

ЭНДОТЕЛИО- И КАРДИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ 3-(2,2,2-ТРИМЕТИЛГИДРАЗИНИЙ) ПРОПИОНАТА

Покровский М. В.¹, Даниленко Л. М.¹, Индерова А. В.¹, Новиков О. О.¹
Клочкова Г. Н.³, Скачилова С. Я.³, Кесарев О. Г.³

¹ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия (30500, г. Белгород, ул. Победы 85), e-mail: Danilenko_L@bsu.edu.ru

²Клинико-диагностическая лаборатория Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа

³ВНЦ БАВ (142450, Московская область, пос. Старая Купавна, ул. Кирова, 23)

В статье изложены результаты исследований по эндотелио- и кардиопротекторной активности 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата и его производных. Установлено, что 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат в дозе 90 мг/кг и его производные (никотинат –189,0 мг/кг, 5-бромникотинат – 237,3 мг/кг, 5-гидроксиникотинат–199,1 мг/кг, глицинат–159,6 мг/кг) 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат калия оказывают выраженное эндотелио- и кардиопротекторное действие на модели L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота у крыс, что выражается в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов и снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции до уровня диапазона 1,6-2,1 у производных и 2,8 у 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата, положительной динамике результатов нагрузочных проб. Также показано, что введение в структуру молекулы 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата новых функциональных групп, а именно остатка никотиновой кислоты, гиполипидемические и вазоактивные свойства которой общеизвестны, приводит к усилению эндотелио- и кардиопротекторной активности изучаемых субстанций.

Установлен наиболее выраженный эндотелио- и кардиопротекторный эффект среди производных 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата у 5-гидроксиникотината, который проявляется в максимальном снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции и улучшением результатов нагрузочных проб.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат, кардиопротекция.

ENDOTHELIUM- AND CARDIOPROTECTIVE EFFECT IN THE SERIES OF DERIVATES OF 3-(2,2,2-TRIMETILGIDRAZINY) PROPIONATE

Pokrovsky M. V.¹, Danilenko L. M.¹, Inderova A. V.¹, Novikov O. O.¹, Clochkova G. N.²,
Skachilova S. Y.³, Caesarev O. G.³

¹FGAOU VPO "Belgorod State University, National Research", Belgorod, Russia (30 500, Belgorod, ul. Victory 85), e-mail: Danilenko_L@bsu.edu.ru

²Clinical and diagnostic laboratory Belgorod Oblast Clinical Hospital of St. Joasaph

³VSC BAS (142 450, Moscow region, pos. Kupavna, Kirov Str., 23)

The article presents the results of studies on endothelial and cardioprotective activity of 3-(2,2,2-trimethylhydrazine) propionate and its derivatives. Found that 3-(2,2,2-trimethylhydrazine) propionate at a dose of 90 mg / kg and its derivatives (nicotinate -189.0 mg / kg, 5-bromnicotinate - 237.3 mg / kg, 5-gidroksinikotinat-199, 1 mg / kg, glycinate-159, 6 mg / kg) 3-(2,2,2-trimethylhydrazine) propionate potassium, have a marked endothelial and cardioprotective effects on the model of L-NAME-induced nitric oxide deficiency in rats, which is expressed the predominance of endothelium-dependent relaxation of blood vessels and reducing the rate of endothelial dysfunction to the level of the range of 1.6-2.1 and 2.8 derived from the 3-(2,2,2-trimethylhydrazine) propionate, the positive dynamics of the results of stress tests. We also show that the introduction to the molecular structure of 3-(2,2,2-trimethylhydrazine) propionate new functional groups, such as a nicotinic acid, which lipid-lowering and vasoactive properties are well known, leads to increased endothelial and cardioprotective activity of the studied substances.

Set the most pronounced endothelial and cardioprotective effects among the derivatives of 3-(2,2,2-trimethylhydrazine) propionate was established in 5-gidroksinikotinat, which manifests itself in the maximum reduction factor of endothelial dysfunction and positive stress tests results.

Key words: endothelial dysfunction, 3-(2,2,2-trimethylhydrazine) propionate, cardioprotection.

