

ЭНДОТЕЛИО- И КАРДИОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ГИДРОКСИПИРИДИНА НА МОДЕЛИ L-NAME-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЕФИЦИТА ОКСИДА АЗОТА

© Рагулина В.А.

Кафедра биологической химии Курского государственного медицинского университета, Курск

E-mail: nitentis@mail.ru

Целью работы стало установление эндотелиопротективных и кардиопротективных эффектов некоторых производных 3-гидроксипиридина в условиях L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота. Эксперименты проведены на крысах Вистар. Производные 3-гидроксипиридина (препараты: мексидол (2-метил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) и этоксидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина малат), соединение бета-гидроксиникотиноилгидразон 2-метил-3-гидрокси-4-формил-5-оксиметилпиридина дигидрохлорид – ПОНКГП) вводили пятикратно, через 24 часа, внутривентриально: мексидол и этоксидол по 50 мг/кг, ПОНКГП по 35 мг/кг сразу после моделирования эндотоксин-индуцированной эндотелиальной дисфункции. Установлено, что по выраженности эндотелио- и кардиопротективных свойств исследованные производные 3-гидроксипиридина в условиях эндотоксин-индуцированной модели эндотелиальной дисфункции располагаются в следующем порядке: мексидол = соединение ПОНКГП → этоксидол.

Ключевые слова: эндотоксин-индуцированная модель эндотелиальной дисфункции, производные 3-гидроксипиридина.

ENDOTHELIO- AND CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF SOME 3-HYDROXYPYRIDINE DERIVATIVES ON THE L-NAME-INDUCED NITRIC OXIDE DEFICIENCY MODEL

Ragulina V.A.

Department of Biological Chemistry of Kursk State Medical University, Kursk

The aim of this work was to establish a cardioprotective and endothelioprotective effects of some 3-hydroxypyridine derivatives in terms of L-NAME-induced deficiency of nitric oxide. The experiments were performed on Wistar rats. Derivatives of 3-hydroxypyridine (drugs: Mexidol (2-methyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate) and Etoxicol (2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine malate), combination of beta-hydroxynicotinate 2-methyl-3-hydroxy-4-formyl-5-oxymethylpyridine dihydrochloride – PONKGP) were administered five times, every 24 hours, intraperitoneally: Etoxicol and Mexidol – 50 mg/kg, PONKGP – 35 mg/kg immediately after modeling endotoxin-induced endothelial dysfunction. It was found that the intensity of endothelio- and cardioprotective properties of the investigated 3-hydroxypyridine derivatives under the conditions of endotoxin-induced endothelial dysfunction is in the following order: Mexidol = PONKGP combination → Etoxicol.

Keywords: endotoxical models of endothelial dysfunction, 3-hydroxypyridines derivative.

В широком смысле эндотелиальная дисфункция может быть определена как неадекватное (увеличенное или сниженное) образование в эндотелии различных биологически активных веществ. В последнее время сложилось более узкое представление об эндотелиальной дисфункции как о состоянии эндотелия, при котором имеется недостаточная продукция оксида азота. Поскольку оксид азота принимает участие в регуляции практически всех функций эндотелия, а кроме того, является фактором, наиболее чувствительным к повреждению, такое представление о дисфункции эндотелия вполне корректно [5, 6, 8, 9].

Широкий спектр биорегуляторных эффектов сосудистого оксида азота указывает на то, что снижение его уровня в эндотелиальных клетках в условиях оксидантного стресса должно вызывать существенные изменения их функций и системы кровообращения в целом [13]. Эти нарушения включают: снижение эффектов эндотелийзависимых

вазодилататоров и повышение вазоконстрикторных влияний, рост артериального давления, нарушения системной и региональной гемодинамики, функций сердца, увеличение адгезивных молекул эндотелия, агрегации тромбоцитов; прилипание их и лейкоцитов к сосудистой стенке; пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток с образованием неоинтимы, синтез внеклеточного матрикса и др. [2].

В этой связи для коррекции состояний, сопровождающихся эндотелиальной дисфункцией, перспективными считаются препараты, обладающие антиоксидантной активностью. В результате многолетних исследований было создано несколько оригинальных отечественных препаратов на основе 3-гидроксипиридина, активно используемых в клинической практике (эмоксипин, мексидол, этоксидол) [10, 14]. В то же время препараты и соединения данной группы мало изучены в отношении коррекции развития эндотелиальной дисфункции.

