



УДК 612.354.1:615.917:615.015.12

ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ АНТИОКСИДАНТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ГИДРОКСИПИРИДИНА И ИХ ВЛИЯНИЕМ НА ВАЗОДИЛАТИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ В УСЛОВИЯХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

В.А. РАГУЛИНА*Курский государственный
медицинский университет**e-mail: wvas@mail.ru*

Производные 3-гидроксипиридина в условиях токсического поражения печени, вызванного введением тетрахлорметана, обладают выраженными антиоксидантными свойствами. Препарат «Этоксидол» в дозе 25 мг/кг предотвращает развитие L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции.

Ключевые слова: токсическое поражение печени, производные 3-гидроксипиридина, тетрахлорметан, эндотелиальная дисфункция, L-NAME, антиоксиданты.

Одним из основных и пусковых патофизиологических механизмов, приводящих к развитию сосудистых и макроорганных нарушений, является окислительный стресс. Так, окислительный стресс инициирует нарушения, связанные с кровоснабжением печени (повреждение эндотелия сосудов и синусоидов печени с изменением выработки оксида азота, ухудшение реологических свойств крови, состояния микроциркуляторного русла и пр.), что усугубляет течение основного патологического процесса.

Для фармакологической коррекции окислительного стресса широко используют антиоксиданты различной химической природы. Химическая структура антиоксидантов определяет и мишени их действия в процессе коррекции окислительного стресса. Соответственно учет такой взаимосвязи может оказаться полезен при поиске новых антиоксидантных препаратов [1, 5, 7, 8, 16].

С учетом важной роли оксидативного стресса при развитии эндотелиальной дисфункции становится целесообразным изучение эндотелиопротекторного действия средств, обладающих высокой антиоксидантной активностью. К группе таких соединений относятся производные 3-гидроксипиридина (3-ГП), проявляющие антиоксидантные и антирадикальные свойства, относящиеся к группе пиридинкарбоновых кислот, которые являются весьма перспективными для их изучения в качестве эндотелиопротекторов [3, 9].

В данном исследовании сделана попытка проанализировать, в какой мере антиоксидантное действие производных 3-ГП сочетается с эндотелиопротекторным.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводили на 80 здоровых половозрелых крысах линии Вистар массой 150-200 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.).

Новое производное 3-ГП, запатентованное под названием этоксидол (ВНЦ БАВ Московская обл., Старая Купавна, Россия) вводили пятикратно, через 24 часа, внутрибрюшинно, в экспериментально подобранной дозе – 50 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали производное оксипиридина, с выраженными антиоксидантными свойствами – мексидол, который вводили внутрибрюшинно, в дозе 50 мг/кг, по той же схеме, что и исследуемое соединение.

В другой серии экспериментов эндотелиальную дисфункцию формировали на одной из наиболее патологически сильных моделей оксидативного стресса, вызванного путем введения внутримышечно 3 мл/кг четыреххлористого углерода в виде 50% раствора в оливковом масле, трехкратно, через 24 часа [2].

Вазодилатирующая функция эндотелия в значительной мере связана с работой NO-синтазной системы, поэтому для оценки ее функционирования использовали тесты с



введением ацетилхолина и N-нитро-L-аргинин метилового эфира. N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) вводился внутривенно, ежедневно, в дозе 25 мг/кг/сут. в течение 7 суток. Этоксидол вводили внутривенно, в дозе 25 мг/кг, в течение 7 суток, в утренние часы. На 7-й день от начала эксперимента под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД), болюсное введение фарно-макологических агентов осуществляли в правую бедренную вену. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряют непрерывно посредством датчика и компьютерной программы «Віорас». Функциональные пробы – эндотелий зависимая вазодилатация (ЭЗВД) – внутривенное введение ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100г массы тела животного, а также изменения параметров гемодинамики в ответ на внутривенное введение раствора нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100г массы тела животного (ЭНВД) [12, 13].

