

NO-МІМЕТИЧНА ДІЯ НОВОГО АНТИАНГІНАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ МТ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІНФАРКТІ МІОКАРДА

І.Ф.Беленічев, І.А.Мазур, Л.І.Кучеренко, Ю.А.Волчик, А.В.Абрамов, Н.В.Бухтіярова, Н.В.Парнюк

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: МТ; NO-міметики; експериментальний інфаркт міокарда; метопролол

В дослідженні вивчалися NO-залежні механізми кардіопротективної дії МТ в умовах інфаркту міокарда. Встановлено, що призначення МТ (розробка НВО «Фарматрон») у дозі 2,5 мг/кг внутрішньоочеревинно паралельно формуванню експериментального гострого інфаркту міокарда приводило до підвищення продукції NO в цитозолі і мітохондріях ішемізованого міокарда за рахунок підвищення експресії і активності ендотеліальної NO-синтази. Введення МТ сприяє також підвищенню біодоступності цього молекулярного месенджера, підсилюючи протективну дію відновлених тіолів. Призначення МТ значно обмежує прояви нітрозуючого стресу в ішемізованому міокарді. Застосування МТ за силою терапевтичної дії достовірно перебільшує ефективність референс-препарату – метопрололу.

Як відмічалось на XII Національному конгресі кардіологів України (2011), початок нинішнього тисячоліття позначився значним розповсюдженням серцево-судинних захворювань, які посіли 2-3 місце в структурі смертності промислово розвинутих держав. Одним з грізних ускладнень, смертність від якого коливається від 10% до 50% у хворих з серцево-судинною патологією, є хронічна серцева недостатність. Розповсюдженість серцевої недостатності продовжує зростати і склала на 2006 рік 6,6 млн в Європі і 5 млн у США [1, 3, 4]. Лідуюче місце серед причин розвитку серцевої недостатності займає ішемічна хвороба серця (ІХС) і один з її грізних проявів – інфаркт міокарда [7]. Тому розробка засобів лікування цих патологій серцево-судинної системи є актуальною задачею сучасної медицини. Згідно з рекомендаціями Європейського співтовариства кардіологів важливими компонентами комплексної терапії серцевої недостатності, особливо після перенесеного інфаркту міокарда,

є β-адреноблокатори, інгібітори АПФ і діуретики [1, 3, 7, 12, 14]. Найбільш ефективним вважається застосування β-адреноблокаторів останнього покоління. Так, у гострий період інфаркту міокарда самостійно призначають парентерально кардіоселективний β₁-адреноблокатор метопролол, який на 23-36% знижує смертність, зменшує зону некрозу, а також частоту виникнення аритмій [3, 10, 12]. Однак відомо, що метопролол є ефективним не при всіх формах інфаркту міокарда (неускладнені, передньої локалізації) і чинить низку побічних реакцій [3, 7, 14].

Вищезазначене стало основою для створення принципово нового антиангінального препарату оригінальної структури. В останній час, враховуючи важливу роль NO в патогенезі серцево-судинних захворювань, механізм багатьох антиангінальних, антигіпертензивних препаратів розглядають через призму NO-модуючої дії [3, 9]. На НВО «Фарматрон» під керівництвом професора І.А.Мазура був розроблений новий підхід до

створення серцево-судинних препаратів і отримана нова оригінальна сполука – похідне 4-аміно-1,2,4-триазолу (робоча назва «МТ»), яка за попередніми даними проявляє властивості β₁-адреноблокатора і периферичного вазодилататора [5].

Виходячи із вищезазначеного, метою цього дослідження було вивчення NO-залежних механізмів кардіопротективної дії МТ в умовах інфаркту міокарда.

Матеріали та методи

Досліди виконані на 40 щурах лінії Вістар масою 190-210 г, отриманих з розплідника ДУ «Інститут фармакології і токсикології АМН України». Тривалість карантину (акліматизаційного періоду) для всіх тварин склала 14 днів. Всі маніпуляції були проведені згідно з положенням про використання тварин в біомедичних дослідках (Страсбург, 1986 р., зі змінами, внесеними в 1998 р.) та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (Київ, 2001), які узгоджені з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей». Протоколи експериментальних

