



## ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ МИЛДРОНАТА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ L-NAME ИНДУЦИРОВАННОГО ДЕФИЦИТА ОКСИДА АЗОТА

Л.М. ДАНИЛЕНКО<sup>1</sup>, О.В. ХАРИТОНОВА<sup>1</sup>  
М.В. ПОКРОВСКИЙ<sup>1</sup>, О.А. СТАРОСЕЛЬЦЕВА<sup>2</sup>  
С.Я. СКАЧИЛОВА<sup>3</sup>, О.Г. КЕСАРЕВ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет

<sup>2</sup>Курский государственный медицинский  
университет

<sup>3</sup>Всероссийский научный центр  
по безопасности биологически активных  
веществ, п. Старая Купавна

e-mail: Danilenkoljudmila@mail.ru

Изучение эндотелиопротекторных свойств в ряду производных 3-(2, 2, 2-триметилгидразиний) пропионата показало, что 3-(2, 2, 2-триметилгидразиний) пропионат (милдронат) в дозе 90 мг/кг и его производные (никотинат, 5-бромникотинат, 5-гидроксиникотина, глицинат) 3-(2, 2, 2-триметилгидразиний) пропионата калия оказывают выраженное эндотелиопротекторное действие на модели L-NAME-индуцируемого дефицита оксида азота, что выражается в снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции. Выявлено, что производное 5-гидроксиникотинат 3-(2, 2, 2-триметилгидразиний) пропионата калия, обладающее наиболее ярко выраженной эндотелиопротекторной активностью.

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

**Введение.** 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-альдостероновой системы (РААС), симпатической нервной системы (СНС) на сердечно-сосудистую систему (иАПФ,  $\beta$ -блокаторы и т.д.); снижающих уровень ХС<sub>общ</sub>, ХС<sub>ЛПНП</sub>, ХС<sub>ЛПОНП</sub> (особенно статины); регулирующих работу Ca<sup>2+</sup> каналов (блокаторы Ca каналов), что очевидно связано как с прямыми эндотелийзависимыми механизмами действия, так и их опосредованным комплексным фармакологическим влиянием [6, 8].

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 неблагоприятное влияние на функции клетки [10].

При экспериментальном моделировании артериальной гипертензии у животных увеличение РФК приводит к эндотелиальной дисфункции, что подтверждается улучшением эндотелийзависимой релаксации при применении антиоксидантов [12].

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 [11].

В этой связи, целью нашего исследования явилось изучение эндотелиопротекторной 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 индуцированной эндотелиальной дисфункции.

**Материалы и методы.** 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<sup>®</sup>(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.

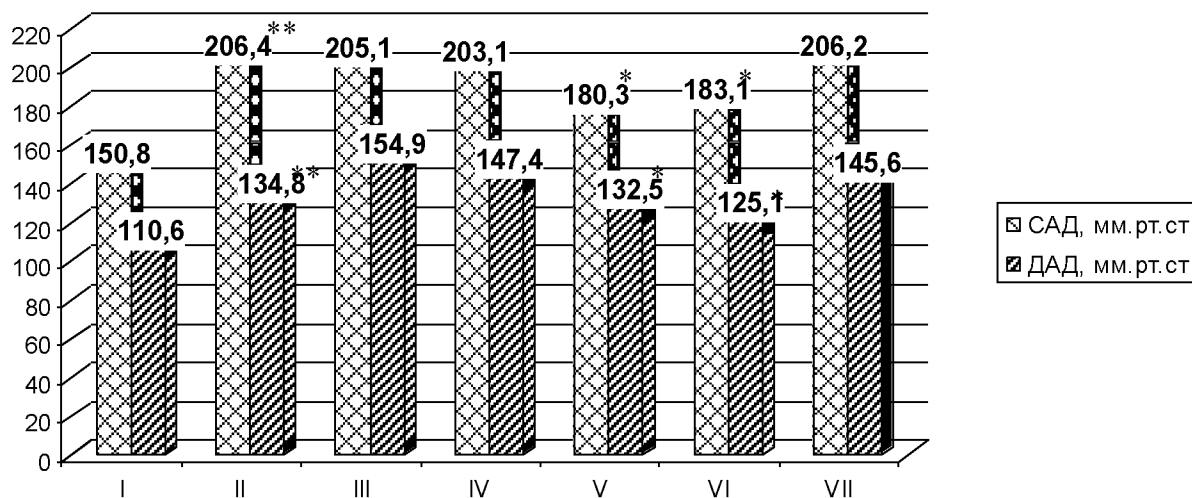
На 8-й день от начала эксперимента под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД). Болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в бедренную вену. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли непрерывно посредством датчика и компьютерной программы «Vіорас Systems, Inc.». 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) [5], 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 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> (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 Милдроната<sup>®</sup>, в пересчете на лабораторных животных.

