

©Коллектив авторов

РОЛЬ ИНГИБИРОВАНИЯ iNOS В МЕХАНИЗМЕ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГАМК И ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА МОДЕЛИ ОСТРОГО АЛКОГОЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА У КРЫС

М.В. Кустова¹, И.И. Прокофьев^{1}, В.Н. Перфилова¹, Е.А. Музыка¹, В.Е. Завадская¹,
С.В. Варламова¹, А.С. Кучерявенко¹, И.Н. Тюренков¹, О.С. Васильева²*

¹Волгоградский государственный медицинский университет,
400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; *эл. почта: igor.prokofiev@mail.ru
²Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена,
191186, Санкт-Петербург, набережная реки Мойки, 48

Изучены кардиопротекторные эффекты новых производных глутаминовой кислоты (глуфимета) и ГАМК (мефаргина) при острой алкогольной интоксикации (ОАИ) на фоне селективной блокады индуцибельной NO-синтазы (iNOS). Выявлено, что ОАИ приводит к выраженному снижению сократительной функции миокарда при проведении нагрузочных проб (нагрузка объёмом, проба на адренореактивность, изометрическая нагрузка), митохондриальной дисфункции и усилению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клетках сердца. Снижение продукции NO при ингибировании iNOS на фоне ОАИ вызывает улучшение дыхательной функции митохондрий, уменьшение уровня продуктов ПОЛ и повышение активности супероксиддисмутазы в митохондриях клеток сердца, что приводит к увеличению сократимости миокарда. Исследуемые соединения — глуфимет и мефаргин — вызывают статистически значимый прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, левожелудочкового давления, а также уменьшают продукцию NO. Это сопровождается снижением интенсивности процессов ПОЛ и увеличением коэффициентов дыхательного контроля, отражающих сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования, при активации комплексов I и II дыхательной цепи. Снижение концентрации NO при селективной блокаде iNOS и введении изучаемых веществ было менее выражено, чем без блокады фермента, что указывает на вероятное влияние новых производных нейроактивных аминокислот на систему оксида азота.

Ключевые слова: алкогольное повреждение миокарда; производные глутаминовой кислоты и ГАМК; блокада iNOS

DOI: 10.18097/PBMC20236902112

ВВЕДЕНИЕ

Острая алкогольная интоксикация (ОАИ) занимает лидирующее место среди бытовых отравлений в нашей стране, может приводить к развитию тяжёлых аритмий, ишемической болезни сердца, инфаркту миокарда, сердечной недостаточности [1].

ОАИ вызывает снижение сократимости миокарда за счёт повреждения саркомеров в результате развития окислительного стресса, апоптоза кардиомиоцитов, нарушения формирования потенциала действия [2, 3]. Известно, что метаболит этанола ацетальдегид избирательно ингибирует влияние блуждающего нерва на сердце, активирует симпатическую нервную систему в первые 24 ч после алкогольной интоксикации [4]. Он участвует в разобщении дыхания и фосфорилирования в митохондриях, индуцирует окислительный стресс и гибель кардиомиоцитов [5]. Употребление этанола влияет на экспрессию и активность NO-синтаз, продуцирующих оксид азота — один из важнейших регуляторов сердечно-сосудистой системы. При хроническом приёме этанола изменяется экспрессия и активность различных типов NO-синтаз, что приводит к развитию эндотелиальной дисфункции [6]. По данным Zhang и соавт., эндотелиальные клетки, обработанные высокими дозами этанола, секретировали меньше оксида азота [7]. Кроме того, синтез NO нейтрофилами усиливается под влиянием этанола [8]. В то же время

окислительный стресс, вызванный ОАИ, приводит к снижению активности эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), митохондриальной дисфункции, сопровождающейся усилением генерации активных форм кислорода (АФК) [9]. Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) усугубляются активацией индуцибельной изоформы NO-синтазы (iNOS), производящей NO в больших количествах, из которого образуется прооксидантное соединение пероксинитрит.

Таким образом, поиск веществ, способных оказывать влияние на систему оксида азота, в частности на iNOS, и корректировать множественные проявления кардионегативного действия этанола на сердце, остаётся актуальным.

В проведённых ранее исследованиях были выявлены кардиопротекторные эффекты новых производных нейроактивных аминокислот. Так, производное глутаминовой кислоты — глуфимет — на фоне острого стрессорного воздействия улучшал функциональное состояние митохондрий сердца крыс, снижал интенсивность процессов ПОЛ в кардиомиоцитах, способствовал сохранению функциональных резервов миокарда [10]. Аналогичные результаты были получены и на модели хронической алкогольной интоксикации (ХАИ) [11]. Кроме того, из ранее полученных данных известно, что глуфимет ингибирует экспрессию iNOS [12]. Производное ГАМК мефаргин — композиция мефебута и L-аргинина — имеет выраженные

кардиопротекторные эффекты при ХАИ, заключающиеся в увеличении инотропных резервов сердца, антиоксидантном, антиагрегантном, антикоагулянтном эффектах [13]. Предположение о влиянии мефаргина на систему NO связано с наличием в его составе аминокислоты L-аргинина, являющейся субстратом для синтеза NO.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования было изучение роли ингибирования iNOS в реализации кардиопротекторного действия новых производных ГАМК и глутаминовой кислоты при острой алкогольной интоксикации у крыс.

МЕТОДИКА

Эксперименты проведены на 72 десятимесячных крысах-самках линии Wistar массой 280-320 г, полученных из питомника лабораторных животных Рапполово (Ленинградская область). ОАИ моделировали внутрижелудочным введением 32% раствора этанола из расчёта 4 г 95% раствора этилового спирта ("РФК", Россия) на 1 кг массы животного [14]. Исследуемые соединения — глуфимет (диметилловый эфир гидрохлорида 3-фенилглутаминовой кислоты, соединение РГПУ-238) и мефаргин (двухкомпонентная кристаллическая композиция гидрохлорида метил-4-амино-3-фенилбутаноата и L-аргинина гидрохлорида в соотношении 1:1, соединение РГПУ-260) — были синтезированы на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена. Препарат сравнения — милдронат (действующее вещество — мельдоний) — использовали в виде готового раствора для инъекций ("Grindex", Латвия). Изучаемые соединения и ингибитор iNOS амингуанидин (AG) ("Sigma-Aldrich", США) вводили внутривентриально за 10 мин до начала алкоголизации. В качестве растворителя для исследуемых веществ и амингуанидина использовали физраствор. Были сформированы следующие группы по 8 животных в каждой: 1 — интактная; 2 — контрольная — ОАИ+физраствор; 3, 4 и 5 — группы животных с ОАИ, которым вводили соответственно глуфимет (28,7 мг/кг), мефаргин (25 мг/кг) и препарат сравнения милдронат (50 мг/кг), 6 — группа алкоголизованных животных, получавших AG (50 мг/кг) + физраствор; 7, 8, 9 группы — животные с ОАИ, которым вводили глуфимет, мефаргин и милдронат соответственно на фоне ингибирования iNOS амингуанидином.

Представленная работа является фрагментом исследования с ингибированием различных NO-синтаз. В этой связи, интактная, контрольная и опытные группы с ОАИ, которым вводили глуфимет, мефаргин и милдронат, были общими для всего эксперимента [15].

Через 10 ч после алкоголизации животных наркотизировали (хлоралгидрат, 350 мг/кг), проводили оперативную подготовку [11]. В условиях *in vivo* через верхушку сердца в левый желудочек вводили катетер, соединенный с датчиком давления ("Biopac systems", США), с помощью которого

регистрировали показатели: скорость сокращения миокарда (+dP/dtmax, мм рт.ст./с), скорость расслабления миокарда (-dP/dtmax, мм рт.ст./с), левожелудочковое давление (ЛЖД) (мм рт.ст.) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) (уд/мин). После периода стабилизации (10 мин) и записи исходных показателей проводили нагрузочные тесты: нагрузку объёмом (внутривенное болюсное введение 0,9% раствора NaCl, из расчёта 0,3 мл на 100 г массы животного), пробу на адренореактивность (внутривенное введение адреналина в разведении 10^{-7} г/л в дозе 0,1 мл/100 г массы животного) и изометрическую нагрузку (окклюзия восходящей части дуги аорты на 30 с). Расчётным способом определяли максимальную интенсивность функционирования структур (МИФС) как (МИФС) = ((ЛЖДсер × ЧССсер) / (масса левого желудочка + 1/3 межжелудочковой перегородки)), которую выражали в мм рт.ст./мг·мин.

