

НО-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА МТ ПРИ КУРСОВОМ НАЗНАЧЕНИИ SHR-КРЫСАМ

И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, И. А. Мазур, Е. А. Нагорная, Н. В. Бухтиярова, Ю. А. Волчик, Н. В. Парнюк¹

Новый препарат МТ (5 мг/кг) и метопролол (10 мг/кг) при внутривнутрибрюшинном введении 1 раз в сутки в течение 15 сут в равной степени снижали АД (на 18 %) у SHR-крыс. МТ оказывал NO-миметическое действие: увеличивая образование NO в миокарде, путем повышения активности общей NOS и концентрации eNOS; и уменьшая образование маркера нитрозирующего стресса — нитротирозина, за счет снижения уровня iNOS в митохондриях миокарда. Метопролол не влиял на показатели нитроксидергической системы в миокарде крыс SHR.

Ключевые слова: артериальная гипертензия; кардиопротекция; NO-синтаза; препарат МТ

ВВЕДЕНИЕ

Артериальной гипертензией (АГ) страдают, по данным на 2011 г., до 30 % населения стран Евросоюза и США и 40 % населения России и Украины [1, 2, 7]. Несмотря на достигнутые успехи в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, проблема создания высокоэффективных лекарственных средств остается актуальной. Одной из особенностей АГ является высокая частота поражения органов-мишеней, в первую очередь — сердца [2, 7, 10]. До настоящего времени нет единой концепции о молекулярно-биохимических механизмах повреждения сердца при АГ. Полученные экспериментальные данные [4, 5, 7, 8] демонстрируют участие NO и его цитотоксических производных в повреждающем действии на клетки органов-мишеней при АГ. Важным направлением антигипертензивной терапии является кардиопротекция, которая предполагает защиту органа-мишени от повреждений и восстановление уже имеющихся в них структурных и функциональных изменений. С этой целью в клинической практике применяются ингибиторы АПФ, блокаторы АТ_{II}-рецепторов, β-адреноблокаторы [1, 2, 6, 8]. Несомненный интерес в плане создания новых препаратов, модулирующих механизмы эндогенной кардиопротекции, является азагетероциклическая система 1,2,4-триазола, структурным аналогом которой является метаболитный кардиопротектор — тиотриазолин [7]. Сотрудниками НПО “Фарматрон” (Запорожье) создан препарат МТ (бромид 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолий), проявляющий β-адреноблокирующее, антигипертензивное, противоишемическое, антиоксидантное и кардиопротекторное свойства, относящийся

к IV классу токсичности (LD₅₀ 295 мг/кг, крысы, внутривнутрибрюшинно) [5]. Разработан регламент синтеза МТ, отвечающего требованиям аналитической нормативной документации. Целью нашего исследования явилась оценка действия препарата МТ на нитроксидергическую систему миокарда у SHR-крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 30 двухмесячных крысах обоего пола со спонтанной гипертензией (SHR) (по 10 животных в контрольной группе и группах, получавших лечение) и 8 нормотензивных интактных крысах линии WKR (нормотензивные Вистар-Киото) массой 180–220 г. Животные были разделены на четыре экспериментальные группы. Исследуемые препараты вводили животным со сформировавшейся АГ внутривнутрибрюшинно, 1 раз в сутки, в течение 15 суток. Препарат МТ вводили в дозе 5,0 мг/кг (0,5 мл 0,1 % стерильного раствора на 100 г массы), метопролол — в дозе 10 мг/кг (0,5 мл 0,2 % стерильного раствора (Astra Zeneca) на 100 г массы).