досліджень та їх результати за-тверджені рішенням Комісії з біоетики ЗДМУ (протокол №33 від 26 жовтня 2011 року). Ці дослідження проводили на моделі гострого інфаркту міокарда у щурів. Інфаркт міокарда (ІМ) моделювали поетапним введенням ізадрину і пітуїтрину за схемою: пітуїтрин – 0,5 Од/кг внутрішньоочеревинно; через 20 хвилин ізадрин – 100 мг/кг підшкірно; через 6 годин ін'єкція ізадрину повторювалась і через 24 години вводились обидва агенти у тих самих дозах [2]. У роботі використовувався пітуїтрин для ін'єкцій виробництва АВ «Endokrininiai» (Литва) та ізадрин гідрохлорид виробництва SIGMA-ALDRICH (USA). Тварин виводили з експерименту через 3 години після останньої ін'єкції ізадрину під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). Препарати, що досліджувались, вводили трикратно протягом доби внутрішньоочеревинно через 30 хвилин після кожної ін'єкції ізадрину: МТ в дозі 2,5 мг/кг, метопролол виробництва «Astra Zeneca UK Ltd.» (Швеція) – 10 мг/кг [3]. В цій серії експерименту було 4 групи тварин:

- 1) інтактні (10 щурів);
- 2) контрольні – неліковані з ІМ (10 щурів);
- 3) тварини з ІМ, які отримували МТ (10 щурів);
- 4) тварини з ІМ, які отримували метопролол (10 щурів).

Тканини серця гомогенізувались на холоді в сольовому ізотонічному середовищі (0,15M KCl) при температурі +4°C за допомогою скляного гомогенізатора у співвідношенні тканина – сольовий розчин 1:20 [6]. Потім при температурі методом диференційного центрифугування на рефрижераторній центрифугі Sigma 3-30k (Німеччина) виділяли мітохондріальну фракцію в 10-кратному об'ємі середовища, що містить (в ммольях): сахарози – 250, трис-НCl-буфера – 20, ЕДТА-1 (pH 7,4) [8]. Для очистки мітохондріаль-

ної фракції від крупних клітинних фрагментів попередньо проводилось центрифугування протягом 7 хвилин при 1000 g, а потім супернатант повторно центрифугували протягом 20 хвилин при 17000 g. Мітохондрії суспендували у середовищі виділення, суспензія містила 80-100 мг білка/мл. Стабільні метаболіти NO визначали за рівнем нітратів в реакції Грісса [8], активність NOS визначали за різницею між швидкістю окиснення NADPH, яка реєструвалась флюорометрично, у двох паралельних зразках – у тому, що не містить, та у тому, що містить інгібітор NOS – N-нітро-L-аргінін [8]. Вміст сумарних SH-груп визначали спектрофотометрично за реакцією з 5,5-дитіо-біс-7-нітробензойною кислотою [8]. Нітротирозин визначали в гомогенаті серця твердофазним імуносорбентним методом по набору ELISA фірми «HBT». Для гістоімунохімічних досліджень серце на 24 години фіксували у рідині Карнуа і далі за стандартною схемою заливали в блоки парапластом-X100, з яких готували серійні фронтальні 14-мікронні гістологічні зрізи в ділянці верхівки серця. Після стандартних маніпуляцій зрізи протягом 24 годин інкубували у вологій камері (T=4-6°C) з первинними поліклональними антитілами кролів IgG (1:500) eNOS (R-20 # SC-648) виробництва «Santa Cruz Biotechnology, Inc.» (USA). Після інкубації зрізи чотири рази по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (pH=7,4). Потім протягом 1 години (T=37°C) інкубували з вторинними антитілами кози до фрагмента IgG миші, кон'югованими з флюоресцентним барвником (FITC) фірми «Sigma-Aldrich» (кат. №F2266). Для визначення експресії iNOS зрізи також після інкубації чотири рази по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (pH=7,4) і потім протягом 24 годин інкубували у вологій камері (T=4-6°C) з первинними полікло-

нальними антитілами iNOS (C-20 # SC-654 FITC), кон'югованими з флюоресцентним барвником (FITC) фірми «Santa Cruz Biotechnology, Inc.» (USA). На флюоресцентному мікроскопі Axioskop (Zeiss, Germany) визначали інтенсивність експресії ізоформ NOS за щільністю iNOS, eNOS-позитивних клітин у зрізах за допомогою відеокамери COHU – 4922 (USA) і вводили в систему цифрового аналізу зображення VIDAS – 386 («Kontron Elektronik», Germany). Статистичну перевірку даних проводили з використанням стандартного пакету аналізу програми статистичної обробки результатів версії Microsoft Office Excel 2003. Дані представлені у вигляді вибіркового середнього значення ± стандартна похибка середнього значення. Перевірку на нормальність розподілення здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Достовірність відмін між експериментальними групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента і U-критерію Уїтні-Манна комп'ютерної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., №AXXR712D833 214FAN5).