После этого сердце извлекали, промывали в ледяном физрастворе и гомогенизировали при температуре 4°C в гомогенизаторе Поттера-Эльвейема в среде выделения, содержащей 220 мМ маннит, 100 мМ сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 4 мМ KH_2PO_4 , 20 мМ HEPES, pH=7,3. Полученные гомогенаты органов центрифугировали 10 мин (с охлаждением) при 600 g (центрифуга 2-16PK, "Sigma", Германия) для осаждения дебриса и неразрушенных клеток. Надосадочную жидкость вновь центрифугировали 20 мин (8000 g). Полученный супернатант сохраняли для последующего определения концентрации конечных метаболитов оксида азота, а осадок ресуспендировали и использовали в качестве митохондриальной фракции [16]. Скорость поглощения кислорода митохондриями определяли полярографическим методом с использованием электрода Кларка на полярографе Oxytherm System ("Hansatech Instruments", Англия). Функциональное состояние митохондрий было изучено по протоколу, описанному Lanza и соавт. и основанному на изменении поглощения изолированными митохондриями кислорода в различных метаболических состояниях (по Чансу) [16]. Предварительно все растворы (кроме ADP) термостатировали 20 мин при 33°C. Реактивы, необходимые для приготовления растворов, были получены от "Sigma-Aldrich" (США). Для изучения метаболических состояний по Чансу в термостатируемую ячейку полярографа объёмом 1 мл со средой полярографии (0,5 мМ ЭДТА, 3 мМ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 мМ таурин, 10 мМ KH_2PO_4 , 20 мМ HEPES, 110 мМ сахароза, 1 г/л свободный от жирных кислот БСА, pH=7,4) последовательно вносили по 100 мкл: V_1 (скорость базового дыхания) — суспензию митохондрий; V_2 (скорость субстрат-зависимого дыхания) — субстраты комплекса I дыхательной цепи — малат/глутамат (5 мМ / 5 мМ); V_3 (I) — скорость потребления кислорода в присутствии субстратов окисления и ADP, то есть в состоянии окислительного фосфорилирования при активации первого комплекса — ADP (200 мкМ); V_3 (I+II) — субстрат комплекса II дыхательной цепи — сукцинат (5 мМ), затем ADP; V_3 (II) — ротенон, ингибитор комплекса I (0,5 мкМ), затем ADP; V_4 — олигомицин, ингибитор АТФ-синтазы (2,5 мМ);

V(разобщения) — карбонилцианид-4-(трифторметокси) фенилгидразон (FCCP), протонный ионофор (0,05 мМ). Скорость поглощения кислорода выражали в нмоль O_2 /мин/мг белка. Для оценки сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования был рассчитан коэффициент дыхательного контроля (КДК) (отношение V_3/V_4) [17]. После изучения митохондриального дыхания аликвоты суспензии митохондрий подвергали однократному замораживанию-оттаиванию для разрушения митохондрий. Эти препараты использовали для определения концентрации малонового диальдегида (МДА), а также активности антиоксидантных ферментов: каталазы [18], глутатионпероксидазы [18] и супероксиддисмутазы (СОД) [19].

Активность каталазы определяли по убыли H_2O_2 в реакционной смеси по сравнению с холостой пробой. Фермент восстанавливал H_2O_2 до воды и кислорода в течение 20 мин в фосфатном буфере при pH 6,8. Реакцию останавливали добавлением 4% раствора молибдата аммония, смесь центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин на центрифуге CM-50 ("Elmi", Латвия). Супернатант фотометрировали при длине волны 410 нм на спектрофотометре Helios λ ("Thermo Electron Corporation", Великобритания). Активность фермента выражали в мг H_2O_2 /мин/мг белка.

Определение глутатионпероксидазной активности основано на реакции окисления глутатиона трет-бутилгидропероксидом. После 5-минутной инкубации в трис-HCl буфере смеси 40 мМ глутатиона (GSH), 10 мМ трет-бутилгидропероксида и суспензии митохондрий реакцию окисления глутатиона останавливали путём добавления 20% раствора трихлоруксусной (ТХУ) кислоты. После этого центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин на центрифуге CM-6M. В надосадочной жидкости определяли уровень восстановленного глутатиона с помощью 0,4% 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) на спектрофотометре Helios γ при 412 нм. По разнице концентраций восстановленного глутатиона с аналогичными холостыми пробами, содержащими 20% раствор ТХУ, рассчитывали активность фермента в единицу времени. Удельную активность фермента выражали в мкмоль GSH/мин/мг белка.

Об активности СОД судили по убыли оптической плотности раствора кверцетина (1,4 мкМ) в фосфатном буфере (pH 7,8; 0,015 М) в присутствии 0,8 мМ тетраметилэтилендиамина (ТМЭД) сразу и через 20 мин после добавления суспензии митохондрий. СОД тормозит окисление кверцетина ТМЭД, вследствие чего оптическая плотность реакционной смеси падает с меньшей скоростью. Активность СОД выражали в % торможения на 1 мг белка.

Метод определения содержания МДА основан на измерении количества ТБК-реактивных продуктов, образующихся при кипячении 0,7% раствора тиобарбитуровой кислоты с выделенными митохондриями в кислой среде (с добавлением 1,3% H_3PO_4). Оптическую плотность полученного раствора определяли при 532 нм на спектрофотометре Helios γ . Уровень МДА выражали в мкмоль МДА/мг белка.

Концентрацию белка в пробах определяли с помощью набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit ("Thermo Scientific", США).

Концентрацию конечных метаболитов оксида азота — нитрит- и нитрат-ионов в сыворотке крови и гомогенатах сердца определяли скрининг-методом в модификации Метельской и соавт. [20], основанном на одновременном восстановлении нитратов в нитриты с помощью хлорида ванадия (III) ("Sigma", США) и реакции диазотирования нитритом сульфаниламида с развитием окраски раствора и последующей спектрофотометрией.

Статистическую обработку осуществляли в программе GraphPad Prism 9 с использованием стандартных статистических критериев. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (Mean \pm SD). Проверку на нормальность распределения осуществляли с использованием критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Равенство дисперсий (equal SDs) оценивали при помощи теста Брауна-Форсайта и теста Уэлча. При равенстве дисперсий использовали однофакторный дисперсионный анализ (тест Тьюки), если SD значительно различались — тест Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние исследуемых соединений на сократительную функцию сердца крыс при ОАИ и блокаде iNOS

При изучении инотропных резервов сердца в условиях нагрузочных тестов было выявлено, что ОАИ приводит к выраженному снижению сократительной функции миокарда. При увеличении преднагрузки у животных группы ОАИ+физраствор приросты $+dP/dt$, $-dP/dt$ и ЛЖД были в 4,0, 2,2 и 1,8 раза ниже по сравнению с интактными крысами, у которых приросты этих показателей составили 15,3, 22,6 и 18,9% относительно исходных данных соответственно (рис. 1).

В опытных группах, получавших перед ОАИ исследуемые соединения и милдронат, отмечали более выраженный прирост $+dP/dt$, $-dP/dt$ и ЛЖД в ответ на увеличение преднагрузки по сравнению с негативным контролем. У животных группы ОАИ+глуфимет прирост $+dP/dt$ был в 4,1 раза, $-dP/dt$ — в 4,7 раза, ЛЖД — в 1,7 раза выше ($p < 0,05$) относительно животных группы ОАИ+физраствор. В опытной группе животных, получавших мефаргин, максимальные увеличения исследуемых параметров были в 6,5, 2,7 и 1,6 раза ($p < 0,05$) соответственно выше по сравнению с контрольной группой. У животных с ОАИ, которым вводили милдронат, наблюдался заметно более высокий прирост $+dP/dt$ и $-dP/dt$ в ответ на увеличение преднагрузки — в 3,9 и 2,3 ($p < 0,05$) раза соответственно; при этом прирост ЛЖД существенно не отличался относительно значений алкоголизованных животных контрольной группы (рис. 1).

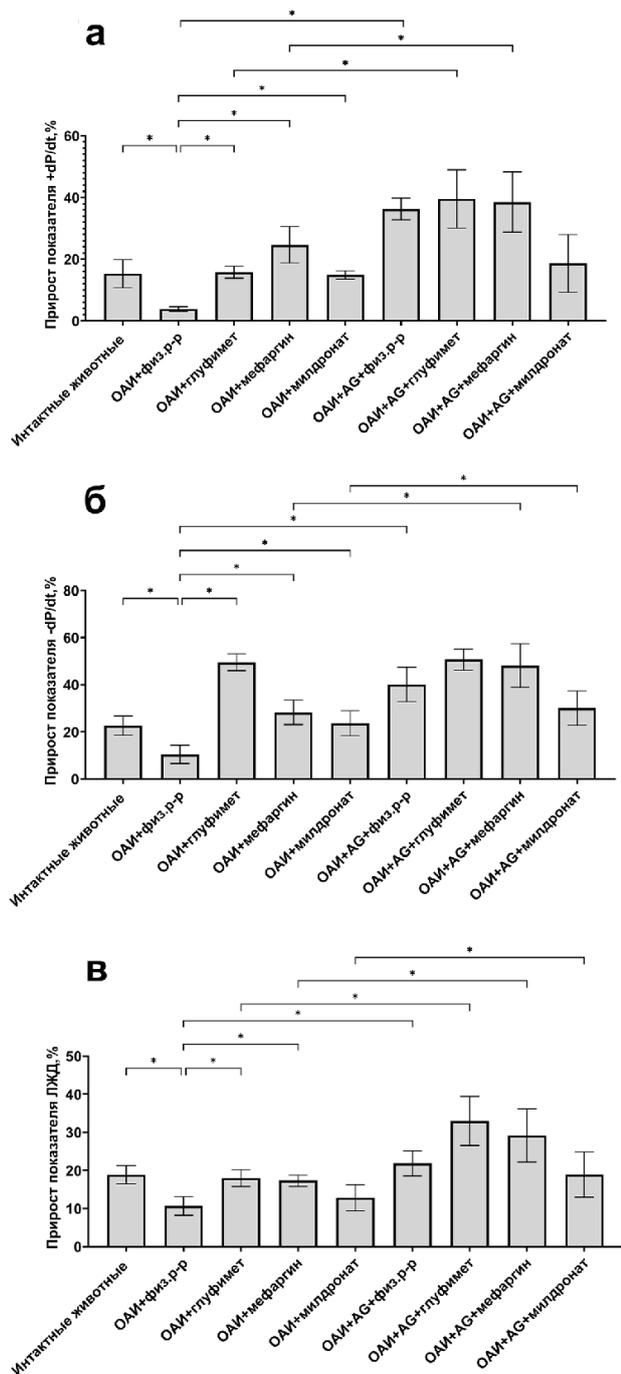


Рисунок 1. Влияние исследуемых соединений на сократительную функцию сердца крыс после ОАИ с блокадой iNOS при увеличении преднагрузки. * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ (тест Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Данна).