У крыс всех групп измеряли артериальное давление (в начале эксперимента и через 15 сут) методом плетизмографии при помощи Transonic Animal Research Flowmeter T-106 Series (США). На 15-е сутки эксперимента животных декапитировали под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Для исследований забирали сердце, которое промывали в охлажденном физиологическом растворе и измельчали в ступке при добавлении жидкого азота. Цитозольную и митохондриальную фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования на центрифуге Sigma 3–30k (Германия) при 1000 g 10 мин, затем при 14000 g 10 мин при 4 °C [3, 5]. Определяли показатели системы оксида азота — уровень нитрит-аниона, общую активность NO-синтазы (NOS), содержание нитротирозина. Содержание нитрит-аниона определяли спектрофотометрически с помощью реактива Грисса [3]. В основе метода определения общей активности NO-синтазы ле-

¹ Кафедра фармакологии и медицинской рецептуры (зав. — проф. И. Ф. Беленичев), Запорожский государственный медицинский университет, Украина, 69035, Запорожье, пр. Маяковского, 26.
НПО “Фарматрон”, Украина, 69096, Запорожье, ул. Червонной Кинноты, 23.

Таблица 1. Влияние препарата МТ и метопролола на артериальное давление крыс со спонтанной артериальной гипертензией после введения в течение 15 сут ($M \pm m$)

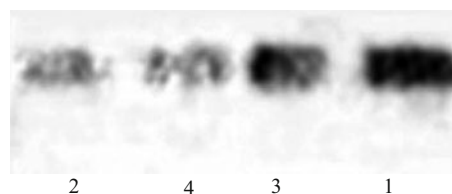
Экспериментальная группа	Артериальное давление, мм. рт. ст	
	До введения препарата	Через 15 дней терапии
Интактная (нормотензивные крысы) ($n = 8$)	105 ± 5,4	108 ± 5,5
SHR(контроль) ($n = 10$)	168 ± 5,5*	168 ± 5,2*
SHR + МТ (5 мг/кг) ($n = 10$)	172 ± 5,4*	141 ± 5,7**
SHR + метопролол (10 мг/кг) ($n = 10$)	171 ± 6,3*	142 ± 5,4**

* — $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой;
** — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой через 15 дней.

жит стехиометрическое окисление НАДФН в процессе реакции образования NO из L-аргинина [3]. Содержание нитротирозина определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (Nitrotyrosine ELISA KIT, Wacoil biotech). Согласно современным представлениям о роли различных изоформ NOS в реализации как эндогенных механизмов кардиопротекции, так и кардиотоксичности [3, 7, 10], мы определяли в митохондриальной фракции миокарда концентрацию индуцированной (iNOS) и в цитозольной — эндотелиальной (eNOS) синтаз методом Вестерн-блот анализа. Определение eNOS и iNOS осуществляли при помощи денситометрии в программе Adobe Photoshop. Данные исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы Statistica, Windows 6.0, а также SPSS 16.0, Microsoft Excel 2003. Отдельные статистические процедуры и алгоритмы реализованы в виде специально написанных макросов в соответствующих программах. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Использовали U-критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из табл. 1 артериальное давление (АД) у крыс со спонтанной гипертензией в начале экспери-



Результаты иммунного определения eNOS в цитозольной фракции миокарда крыс линии SHR на 15-е сутки экспериментальной терапии.

1 — нормотензивные крысы; 2 — SHR-крысы; 3 — SHR-крысы + МТ; 4 — SHR-крысы + метопролол.

мента и через 15 сут было повышенным на 60 %. МТ в дозе 5 мг/кг, и метопролол в дозе 10 мг/кг в течение 15 сут, в равной степени снижали АД (на 18 %).

