогідно перевершує референс-препарат у середньому відповідно на 36,3; 50,6 та 12, 7%.

Таким чином, в умовах змодельованого ІМ адемолом впливає на гомеостаз у системі NO і перешкоджає розвитку нітрозативного стресу. У разі однакового режиму введення та дозах (3 доби, 10 мг/кг внутрішньочеревинно) за своїми захисними властивостями адемолом вірогідно переважає корвітин. На нашу думку, адемолом не має прямого впливу на продукцію NO в умовах експериментального ІМ. Його

Вплив адемолу та корвітину на показники обміну NO в серцевому м'язі щурів із експериментальним інфарктом міокарда (M ± m, n = 10)

Показники	Активність NOS, нмоль NADPH/хв·мг протеїну	Стабільні метаболіти NO (нітрати), мкмоль/г протеїну	Нітротирозин, нмоль/г тканини
Інтактні тварини	14,32 ± 0,40	6,69 ± 0,21	67,48 ± 2,03
ІМ (контроль)	5,36 ± 0,43* (-62,6%)	2,82 ± 0,19* (-58,0%)	246,02 ± 12,01* (+264,6%)
ІМ+ адемолом (10 мг/кг)	10,93 ± 0,43**^ (-23,7%) [+103,9%]	4,08 ± 0,19**^ (-39,02%) [+44,7%]	165,81 ± 3,83**^ (+145,7%) [-32,6%]
ІМ + корвітин (10 мг/кг)	8,02 ± 0,43** (-44,0%) [+49,6%]	2,71 ± 0,17* (-59,5%) [+4,0%]	186,9 ± 4,80** (+177,0%) [-24,0%]

ІМ – інфаркт міокарда; * $P < 0,05$ відносно відповідного показника в інтактних щурів; # $P < 0,05$ відносно відповідного показника в контрольній групі; ^ $P < 0,05$ відносно відповідного показника у групі щурів, яким вводили корвітин; (%) – зміна відносно показника тварин інтактною групи; [%] – зміна відносно показника тварин контрольної групи.

коригувальна дія на систему обміну NO, напевно, як і референс-препарату корвітину [14] може бути пов'язана з антиоксидантними властивостями, реалізація яких попереджає перетворення NO в пероксинітрит (на користь цього вказує зниження рівня НТЗ відносно контролю). Це узгоджується і з даними літератури [23] щодо наявності в адемолю антиоксидантних властивостей на тлі хронічного іммобілізаційного стресу, однак наведена теза потребує додаткових досліджень за даної патології.

Вплив адемолю на функціонування системи NO в разі змодельованого ІМ може бути одним із механізмів його захисного впливу на ішемізований міокард і вказує на перспективність розробки на його основі, а саме адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанол гідрохлориду, вітчизняного кардіопротектора.

ВЛИЯНИЕ АДЕМОЛА НА ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА NO У КРЫС С МОДЕЛЬЮ ИНФАРКТА МИОКАРДА

*А. А. Ходаковский¹, С. В. Павлов²,
Н. В. Бухтиярова²*

¹Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Украина;

²Запорожский государственный медицинский университет, Украина;
e-mail: aleksey.hodakovskiy@bk.ru

В экспериментах на крысах показано, что в острый период питуитрин-изадринового инфаркта миокарда (ИМ) происходит снижение уровня монооксида азота (NO) с параллельным увеличением его превращения в пероксинитрит. Об этом свидетельствует более чем двукратное угнетение активности в миокарде NO-синтазы и уменьшение содержания нитратов на фоне увеличения уровня маркера пероксинитрита — нитротирозина — в среднем на 246,6%. Экспериментальная терапия крыс адемолом (1-адамантилокси-3-морфоліно-2-пропанолом гидрохлоридом) эффективнее, чем корвитин (референс-препарат) нормализовала процессы синтеза NO. Показано, что адемолю превышает референс-препарат по таким показателям как активность NO-синтазы (36,3%), образование нитратов (50,6%), а также он снижает уровень нитротирозина в миокарде соответственно на 12,7%. Наличие у адемола корригирующего действия на показатели метаболизма в системе

NO в условиях ИМ указывает на возможность создания на его основе отечественного кардиопротектора.

Ключевые слова: адемолю, корвитин, инфаркт миокарда, нитрозативный стресс.

INFLUENCE OF ADEMOL ON NO METABOLISM INDICES IN RATS WITH MODELING MYOCARDIAL INFARCTION

*O. A. Khodakovskiy¹, S. V. Pavlov²,
N. V. Buchtiyarova²*

¹Vinnitsa National Pirogov Memorial Medical University, Ukraine;

²Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine;
e-mail: aleksey.hodakovskiy@bk.ru

It was established in experiments on the rats in the acute period of modeling pituitrin-isadrin myocardial infarction the formation of nitrogen monoxide decreases along with its accelerated transformation into peroxy-nitrite.