У животных, которым перед ОАИ вводили AG, приросты исследуемых показателей в ответ на введение объёма были значительно выше, чем в контрольной группе — в 9,6, 3,9 и 2,1 раза ($p < 0,05$) соответственно. В опытных группах, получавших перед ОАИ исследуемые соединения и AG, наблюдались также более высокие приросты исследуемых показателей по сравнению с аналогичными опытными группами без блокады iNOS: в группе ОАИ+AG+глуфимет прирост +dP/dt был в 2,5 раза выше, ЛЖД — в 1,8 раз

выше ($p < 0,05$), в группе ОАИ+AG+мефаргин — прирост +dP/dt в 1,5 раза выше ($p < 0,05$), -dP/dt — в 1,7 раза выше ($p < 0,05$), ЛЖД — в 1,7 раза выше ($p < 0,05$). По сравнению с показателями группы животных с ОАИ+AG+физраствор приросты +dP/dt, -dP/dt и ЛЖД были несколько выше, однако статистически значимо не отличались (рис. 1).

У животных интактной группы при проведении пробы на адренореактивность прирост +dP/dt составил 52,7%, -dP/dt — 48,9%, ЛЖД — 42,7%. У крыс группы негативного контроля были отмечены более низкие приросты исследуемых показателей в ответ на введение адреналина (в 3,5, 3,1 и 2,2 раза ниже) ($p < 0,05$). В опытной группе ОАИ+глуфимет прирост +dP/dt был в 2,3 раза ($p < 0,05$), -dP/dt — в 3,5 раза ($p < 0,05$), ЛЖД — в 1,9 раза выше, по сравнению с контрольной группой. У животных, получавших перед алкоголизацией мефаргин, приросты +dP/dt и -dP/dt были в 2,3 и 1,4 раза ($p < 0,05$) выше по сравнению с негативным контролем. Животные с ОАИ, получавшие милдронат, показали более высокий прирост: +dP/dt — в 2,5 раза ($p < 0,05$), -dP/dt — в 2,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с животными группы ОАИ+физраствор (рис. 2).

У животных с ОАИ, получавших AG+физраствор при проведении пробы на адренореактивность, наблюдали значительно более выраженные приросты по сравнению с группой негативного контроля: +dP/dt — в 3,3 раза ($p < 0,05$), -dP/dt — в 3,5 раза ($p < 0,05$) и ЛЖД — в 1,6 раза ($p < 0,05$) выше (рис. 2). Приросты исследуемых показателей в опытных группах, получавших исследуемые соединения и аминоксантидин, статистически значимо не отличались от показателей животных, которым вводили этанол+AG+физраствор. При сравнении опытных групп, получавших исследуемые соединения при блокаде iNOS и без неё, была отмечена тенденция к увеличению приростов изучаемых параметров у животных, которые получали новые производные нейроактивных аминоксидов и аминоксантидин, по сравнению с животными с функционирующей iNOS (рис. 2).

На 5 с и 30 с выполнения максимальной изометрической нагрузки у животных негативного контроля наблюдали более низкие приросты скоростей сокращения и расслабления миокарда и ЛЖД по сравнению с интактными животными: в 1,7, 1,5 и 1,3 раза ниже на 5 с ($p < 0,05$), в 1,7, 2,2 и 1,3 раза ниже ($p < 0,05$) на 30 с. В опытных группах, получавших перед ОАИ исследуемые соединения, были отмечены более высокие приросты соответствующих показателей при проведении максимальной изометрической нагрузки по сравнению с контрольной группой. Прирост +dP/dt, -dP/dt и ЛЖД у алкоголизованных животных, которым вводили глуфимет, на 5 с изометрической нагрузки был выше в 1,7, 1,5 и 1,6 раза соответственно ($p < 0,05$), на 30 с — в 1,6, 2,1 и 1,6 раза ($p < 0,05$); у животных, получавших мефаргин, на 5 с изометрической нагрузки прирост этих показателей был выше в 1,6, 1,5 и 1,2 раза ($p < 0,05$), на 30 с — в 1,7, 2,0 и 1,3 раза ($p < 0,05$). У животных, получавших милдронат,

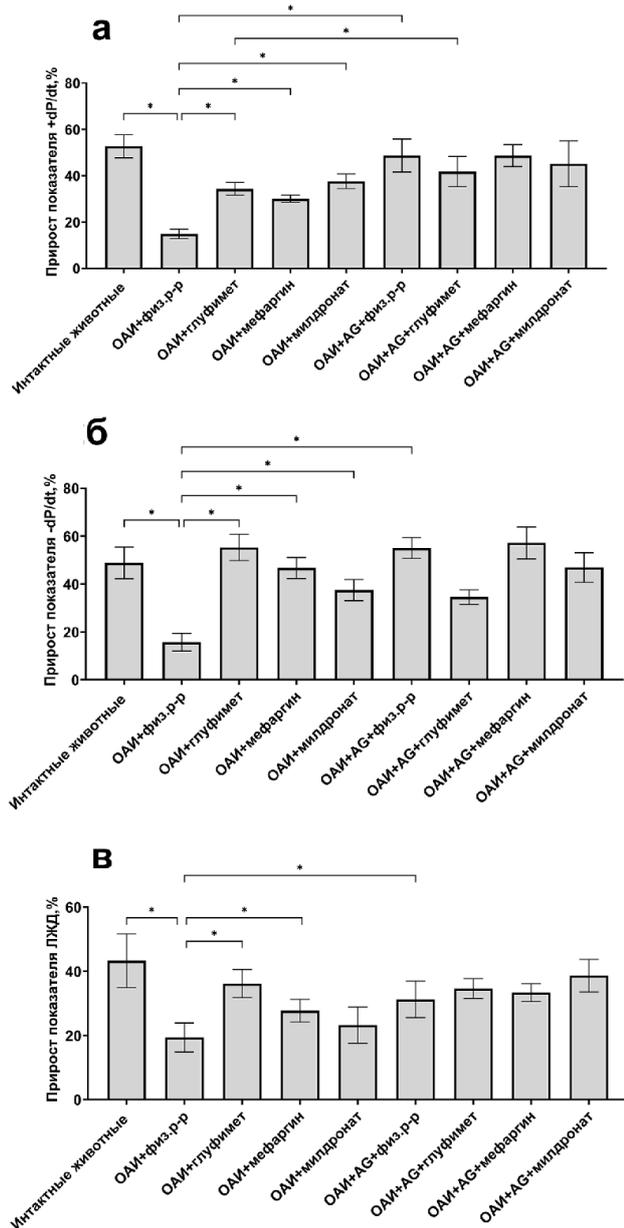


Рисунок 2. Влияние исследуемых соединений на сократительную функцию сердца крыс после ОАИ с блокадой iNOS при проведении пробы на адренореактивность. * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ (тест Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Данна).

значения на 5 с изометрической нагрузки были выше в 1,6, 1,4 и 1,4 раза ($p < 0,05$), на 30 с — в 1,4, 1,5 и 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с животными группы ОАИ+физ.р-р. (рис. 3).

При ингибировании iNOS острая алкогольная интоксикация не приводит к значительному снижению сократимости при проведении максимальной изометрической нагрузки: у животных группы ОАИ+AG+физ.р-р. прирост +dP/dt на 5 с был выше в 1,8 раза ($p < 0,05$), -dP/dt — в 1,9 раза ($p < 0,05$), ЛЖД в 1,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой негативного контроля. На 30 с изометрической нагрузки приросты исследуемых показателей

были в 2,0, 2,8 и 1,7 раза ($p < 0,05$) выше по сравнению с животными группы ОАИ+физраствор соответственно (рис. 3).

Показатели сократимости в группах животных с блокадой iNOS, получавших перед ОАИ исследуемые соединения, были несколько выше по сравнению с аналогичными параметрами группы ОАИ+AG+физраствор, однако статистически значимых различий получено не было.

У животных группы ОАИ+AG+меффаргин приросты исследуемых показателей были выше по сравнению с животными аналогичной группы без блокады iNOS: приросты +dP/dt и -dP/dt на 5 с — в 1,2 раза ($p < 0,05$), а ЛЖД — в 1,3 раза; на 30 с — в 1,3, 1,4 и 1,4 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с группой ОАИ+меффаргин. У животных, которые перед алкоголизацией получали глуфимет и амингуанидин, наблюдали более высокий прирост +dP/dt на 30 с — в 1,4 раза ($p < 0,05$), -dP/dt на 5 с и 30 с изометрической нагрузки — в 1,3 и 1,4 раза ($p < 0,05$) (рис. 3).

Острая алкогольная интоксикация приводила к снижению максимальной интенсивности функционирования структур при увеличении поствагрузки: прирост МИФС как на 5 с, так и на 30 с окклюзии восходящей части дуги аорты у крыс с ОАИ был ниже в 1,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой. У самок опытных групп, получавших глуфимет, меффаргин и препарат сравнения милдронат, приросты МИФС на 5 с максимальной изометрической нагрузки были выше в 1,5, 1,4 и 1,6 раза ($p < 0,05$), на 30 с — в 1,5, 1,3 и 1,6 раза ($p < 0,05$) соответственно (табл. 1).

У животных, получавших перед алкоголизацией амингуанидин, ОАИ приводила к менее выраженному снижению МИФС по сравнению с животными группы негативного контроля: прирост показателя на 5 с был в 1,6 раза ($p < 0,05$), на 30 с — в 1,9 раза ($p < 0,05$) выше относительно контрольных крыс. У животных опытных групп с блокадой iNOS приросты МИФС не отличались от таковых в группе ОАИ+AG+физраствор и проявляли тенденцию к увеличению при сравнении с аналогичными опытными группами животных, которым не вводили амингуанидин (табл. 1).