Результати та їх обговорення

Однією з основних мішеней оксидативного стресу при гострій ішемії міокарда є система оксиду азоту. Оксид азоту втягнений у велику кількість фізіологічних і патофізіологічних процесів. Він являє собою унікальний за природою і механізмом дії вторинний месенджер у більшості клітин організму. NO виконує роль сигнальної молекули, бере участь у проліферації ендотеліальних і гладком'язових клітин стінок судин, у контролі артеріального тиску, виникненні атеросклерозу і гіпертензій в судинній системі [3, 13]. NO викликає розширення коронарних судин, збільшуючи кровопостачання міокарда, може збіль-

Таблиця 1

Вплив МТ і референс-препарату на активність систем оксиду азоту в цитозольній фракції тканини серця при експериментальному інфаркті міокарда, n=40

Група тварин	NOS, нмоль/хв/мг білка	Нітрити, мкмоль/г тканини	Вільні тіоли, ммоль/г білка	Нітротирозин, нмоль/г білка
Інтакт	12,95±1,47	6,26±0,49	439,17±18,3	62,5±7,3
Інфаркт (контроль)	5,59±0,60	2,87±0,16	293,45±27,4	214,7±12,4
Метопролол + інфаркт	6,78±0,71 (+21%)	3,17±0,40 (+10,4%)	322,70±27,8 (+10%)	172,8±13,1 (-19,6%)
МТ + інфаркт	12,23±1,07* ¹ (+118%)	5,62±0,27* ¹ (+96,0%)	596,25±40,2* ¹ (+103%)	77,5±9,6* ¹ (-64,0%)

Примітки (тут і в табл. 2, 3):

1) * – зміни достовірні по відношенню до тварин контрольної групи (p<0,05);

2) ¹ – зміни достовірні по відношенню до групи тварин, які отримували метопролол (p<0,05).

шувати скоротливість міокарда через збільшення концентрації цАМФ за рахунок цГМФ-залежного зниження активності фосфодіестерази, забезпечуючи збільшення току через L-тип кальцієвих каналів [7]. NO володіє антиоксидантною дією, знижує адгезію і агрегацію тромбоцитів [13]. В умовах гострої ішемії під впливом АФК зменшується експресія ендотеліальної NO-синтази (eNOS) і знижується концентрація необхідних кофакторів NO-синтази, підвищується утилізація в міокарді і в стінках судин [15]. В умовах дефіциту антиоксидантів, особливо тіольних, має місце зниження біодоступності NO за рахунок його перетворення на пероксинітрит під дією АФК.

Наші дослідження довели, що при моделюванні ІМ спостерігається значне пригнічення в цитозольній і мітохондріальній фракціях гомогенату серця тварин активності загальної NO-синтази (на 132% і 81% відповідно), зниження рівня стабільних метаболітів NO-нітритів (на 54% і 46%) на фоні дефіциту тіольних сполук (на 33% і 38% відповідно). Такі зсуви в системі NO/відновлені тіоли призводять до зниження біодоступності NO і його перетворення на пероксинітрит, про що свідчило підвищення в цитозолі міокарда нітротирозину. Наші дані не суперечать результатам

Таблиця 2

Вплив МТ і референс-препарату на активність системи оксиду азоту в мітохондріальній фракції тканини серця при експериментальному інфаркті міокарда, n=40

Група тварин	NOS, нмоль/хв/мг білка	Нітрити, мкмоль/г тканини	Вільні тіоли, ммоль/г білка
Інтакт	0,297±0,01	6,291±0,45	152,21±7,2
Інфаркт (контроль)	0,056±0,006	3,436±0,15	94,983±17,3
Метопролол + інфаркт	0,078±0,01 (+40%)	4,045±0,32 (+18,0%)	108,139±5,8 (+14,0%)
МТ+інфаркт	0,118±0,02* ¹ (110%)	6,082±0,38* ¹ (+77,2%)	146,442±7,2* ¹ (+54,3%)