It was evidenced by more than double inhibition of NO synthase activity in the myocardium and by decreasing the amount of nitrates on the background of the increasing level of peroxy-nitrites' marker — nitrotyrosine by 246.6% at an average. Experimental therapy of rats by ademol which is a derivate of adamantan (1-adamantiloxy-3-morpholino-2 propanol hydrochloride) better than by corvitin normalizes the processes of synthesis of nitric oxide. At the same time ademol probably exceeded the reference drug in ability to increase NO synthase activity and amount of nitrate, and promoted a decrease of the level of nitrotyrosine in the myocardium on the average by 36.3; 50.6 and 12.7%, respectively. Corrective influence of ademol on indicators of metabolism in NO system under the conditions of acute cardiac ischemia indicates to promising development of domestic cardioprotector on its base.

Key words: ademol, corvitin, myocardial infarction, nitrosative stress.

1. Целуйко В. И. // Ліки України. — 2009. — № 4. — С. 33–39.
2. Кравчук П. Г., Лапшина Л. А., Титова А. Ю. // Укр. мед. часопис. — 2009. — 11–12, № 6 (74). — С. 49–53.
3. Adlbrecht C., Andreas M., Redwan B. // Eur. Heart J. — 2010. — 31. — P. 892.

4. Волошин П. В., Малахо В. А., Завгородняя А. Н. Эндотелиальная дисфункция при цереброваскулярной патологии. — Харьков, 2006. — 92 с.
5. Стокле Ж. К., Мюлле Б., Андрианцитохайна Г., Клещев А. // Биохимия. — 1998. — **63**, № 7. — С. 976–983.
6. Марков Х. М. // Успехи физиол. наук. — 2001. — **32**, № 3. — С. 49–65.
7. Сагач В. Ф., Андрухов О. Я. // Фізіол. журн. — 2000. — **46**, № 1. — С. 3–9.
8. Champion H. C., Georgakopoulos D., Takimoto E. // Circ. Res. — 2004. — **94**, N 5. — P. 657–663.
9. Bers D. M. Ca // Nature. — 2002. — **415**. — P. 198–205.
10. Охотин В. Е., Шуклин А. В. // Морфология. — 2006. — **129**, № 1. — С. 7–17.
11. Мойбенко А. А., Павлюченко В. Б., Даценко В. В., Майский В. А. // Успехи физиол. наук. — 2005. — № 4. — С. 33–37.
12. Рахматуллина Ф. Ф., Чельшев Ю. А., Зефирова А. Л. // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2004. — **90**, № 8. — С. 449.
13. Danson E. J., Paterson D. J. // Ann. NY Acad. Sci. — 2005. — **1047**. — P. 183–196.
14. Даценко В. В., Павлюченко В. Б., Мойбенко А. А. // Архив клин. и эксперим. медицины. — 2003. — **12**, № 1. — С. 8–9.
15. Кургалюк Н. М., Серебровська Т. В., Носар В. І. // Укр. біохім. журн. — 2002. — **74**, № 1. — С. 82–87.
16. Беленичев И. Ф., Кучеренко Л. И., Бухтиярова Н. В. и др. // Эксперим. фізіологія та біохімія. — 2012. — № 2. — С. 7–11.
17. Реутов В. П., Гоженко Е. А., Охотин В. Е. и др. // Актуальные проблемы транспортной медицины. — 2007. — № 4 (10). — С. 89–112.
18. Трошин В. Д., Бровков Н. Н. Неотложная кардионеврология. — М: Медицинское информационное агентство, 2010. — 672 с.
19. Мойбенко А. А., Досенко В. Е., Пархоменко А. Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. — К.: Наукова думка, 2008. — 514 с.
20. Мойбенко А. А., Косенко В. Е., Пархоменко А. Н. // Вісник фармакол. фармації. — 2008. — № 9. — С. 56–61.
21. Привалов Д. В. // Медицина неотложных состояний. — 2010. — № 1 (26). — С. 22–25.
22. Мойбенко А. А. // Вісн. фармакол. фармації. — 2007. — № 5. — С. 38–47.
23. Лонська О. П. Экспериментальне дослідження актопротекторної активності нових похідних адамантану. Автореф. дис. ... к. мед. н. — Одеса, 2008. — 19 с.
24. Ходаківський О. А. // Вісник морфології. — 2010. — **16**, № 3. — С. 564–568.
25. Ходаківський О. А. // Biomed. Biosoc. Anthropol. — 2011. — N 16. — С. 7–9.
26. Чекман И. С., Колесник Ю. М., Мазур И. А. // Запорож. мед. журн. — 2010. — **12**, № 5. — С. 198–201.
27. Коренман Н. М. Методы определения органических соединений. — М.: Химия, 1975. — 360 с.
28. Чекман И. С., Губский Ю. И., Громов Л. А., Беленичев И. Ф. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: Метод. рекомендации. — К., 2010. — 81 с.
29. Реутов В. П. // Биохимия. — 2002. — **67**, № 3. — С. 353–376.
30. Godecke A., Molojavuyi A., Heger J. // J. Biol. Chem. — 2003. — **278**. — P. 21761–21766.

Отримано 13.12.2012