В настоящее время эндотелий рассматривается как самостоятельная мишень терапевтического воздействия для коррекции различных сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Исходя из этого, актуальной проблемой экспериментальной и клинической

фармакологии является поиск веществ с эндотелиопротекторным действием (ЭПД) как среди известных препаратов, так и новых соединений [1].

К настоящему времени установлено ЭПД препаратов, уменьшающих влияние ренин-ангиотензин-альдостероновую систему (РААС), симпатическую нервную систему (СНС) на сердечно-сосудистую систему (иАПФ, β -блокаторы и т.д.); снижающих уровень $ХС_{общ}$, $ХС_{ЛПНП}$, $ХС_{ЛПОНП}$ (особенно статины); регулирующих работу Ca^{2+} каналов (блокаторы Ca каналов), что очевидно связано как с прямыми эндотелийзависимыми механизмами действия, так и их опосредованным комплексным фармакологическим влиянием [6,7].

Уникальное положение клеток эндотелия на границе между циркулирующей кровью и тканями делает их наиболее уязвимыми для различных патогенных факторов, находящихся в системном и тканевом кровотоке. Именно эти клетки первыми встречаются с реактивными свободными радикалами, с окисленными липопротеинами низкой плотности, с гиперхолестеринемией, с высоким гидростатическим давлением внутри выстилаемых ими сосудов (при артериальной гипертензии), с гипергликемией (при сахарном диабете). Все эти факторы приводят к повреждению эндотелия сосудов, к эндотелиальной дисфункции (ЭД) [2,7]. Из всех факторов, синтезируемых эндотелием, основная роль принадлежит эндотелиальному фактору релаксации или оксиду азота (NO). Именно это соединение регулирует активность и последовательность “запуска” всех остальных биологически-активных веществ, продуцируемых эндотелием.

NO, синтезируемый эндотелиальной NO-синтазой (eNOS), – один из главных регуляторов тонуса кровеносных сосудов. Для артериальной гипертензии, мощного фактора риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, характерно образование в организме избыточного количества активных форм кислорода, которые, взаимодействуя с NO, снижают его биодоступность, а, окисляя NO до пероксинитрита, вызывают развитие окислительного стресса [3].

Повышенное образование РФК при сосудистых нарушениях сопровождается выраженной дисфункцией сосудистого эндотелия. Продукция какой-либо одной РФК может вызывать образование нескольких других. Все они накапливаются в клеточной мембране и могут оказывать неблагоприятные влияния на функции клетки [9].

При экспериментальном моделировании артериальной гипертензии у животных увеличение РФК приводит к эндотелиальной дисфункции, что подтверждается улучшением эндотелийзависимой релаксации при применении антиоксидантов.

Хроническая почечная недостаточность у животных приводит к усилению продукции РФК и снижению биодоступности NO, и как следствие – к появлению эндотелиальной дисфункции, корригируемой предварительной терапией антиоксидантами

[10].

В этой связи целью нашего исследования явилось изучение эндотелио- и кардиопротекторной активности 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата (милдронат) и его производных (никотинат, 5-бромникотинат, 5-гидроксиникотина, глицинат) 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата) на модели L-NAME индуцированного дефицита оксида азота.

Материалы и методы исследования. Исследовано 4 химических производных 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата (производные 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия), которые синтезированы во Всероссийском научном центре биологически активных веществ (ВНЦ БАВ) и препарат сравнения Милдронат® (пр-ва АО «Гриндекс»).

Изучение эндотелиопротекторной активности проводили на самцах белых крыс линии Вистар массой 250±50 г. Для моделирования эндотелиальной дисфункции внутрибрюшинно вводился неселективный блокатор NO-синтазы N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) в дозе 25 мг/кг/сут в течение 7 дней.

На 8 день от начала эксперимента под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД). Болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в бедренную вену. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряют непрерывно посредством датчика и компьютерной программы "BiopacSystems, Inc.", США. Помимо измерения АД проводили ряд функциональных тестов с последующей оценкой изменения параметров гемодинамики (САД, ДАД, ЧСС) в ответ на внутривенное введение раствора ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного (ЭЗВД) [4,5], а также изменения параметров гемодинамики в ответ на внутривенное введение раствора нитропрусида натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного (ЭНВД) [4, 5].