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Microsoft Excel. «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-гидроксиникотинат 3-(2, 2, 2-триметилгидразиний) пропионата калия и 5-бромникотинат 3-(2, 2, 2-триметилгидразиний) пропионата калия, где САД и ДАД составили 183,1±3,5 и 125,1±4,3 и 180,3±6,3 и 132,5±4,8 мм рт.ст. соответственно.

Влияние Милдроната<sup>®</sup> и исследуемых веществ на исходные показатели артериального давления у наркотизированных крыс с моделированием L-NAME индуцированной патологии представлены на рис. 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)

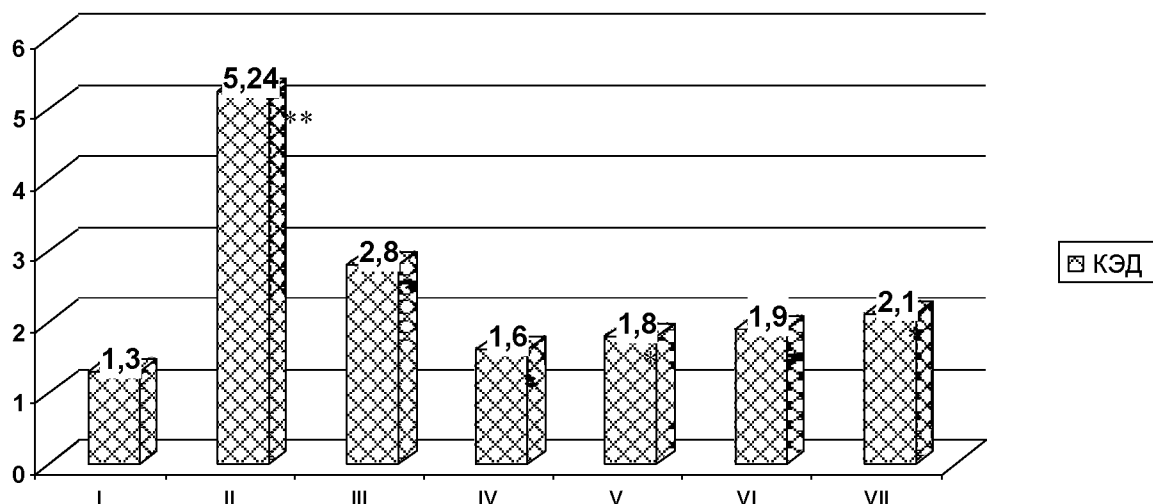
Примечание. \* –  $p = 0,05$  – в сравнении с L-NAME; \*\* –  $p = 0,05$  – в сравнении с интактными

Рис. 1. Влияние производных 3-(2, 2, 2-триметилгидразиний) пропионата калия на АД систолическое и АД диастолическое при моделировании L-NAME (25 мг/кг внутривенно, однократно в течение 7 дней)-индуцированного дефицита NO

На рис. 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<sup>®</sup> и все его производные приводили к достоверно выраженному снижению КЭД. Обнаружено, что Милдронат<sup>®</sup> 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.