Далее проводили оценку антиоксидантной активности как одного из компонентов эндотелиопротекторного действия изучаемых препаратов.

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов оценивали по содержанию в сыворотке крови диеновых конъюгатов жирных кислот и малонового диальдегида [15]. Кроме этого, определяли активность каталазы [4, 10].

Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя параметрический коэффициент Стьюдента и непараметрические критерии Вилкоксона-Манна и Уитни [6]. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Установлено, что в группе интактных животных ни одно из исследуемых соединений не оказывало влияния на фоновый уровень процессов ПОЛ, протекающих в организме, а также на активность одного из основных ферментов антиоксидантной системы – каталазы (табл. 1).

Таблица 1

Влияние производных 3-ГП на процессы перекисного окисления липидов в норме и при токсическом поражении печени

№ гр.	Условия опыта	АГП, усл. ед.	МДА, мкмоль/л	Каталаза, Мкат/л
1	Здоровые животные	0,37±0,03	1,76±0,07	12,14±0,31
Интактные животные				
2	Введение 0,15М раствора хлорида натрия	0,34±0,08	1,78±0,04	12,23±0,22
3	Введение метксидола	0,37±0,02	2,03±0,17	12,84±0,41
4	Введение этоксидола	0,36±0,02	1,84±0,08	11,65±0,53
Крысы с токсическим поражением печени				
5	Введение CCL ₄ и 0,15М раствора хлорида натрия	0,68±0,01 ^{*1-4}	2,43±0,1 ^{*1-4}	6,48±0,26 ^{*1}
6	Введение CCL ₄ и метксидола	0,29±0,09 ^{*5}	1,55±0,19 ^{*5}	13,10±0,41 ^{*5}
7	Введение CCL ₄ и этоксидола	0,33±0,03 ^{*5}	1,65±0,24 ^{*5}	16,23±0,3 ^{*1-6}

Примечание: * – $p < 0,05$, цифра рядом со звездочкой указывает, по отношению к какой группе показатель достоверно отличается.

Известно, что под влиянием ферментной монооксигеназной системы цитохрома P-450 образуются свободные радикалы CCL₃ и CCL, с чем связаны гепатотоксические эффекты тетрахлорметана. Эти метаболиты свободнорадикальной природы активируют процессы перекисного окисления и снижают активность антиоксидантной системы. Также в клетках печени CCL₄ путем активации NO-синтетазной системы индуцирует синтез оксида азота (NO), который, с одной стороны, играет роль молекулы-посредника, а с другой стороны, обладает цитотоксическим действием [11, 20]. Кроме того, возможно изменение проницаемости внутриклеточных структур для ионов кальция, что сопровождается повышением его концентрации в гепатоците и повышением активности кальций зависимых ферментных систем. Активированные кальцием фосфолипазы воздействуют на мембраны гепатоцитов, что приводит к повреждению мембран эндоплазматической сети и нарушению синтеза белка в клетке [17, 18].

Вторая серия экспериментов проводилась у животных с токсическим поражением печени, вызванным внутримышечным введением тетрахлорметана. У крыс с острой токсической гепатопатией выявлено статистически существенное повышение содержания продуктов ПОЛ, в частности, АГП – в 1,84 раза, МДА –

в 1,4 раза. При этом активность каталазы снижалась практически в 1,9 раза (табл. 1).

У всех исследуемых соединений обнаружены выраженные антиоксидантные эффекты, поскольку после их введения нормализовался уровень АГП и МДА. При острой тетрахлорметановой токсической гепатопатии мексидол нормализовал, а этоксидол стимулировал активность каталазы (табл. 1).

Таким образом, изученные производные 3-ГП в норме не оказывают влияния на интенсивность процессов ПОЛ и активность каталазы. При токсическом поражении печени, вызванном введением четыреххлористого углерода, все препараты нормализуют уровень продуктов ПОЛ, мексидол – нормализует, а этоксидол стимулирует активность каталазы.

