

УДК 616.831-005.001.5:615.717

Г. І. Степанюк, *д-р мед. наук, проф.*,
О. В. Дякова,
Д. Г. Коньков,
О. В. Паршиков, *канд. мед. наук*

ВИВЧЕННЯ ЕНДОТЕЛІЙЗАЛЕЖНИХ МЕХАНІЗМІВ ВАЗОДИЛАТАТОРНОЇ АКТИВНОСТІ ВІНБОРОНУ IN VITRO

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова

Вступ

Новому вітчизняному спазмолітику вінборону (2-феніл-3-карбетокси-4-диметиламінометил-5-оксибензофурану гідрохлорид) притаманний комплекс фармакологічних властивостей — вазодилатуюча, антиоксидантна, антиагрегантна, протигіпоксична дія, а також активуючий вплив на мікроциркуляторні та репаративні процеси [1; 7]. Оцінюючи результати експериментального та клінічного вивчення вінборону як спазмолітика [6; 8], можна припустити, що вазодилатуюча дія препарату на гладком'язові структури має комплексний характер, її не можна пояснити виключно міотропним ефектом [2; 5]. Механізм впливу, цілком ймовірно, пов'язаний з ендотелійзалежною каскадною дією самого препарату, пусковим моментом якої, можливо, є підвищення синтезу NO ендотелієм, внаслідок чого відбуваються розслаблення судинного гладкого м'яза і вазодилатація та поліпшення реологічних властивостей крові [10]. Однак клітинні механізми вазодилаторної активності цього похід-

ного фуранхрому вивчено недостатньо, що і спонукало нас дослідити вплив вінборону на продукцію NO в клітинах кровоносних судин.

Мета даного дослідження: вивчити ендотелійзалежні та NO-залежні механізми дилаторних реакцій ізольованих фрагментів аорти щурів під дією вінборону.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проведено на ізольованих кільцевих фрагментах аорти у 15 щурів-самців лінії Вістар масою 160–210 г. Тварин декапітували під ефірним наркозом через 5 хв після внутрішньовенного введення гепарину (10 ОД/кг у хвостову вену). Грудний відділ аорти виділяли негайно після розтину грудної клітки, поміщали його в охолоджений розчин Кребса — Рінгера, який містить у мілімолях: 132 NaCl; 4,7 KCl; 1,4 NaH₂PO₄; 1,0 MgCl; 1,8 CaCl; 12,5 NaHCO₃; 5,6 глюкози; рН 7,4 підтримували шляхом продування газової суміші 5 % CO₂ / 95 % повітря). Ізольовані судини очищували від жирової та сполучної тканини на зовнішній поверхні,

розрізали на фрагменти шириною 1–2 мм і зберігали при +4 °С. Механографічні дослідження м'язових скорочень ізольованих судин проводили на експериментальній установці, яку збирали з використанням багатофункціонального вимірювального комплексу (Multi-purpose polygraph R85, Nihon Kohden, Японія).

Фрагменти судин розміщували у проточній горизонтальній тефлоновій камері (0,5 мл), яку перфузували зі швидкістю 1,5 мл/хв підігрітим до 36 °С розчином Кребса. Кільця аорти розтягували на двох сталевих гачках з постійним навантаженням 2,0 г. Один з гачків був рухомим і прикріплювався до ємнісного тензOMETричного датчика (ФТК-0,1). Силу скорочувальних реакцій кілець аорти реєстрували в ізометричному режимі після стабілізації амплітуди скорочень, які викликали періодичною стимуляцією гіперкалієвим розчином Кребса (KCl, 80 мМ) протягом 40–60 хв. Рівень ендотелійзалежних реакцій оцінювали за здатністю кілець аорти, передскорочених мезатонем (МЕЗ, 10⁻⁶ М), розслаблюватися у відповідь на ацетилхо-

лін (АХ, 10^{-6} М). У всіх експериментах з вивчення скорочувальних відповідей ізольованих судин до розчину Кребса додавали індометацин (Індо, $5 \cdot 10^{-6}$ М) — інгібітор ендогенного синтезу вазоактивних простаноїдів [16]. В окремій серії дослідів дилататорні реакції передскорочувальних гладких м'язів аорти досліджували на деендотелізованих фрагментах судин. Для цього ендотелій видаляли з інтимної поверхні кілець аорти механічно за допомогою ватного тампона, що підтверджувалося повною відсутністю дилататорних відповідей на ацетилхолін [17].