Целью исследования явилось установление кардиопротективных и эндотелиопротективных эффектов некоторых производных 3-гидроксипиридина в условиях L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 120 здоровых половозрелых крысах-самцах Вистар, массой 170-200 г. В опытах использовали животных, прошедших карантинный режим вивария Курского государственного медицинского университета и не имевших внешних признаков каких-либо заболеваний. Все исследования проводили в одно и то же время суток, с 8 до 12 ч, с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986), и согласно правилам лабораторной практики РФ (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.).

Модель L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота проводили путем введения N^G-нитро-L-аргинин метиловый эфира крысам-самцам ежедневно один раз в сутки, внутривенно, в дозе 25 мг/кг. На 6-й день от начала эксперимента под наркозом вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей. Болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в правую бедренную вену. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли непрерывно посредством датчика и компьютерной программы «Bioshell». Функциональные пробы: внутривенное введение ацетилхолина (40 мкг/кг) [15] и нитропруссид натрия (30 мкг/кг) [3].

Степень эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных, а также степень ее коррекции исследуемыми препаратами оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД), представляющему собой отношение площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение нитропруссид натрия к площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение ацетилхолина [11, 12].

Исследование сократимости миокарда после моделирования патологии проводили у наркотизированных крыс, находящихся на управляемом дыхании. Полость левого желудочка зондировали иглой через верхушку сердца и посредством датчика P23ID «Gould» (США),

АЦП L-154 и компьютерной программы «Bioshell» регистрировали показатели кардиогемодинамики (левожелудочковое давление (ЛЖД), максимальную скорость сокращения (+dp/dt max), максимальную скорость расслабления (-dp/dt max), частоту сердечных сокращений (ЧСС) [9].

Для оценки функциональных возможностей миокарда у животных проводили нагрузочные пробы [12] в представленной последовательности.

Проба на адренореактивность – внутривенное одномоментное введение раствора адреналина гидрохлорида 1×10^{-5} моль/л, из расчета 0,1 мл на 100 г.

Нагрузка сопротивлением – пережатие восходящей аорты на 30 сек.

3-минутная гипоксия.

Все исследованные производные 3-гидроксипиридина вводили пятикратно, внутривенно, через 24 часа, мексидол и эзоксидол в дозе 50 мг/кг, соединение ПОНКГП – 35 мг/кг. Дозировки, способы и кратность введения препаратов были основаны на рекомендациях «Регистра лекарственных средств России» (2010) и инструкциях по их применению, доз, способ и кратность применения 2-метил-3-гидрокси-4-формил-5-оксиметилпиридина дигидрохлорид (ПОНКГП) основывались на рекомендации авторов патента на соединение [1].

Уровень Total NO (сумма нитритов и нитратов, стабильные метаболиты оксида азота – SM_{NO}) определяли используя 2 аналитические операции: первая – измерение эндогенного нитрита, вторая – превращение нитрата в нитрит с использованием нитрит-редуктазы и измерение общего нитрита по абсорбции азокрасителя в реакции Грисса при длине волны 540нм с применением коммерческого набора для твердофазного ИФА фирмы «R&D» (Англия).

Достоверность наблюдавшихся при действии исследованных препаратов изменений параметров как абсолютных, так и в приростах от исходного уровня определяли разностным методом описательной статистики с нахождением средних значений сдвигов (M), средней ошибки средней арифметической ($\pm m$) и вероятности возможной ошибки (p), рассчитанной с использованием t-test для групп с различной дисперсией. Различия оценивали как достоверные, при $p < 0,05$ [4]. Для расчетов использовали программу для статистического анализа Microsoft Excel 7.0.