Как видно из полученных результатов, ОАИ приводит к значительному снижению сократимости миокарда, что согласуется с литературными данными [3, 21]. Выявленное снижение скорости расслабления даже без изменения ЛЖД может свидетельствовать о неполном расслаблении в диастолу, ухудшении наполнения желудочков [22]. Предположительно, причиной снижения сократимости служит утечка Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, вызванная активацией этанолом NADPH-оксидазы-2 (NOX2) и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы (CaMKII) [23]. Известно, что ОАИ вызывает развитие дисфункции митохондрий и окислительного стресса, апоптоза, с последующим наступлением некроза [3]. В механизме повреждающего действия

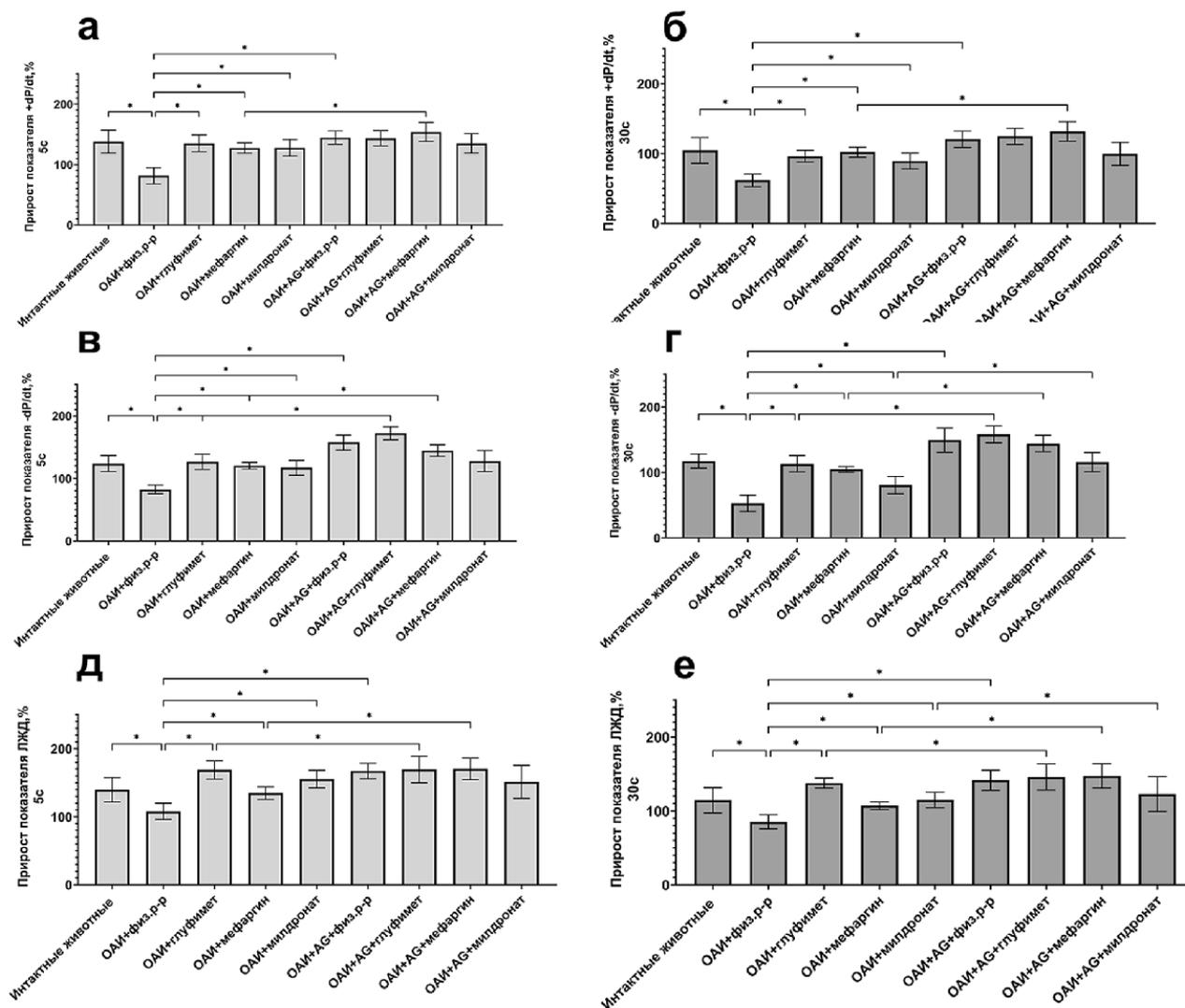


Рисунок 3. Влияние исследуемых соединений на сократительную функцию сердца крыс после ОАИ с блокадой iNOS при осуществлении максимальной изометрической нагрузки. * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ (тест Тьюки при равенстве дисперсий, тест Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Данна при отсутствии равенства дисперсий).

Таблица 1. Влияние исследуемых соединений на максимальную интенсивность функционирования структур у крыс после острой алкогольной интоксикации и с блокадой iNOS

Группы животных	МИФС, мм рт.ст/мг-мин (в скобках указан прирост показателей в % относительно исходных значений)		
	Исходное значение	5 с окклюзии	30 с окклюзии
Интактная	73,9±18,0	237,6±54,2 (222,9±24,6)	197,4±46,1 (169,2±31,7)
ОАИ+физраствор	74,1±19,5	185,0±49,5 (149,9±20,6)*	159,7±51,2 (113,1±25,2)*
ОАИ+глутимет	69,3±15,1	226,4±51,1 (226,3±28,4)#	190,3±46,8 (173,4±19,0)#
ОАИ+мефаргин	68,9±12,3	212,4±41,1 (209,1±25,7)#	166,4±37,8 (150,7±23,7)#
ОАИ+милдронат	70,7±19,8	236,7±48,3 (242,8±44,3)#	198,3±64,5 (178,2±40,1)#
ОАИ+AG+физраствор	66,0±11,2	226,3±20,1 (241,0±28,4)#	211,3±44,4 (219,2±35,3)#
ОАИ+AG+глутимет	65,7±12,2	230,2±45,6 (251,6±43,4)	203,9±40,1 (212,3±45,7)
ОАИ+AG+мефаргин	70,9±13,2	233,6±47,4 (231,7±54,0)	217,0±58,1 (205,6±59,6)
ОАИ+AG+милдронат	59,7±7,2	198,5±28,7 (233,3±31,9)	171,0±35,2 (188,2±56,3)

Примечание: различия статистически значимы ($p < 0,05$) по сравнению: * – с интактной группой; # – с группой ОАИ+физраствор (тест Тьюки).

этанола при ОАИ задействовано снижение активности системы Akt, при этом также усиливается ядерная транскрипция NF-κB, которая, в свою очередь, активирует iNOS и циклооксигеназу 2 типа (ЦОГ-2) [24]. Оксид азота также является важным звеном патогенеза алкогольного поражения сердца при ОАИ. Известно, что употребление этанола приводит к усилению синтеза асимметричного диметиларгинина (ADMA), ингибирующего eNOS, в то время как активность iNOS возрастает [6]. В больших количествах оксид азота обладает отрицательным инотропным действием: как видно из полученных результатов, в группах животных с ОАИ +dP/dt, -dP/dt и ЛЖД ниже показателей интактных животных. Кроме того, при ингибировании iNOS изучаемые параметры были достоверно выше, чем в контрольной группе животных, что подтверждает факт снижения сократимости миокарда при избыточной продукции NO.

Новые производные нейроактивных аминокислот — глутимет и мефаргин — оказывали выраженное кардиопротекторное действие. Это выражалось в увеличении скоростей сокращения, расслабления, ЛЖД и МИФС при проведении нагрузки объемом, пробы на адренореактивность и изометрической нагрузки. Глутимет и мефаргин — производные глутаминовой кислоты и ГАМК соответственно, которые играют ключевую роль в метаболизме клеток сердца. Глутамат участвует в восстановлении митохондриального пула протонов и цитозольного NAD⁺ [25], является источником компонентов цикла Кребса. Как возбуждающая аминокислота, глутамат активирует симпатические влияния на миокард [26]. ГАМК также обладает широким спектром метаболических эффектов в клетке и, вероятно, ограничивает избыточные симпатические влияния на сердце, сохраняя его функциональные резервы. Глутимет имеет NO-ергический компонент в механизме действия, выражающийся в снижении экспрессии индуцибельной iNOS в перитонеальных макрофагах мышей, активированных липополисахаридом, в условиях *in vitro* и *ex vivo*, а также в реализации кардиопротекторного действия на фоне введения аминоксидина при остром

стрессорном воздействии [12]. ГАМК, производным которой является мефаргин, может тормозить iNOS посредством снижения синтеза интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли-α (ФНО-α) [27].

Препарат сравнения милдронат ингибирует синтез карнитина, увеличивает содержание в клетках гамма-бутиробетанаина, который стимулирует выработку NO [28]. Однако этот препарат имел менее выраженный кардиопротекторный эффект по сравнению с животными, получавшими глутимет и мефаргин. Вероятно, это связано с тем, что помимо влияния на NO-систему, изучаемые соединения участвуют в энергетическом метаболизме в клетке, обеспечивают антиоксидантную защиту, что также продемонстрировано результатами настоящей работы.

Изучение влияния глутимета и мефаргина на дыхательную функцию митохондрий при ОАИ и ингибировании iNOS

Как было описано выше, одной из причин снижения инотропной функции сердца при ОАИ может являться митохондриальная дисфункция, в связи с чем было изучено влияние глутимета и мефаргина на скорость поглощения кислорода митохондриями в различных метаболических состояниях.