Основні солі кваліфікації х. ч. і препарат мезатон (фенілефрин) вітчизняного виробництва використовували без додаткового очищення. Зразки вінборону для клінічних досліджень були виготовлені НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (Київ). Хімічний акцептор позаклітинного NO — Нітоксидел (Ніто, залізо-сірчаній комплекс) отримували безпосередньо перед використанням за методом [3]. У роботі також використовували NaHCO_3 , ацетилхолін, індометацин, інгібітори ферментативного синтезу NO в клітинах: метиловий ефір N^G -нітро-L-аргініну (L-NAME) — конкурентний субстратний інгібітор NOS та S-метилізотіосечовину (SMT) — інгібітор iNOS (усі від фірми Sigma Chemical Co, USA). Статистичну обробку результатів вимірювань виконано з використанням програмного продукту Origin (версія 6.1, Origin-Lab Co., USA) на IBM-ПК [3].

Результати дослідження та їх обговорення

Вазодилататорна активність вінборону

Особливості вазодилататорної дії вінборону на фрагментах грудного відділу аорти щурів вивчали у відповідності з двома експериментальними протоколами. Попереднє ско-

рочення ізольованих судин спричинювали мезатоном (10^{-6} М) — агоністом $\alpha 1$ -адренорецепторів гладком'язових клітин. Середня сила скорочення кілець аорти, яку вимірювали за вказаних експериментальних умов, становила ($0,78 \pm 0,10$) г для судин з ендотелієм і ($0,94 \pm 0,12$) г — для деендотелізованих судин. У присутності ацетилхоліну (10^{-6} М) судини з інтактним ендотелієм зворотнорозслаблювалися на ($72,5 \pm 4,6$) % від вихідного рівня скорочення, спричиненого мезатоном. Деендотелізовані судини не реагували на ацетилхолін або відповідали невеликим скороченням — приблизно 10–15 % від рівня скорочення, яке спричиняли мезатоном, внаслідок прямої стимуляції мускаринових рецепторів гладких м'язів [13]. До першого протоколу дослідження динаміки та тривалості ефекту розслаблення кілець аорти під впливом терапевтично діючих концентрацій вінборону

10^{-6} – 10^{-5} М відповідно до клінічних даних. Препарат періодично додавали разом з мезатоном у сольовий розчин Кребса, за допомогою якого перфузували камеру з ізольованою судиною. В іншому протоколі реєстрували дозозалежні зміни сили ізометричного напруження скорочених мезатоном кілець аорти при збільшенні концентрації вінборону в розчині Кребса від 10^{-8} до 10^{-4} М (6–8 концентрацій, послідовно по 15–20 хв).

Введення вінборону в омиваючий розчин Кребса спричинило стійке та дозозалежне розслаблення скорочених мезатоном кілець аорти. Як показано на рис. 1, а, б, знижений рівень скорочувальної активності судин тривало зберігався і після відміни препарату. На кільцях аорти з інтактним ендотелієм спостерігалось повільне і поступове відновлення сили м'язового скорочення. Навпаки, розслаблення деендотелізованих фрагментів мало незворотний характер в ін-