Влияние производных 3-гидроксипиридина на коэффициент эндотелиальной дисфункции при моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота ($M \pm m$)

Группы животных	Функциональная проба	САД	ДАД	S	КЭД
Интактные	Исходные	135,1±3,5	102,2±4,7		1,1±0,1
	АХ	83,9±4,4	37,9±2,7	1234,2±88,2	
	НП	82,9±3,8	42,6±4,5	1364,8±96,4	
L-NAME	Исходные	191,1±6,1	144,8±4,9		5,3±0,5*
	АХ	111,4±4,5*	83,1±6,2*	689,6±57,4*	
	НП	87,8±4,8	51,2±3,9	3331,1±121,1*	
L-NAME + Мексидол	Исходные	169,2±9,1	134,8±4,8		2,7±0,2**
	АХ	81,1±2,5	52,1±3,9	1329,6±175,2	
	НП	80,9±5,0	44,9±2,6	3884,7±334,2	
L-NAME + Этоксидол	Исходные	154,5±7,9	115,3±11,9		2,1±0,2**
	АХ	93,6 ± 6,4	54,8±4,5	1566,6±246,3	
	НП	104,1 ± 5,9	52,3±4,7	3352,4±389,6	
L-NAME + ПОНКГП	Исходные	184,2 ± 12,8	142,1±7,9*		1,3±0,1**
	АХ	55,3 ± 7,1	33,3±3,2	1655,4±84,3	
	НП	85,8 ± 7,5	50,1±4,8	2063,4±93,8	

Примечание: * – $p < 0,05$ – в сравнении с интактными, ** – $p < 0,05$ – в сравнении с L-NAME, САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, S – площадь над кривой восстановления артериального давления при проведении фармакологических проб, КЭД – коэффициент эндотелиальной дисфункции.

Таблица 2

Влияние производных 3-гидроксипиридина на показатели сократимости левого желудочка сердца крыс при моделировании L-NAME индуцированного дефицита оксида азота ($M \pm m$)

Группы животных	ЛЖД	+dp/dtmax	-dp/dtmax	ЧСС
Интактные	107,3±5,9	6302±689	-3926±378	388±16
L-NAME	165,2±8,6*	9702±408*	-5557±219*	379±11
L-NAME + Мексидол	116,2±9,6**	5085±739**	-3798±493**	385±11
L-NAME + Этоксидол	129,8±7,9**	7126±368**	-4298±188**	358±17
L-NAME + ПОНКГП	112,9±10,2**	6149±974**	-4385±669**	348±14

Примечание: * – $p < 0,05$ – в сравнении с интактными, ** – $p < 0,05$ – в сравнении с L-NAME, ЛЖД – левожелудочковое давление, +dp/dtmax – максимальная скорость нарастания левожелудочкового давления, dp/dtmax – максимальная скорость снижения левожелудочкового давления, ЧСС – частота сердечных сокращений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе оценивалось влияние производных 3-гидроксипиридина (мексидол, этоксидол, соединение бета-гидроксиникотиноилгидразон 2-метил-3-гидрокси-4-формил-5-оксиметил-пиридина дигидрохлорид – ПОНКГП) на динамику изменений САД и ДАД при моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота.

Моделирование L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота вызывало статистически существенное повышение САД и ДАД в пробе с АХ. Это вызывало снижение площади восстановления кривой АД при проведении указанной пробы, однако наблюдалось увеличение площади треугольника

восстановления АД при проведении пробы на эндотелий-независимую вазодилатацию с НП. КЭД в группе с L-NAME индуцированным дефицитом оксида азота составил 5,3±0,5 (табл. 1). Установлено, что изучаемые препараты в разной степени снижали показатели САД и ДАД, при проведении пробы с АХ, однако у животных с L-NAME-индуцированным дефицитом оксида азота, получавших мексидол или этоксидол, целевой уровень АД не достигался. Показатели АД, статистически сопоставимые с контрольной группой, отмечены у крыс с L-NAME моделью ЭД, получавших ПОНКГП. В этой связи КЭД в группах экспериментальных животных, получавших мексидол и этоксидол, составил соответственно 2,7±0,2 и 2,1±0,2, а у крыс, получавших ПОНКГП – 1,3±0,1 (интактные животные – 1,1±0,1) (табл. 1).