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 НП (ЭНВД) к площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение АХ (ЭЗВД) [4, 5]. Милдронат® и производные вводились внутрибрюшинно, однократно в течение 7 дней. Экспериментальные животные были разделены на группы (n=10): I – интактные; II – с введением L-NAME; III – с введением на фоне L-NAME Милдроната^R (пр-ва АО «Гриндекс») в дозе 90 мг/кг, IV – с введением на фоне L-NAME никотинат 3-(2,2,2-

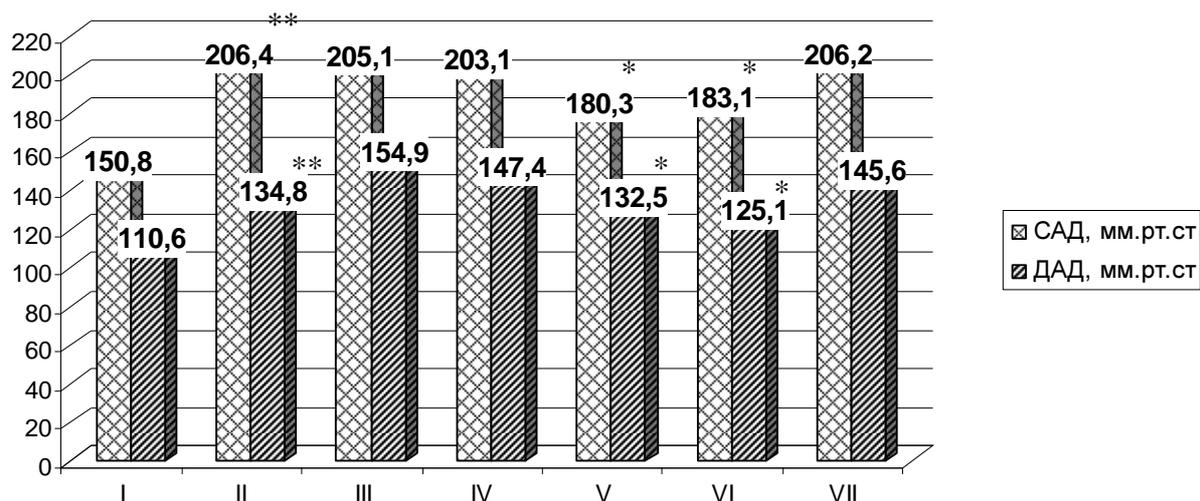
триметилгидразиний) пропионата калия в дозе 189 мг/ кг, V- с введением на фоне L-NAME 5-бромникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия в дозе 189 мг/ кг, VI – с введением на фоне L-NAME глицинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия в дозе 199 мг/кг, VII – с введением на фоне L-NAME 5-гидроксиникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия в дозе 159 мг/кг. Дозы исследуемых производных рассчитывались по молярной массе от препарата сравнения Милдронат®, в пересчете на лабораторных животных.

Для оценки функциональных возможностей миокарда у животных, находящихся на управляемом дыхании, полость левого желудочка зондировали иглой через верхушку сердца и посредством датчика RX104A "BiopacSystems, Inc." и компьютерной программы "BiopacSystems, Inc.", США, регистрировали показатели кардиогемодинамики, левожелудочковое давление (ЛЖД). Для оценки функциональных возможностей миокарда у животных проводили ряд нагрузочных проб: проба на адренореактивность (внутривенное одномоментное введение раствора адреналина гидрохлорида $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, из расчёта 0,1 мл на 100 г), нагрузка сопротивлением (пережатие восходящей аорты на 30 сек).

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе MicrosoftExcel. «Описательная статистика» применялась для нахождения среднего значения (M) и ошибки среднего (m). «Двухвыборочный t-тест с различными дисперсиями» использовался для сравнения показателей в различных группах животных и определения достоверности различий между ними. Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Обнаружено, что изучаемые препараты не предотвращали развития выраженной гипертензии, и значения САД и ДАД были достоверно выше соответствующих значений интактных животных во всех сериях экспериментов, кроме производных 5-гидрокси никотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия и 5-бромникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия, где САД и ДАД составили $183,1 \pm 3,5$ и $125,1 \pm 4,3$ и $180,3 \pm 6,3$ и $132,5 \pm 4,8$ соответственно.