В третьей серии опытов эндотелиальную дисфункцию, согласно дизайну исследования, моделировали в контрольной группе животных ежедневным, в течение 7 суток внутрибрюшинным введением L-NAME в дозе 25 мг/кг. Этоксидол вводили внутрибрюшинно, в дозе 25 мг/кг, в течение 7 суток, в утренние часы.

По протоколу, на восьмые сутки наркотизированное животное брали в эксперимент.

Одновременное введение L-NAME и этоксида привело к оптимальному снижению показателей исходных значений АД, так как исходные цифры АД были ниже: САД – $156,5 \pm 8,6$, ДАД – $114,7 \pm 12,2$ мм рт. ст. Также отмечалось потенцирование снижения показателей артериального давления в ответ на введение АХ (табл. 2).

Таблица 2

Влияние препарата «Этоксидол» на показатели гемодинамики при моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота (M±m в абсолютных значениях n=10)

Группы животных	Функциональные пробы	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.	ЧСС, уд. в мин.
Интактные	Исходные	$137,7 \pm 3,7$	$101,9 \pm 4,3$	$420,0 \pm 9,0$
	ЭЗВ с АХ	$84,3 \pm 4,5$	$38,7 \pm 2,8$	$416,0 \pm 14,0$
	ЭНЗВ с НП	$83,0 \pm 3,7$	$42,1 \pm 4,4$	$415,0 \pm 10,0$
Получавшие L-NAME (25 мг/кг)	Исходные	$190,3 \pm 6,7^*$	$145,0 \pm 3,9^*$	$428,0 \pm 11$
	ЭЗВ с АХ	$110,6 \pm 5,2^*$	$82,8 \pm 6,6^*$	$426,0 \pm 14,0$
	ЭНЗВ с НП	$88,7 \pm 4,7$	$50,8 \pm 4,2$	$426,0 \pm 13,0$
L-NAME (25 мг/кг) + этоксидол (25 мг/кг)	Исходные	$156,5 \pm 8,6^{**}$	$114,7 \pm 12,2^{**}$	$350,0 \pm 16,2$
	ЭЗВ с А,Х	$94,0 \pm 6,4^{**}$	$55,0 \pm 4,9^{**}$	$322,0 \pm 12,8$
	ЭНЗВ с НП	$103,8 \pm 6,7$	$51,8 \pm 4,8$	$355,9 \pm 14,9$

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных, ** – $p < 0,05$ в сравнении с группой животных, получавших L-NAME.

Новое производное 3-оксипиридина «Этоксидол» (ВНЦ БАВ Московская обл., Старая Купавна, Россия) проявляет выраженное эндотелиопротективное действие на модели L-NAME индуцированного дефицита оксида азота, что выразилось в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов.

Основным предполагаемым механизмом антиоксидантного действия веществ этой группы является взаимодействие с образующимися в ходе ПОЛ перокси (ROO·) и алкокси-радикалами (RO·) за счет легко подвижного атома водорода фенольной группы в составе молекулы. Способность этоксида регулировать оксидативный стресс представляет значительный интерес, так как может являться одним из ведущих механизмов действия этого препарата [5, 14, 19].

Анализируя полученные данные, мы можем отметить, что исследуемые производные 3-ГП оказывают выраженное антиоксидантное действие на модели токсического поражения печени и значительно улучшают вазодилатирующую функцию эндотелия, выступая в качестве эндотелиопротекторов на фоне оксидативного стресса различного генеза.

Результаты анализа позволяют считать, что улучшение общей антиоксидантной защиты организма под влиянием исследуемых производных 3-ГП предупреждает дисфункцию эндотелия при остром токсическом поражении печени.

Полученные результаты могут быть использованы для прогноза возможной эффективности различных терапевтических стратегий, направленных на снижение оксидативного стресса.