Таблица 3

Влияние производных 3-гидроксипиридина на функциональные возможности миокарда крыс при проведении нагрузочных проб на фоне моделирования L-NAME индуцированного дефицита оксида азота ($M \pm m$)

Группа животных	Адренореактивность (ЛЖД, мм рт.ст.)	Исчерпание миокардиального резерва (%)
Интактные	189,9±8,1	82,9±2,2
L-NAME	238,4±5,9*	65,4±3,1*
L-NAME + Мексидол	219,8±4,9**	81,8±2,2**
L-NAME + Этоксидол	210,2±9,2**	70,9±3,6**
L-NAME + ПОНКГП	205,5±11,8**	78,8±3,5**

Примечание: * – $p < 0,05$ – в сравнении с интактными, ** – $p < 0,05$ – в сравнении с L-NAME.

При переводе животных на управляемое дыхание обнаружено, что исходные показатели сократимости левого желудочка у животных, получавших L-NAME, на фоне введения ПОНКГП, этоксидола, мексидола, достоверно оказались меньше, чем в группе животных с L-NAME-индуцированным дефицитом оксида азота, не получавших препараты. Наиболее выраженное гиподинамическое действие оказывали мексидол и ПОНКГП, т.к. значения ЛЖД после их введения не отличались от группы интактных животных (табл. 2).

Для оценки функциональных возможностей миокарда у животных с L-NAME-индуцированной ЭД дефицитом оксида азота проводились нагрузочные пробы. Использование производных 3-гидроксипиридина предотвращало повышение адренореактивности у животных с моделированием L-NAME-индуцированной патологии, снижая абсолютные цифры ЛЖД на пробе с введением адреналина (табл. 3).

Так, в группе животных, получавших L-NAME и мексидол, ЛЖД составило 219,8±4,9; в группе животных, получавших дополнительно этоксидол, – 210,2±9,2, в группе животных, получавших ПОНКГП, – 205,5±11,8, тогда как в группе животных, получавших только L-NAME, – 238,4±5,9, а у интактных животных – 189,9±8,1 мм рт.ст. Следует отметить, что только при введении ПОНКГП данный показатель статистически не отличался от нормы (здоровые животные) (табл. 3).

При проведении пробы на нагрузку сопротивлением значение прироста ЛЖД к 25-й секунде пережатия восходящей аорты в группе с моделированием L-NAME-индуцированного дефицита NO составило 65,4% по отношению к 5-й секунде, тогда как у интактных животных 82,9%, в группе животных, получавших дополнительно мексидол, – 81,8%, этоксидол – 70,9%, а в группе с ПОНКГП – 78,8%, т.е. наибольшей эффективностью обладал мексидол (табл. 3).

Таким образом, результаты исследования функционального состояния миокарда при проведении нагрузочных проб выявили отчетливое

кардиопротективное действие производных 3-гидроксипиридина, выражающееся в предотвращении увеличения адренореактивности (особенно для ПОНКГП) и падения ЛЖД (особенно для мексидола) при проведении пробы на нагрузку сопротивлением по сравнению с животными, у которых моделировали L-NAME-индуцированный дефицит NO.

Изучение содержания в сыворотке крови стабильных метаболитов оксида азота (CM_{NO}) дало следующие результаты. Применение мексидола, этоксидола и ПОНКГП соответственно повышало концентрацию CM_{NO} с 1,3±0,1 мкмоль/л у животных с L-NAME-индуцированным дефицитом оксида азота до 5,45±0,9 (у здоровых крыс 6,82±0,83 мкмоль/л), 5,1±0,5 и 4,2±0,3 мкмоль/л.

Резюмируя полученные результаты эндотелио- и кардиопротективных эффектов производных 3-гидроксипиридина на модели L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота, можно сделать вывод о том, что исследуемые препараты и соединение в той или иной степени по различным показателям проявляют выраженное эндотелиопротективное действие, что выражалось в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов, снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции КЭД и сократимости левого желудочка сердца, предупреждении снижения уровня стабильных метаболитов оксида азота. Одновременно результаты нагрузочных проб выявили предотвращение повышения адренореактивности и истощения миокардиального резерва.

Результаты проведенных нами экспериментов свидетельствуют о том, что исследуемые препараты с антиоксидантной направленностью действия обладают выраженным терапевтическим эффектом в отношении восстановления регуляторной функции эндотелия и способствуют восстановлению активности eNOS [7]. Более того, так как восстановление NO-продуцирующей функции эндотелия на фоне терапии антиоксидантами сопровождалось улучшением эндотелийзависимой вазодилатации, можно считать, что это связано с увеличением биодоступности NO, поскольку антиоксиданты, уменьшая окислитель-

ный стресс, препятствуют деградации оксида азота [3, 12].