У животных с ОАИ скорости базового и субстрат-зависимого дыхания были ниже в 1,2 ($p<0,05$) и 1,4 ($p<0,05$) раза по сравнению с животными интактной группы. Потребление кислорода в состоянии V₃ по Чансу при изолированной работе комплекса I дыхательной цепи у животных с ОАИ было ниже в 1,2 раза ($p<0,05$), при совместном стимулировании комплексов I и II — в 1,7 раза ($p<0,05$), при работе только комплекса II — в 1,5 раза ($p<0,05$), а скорость V₄ в 1,4 раза ($p<0,05$) выше по сравнению с животными интактной группы. КДК для комплекса I, совместного стимулирования комплексов I и II и изолированной работы комплекса II были в 2,2, 2,3 и 2 раза ($p<0,05$) ниже у животных контрольной группы по сравнению с интактными животными, что свидетельствует о выраженном разобщении процессов дыхания и фосфорилирования (табл. 2).

Таблица 2. Влияние исследуемых соединений на скорость поглощения кислорода митохондриями сердца крыс

Группы животных	V ₁	V ₂	V ₃ (I)	V ₃ (I+II)	V ₃ (II)	V ₄	КДК (I)	КДК (I+II)	КДК (II)
Интактная	21,0±2,0	28,7±4,0	37,8±3,3	40,9±3,7	25,6±4,2	14,4±3,0	2,7±0,5	3,0±0,8	1,9±0,6
ОАИ+физраствор	17,5±1,3*	20,6±2,6*	23,2±3,4*	26,1±5,8	17,4±2,3*	19,7±3,2*	1,2±0,3*	1,4±0,4*	1,0±0,3
ОАИ+глутимет	21,5±0,9 [#]	24,4±2,3	33,5±6,0 [#]	43,8±9,6 [#]	26,5±5,7 [#]	13,3±2,5 [#]	2,5±0,5 [#]	3,3±0,7 [#]	2,0±0,4 [#]
ОАИ+мефаргин	21,1±1,8 [#]	24,8±3,2	35,8±5,9 [#]	43,9±9,7 [#]	26,8±5,2 [#]	13,3±0,8 [#]	2,7±0,7 [#]	3,3±0,9 [#]	2,0±0,7 [#]
ОАИ+милдронат	21,1±2,3 [#]	26,3±2,6 [#]	35,3±6,0 [#]	42,2±6,4 [#]	24,5±5,3	12,7±2,9 [#]	2,9±0,6 [#]	3,4±0,7 [#]	1,9±0,5 [#]
ОАИ+AG+физраствор	19,0±1,5	26,5±4,7	35,0±5,3 [#]	41,1±7,2 [#]	22,1±6,5	15,0±3,5	2,4±0,6 [#]	2,8±5,6 [#]	1,5±0,2
ОАИ+AG+ глутимет	21,9±2,0 ^{&}	26,5±3,4	33,5±4,4	43,1±6,7	30,6±5,4	12,4±1,8	2,9±0,7	3,7±0,7	2,5±0,3 ^{&}
ОАИ+AG+мефаргин	21,5±2,1	30,2±6,5	37,3±7,2	45,3±9,0	30,6±4,9	15,6±5,7	2,5±0,4	3,0±0,7	2,0±0,5
ОАИ+AG+милдронат	20,8±1,8	27,0±5,1	35,7±6,0	46,3±8,1	30,4±5,0	14,3±1,5	2,5±0,4	3,2±0,5	2,1±0,4

Примечание: различия статистически значимы при $p<0,05$ по сравнению с: * – интактной группой; # – группой негативного контроля; & – группой ОАИ+AG+физраствор (тест Тьюки).

Исследуемые соединения способствовали улучшению функционального состояния митохондрий. Скорость стимулированного дыхания при добавлении субстрата окисления комплекса I у животных группы ОАИ+глуфимет была выше в 1,4 раза ($p<0,05$), у животных группы ОАИ+мефаргин — в 1,5 раза. При этом поглощение кислорода при добавлении сукцината у животных этих групп было в среднем в 1,8 раза ($p<0,05$) выше, а при внесении ротенона — в 1,5 раза ($p<0,05$) выше, в то время как в состоянии V_4 — в 1,5 раза ($p<0,05$) ниже по сравнению с контрольной группой. КДК при использовании субстратов комплекса I у животных с ОАИ, получавших глуфимет, был в 2,1 раза ($p<0,05$), а у животных группы ОАИ+мефаргин — в 2,2 раза ($p<0,05$) выше. При совместной работе комплексов I и II КДК был выше в 2,5 раза ($p<0,05$), а при использовании субстратов комплекса II — в 2,2 раза ($p<0,05$). У животных с ОАИ, получавших милдронат, также были отмечены более высокая по сравнению с контрольной группой скорость поглощения кислорода в состоянии V_3 : в 1,5 раза ($p<0,05$) для комплекса I, в 1,7 раза ($p<0,05$) для комплекса I+II, и в 1,4 раза для комплекса II, скорость V_4 была меньше в 1,6 раза ($p<0,05$). КДК для изолированной работы комплексов I и II в среднем был в 2,2 раза ($p<0,05$) выше, а для совместной работы комплексов I и II — в 2,5 раза ($p<0,05$) выше у крыс опытной группы, получавших милдронат по сравнению с ОАИ+физраствор (табл. 2).

В группе ОАИ+AG+физраствор наблюдали в 1,4 раза ($p<0,05$) более высокую скорость поглощения кислорода в состоянии V_3 для комплекса I, в 1,7 раза ($p<0,05$) — при совместной работе комплексов I и II по сравнению с группой негативного контроля, V_3 (II) и V_4 не отличались от таковых контрольной группы (табл. 2).

Коэффициенты дыхательного контроля при раздельном и совместном стимулировании комплексов I и II у алкоголизованных животных были в среднем в 2 раза ниже по сравнению с интактными ($p<0,05$), что свидетельствует о разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях клеток сердца. Глуфимет и мефаргин улучшали функциональное состояние митохондрий, что выражалось в увеличении КДК в среднем более чем в 2 раза ($p<0,05$) по сравнению с группой отрицательного контроля. Ингибирование iNOS у животных с острой алкогольной интоксикацией также приводило к улучшению митохондриального дыхания — КДК при использовании субстратов комплексов I и I+II были в 2 раза выше относительно показателей алкоголизованных животных контрольной группы, для комплекса II — в 1,5 раза ($p<0,05$). КДК у животных с ОАИ и блокадой iNOS на фоне лечения мефаргином существенно не отличались от животных с ОАИ, получавших амингуанидин без исследуемых соединений (табл. 2). Однако, выраженное повышение КДК под влиянием глуфимета у алкоголизованных животных на фоне ингибирования iNOS, вероятно, связано со значительным увеличением сопряжения

процессов окисления субстратов и синтеза АТР, сопровождающимся снижением утечки электронов из дыхательной цепи. При гипоксии утечка электронов с дыхательных комплексов усиливается. На фоне уменьшения продукции АФК ввиду ингибирования iNOS, данный эффект обусловлен, вероятно, антигипоксическими и метаболическими свойствами глуфимета.

Таким образом, ОАИ приводила к выраженной митохондриальной дисфункции, выражающейся в снижении скорости потребления кислорода митохондриями в состоянии 3 (V_3) по Чансу при совместной и раздельной субстратной активации дыхательных комплексов I и II, и увеличении V_4 в аналогичных условиях. Описанные изменения характеризовались закономерным снижением коэффициента дыхательного контроля, что указывает на нарушение сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования, приводящее к энергодефициту в клетке. Это согласуется с литературными данными, свидетельствующими о нарушении механизмов окислительного контроля в митохондриях, снижении активности комплексов I, II и IV цепи переноса электронов со структурными изменениями митохондрий [29, 30].

У животных, которым до ОАИ вводили глуфимет и мефаргин, наблюдали выраженное улучшение функционирования митохондрий клеток сердца — КДК при активации дыхательных комплексов I, II и I+II были статистически значимо выше относительно таковых у животных контрольной группы. Возможно, эффекты исследуемых веществ связаны с их метаболической функцией. Глуфимет — производное глутаминовой кислоты, имеющей решающее значение для восстановления окислительного метаболизма в кардиомиоцитах, в частности, митохондриального пула протонов, регенерации концентрации цитозольного NAD^+ [25]. Глутаминовая кислота также является источником α -кетоглутаровой кислоты — интермедиата цикла Кребса. ГАМК, производным которой является мефаргин, служит важным звеном функционирования шунта Робертса, в котором образуется сукцинат — субстрат комплекса II дыхательной цепи митохондрий, что увеличивает протонный градиент и, следовательно, стимулирует АТР-синтазу, приводя к увеличению синтеза АТР.

Ингибирование индуцибельной изоформы NO-синтазы приводило к повышению V_3 и КДК при совместной и раздельной активации комплексов I и II дыхательной цепи. Оксид азота, синтезируемый iNOS в больших количествах, легко переходит в прооксидантное соединение пероксинитрит. Вероятно, отсутствие избыточного синтеза NO способствовало ограничению развития оксидативного стресса и уменьшению окислительного повреждения биомолекул митохондрий клеток сердца.