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).

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

Рис. 2. Влияние производных 3-(2, 2, 2-триметилгидразиний) пропионата калия на коэффициент эндотелиальной дисфункции при моделировании L-NAME (25 мг/кг внутривенно, однократно в течение 7 дней) – индуцированного дефицита NO

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.

Общеизвестно, что введение в молекулу лекарственного вещества дополнительных функциональных групп приводит к расширению спектра его фармакологической активности. При этом важно, чтобы дополнительные свойства не приводили к снижению эффективности препарата, а наоборот способствовали усилению его основного эффекта. При введении в молекулу триметилгидразиния пропионата никотиновой кислоты (никотината) и её производных, а именно 5-бромникотината, 5-гидроксиникотината, а также глицината, обладающих различной степенью антиоксидантной активности, предполагается выявление новых свойств и усиление эффектов, однако закономерно, что в зависимости от вводимой компоненты диапазон активности полученных субстанций может варьировать, что и показали результаты наших исследований.

Так, вещество, обладающее наиболее ярко выраженной антиоксидантной активностью, 5-гидроксиникотинат 3-(2, 2, 2-триметилгидрозиный) пропионат калия достоверно в отличие от других веществ повлияло на гемодинамические показатели на модели L-NAME индуцированного дефицита NO и понизило САД и ДАД до следующих значений:  $183,1 \pm 3,5$  и  $125,1 \pm 4,3$  мм рт.ст соответственно. Максимально снижение КЭД характерно для трех представленных модификаций: никотинат, 5- бромникотинат, 5-гидроксиникотинат (3-(2, 2, 2-триметилгидрозиный) пропионат калия),  $1,6 \pm 0,3$ ,  $1,8 \pm 0,6$ ,  $1,9 \pm 0,5$ . В ранее проведенных работах было показано противоишемическое действие исследуемых веществ. Установлено, что профилактическое введение соединений никотинат, 5-бромникотинат, 5-гидроксиникотинат, глицинат (3-(2, 2, 2-триметилгидрозиный) пропионат калия), производных 3-(2, 2, 2-триметилгидразиний) пропионата в соответствующих дозах приводит к уменьшению зоны некроза. Максимально размер зоны некроза уменьшило соединение 5-гидроксиникотинат (3-(2, 2, 2-триметилгидрозиный) пропионат калия) [4].

Проведенные экспериментальные исследования позволяют заключить, что препарат Милдронат<sup>®</sup> и все его производные оказывали выраженное эндотелиопротективное действие на модели L-NAME-индуцированного дефицита NO, что выражалось в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов и снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции.

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 высокоактивных эндотелиопротекторов среди соединений, обладающих антиоксидантной активностью, вполне оправдан.

#### **Выводы.**

1. Длительное (в течение 7 дней) внутрибрюшинное введение L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывает у самцов линии Вистер нарушение функции эндотелия сосудов, выражающееся в повышении значений артериального давления и коэффициента эндотелиальной дисфункции.

2. Милдронат<sup>®</sup> в дозе 90 мг/кг и все его производные – (никотинат, 5-бромникотинат, 5-гидроксиникотинат, глицинат (3-(2, 2, 2-триметилгидрозиный) пропионат калия) оказывают выраженное эндотелиопротективное действие, проявляющееся в снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции.



3. Производные 3-(2, 2, 2-триметилгидразиний) пропионата калия способны оказывать наиболее выраженное эндотелиопротективное действие, в отличие от препарата сравнения Милдронат®, что позволяет предположить их использование для наиболее эффективного лечения при эндотелиальной дисфункции и продолжить дальнейшее изучение.