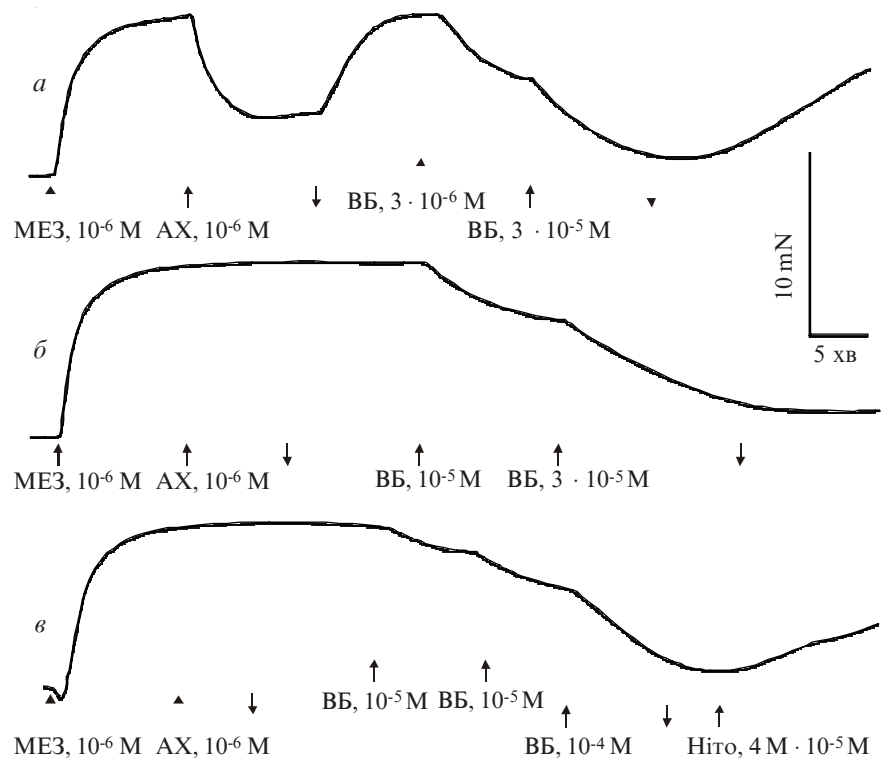


Рис. 1. Типові криві зміни скорочувальної активності ізольованих фрагментів грудного відділу аорти щурів з інтактним ендотелієм (а) та деендотелізованих фрагментів (б, в) під впливом мезатону (МЕЗ), ацетилхоліну (АХ), вінборону (ВБ) та нітоксиделу (Ніто)

тервалі більше 2 год після відміни препарату. Встановлена кореляція між тривалістю реакції релаксації фрагментів аорти та функціональною цілісністю ендотеліального шару може бути ознакою певної вибірковості дії препарату, що досліджувався. Можна припустити, що за терміном розвитку й амплітудою вазодилаторний ефект вінборону буде більш виразним на уражених ділянках судинного русла, які вирізняються, як відомо, високою спастичною готовністю [16; 17].

З другого боку, відновлення м'язового тонуусу кілець аорти, які обробляли вінбороном, відбувалося в обох випадках швидше і більш виразно, якщо в розчині Кребса був присутній нітосидел — хімічний акцептор позаклітинного NO (Ніто, $4 \cdot 10^{-5}$ М) та інгібітори ферментативного синтезу NO в клітинах: L-NAME ($2\text{--}5 \cdot 10^{-5}$ М) — конкурентний субстратний інгібітор NOS, SMT ($5 \cdot 10^{-5}$ М) — інгібітор iNOS, рис. 1, в.

Це вказує на наявність прямого зв'язку між дилаторною активністю препарату та посиленням під його впливом утворенням NO в ендотелії або в гладком'язових клітинах аорти щурів. Порівнюючи отримані дані про вплив вінборону на ізольованих судинах з даними літератури [12], можна вважати, що рівень продукції NO, спричинений дією препарату, що вивчається, менш значний, ніж відповідь на специфічні ендотелійзалежні агоністи (ацетилхолін, гістамін, АТФ та ін.), ендотелійнезалежні вазодилатори NO або донори NO (нітрогліцерин, нітрозоглютаціон та ін.). Однак загальна тривалість дилаторної реакції судин на вінборон була суттєво більшою, можливо за рахунок пролонгованої стимуляції NO-залежної компоненти, що є принциповою перевагою даного препарату порівняно з іншими фармакологічними засобами.

Ендотелійзалежна дія вінборону

Для кількісної оцінки функціонального внеску ендотелію в процес розслаблення ізольованих судин під дією вінборону був проведений порівняльний аналіз чутливості до препарату кілець аорти з ендотелієм та деендотелізованих фрагментів. В комп'ютерних розрахунках середньої дози ефекту вінборону (ED_{50}) використовували апроксимацію S-подібними кривими (рівняння Больцмана) експериментальних значень величини розслаблення судини (процент вихідного скорочення) залежно від дози препарату (Log M). Експериментальні результати, які представлені в графічному вигляді на рис. 2, показують, що відсутність ендотелію на кільцях аорти викликала зсув кривої «доза — ефект» вправо, тобто знижувала ефективність дії вінборону ($ED_{50} = 1,3 \cdot 10^{-5}$ М, $n=15$) порівняно з інтактними фрагментами судин ($ED_{50} = 6,6 \cdot 10^{-6}$ М, $n=12$).

В свою чергу, попередня блокада синтезу NO в ендотелії ізольованих судин за допомогою L-NAME ($5 \cdot 10^{-5}$ М) також вірогідно знижувала їх чутливість до вінборону ($ED_{50} = 2,0 \cdot 10^{-5}$ М, $n=10$).