В результате проведенных исследований установлено, что у SHR-крыс на фоне повышенного АД наблюдается уменьшение образования NO, о чем свидетельствовало снижение количества его стабильного метаболита — нитрит-аниона на фоне угнетения активности общей NOS как в митохондриях, так и в цитозоле миокарда (табл. 2 и 3). Наши данные согласуются с результатами других исследователей [9, 10]. В цитозольной фракции миокарда SHR крыс наблюдали снижение концентрации eNOS ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем у нормотензивных крыс. Активность eNOS напрямую коррелирует с концентрацией внутриклеточного кальция, и ей отводится ведущая роль в обеспечении базисного уровня NO и физиологической регуляции АД [9]. В митохондриях миокарда SHR крыс на фоне повышенной концентрации iNOS ($p < 0,05$) наблюдали увеличение содержания нитротирозина в 2,46 раза ($p < 0,05$) по сравнению с нормотензивными животными. Полученные факты свидетельствуют об участии митохондриальной iNOS в инициации нитрозирующего стресса, когда в условиях дефицита L-аргинина, антиоксидантной недостаточности, дисфункции митохондрий, iNOS продуцирует не NO, а его цитотоксические формы — пероксинитрит, ион нитрозония и т.д. [9].

Курсовое назначение МТ в дозе 5 мг/кг/сут SHR крысам приводило к повышению продукции NO в ми-

Таблица 2. Влияние препарата МТ и метопролола на показатели системы NO в митохондриальной фракции миокарда крыс со спонтанной артериальной гипертензией после введения в течение 15 сут ($M \pm m$)

Группа животных	NOS, мкмоль НАДФ/мин/г белка	Нитротирозин, нмоль/г белка	Нитриты, мкмоль / г ткани	Концентрация iNOS, у.е./г белка
Нормотензивные (интактные) ($n = 8$)	4,37 ± 0,26	1,04 ± 0,33	16,31 ± 1,06	0,11 ± 0,02
SHR (контроль) ($n = 10$)	1,87 ± 0,08*	2,56 ± 0,15*	6,23 ± 0,95*	1,88 ± 0,16*
SHR + МТ (5 мг/кг) ($n = 10$)	3,12 ± 0,14*** ¹	1,23 ± 0,12*** ¹	10,71 ± 0,73*** ¹	0,44 ± 0,05*** ¹
SHR + метопролол (10 мг/кг) ($n = 10$)	1,90 ± 0,07	2,54 ± 0,18	6,70 ± 1,15	1,76 ± 0,23

Примечание. Здесь и в табл. 3 изменения достоверны по сравнению:

* — с животными интактной группы ($p < 0,05$); ** — с животными контрольной группы ($p < 0,05$); ¹ — с группой животных, получавших метопролол ($p < 0,05$).

Таблица 3. Влияние препарата МТ и метопролола на показатели системы NO в цитозольной фракции миокарда крыс со спонтанной артериальной гипертензией после введения в течение 15 сут ($M \pm m$)

Группа животных	NOS, мкмоль НАДФ/мин/г белка	Нитриты, мкмоль/г ткани	Концентрация eNOS, у. е./г белка
Нормотензивные (интактные) ($n = 8$)	11,75 ± 0,75	17,23 ± 0,84	15,21 ± 0,73
SHR (контроль) ($n = 10$)	5,15 ± 0,64*	7,76 ± 0,67*	4,11 ± 0,21*
SHR + МТ (5 мг/кг) ($n = 10$)	9,71 ± 0,65** ¹	15,15 ± 0,77** ¹	12,32 ± 0,65** ¹
SHR + метопролол (10 мг/кг) ($n = 10$)	5,77 ± 0,41	7,85 ± 0,42	4,70 ± 0,33

тоходриях и цитозоле миокарда на 72 и 95 % соответственно. МТ усиливал физиологический путь синтеза NO, повышая концентрацию эндотелиальной NO-синтазы. Так, в группе SHR крыс, получавших МТ, активность общей NO-синтазы в цитозоле и митохондриях миокарда была выше аналогичных показателей контроля на 88 и 67 %, соответственно ($p < 0,05$). В группе SHR крыс, получавших МТ, отмечали увеличение в цитозоле миокарда концентрации эндотелиальной NO-синтазы в 3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с нелеченными животными.