### Литература

1. Карпов, Ю.А. Новые рекомендации по артериальной гипертензии / Ю. А. Карпов // Русский медицинский журнал. – 2010. – № 22. – С. 1290.
2. Ланкин, В.З. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: pro et contra / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. – М.: Медпрактика, 2003. – С. 200.
3. Метельская, В.А. Характеристика биохимических маркеров функции сосудистого эндотелия: разработка модельной системы с применением клеточных культур / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова, О.А. Литинская // Вопросы биологической медицины и фармацевтической химии. – 2004. – №2. – С. 34-39.
4. Покровский, М.В. Сравнительное исследование противоишемического эффекта 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата и его производных при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда / М.В. Покровский, Л.М. Даниленко, О.В. Харитоновна и др. // Вестник ВолгГМУ: приложение. Материалы III Всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии». – 2011. – С.76-77.
5. Покровский, М. В. Метаболическая и антиоксидантная терапия L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции/ М.В. Покровский, Е.Б. Артюшкова, Т.Г. Покровская и др.// Кубанский научный медицинский вестник. – 2008. – №3-4. – С.73-78.
6. Aikawa, M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets / M. Aikawa, P. Libby // Nat. Med. – 2002. – Vol. 8. – P. 1257-6122.
7. Bloch, W. Ischemia increases detectable endothelial nitric oxide synthase in rat and human myocardium / W. Bloch, U. Mehlhorn, A. Krahwinkel et al.//NitricOxid. – 2001. – Vol. 5, N 4. –P. 317-333.
8. Egashira, K. Effect of L-arginine on acetylcholine-induced endothelium-dependent vasodilation differs between the coronary and forearm vasculatures in humans/ K.Egashira, Y. Hirooka, T. Imaizumi et al.//J.Am. Coll. Cardiol. -2010. –Vol. 24. № 4. – P. 948 –952
9. Marchesi, C. Role of the 62eprod-angiotensin system in vascular inflammation//C. Marchesi P.Paradis, E.L Schiffrin // Trends Pharmacol. Sci. – 2008. – Vol. 29(7). – P.367–374.
10. Frisbee, J. C. Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats / J.C.Frisbee, D.W. Stepp //Am J Physiol Heart Circ Physiol.– 2001. – Vol. 281. – P. 1304–1311.
11. Heilzer T., Schlinzig T., Krohn K. et al. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers// Circulation. – 2001.- Vol. 104, N 22. – 2638-2646.
12. Suzuki, T. Eicosapentaenoic acid protects endothelial cells against anoikis through restoration of cFLIP/ T. Suzuki, K. Fukuo, T.Suhara et al. //Hypertension. – 2003. – Vol. 42. – P. 342-348.

## ENDOTELIOPROTEKTIVE ACTION OF MILDRONATE AND ITS DERIVATIVES IN MODELING L-NAME INDUCED DEFICIENCY OF NITRIC OXIDE

**L.M. DANILENKO<sup>1</sup>**  
**O.V.KHARITONOVA<sup>1</sup>**  
**M.V. POKROVSKII<sup>1</sup>**  
**O.A.STAROSSELZEVA<sup>2</sup>**  
**S.Y. SKACHILOVA<sup>3</sup>**  
**O.G. KESAREV<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Belgorod National Research University

<sup>2</sup>Kursk State Medical University

<sup>3</sup>Allrussian research center of safety of biological active compounds, Settl.Staraya Kupavna

e-mail: Danilenkolyudmila@mail.ru

Study of endotelioprotektive properties in a series of 3-(2, 2, 2-trimethylhydrazine) propionate showed that (Mildronate) at a dose of 90 mg/kg and its derivatives (nicotinate) 5 bromnikotinat, 5-gidroksinikotina, glycinate) 3 - (2,2,2-trimethylhydrazine) propionate potassium, have a marked effect on the model endotelioprotektor L-NAME-induced nitric oxide, resulting in a decrease in the coefficient of endothelial dysfunction.

Revealed that the derivative of 5-gidroksinikotinat 3 - (2, 2, 2-trimethylhydrazine) propionate potassium, which has the most pronounced endotelioprotektive activity.

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