В заключение можно высказать предположение, что прогнозирование возможных механизмов оксидативного стресса, приводящего к развитию эндотелиальной дисфункции, необходимо для разработки соответствующих профилактических и терапевтических мероприятий, используемых с целью коррекции ряда факторов патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Е.В., Сернов Л.Н., Кесарев О.Г., Конопля А.И. Бета-гидроксиникотиноилгидразон 2-метил-3-гидрокси-4-формил-5-оксиметилпиридина дигидрохлорид, проявляющий антиоксидантную, гепатопротекторную и иммуномодулирующую активность // Патент на изобретение № 2304142 от 10.08.07 г.
2. Гайсинская М.В. Эндотелиальная дисфункция, легочная гипертензия и их коррекция кораксаном у больных ишемической болезнью сердца с артериальной гипертензией и сахарным диабетом // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2008. – № 2. – С. 69-74.
3. Галаган М.Е., Широколова А.В., Ванин А.Ф. Гипотензивное действие оксида азота, продуцируемого из экзо- и эндогенных источников // Вопр. мед. химии. – 1991. – Т. 37, № 1. – С. 67-70.
4. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Л.: Медицина, 1973. – 141 с.
5. Загидуллин Н.Ш., Валеева К.Ф., Гассанов Н.Г., Загидуллин Ш.З. Значение дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях и методы ее медикаментозной коррекции // Кardiология. – 2010. – № 5. – С.54-60.
6. Инжутова А.И., Ларионов А.А., Петрова М.М., Салмина А.Б. Теория межклеточной коммуникации в развитии дисфункции эндотелия // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153, № 2. – С. 165-170.
7. Маль Г.С., Артюшкова Е.Б., Григорьева Т.М., Каплина К.Р., Каплин А.Н., Гладченко М.П., Заугольникова Н.С. Фармакологическая коррекция уровня перекисного окисления липидов при экспериментальной эндотелиальной дисфункции // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2015. – № 3. – С. 79-83.
8. Мансимова О.В., Гаврилюк Е.В., Михин В.П., Конопля Е.Н. Иммунные и оксидантные нарушения и изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов у больных с острым коронарным синдромом // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2011. – № 4. – С. 130-135.
9. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Оксид азота: роль в регуляции биологических функций, методы определения в крови человека // Лабораторная медицина. – 2005. – № 7. – С. 19-24.
10. Орлова Е.А., Рагулина В.А., Локтионов А.Л., Конопля А.И. Коррекция нарушений иммунного гомеостаза производными 3-гидрокси-4-пиридина при патологии органов панкреатобилиарной области // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 759-763.
11. Покровская Т.Г., Кочкаров В.И., Покровский М.В., Артюшкова Е.Б., Пашин Е.Н., Корокин М.В., Корокина Л.В., Залозных Я.И., Клявс Ю.П., Бруслик М.В., Корнеев М.М., Черногорцева Е.С., Чулюкова Т.А., Зеленкова Т.И., Ахметзянова И.Н., Смышко Н.В., Мальхин В.А. Принципы фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции // Кубанский науч. мед. вестн. – 2007. – № 1-2 (94-95). – С. 146-150.
12. Покровский М.В., Кочкаров В.И., Покровская Т.Г. Новый взгляд на коррекцию эндотелиальной дисфункции // Российский иммунологический журнал. – 2006. – Т. 9. – С. 60-61.
13. Свиридова С.П., Сытов А.В., Кашия Ш.Р., Сотников А.В. Роль оксида азота в патогенезе сепсис-индуцированной полиорганной недостаточности. Методы коррекции // Вестник интенсивной терапии. – 2014. – № 2. – С. 8-17.
14. Яснецов В.В., Цублова Е.Г., Яснецов В.В., Скачилова С.Я., Карсанова С.К., Иванов Ю.В. Исследование некоторых фармакологических свойств нового производного 3-гидрокси-4-пиридина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79, № 2. – С. 3-8.
15. Laursen J.B., Rajagopalan S., Galis Z. Role of superoxide in angiotensin II – induced but not catecholamine-induced hypertension // Circulation. – 1997. – Vol. 95, N 3. – P. 588-593.