Позитивное действие МТ в отношении системы NO сопровождалось и торможением так называемых “паразитарных” реакций и уменьшением количества их продуктов — цитотоксических производных NO [7]. Данный эффект МТ является результатом снижения концентрации iNOS в митохондриях миокарда. Так, в митохондриях миокарда SHR крыс, получавших МТ, было выявлено уменьшение концентрации iNOS на 76 % ($p < 0,05$) и снижение маркера нитрозирующего стресса — нитротирозина — на 52 % ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы. Таким образом, МТ, нормализуя соотношение eNOS/iNOS в цитозоле и митохондриях миокарда, усиливает кардиопротекторные и уменьшает кардиотоксические свойства NO на определенном этапе молекулярно-биохимического каскада. Курсовое назначение SHR-крысам метопролола не оказывало влияния на нитроксидергическую систему миокарда.

ВЫВОДЫ

1. Препарат МТ в дозе 5 мг/кг 1 раз в сутки внутривентриально в течение 15 сут снижает артериальное давление у гипертензивных крыс (SHR).

2. Препарат МТ уменьшает гипертензия-индуцированные нарушения в нитроксидергической системе миокарда SHR-крыс, повышая соотношение eNOS/iNOS в 12,8 раз, тем самым интенсифицирует синтез NO, усиливая его защитные — кардиопротекторные эффекты и уменьшая риск развития нитрозирующего стресса.

3. Метопролол в дозе 10 мг/кг 1 раз в сутки внутривентриально в течение 15 сут не влиял на показатели нитроксидергической системы в миокарде крыс SHR.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ф. Т. Агеев, *Сердечная недостаточность*, № 2, 52 – 78 (2005).
2. *Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Российские рекомендации (третьей пересмотра)*, Москва (2008).
3. *Доклиническое изучение специфической активности потенциальных препаратов: метод. рекомендации ГФЦ МЗ Украины*, И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев (ред.), Киев (2010).
4. А. Ю. Коняхин, *Автореф. дис. д-ра мед. наук*, Москва (2007).
5. И. А. Мазур, И. Ф. Беленичев, Ю. М. Колесник, Л. И. Кучеренко и др., Патент 2404974 РФ, опубл. 27.11.2010.
6. М. А. Прохорова, *Современные методы в биохимии*, Изд-во ЛГУ, Ленинград (1986).
7. И. С. Чекман, И. А. Мазур, И. Ф. Беленичев, *Запорож. мед. журн.*, 12(4), 198 – 202 (2010).
8. G. L. Bakris, *JAMA*, 292(11), 2227 – 2236 (2008).
9. B. Muller, A. L. Kleschyov, J. C. Gyorgy, J. C. Stoclet, *Physiol. Res.*, 49, 19 – 26 (2010).
10. R. Shaddy, *JAMA*, 298(9), 1171 – 1179 (2007).

Поступила 27.06.13

NO-DEPENDENT MECHANISMS OF CARDIOPROTECTIVE ACTIVITY OF MT PREPARATION DURING COURSE ADMINISTRATION TO SHR RATS

I. S. Chekman, I. F. Belenichev, L. I. Kucherenko, I. A. Mazur, E. A. Nagornaya, N. V. Bukhtiyarova, Yu. A. Volchik, and N. V. Parniuk

Zaporozhye State Medical University, pr. Mayakovskogo 26, 69035 Zaporohye, Ukraine
Farnatron Corporation, ul. Chervonoi Kinnoty 23, 69096 Zaporohye, Ukraine

Chronic (15 days) single daily intraperitoneal insertion of the new preparation MT (5 mg/kg) and metoprolol (10 mg/kg) into SHR rats leads to the same decrease (18%) in arterial pressure. In addition, MT exhibits a cardioprotective effect because of NO-mimetic properties, increasing NO formation in myocardium via increasing general NOS activity and eNOS expression. MT normalizes iNOS expression in myocardium mitochondria and decreases nitrotyrosine (nitrosation stress marker) formation. At the same time, the reference preparation metoprolol did not exhibit NO-mimetic properties in myocardium of SHR rats.

Keywords: arterial hypertension; cardioprotection; NO synthase; 4-amino-1,2,4-triazole derivative (MT)