інших дослідників, якими показано, що при ІМ у щурів спостерігається зниження синтезу NO у стінці аорти, зниження активності ендотеліальної NO-синтази і збільшення активності індуцибельної NO-синтази у серці [16]. Однак збільшення експресії індуцибельної NO-синтази при ІМ не компенсує загальну NO-синтазну активність, а в умовах дефіциту L-аргініну приводить до підсилення синтезу АФК [13]. Гістоімунохімічними дослідженнями нами було встановлено зниження щільності eNO-позитивних клітин у міокарді тварин з ІМ і підвищення щільності iNO-позитивних клітин. Ці спостереження свідчать про те, що моделювання ІМ призводить до пригнічення експресії eNOS, яка володіє вираженим кардіопротективним ефектом, і підсилює експресію iNOS, яка бере участь у

реалізації програми нітрозуючого стресу. Іншими авторами показано, що не менш важливим наслідком ішемії міокарда є втрата таких опосередкованих NO ефектів як пригнічення проліферації клітин, агрегації тромбоцитів і, головне, пригнічення активації моноцитів так званими молекулами адгезії. Останній механізм відіграє суттєву роль у реалізації феномену імунозапальної активації. В розвитку останнього феномену суттєвим фактором виступають різноспрямовані зміни експресії двох ізоформ – ендотеліальної (зменшення, про що говорилося вище) та індуцибельної (зростання); iNOS, на відміну від eNOS, не потребує Ca²⁺ і кальмодуліну для свого синтезу і продукує NO в концентраціях, які значно перевищують ті, які утворюються під впливом eNOS. Крім того, на відміну від ендотеліаль-

Таблиця 3

Вплив МТ і референс-препарату на експресію індукцйбельної ендотеліальної NOS в міокарді експериментальних тварин з інфарктом міокарда, n=40

Група тварин	Щільність eNOS-позитивних клітин	Щільність iNOS-позитивних клітин
Інтакт	432,5±17,6	127,6±20,1
Інфаркт (контроль)	277,5±14,8	185,4±20,5
Метопролол + інфаркт	280,8±17,2 (+1,0%)	180,4±15,1 (-2,7%)
МТ + інфаркт	382,5±12,1* ¹ (+38,0%)	137,1±11,5* ¹ (-26,0%)

ної індукцйбельна NO-синтета за експресується тільки в патологічних умовах – у відповідь на активацію протизапальними цитокінами (зокрема, TNF-α) [10, 12, 16]. Патогенетичний зв'язок між eNOS та iNOS при ішемії міокарда полягає в тому, що в результаті пригнічення eNOS і відповідному цьому пригніченню продукції NO ендотелієм зростає експресія так званих молекул адгезії, які активують моноцити. Активний синтез iNOS останніми є ключовим фактором гіперпродукції тих самих TNF-α та інших протизапальних цитокінів, підвищеного утворення вільних радикалів з подальшим пошкодженням і апоптозом клітин тканин-мішеней [10, 12]. Призначення тваринам з експериментальним ІМ розчину для ін'єкцій МТ в дозі 2,5 мг/кг внутрішньоочеревинно приводить до підвищення активності NO-синтази на 118% і 110% в цитозолі і мітохондріях міокарда за рахунок експресії eNOS (підвищення щільності eNOS-позитивних клітин на 38%), підвищуючи таким чином створення NO (підвищення нітритів на 96% і 72% в цитозолі і мітохондріях міокарда). Наслідком цього є виразний вазодилатуючий ефект препарату, ендотелій-залежний характер якого продемонстрований на кролях з ішемією міокарда [9]. Введення МТ призводило до нормалізації експресії iNOS в міокарді (зменшення щільності iNOS-позитивних клітин на 26%). Нормалізація співвідношення між eNOS і iNOS під дією МТ приводить до гальмування реакцій нітрозуючого стресу, що проявляється в зниженні нітротирозину на 64% в цитозолі міокарда тварин з ІМ, які отримали цей препарат, у порівнянні з групою нелікованих тварин. Іншим важливим механізмом NO-міметичного ефекту МТ є підвищення біодоступності NO за рахунок збільшення концентрації транспортних молекул цього месенджера – відновлених тіолів. Так, у групі тварин з ІМ, які отримували лікування МТ, спостерігалось підви-

щення відновлених тіолів у цитозолі і мітохондріях міокарда на 103% і 54% відповідно. Призначення тваринам з ІМ метопрололу не спричиняло достовірного впливу на цей показник (табл. 1-3).