В связи с вышесказанным, представлялось целесообразным изучить влияние новых производных аминокислот на показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) на фоне ингибирования iNOS.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ АЛКОГОЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА

Изучение влияния глүфимета и мефаргина на концентрацию продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в клетках сердца животных после ОАИ на фоне ингибирования iNOS

Установлено, что ОАИ приводит к интенсификации процессов ПОЛ в митохондриях клеток сердца крыс, о чём свидетельствует повышение концентрации МДА у контрольной группы в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателями интактных животных. В группе ОАИ+глүфимет концентрация МДА была ниже в 1,4 раза ($p < 0,05$); в группе ОАИ+мефаргин — в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. При ингибировании iNOS у животных с ОАИ наблюдали в 1,3 раза ($p < 0,05$) более низкие значения МДА по сравнению с самками контрольной группы (табл. 3).

При исследовании активности антиоксидантных ферментов статистически значимых изменений активности каталазы и глутатионпероксидазы не было выявлено. Активность СОД у животных группы ОАИ+физраствор была в 1,7 раза ($p < 0,05$) ниже по сравнению с животными интактной группы. В опытных группах алкоголизованных животных, получавших глүфимет или мефаргин, активность СОД была в 1,7 ($p < 0,05$) и в 1,8 раза ($p < 0,05$) соответственно выше по сравнению с контрольной группой (табл. 3).

Очевидно, что ОАИ приводит к усилению процессов ПОЛ, о чём свидетельствуют накопление вторичных продуктов ПОЛ и снижение активности антиоксидантного фермента первой линии защиты — СОД. Основным источником АФК в кардиомиоцитах является продукция NADPH-оксидазой 2 (NOX2) супероксид-аниона, который способен как самостоятельно оказывать повреждающее действие, так и вступать в реакцию с NO с получением пероксинитрита [31]. Образующиеся активные формы кислорода и азота непосредственно способствуют фрагментации сократительных белков, дисфункции саркоплазматического ретикулума, уменьшению активности миофибриллярной АТФазы [32]. Все эти процессы наряду с изменением биоэнергетики

клеток уменьшают функциональные резервы сердца, вызывают развитие сердечной недостаточности.

Изучаемые соединения выражено ограничивали интенсивность процессов ПОЛ. Глүфимет и мефаргин снижали концентрацию МДА, вероятно, улучшая функциональное состояние митохондрий, так как основным источником свободных радикалов являются митохондрии. Кроме того, молекула глүфимета включает в свою структуру остаток глицина, который участвует в синтезе пептидов и белков, например, трипептида глутатиона, обладающего мощным антиоксидантным действием.

У алкоголизованных животных, получавших аминоксидин, концентрация продуктов ПОЛ была статистически значимо ниже. Селективный ингибитор iNOS предотвращал избыточную продукцию NO, образование пероксинитрита и окислительное повреждение липидов с образованием малонового диальдегида. Стоит отметить, что исследуемые соединения на фоне ингибирования iNOS, также оказывали антиоксидантный эффект, причём у глүфимета он был менее выражен, что подтверждает влияние последнего на активность iNOS и обеспечивает его кардиопротекторное действие.

Ввиду вероятного участия системы оксида азота в кардиопротекторном действии исследуемых соединений, а также на основании ранее полученных результатов [12, 33], представлялось необходимым изучение влияния глүфимета и мефаргина на концентрацию конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови и гомогенате сердца животных с ОАИ на фоне блокады iNOS.

Изменение уровня конечных метаболитов NO у алкоголизованных животных на фоне ингибирования iNOS под влиянием новых производных нейроактивных аминокислот

ОАИ приводила к увеличению суммарной концентрации нитрит- и нитрат-ионов в сыворотке крови на 68% ($p < 0,05$), в гомогенатах сердца — на 22%. Глүфимет и мефаргин снижали исследуемый показатель в крови на 19% и 28% ($p < 0,05$),

Таблица 3. Влияние исследуемых соединений на концентрацию малонового диальдегида (МДА) и активность антиоксидантных ферментов митохондрий сердца крыс с ОАИ

Группы животных	МДА, мкмоль/мг белка	Каталаза, мг H ₂ O ₂ /мин/мг белка	Глутатионпероксидаза, мкмоль GSH/мин/мг белка	СОД, % ингибирования/мг белка
Интактная	26,6±3,6	154,6±22,7	2,1±0,6	48,1±6,8
ОАИ+физраствор	40,9±2,7*	168,2±30,2	2,7±0,6	28,5±4,5*
ОАИ+глүфимет	28,7±4,3 [#]	138,6±27,4	2,7±0,3	47,4±5,3 [#]
ОАИ+мефаргин	32,5±3,4 [#]	143,5±23,7	2,3±0,4	51,7±5,6 [#]
ОАИ+милдронат	34,2±3,9	143,6±35,3	2,6±0,3	38,9±4,9
ОАИ+AG+физраствор	30,3±2,9 [#]	161,6±18,1	2,8±0,4	39,1±6,1
ОАИ+AG+глүфимет	25,6±2,7	170,9±32,3	2,8±0,6	36,6±4,8
ОАИ+AG+мефаргин	31,3±4,2	178,2±30,4	2,5±0,6	45,1±5,0
ОАИ+AG+милдронат	32,2±3,6	157,4±29,1	1,5±0,6	35,4±5,2

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0,05$: * – по сравнению с интактной группой, # – по сравнению с группой ОАИ+физраствор (тест Тьюки).

в гомогенатах сердца — на 14% ($p<0,05$) и 20% ($p<0,05$) соответственно. Милдронат статистически значимо уменьшал концентрацию конечных метаболитов NO только в клетках сердца (на 15%, $p<0,05$) относительно животных контрольной группы (рис. 4).

Ингибирование iNOS аминоксидом вызвало значительное снижение уровня NO в сыворотке крови и ткани сердца на 46% ($p<0,05$) и 40% ($p<0,05$) соответственно. В группах животных, получавших новые производные глутамата и ГАМК на фоне блокады iNOS, концентрация конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови и гомогенатах сердца была выше на 14% и 44% (в группе алкоголизованных животных, которым вводили глутимет) и на 48% и 59% (у животных группы ОАИ+AG+мефаргин) соответственно относительно группы алкоголизованных животных с ингибированием индуцибельной NO-синтазы (рис. 4).

Оксид азота обладает широким спектром биологических свойств, участвует в регуляции сократимости миокарда, оказывает модулирующее влияние на функционирование митохондрий кардиомиоцитов и оксидантный статус. Из полученных результатов следует, что ОАИ приводит к увеличению синтеза оксида азота, вероятно, за счёт активации iNOS, что подтверждается литературными данными [34]. Как известно, в процессе метаболизма одной молекулы этанола происходит восстановление 2 молекул NAD^+ , что значительно увеличивает соотношение $NADH/NAD^+$ в клетке. Это вызывает снижение экспрессии NAD -зависимой ацетилазы SIRT-1. Данный фермент первично локализуется в ядре клетки и модулирует активность различных молекулярных мишеней, в частности, подавляет экспрессию iNOS [35].

Глутимет и мефаргин снижали концентрацию конечных метаболитов NO в сыворотке крови и гомогенатах сердца животных с ОАИ. В связи с этим можно предположить, что производные глутаминовой

кислоты и ГАМК, улучшая сопряжение процессов в дыхательной цепи, пополняют пул NAD^+ , служащей субстратом SIRT-1. Последней, в свою очередь, ингибирует экспрессию iNOS, стабилизирует HIF-1 α , оказывает противовоспалительное, антиоксидантное, антиапоптотическое действие, тем самым увеличивая инотропные резервы сердца. Кроме того, ещё одним механизмом реализации кардиопротекторного действия глутимета может быть активация различных метаболитных рецепторов глутамата (mGluR2, mGluR3, mGluR5), которая, как известно, уменьшает экспрессию iNOS посредством снижения активности NF- κ B, NADPH-оксидазы, а также проницаемости Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны [36-38]. Глицин, включённый в структуру глутимета, также способен ингибировать активацию NF- κ B и экспрессию iNOS [39]. Имеются данные, что ГАМК может тормозить iNOS посредством снижения синтеза интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) [27]. В поддержку NO-ергического механизма действия изучаемых соединений свидетельствует и отсутствие снижения уровня оксида азота у животных с блокадой iNOS, особенно выраженное для мефаргина. В данную композицию включён L-аргинин, являющийся субстратом для синтеза NO конститутивными NO-синтазами (эндотелиальной и нейрональной). Можно предположить, что данное соединение увеличивает их активность и синтез оксида азота в базовых количествах, оказывая модуляторные эффекты в клетках. Известно о тесной функциональной взаимосвязи ГАМК и NO-ергической системы [40]. Глутимет, являясь производным глутаминовой кислоты, возможно, реализует свои влияния путём стимуляции ионотропных глутаматных рецепторов, в частности подтипа NMDA, увеличения цитозольного Ca^{2+} , который после связывания с кальмодулином активирует нейрональную изоформу NOS [41]. В поддержку этого свидетельствует снижение активности nNOS при блокаде NMDA-рецептора [42].