Влияние Милдроната® и исследуемых веществ на исходные показатели артериального давления у наркотизированных крыс с моделированием L-NAME-индуцированной патологии представлены на рисунке 1.1.



I – Интактные; II – L-NAME; III – Милдронат® в дозе 90 мг/кг; IV– никотинат в дозе 189,2 мг/кг; V– 5-бромникотинат в дозе 237 мг/кг; VI– 5-гидроксиникотинат в дозе 199,1 мг/кг; VII – глицинат в дозе 159,6 мг/кг(3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия)

Рисунок 1.1. Влияние производных 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата калия на АД систолическое и АД диастолическое при моделировании L-NAME (25 мг/кг внутрибрюшинно, однократно в течение 7 дней)-индуцированного дефицита NO.

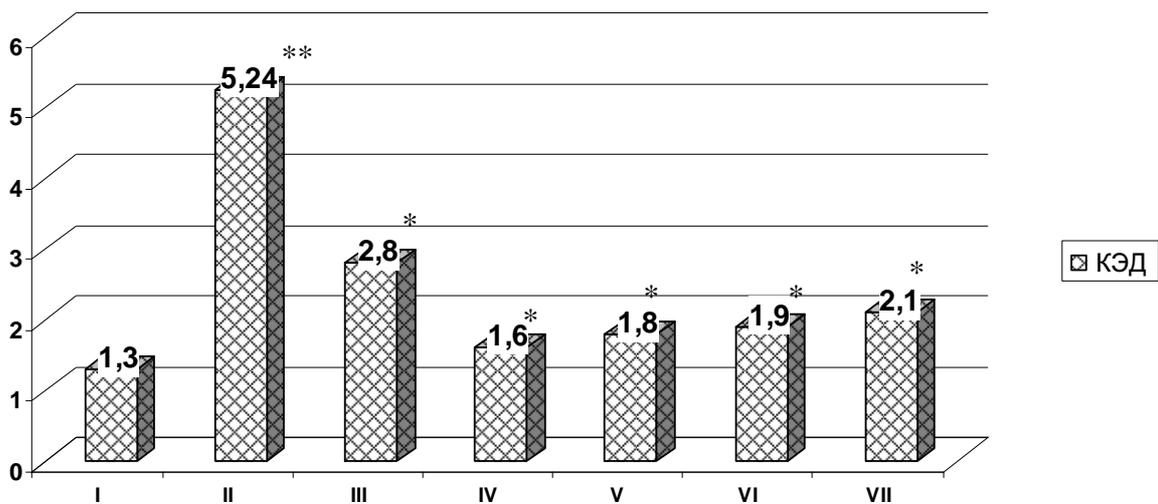
Примечание. * – $p = 0,05$ – в сравнении с L-NAME, ** – $p = 0,05$ – в сравнении с интактными.

На рисунке 1.2 представлены результаты функциональных проб на эндотелийзависимое (ацетилхолин 40 мкг/кг в/в) и эндотелийнезависимое (нитропруссид 30 мг/кг в/в) расслабление сосудов у животных с L-NAME индуцированной патологией на фоне лечения исследуемыми препаратами с последующим расчетом КЭД.

Обращает на себя внимание, что Милдронат® и все его производные приводили к достоверно выраженному снижению КЭД. Обнаружено, что Милдронат® снижает КЭД до $2,8 \pm 0,1$, тогда как в группе животных, получавших L-NAME, он составлял $5,3 \pm 0,6$.

Исследуемые производные достоверно относительно контрольной группы снижали КЭД до $1,6 \pm 0,3, 1,8 \pm 0,6, 1,9 \pm 0,5, 2,4 \pm 0,5$ соответственно.