Висновки

1. При моделюванні інфаркту міокарда реєструється значне зниження активності загальної NO-синтази в цитозольній і мітохондріальній фракціях гомогенату серця експериментальних тварин, зниження рівня стабільних метаболітів NO і дефіцит відновлених тіолів на фоні активації нітрозуючого стресу.

2. При моделюванні інфаркту міокарда спостерігається депривація експресії ендотеліальної NO-синтази, яка проявляє кардіопротективні властивості, і підвищується експресія індукцйбельної NO-синтази, яка відіграє важливу роль у реалізації програми нітрозуючого стресу і ушкодження кардіоцитів.

3. Введення експериментальним тваринам розчину для ін'єкцій МТ внутрішньоочеревинно в дозі 2,5 мг/кг приводить до підвищення активності NO-синтази на 118% і 110% в цитозолі і мітохондріях міокарда за рахунок експресії ендотеліальної NO-синтази (підвищення щільності eNOS-позитивних клітин на 38%), збільшуючи таким чином утворення NO (підвищення нітритів на 96% і 72% в цитозолі і мітохондріях міокарда).

4. За силою NO-міметичної дії МТ перевищує референс-препарат метопролол.

ЛІТЕРАТУРА

1. Агеев Ф.Т. // Сердечная недостаточность. – 2005. – №2. – С. 52-78.
2. Воронина Т.А., Серединин С.Б. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – МЗ РФ ЗАО ИИА Ремедиум, 2002. – 320 с.
3. Коняхин А.Ю. Современные патогенетические подходы к коррекции ишемии миокарда: Автореф. ... дис. докт. мед. наук. – М., 2007. – 47 с.
4. Кушаковский М.С., Трешкур Т.В. Желудочковая парасистолия как фактор риска развития угрожающих аритмий у больных ишемической болезнью сердца // Матер. 1-ой Северо-западной конф. по проблеме внезапной смерти. – СПб., 1996. – С. 84.

5. Пат. РФ №2404974 С 07 D 249/08, А 61 К 31/41 и Пат. Украины №92692 Бромид 1-(β-фенил)-4-амино-1,2,4-триазолия (МТ), проявляющий кардиопротективное, противоишемическое, антигипертензивное, антиоксидантное, протеинсинтетическое и энерготропное действие / И.А.Мазур, И.Ф.Беленичев, Л.И.Кучеренко. – Заявл.: 20.04.2009. Оpubл.: 13.04.2010.
6. Прохорова М.А. Современные методы в биохимии. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1986. – 368 с.
7. Рябов В.В. Оценка влияния кардиоселективного бета-адреноблокатора талинолола на реперфузионный синдром и клиническое течение инфаркта миокарда: Дис. канд. мед. наук. – Томск, 2000. – 130 с.
8. Чекман И.С., Губский Ю.И., Громов Л.А., Беленичев И.Ф. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: Метод. рекоменд. Государственного фармакологического центра МОЗ Украины. – К., 2010. – 81 с.
9. Чекман И.С., Мазур И.А., Беленичев И.Ф. // Запорозж. мед. журн. – 2010. – Т. 12. – С. 198-202.
10. Bakris G.L. // JAMA. – 2008. – Vol. 292, №11. – P. 2227-2236.
11. Bowman A.J., Chen C.P.L.H., Ford G.A. // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1994. – №38. – P. 199-204.
12. Expert consensus document on b-adrenergic receptor blockers. The task force on beta-blockers of European Society of Cardiology // Eur. Heart. J. – 2007. – Vol. 25. – P. 1341-1362.
13. Muller B., Kleschyov A.L., Gyorgy J.C., Stoclet J.C. // Physiol. Res. – 2010. – №49. – P. 19-26.
14. Packer M. // N. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 31, №344 (22). – P. 1651-1658.
15. Shaddy R. // JAMA. – 2007. – Vol. 298, №9. – P. 1171-1179.
16. White W. Blood pressure monitoring in cardiovascular medicine and therapeutics. – New Jersey: Humana Press, 2001. – 308 p.

Адреса для листування: 69035 м. Запоріжжя,
пр. Маяковського, 26. Тел. (61) 224-69-25.
Запорізький державний медичний університет

Надійшла до редакції 16.07.2012 р.