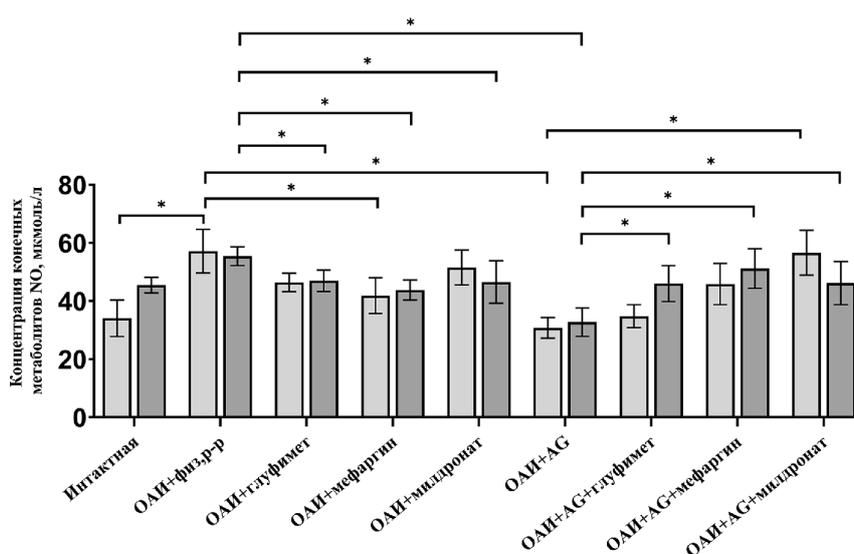


Рисунок 4. Изменение концентрации конечных метаболитов оксида азота в сыворотке крови и гомогенатах сердца алкоголизованных животных под влиянием глутимета и мефаргина на фоне ингибирования iNOS. Заштрихованные столбцы – изучаемый показатель в сыворотке крови, черные столбцы – в гомогенате сердца. Различия статистически значимы при $p<0,05$ (тест Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Данна).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острая алкогольная интоксикация приводит к выраженному снижению сократимости миокарда, развитию митохондриальной дисфункции, оксидативного стресса. Этанол нарушает белковый и кальциевый гомеостаз, потенцирует окислительное повреждение биомакромолекул клеток сердца, нарушает структуру и функцию мембран, в частности, митохондрий, что способствует развитию апоптоза, уменьшению объёма сократительных кардиомиоцитов и сердечной недостаточности. Исследуемые производные глутаминовой кислоты и ГАМК глуфимет и мефаргин способствуют сохранению функциональных резервов сердца, улучшению дыхательной функции митохондрий, снижению продукции АФК. В представленной работе мы акцентировали внимание на вероятном участии оксида азота в кардиопротекторном действии изучаемых соединений, что подтверждалось данными ранее проведённых исследований и полученными результатами. Глуфимет и мефаргин приводили к значительному снижению конечных метаболитов NO в сыворотке крови и ткани сердца, уровень которых был выше у животных с ОАИ, вероятно, за счёт ингибирования iNOS. Однако уменьшение концентрации NO при селективной блокаде iNOS и введении изучаемых веществ было менее выражено, чем без блокады фермента. Можно предположить, что производное глутамата глуфимет и производное ГАМК мефаргин снижают экспрессию/активность iNOS, либо индуцируют экспрессию конститутивных NO-синтаз, участвующих в модуляции различных метаболических путей в клетке и сократительной функции сердца. Полученные результаты могут послужить предпосылкой для разработки на основе производных нейроктивных аминокислот кардиопротекторных лекарственных препаратов, модулирующих систему оксида азота в кардиомиоцитах, для эффективной фармакотерапии последствий кардионегативного действия алкоголя.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт средств Волгоградского государственного медицинского университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Животных содержали в условиях вивария со свободным доступом к воде и пище, с 12-часовым световым днём согласно рекомендациям национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики”, Международных рекомендаций “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (1986 г.) и директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. Протокол исследования

был одобрен Региональным исследовательским этическим комитетом Волгоградской области (протокол 2095-2019 от 25.01.2019).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bell S., Daskalopoulou M., Rapsomaniki E., George J., Britton A., Bobak M., Casas J.P., Dale C.E., Denaxas S., Shah A.D., Hemingway H. (2017) Association between clinically recorded alcohol consumption and initial presentation of 12 cardiovascular diseases: Population-based cohort study using linked health records. *Br. Med. J.*, **356**, 909. DOI: 10.1136/bmj.j909
2. Pásek M., Bébarová M., Christé G., Šimurdová M., Šimurda J. (2016) Acute effects of ethanol on action potential and intracellular Ca²⁺ transient in cardiac ventricular cells: A simulation study. *Med. Biol. Eng. Comput.*, **54**, 753-762. DOI: 10.1007/s11517-015-1366-8
3. Umoh N.A., Walker R.K., Al-Rubaiee M., Jeffress M.A., Haddad G.E. (2014) Acute alcohol modulates cardiac function as PI3K/Akt regulates oxidative stress. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **38**(7), 1847-1864. DOI: 10.1111/acer.12459
4. Voskoboinik A., McDonald C., Chieng D., O'Brien J., Gutman S., Ngu P., Sugumar H., Wong G., Kalman J.M., Taylor A.J., Kistler P.M. (2021) Acute electrical, autonomic and structural effects of binge drinking: Insights into the “holiday heart syndrome”. *Int. J. Cardiol.*, **331**, 100-105. DOI: 10.1016/j.ijcard.2021.01.071
5. Piano M.R., Phillips S.A. (2014) Alcoholic cardiomyopathy: Pathophysiologic insights *Cardiovasc. Toxicol.*, **14**, 291-308. DOI: 10.1007/s12012-014-9252-4
6. Toda N., Ayajiki K. (2010) Vascular actions of nitric oxide as affected by exposure to alcohol. *Alcohol Alcohol.*, **45**(4), 347-355. DOI: 10.1093/alcalc/agg028
7. Zhang J., He S., Zhou W., Yuari B. (2016) Ethanol induces oxidative stress and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **9**(2), 4125-4130.
8. Deng X.S., Deitrich R.A. (2007) Ethanol metabolism and effects: Nitric oxide and its interaction. *Curr. Clin. Pharmacol.*, **2**(2), 145-153. DOI: 10.2174/157488407780598135
9. Daiber A., Xia N., Steven S., Oelze M., Hanf A., Kröller-Schön S., Münzel T., Li H. (2019) New therapeutic implications of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function/dysfunction in cardiovascular disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(1), 187. DOI: 10.3390/ijms20010187
10. Тюренков И.Н., Попова Т.А., Перфилова В.Н., Прокофьев И.И., Борисов А.В., Кустова М.В., Зайпуллаев Г.И., Островский О.В. (2017) Стресспротекторное действие нового производного глутаминовой кислоты при блокаде нейрональной NO-синтазы. *Биомедицинская химия*, **63**(1), 47-55. [Tyurenkov I.N., Popova T.A., Perfilova V.N., Prokofiev I.I., Borisov A.V., Kustova M.V., Zaypullaev G.I., Ostrovskij O.V. (2017) Protective effects of a new glutamic acid derivative against stress after nNOS blockade. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **63**(1), 47-55.] DOI: 10.18097/PBMC2017630147
11. Perfilova V.N., Kustova M.V., Popova T.A., Khusainova G.H., Prokofiev I.I., Nesterova K.I., Tyurenkov I.N. (2021) Cardioprotective effects of a new glutamic acid derivative in chronic alcohol intoxication. *Alcohol*, **93**, 1-10. DOI: 10.1016/j.alcohol.2021.01.006