При проведении пробы на адренореактивность выявлено достоверное снижение максимального подъема левожелудочкового давления в ответ на внутривенное введение адреналина у крыс, получавших Милдронат® $230,8 \pm 6,7$ мм. рт. ст., по сравнению с группой не леченных животных $254,2 \pm 7,8$ мм. рт. ст. ($p < 0,05$), что свидетельствует о предотвращении повышения адренореактивности на фоне лечения. Производные никотинат и 5-гидроксиникотинат (3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат калия), максимально предотвращали повышение адренореактивности до $192,6 \pm 5,4$ и $163,9 \pm 7,1$ мм. рт. ст.



I – Интактные; II – L-NAME; III – Милдронат® в дозе 90 мг/кг; IV– никотинат в дозе 189,2 мг/кг; V– 5-бромникотинат в дозе 237 мг/кг; VI– 5-гидроксиникотинат в дозе 199,1 мг/кг; VII– глицинат в дозе 159,6 мг/кг(3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия)

Рисунок 1.2. Влияние производных 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата калия на коэффициент эндотелиальной дисфункции при моделировании L-NAME (25 мг/кг внутрибрюшинно однократно в течение 7 дней)-индуцированного дефицита NO.

Примечание. * – $p = 0,05$ – в сравнении с L-NAME, ** – $p = 0,05$ – в сравнении с интактными, вызванное L-NAME-индуцированной патологией. У 5-бромникотината и глицината (3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат калия) адренореактивность составила $223,5 \pm 8,4$ и $213,4 \pm 6,9$ мм. рт. ст.

Проба на нагрузку сопротивлением показала, что Милдронат® и все его производные предотвращали падение сократимости с 5 на 25 секунду пережатия аорты на фоне моделирования эндотелиальной дисфункции. Так, миокардиальный резерв на 25 секунде проведения проб у интактных животных составил $83,6 \pm 2,1$ % от величины на 5 секунде. В контрольной группе (L-NAME индуцированный дефицит оксида азота) – $66,0 \pm 2,3$ % введение крысам препарата Милдронат® способствовало поддержанию миокардиального резерва на уровне $78,5 \pm 4,1$. Предварительное введение производных (никотинат, 5-бромникотинат, 5-гидроксиникотина, глицинат) (3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат калия) при проведении пробы на нагрузку сопротивлением приближало значения до уровня интактных животных и составило $72,5 \pm 2,1$, $82,3 \pm 3,9$, $78,1 \pm 6,1$ и $70,9 \pm 5,8$ % соответственно.

В настоящее время для коррекции состояний, сопровождающихся эндотелиальной дисфункцией, перспективными считаются препараты, обладающие антиоксидантной активностью, так как главным механизмом, лежащим в основе эндотелиальной дисфункции, является снижение продукции и биодоступности NO при одновременном повышении уровня супероксид аниона вследствие увеличения окислительной активности НАДФ [1].

Милдронат, который сам антиокислительными свойствами не обладает, увеличивает в организме концентрацию гамма-бутиробетаина (ГББ), потому что под воздействием Милдроната он окисляется в карнитин медленнее обычного. В свою очередь ГББ может индуцировать образование NO, который является одним из самых эффективных поглотителей свободных радикалов в организме. Милдронат, увеличивая количество ГББ, способен защищать клетки от эффектов свободных радикалов, но это осуществляется, опосредованно, через индукцию биосинтеза NO. Следовательно, Милдронат способствует появлению физиологически регулируемого количества NO, позволяющего организму самому осуществить необходимый для него уровень защиты от радикалов.

При введении в молекулу 3-(2,2,2-триметилгидразиния пропионата) никотиновой кислоты и её производных, а именно 5-бромникотината, 5-гидроксиникотината, а также глицината, обладающих различной степенью антиоксидантной активности, предполагается выявление новых свойств и усиление эффектов при лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

Так, субстанции 5-гидроксиникотинат и 5-бромникотинат (3-(2,2,2-триметилгидрозиний) пропионат калия) достоверно в отличие от других веществ повлияли на гемодинамические показатели на модели L-NAME-индуцированного дефицита NO и понизили САД и ДАД до следующих значений $183,1 \pm 3,5$ и $125,1 \pm 4,3$ мм.рт. ст. и $180,3 \pm 6,3$ и $132,5 \pm 4,8$ мм. рт. ст. соответственно. Максимально снижение КЭД характерно для трех представленных модификаций: никотинат, 5- бромникотинат, 5-гидроксиникотинат (3-(2,2,2-триметилгидрозиний) пропионат калия), $1,6 \pm 0,3$, $1,8 \pm 0,6$, $1,9 \pm 0,5$.