Литература

1. Авдеева, Е.В. Влияние производных оксиникотиновой кислоты и 3-оксипиридина на функциональную активность полинуклеаров крыс / Е.В. Авдеева, А.И. Конопля, Л.Н. Сернов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2006. – № 3-1(14). – С. 102-104.
2. Алексеева, Н.Н. Печень и иммунологическая реактивность / Н.Н. Алексеева, Т.М. Брызгина, С.И. Павлович. – Киев. : Наук. Думка, 1991. – 188 с.
3. 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.
4. Состояние перекисного окисления липидов у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки / П.П. Галактионова, А.В. Молчанов, С.А. Ельчанинова, Б.Я. Варшавский // Клин. и лаб. диагностика. – 1998. – № 8. – С. 10-14.
5. Свободнорадикальное окисление и сердечно-сосудистая патология: коррекция антиоксидантами / А.П. Голиков, С.А. Бойцов, В.П. Михин, В.Ю. Полумисков // Леч. врач. – 2003. – № 4. – С. 70-74.
6. Гублер, Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В. Гублер, А.А. Генкин. – Л. : Медицина, 1973. – 141 с.
7. Зенков, Н.К. Окислительный стресс / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньшикова. – М., 2001. – 289 с.
8. Конопля, А.И. Взаимосвязь структуры и функции эритроцитов с иммунным гомеостазом / А.И. Конопля. – Курск, 2008. – 40 с.
9. Эндотелиопротективные, кардиопротективные и коронаролитические эффекты производных 3-оксипиридина / М.В. Корокин, Е.Н. Пашин, К.Е. Бобраков и др. // Человек и его здоровье. – 2009. – № 4. – С. 11-19.
10. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
11. Марков, Х.М. Оксид азота и сердечно-сосудистая система / Х.М. Марков // Успехи физиол. наук. – 2001. – Т. 32. – № 3. – С. 49-65.
12. Новый взгляд на коррекцию эндотелиальной дисфункции / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская и др. // Российский журнал иммунологии. – 2006. – Т. 9. – С. 60-61.
13. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская и др. // Кубанский науч. мед. вестн. – 2006. – № 10(91). – С. 72-77.
14. Рагулина, В.А. Влияние новых производных 3-гидроксипиридина на иммунную реактивность в условиях токсической гепатопатии / В.А. Рагулина, Е.В. Авдеева, Е.А. Орлова // Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии : сб. трудов X междунар. конгресса. – Казань, 2009. – С. 383.
15. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили. – М. : Медицина, 1977. – С. 66-68.
16. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease / T. Heitzer, T. Schlinzig, K. Krohn et al. // Circulation. – 2001. – № 104. – P. 2673-2678.
17. Abnormal endothelium dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension / J.A. Panza, A.A. Quyyumi, J.E. Brush Jr., S.E. Epstein // N. Engl. J. Med. – 1990. – Vol. 323. – P. 22-27.
18. A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis / S.A. Stanner et. al. // Public. Health. Nutr. – Vol. 7. – P. 407-422.
19. Long term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction / J.A. Suwaidi, S. Hamasaki, S.T. Higano et al. // Circulation. – 2000. – Vol. 101. – P. 948-954.

RELATIONSHIP BETWEEN THE ANTIOXIDANT EFFECT OF 3-HYDROXYPYRIDINE AND THEIR INFLUENCE ON ENDOTHELIUM VASODILATING EFFECT IN ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

V.A. RAGULINA

Kursk State Medical University

e-mail: wvas@mail.ru

Derivatives of 3-hydroxypyridine in toxic liver injury induced by administration of carbon tetrachloride, have strong antioxidant properties. The drug "Etoksidol" at a dose of 25 mg/kg prevents the development of L-NAME-induced endothelial dysfunction.

Key words: liver toxicity, derivatives of 3-hydroxypyridine, carbon tetrachloride, endothelial dysfunction, L-NAME, antioxidants.