12. Борисов А.В., Прокофьев И.И., Мокроусов И.С., Перфилова В.Н., Тюренков И.Н. (2017) Подавление экспрессии индуцибельной NO-синтазы производными нейрорактивных аминокислот — фенибутом и глуфиметом в условиях *in vitro* и *ex vivo*. Бюлл. Эксп. Биол. Мед., **164**(8), 205-208. [Borisov A.V., Prokofiev I.I., Mokrousov I.S., Perfilova V.N., Tyurenkov I.N. (2017) Inhibition of the expression of inducible NO synthase by neuroactive amino acid derivatives phenibut and glufimet *in vitro* and *ex vivo*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, **164**(2), 177-180. DOI: 10.1007/s10517-017-3952-2]
13. Кустова М.В., Перфилова В.Н., Прокофьев И.И., Тюренков И.Н. (2020) Влияние нового производного ГАМК — соединения РГПУ-260 на функциональные резервы сердца крыс, подвергшихся хронической алкогольной интоксикации. Бюлл. Экспер. Биол. Мед., **170**(11), 590-596. [Kustova M.V., Perfilova V.N., Prokofiev I.I., Tyurenkov I.N. (2021) Effect of RGPU-260, a novel GABA derivative, on functional reserves of rat heart after chronic alcohol intoxication. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, **170**(5), 631-635.] DOI: 10.1007/s10517-021-05121-7
14. Jeon E.J., Cho Y.S., Kim A.H., Shim J.M., Kim Y.S., Piao Z., Shin Y.C., Kwon J. (2020) Enhanced alcohol degradation and hepatic protective effects of an *Acetobacter pasteurianus*-derived product, CureZyme-ACE, in an acute intoxication rat model. Laboratory Animal Research, **36**(1), 1-8. DOI: 10.1186/s42826-020-00050-4
15. Kustova M.V., Perfilova V.N., Prokofiev I.I., Musyko E.A., Kucheryavenko A.S., Kusnetsova E.E., Tsetsera D.E., Tyurenkov I.N. (2022) Pharmacological correction of the sequelae of acute alcohol-induced myocardial damage with new derivatives of neuroactive amino acids coupled with the blockade of the neuronal NO synthase isoform. Research Results in Pharmacology, **8**(4), 1-13. DOI: 10.3897/rrpharmacology.8.90241
16. Lanza I.R., Nair K.S. (2009) Functional assessment of isolated mitochondria *in vitro*. Methods Enzymol., **457**, 349-372. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)05020-4
17. Brand M.D., Nicholls D.G. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. Biochemical J., **435**(2), 297-312. DOI: 10.1042/BJ4370575u
18. Oliveira A.A., Almeida J.P.C., Freitas R.M., Nascimento V.S., Aguiar L.M.V., Junior H.V.N., Fonteles M.M.F. (2007) Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. Cell. Mol. Neurobiol., **27**(3), 395-406. DOI: 10.1007/s10571-006-9132-y
19. Костюк В.А., Потанович А.И., Ковалева Ж.В. (1990) Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. Вопросы медицинской химии, **36**(2), 88-91. [Kostyuk V.A., Potanovich A.I., Kovaleva Z.V. (1990) A simple, sensitive assay for determination of superoxide dismutase activity based on reaction of quercetin oxidation. Voprosy Meditsinskoi Khimii, **2**(36), 88-91.]
20. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. (2005) Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. Клиническая лабораторная диагностика, **6**, 15-18. [Metelskaya V.A., Gumanova N.G. (2005) Screening as a method for determining the serum level of nitric oxide metabolites. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika, **6**, 15-18.]
21. Перфилова В.Н., Тюренков И.Н., Берестовицкая В.М., Васильева О.С. (2006) Кардиопротекторный эффект производных ГАМК при острой алкогольной интоксикации. Экспериментальная и клиническая фармакология, **69**(4), 23-27. [Perfilova V.N., Tyurenkov I.N., Berestovitskaya V.M., Vasil'eva O.S. (2006) Cardioprotective effect of GABA derivatives under acute alcohol intoxication conditions. Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya, **69**(4) 23-27.]
22. Капелько В.И. (2019) Почему расслабление миокарда всегда замедляется при патологии сердца? Кардиология, **59**(12), 44-51. [Kapelko V.I. (2019) Why myocardial relaxation always slows at cardiac pathology? Kardiologiya, **59**(12), 44-51.]
23. Mustroph J., Lebek S., Maier L.S., Neef S. (2019) Mechanisms of cardiac ethanol toxicity and novel treatment options. Pharmacol. Ther., **197**, 1-10. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.12.006
24. Xie L.Y., Yang Z., Wang Y., Hu J.N., Lu Y.W., Zhang H., Jiang S., Li W. (2022) 1-O-Acetylbritannilactone ameliorates alcohol-induced hepatotoxicity through regulation of ROS/Akt/NF- κ B-Mediated apoptosis and inflammation. ACS Omega, **7**(21), 18122-18130. DOI: 10.1021/acsomega.2c01681
25. Jiang H., Holm J., Vidlund M., Vanky F., Friberg Ö., Yang Y., Svedjeholm R. (2020) The impact of glutamate infusion on postoperative NT-proBNP in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A randomized study. J. Transl. Med., **18**, 193. DOI: 10.1186/s12967-020-02351-7
26. Neckel H., Quagliotto E., Casali K.R., Montano N., dal Lago P., Rasia-Filho A.A. (2012) Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses. Can. J. Physiol. Pharmacol., **90**(5), 525-536. DOI: 10.1139/y2012-024
27. Lee M., Schwab C., McGeer P.L. (2011) Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. Glia, **59**, 152-165. DOI: 10.1002/glia.21087
28. Skachilova S.Y., Kesarev O.G., Danilenko L.M., Bystrova N.A., Dolzhikov A.A., Nikolaev S.B. (2016) Pharmacological correction of L-NAME-induced oxide deficiency with derivatives of 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate. Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology, **2**(1), 36-41.
29. Steiner J.L., Lang C.H. (2017) Etiology of alcoholic cardiomyopathy: Mitochondria, oxidative stress and apoptosis. Int. J. Biochem. Cell Biol., **89**, 125-135. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.06.009
30. Fernandez-Solà J. (2020) The effects of ethanol on the heart: Alcoholic cardiomyopathy. Nutrients, **12**, 572. DOI: 10.3390/nu12020572
31. Brandt M., Garlapati V., Oelze M., Sotiriou E., Knorr M., Kröller-Schön S., Kossmann S., Schonfelder T., Morawietz H., Schulz E., Schultheiss H.P., Daiber A., Münzel T., Wenzel P. (2016) NOX2 amplifies acetaldehyde-mediated cardiomyocyte mitochondrial dysfunction in alcoholic cardiomyopathy. Sci. Rep., **6**(1), 1-16. DOI: 10.1038/srep32554
32. Piano M.R. (2017) Alcohol's effects on the cardiovascular system. Alcohol Res., **38**(2), 219-241.
33. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Садикова Н.В., Прокофьев И.И. (2015) NO-зависимый механизм кардиопротекторного действия фенибута при стрессорном нарушении сократительной функции сердца. Экспериментальная и клиническая фармакология, **78**(11), 8-11. [Tyurenkov I.N., Perfilova V.N., Sadikova N.V., Prokofiev I.I. (2015) NO-dependent mechanism of the cardioprotective action of phenibut on stress-induced violation of contractile function of the heart. Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya, **78**(11), 8-11.]

34. Беленичев И.Ф., Стеблюк В.С., Камышный А.М. (2017) Характер экспрессии мРНК iNOS и eNOS в миокарде крыс с алкогольной кардиомиопатией и на фоне проводимой терапии метаболитотропными кардиопротекторами. Вестник проблем в биологии и медицине, 2, 82-87. [Bielenichev I.F., Stebliuk V.S., Kamyshnyi O.M. (2017) The mRNA expression character of iNOS and eNOS in the rat's myocardium with alcoholic cardiomyopathy during metabolitotropic cardioprotectors therapy. Vestnik Problem v Biologii i Meditsine, 2, 82-87.]
35. Ye F., Jiang J.H., Zong C., Yang X., Gao L., Meng Y., Li R., Zhao Q., Han Z., Wei L. (2020) Sirt1-overexpressing mesenchymal stem cells drive the anti-tumor effect through their pro-inflammatory capacity. Molecular Therapy, 28, 874-888. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.01.018
36. Loane D.J., Stoica B.A., Byrnes K.R., Jeong W., Faden A.I. (2013) Activation of mGluR5 and inhibition of NADPH oxidase improves functional recovery after traumatic brain injury. J. Neurotrauma, 30, 403-412. DOI: 10.1089/neu.2012.2589
37. Yao H.H., Ding J.H., Zhou F., Wang F., Hu L.F., Sun T., Hu G. (2005) Enhancement of glutamate uptake mediates the neuroprotection exerted by activating group II or III metabotropic glutamate receptors on astrocytes. J. Neurochemistry, 92(4), 948-961. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02937.x
38. Foreman M.A., Gu Y., Howl J.D., Jones S., Publicover S.J. (2005) Group III metabotropic glutamate receptor activation inhibits Ca²⁺ influx and nitric oxide synthase activity in bone marrow stromal cells. J. Cell. Physiol., 204(2), 704-713. DOI: 10.1002/jcp.20353
39. Mauriz J.L., Matilla B., Culebras J.M., Gonzalez P., Gonzalez-Gallego J. (2001) Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat. Free Rad. Biol. Med., 31(10), 1236-1244. DOI: 10.1016/s0891-5849(01)00716-x
40. Tarasenko A.S. (2016) Effect of nitric oxide donor SNAP on GABA release from rat brain nerve terminals. Ukr. Biochem. J., 88(5), 82-89.
41. Santos R.M., Lourenço C.F., Ledo A., Barbosa R.M., Laranjinha J. (2012) Nitric oxide inactivation mechanisms in the brain: Role in bioenergetics and neurodegeneration. Int. J. Cell. Biol., 2012, 391914. DOI: 10.1155/2012/391914
42. Park D.J., West A.R. (2009) Regulation of striatal nitric oxide synthesis by local dopamine and glutamate interactions. J. Neurochem., 111(6), 1457-1465.

Поступила в редакцию: 29. 01. 2023.
После доработки: 28. 03. 2023.
Принята к печати: 05. 04. 2023.

THE ROLE OF iNOS INHIBITION IN THE MECHANISM OF THE CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF NEW GABA AND GLUTAMIC ACID DERIVATIVES IN THE MODEL OF ACUTE ALCOHOLIC MYOCARDIAL INJURY IN RATS

M.V. Kustova¹, I.I. Prokofiev^{1*}, V.N. Perfilova¹, E.A. Muzyko¹, V.E. Zavadskaya¹, S.V. Varlamova¹, A.S. Kucheryavenko¹, I.N. Tyurenkov¹, O.S. Vasilyeva²

¹Volgograd State Medical University, 1 Pavshikh Bortsov sq., Volgograd, 400131 Russia; *e-mail: igor.prokofiev@mail.ru

²Herzen Russian State Pedagogical University, 48 Moika emb., St. Petersburg, 191186 Russia

The cardioprotective effects of new derivatives of glutamic acid (glufimet) and GABA (mefargin) were studied in rats exposed to acute alcohol intoxication (AAI) under conditions of selective blockade of inducible NO-synthase (iNOS). AAI induced a pronounced decrease in the contractile function of the myocardium during exercise tests (load by volume, test for adrenoactivity, isometric exercise), caused mitochondrial dysfunction and increased processes of lipid peroxidation (LPO) in heart cells. A decrease in NO production during iNOS inhibition and AAI improved the respiratory function of mitochondria, a decreased the level of LPO products, and increased mitochondrial superoxide dismutase activity of heart cells. This led to an increase in myocardial contractility. The studied compounds, glufimet and mefargin, caused a statistically significant increase in the rates of myocardial contraction and relaxation, left ventricular pressure, and also reduced NO production. This was accompanied by a decrease in the intensity of LPO processes and an increase in the respiratory control ratio (RCR), reflecting the coupling between respiration and phosphorylation processes during activation of the respiratory chain complexes I and II. The decrease in NO concentration during selective blockade of iNOS and administration of the studied substances was less pronounced than without blockade of the enzyme. This suggests the putative effect of new derivatives of neuroactive amino acids on the NO system.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: alcoholic myocardial injury; GABA and derivatives glutamic acid; iNOS blockade

Funding. The study was funded by the Volgograd State Medical University.

Received: 29.01.2022; revised: 28.03.2023; accepted: 05.04.2023.