Проведенные экспериментальные исследования позволяют заключить, что препарат Милдронат®) и все его модификации оказывали выраженное эндотелиокардиопротекторное действие на модели L-NAME-индуцированного дефицита NO, что выражалось в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов и снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции, предотвращении повышения адренореактивности и падении сократимости ЛЖ давления.

Учитывая важную роль в развитии ЭД оксидативного стресса, можно предположить, что вещества, обладающие антиоксидантной активностью, могут воздействовать на различные звенья развития ЭД: на систему синтеза и биодоступности NO, гемореологические параметры крови, липидный и углеводный обмен, воспаление, пролиферацию. Поэтому поиск высоко активных эндотелиопротекторов среди соединений, обладающих антиоксидантной активностью, вполне оправдан.

Выводы

1. (3-(2,2,2-триметилгидрозиный) пропионат (вилдронат) и его производные (никотинат, 5-бромникотинат, 5-гидроксиникотина, глицинат) (3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат калия) оказывают выраженное эндотелио- и кардиопротекторное действие на модели L-NAME индуцированного оксида азота, что свидетельствует о вкладе их в NO-эргическую систему за счет увеличения гамма-бутеробитаина.
2. Все производные в ряду 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата оказывают наиболее выраженное эндотелио- и кардиопротекторное действие на модели L-NAME индуцированного оксида азота по сравнению с препаратом сравнения (милдронат), что подтверждает перспективность их дальнейшего углубленного изучения.

Список литературы

1. Карпов Ю. А. Новые рекомендации по артериальной гипертензии РМОАГ/ВНОК 2010 г.: вопросы комбинированной терапии // Русский медицинский журнал. 2010. № 22: Кардиология. С. 1290-1298.
2. Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: Pro et contra: пособие для врачей. М.: Медпрактика-М, 2003. 39 с.
3. Характеристика биохимических маркеров функции сосудистого эндотелия: разработка модельной системы с применением клеточных культур / В. А. Метельская, Н. Г. Гуманова, О. А. Литинская и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2004. № 2. С. 34-39.
4. Сравнительное исследование противоишемического эффекта 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата и его производных при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда / М. В. Покровский, О. В. Харитонова и др. // Вестник ВолгГМУ. Прил. 2011. С. 76-77 (Материалы III Всерос. науч.-практ. семинара для мол. ученых «Методол. аспекты эксперим. и клинич. фармакологии», Волгоград, 20–21 сент. 2011 г.).
5. Метаболическая и антиоксидантная терапия L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции / Е. Б. Артюшкова, М. В. Покровский, Е. В. Артюшкова и др. // Кубанский научный медицинский вестник. 2008. № 3-4. С. 73-78.
6. Libby P., Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets // Nat. Med. 2002. Vol. 8, № 11. P. 1257-1262.
7. Effect of L-arginine on acetylcholine-induced endothelium-dependent vasodilation differs between the coronary and forearm vasculatures in humans / Y. Hirooka, K. Egashira, T. Imaizumi et al. // J. Am. Coll. Cardiol. 1994. Vol. 24, № 4. P. 948-955.

8. Marchesi C., Paradis P., Schiffrin E. L. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation // Trends Pharmacol. Sci. 2008. Vol. 29, № 7. P. 367-374.
9. Frisbee J. C., Stepp D. W. Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2001. Vol. 281, № 3. P. H1304-H1311.
10. Heilzer T., Schlinzig T., Krohn K. et al. // Circulation. 2001. Vol. 104, N 22. P. 2638-2646.

Рецензенты:

Бубенчикова В. Н., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармакогнозии и ботаники Курского государственного медицинского университета, г. Курск.

Сипливая Л. Е., д.б.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической, токсикологической и аналогической химии Курского государственного медицинского университета, г. Курск.