Ці дані дозволяють розглядати ендотелій як активний елемент в процесі реалізації міотропної та спазмолітичної дії вінборону на кровеносних судинах. Ендотелій може потенціювати дію вінборону як безпосередньо, за рахунок стимульованої препаратом продукції NO, так і опосередковано, внаслідок зміни інтенсивності клітинного метаболізму NO [14; 15]. На користь такого механізму свідчать результати дослідів на деендотелізованих кільцях аорти, подані на рис. 3, де інгібітори синтезу NO окремо (L-NAME + SMT, $ED_{50} = 6,8 \cdot 10^{-6}$ М, $n=8$) та в комбінації з позаклітинною пасткою для NO (Ніто, $ED_{50} = 6,1 \cdot 10^{-6}$ М, $n=11$) спричинювали зсув вліво

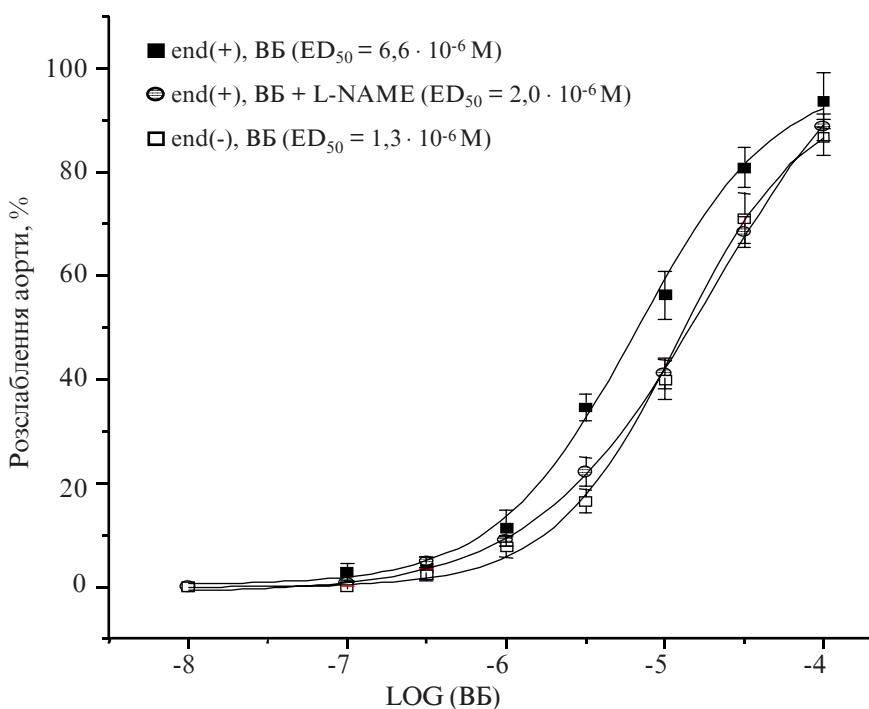


Рис. 2. Криві дозозалежного ефекту розслаблення передскорочувальних мезатонем фрагментів грудного відділу аорти щура під дією вінборону (ВБ): ○ — фрагменти аорти з інтактним ендотелієм, ■ — фрагменти аорти з інтактним ендотелієм, які обробляли L-NAME ($5 \cdot 10^{-5}$ М), □ — деендотелізовані фрагменти аорти

кривої «доза — ефект» для вінборону, тобто відтворювали «ефект присутності» інтактного ендотелію.

Результати проведеного дослідження дають підставу стверджувати, що вінборон не тільки виразно стимулює здатність ендотелію посилювати або регулювати NO-залежне розслаблення судин, але й сприяє також перетворенню гладком'язових клітин на самостійні продуценти NO. Необхідно, однак, відмітити парадоксальну ситуацію, коли NO або його метаболіти, які звільняються з ендотелію та гладких м'язів під впливом вінборону, виявляють різноспрямований вплив на чутливість аорти щура до цього препарату. Імовірно, це пов'язано з принциповими відмінностями в спектрі та фізіологічній ролі продуктів, які утворюються в ендотелії (EDRF/NO) та в гладком'язових клітинах (NO⁺, NO₂⁺, ROONO) [11; 13]. Отже, збільшення рівня біотрансформації реактивних форм азоту або депонування NO в складі вазоактивних інтермедіаторів ендотеліальними клітинами під впливом вінборону можна вважати головною особливістю ендотеліозалежної дії цього препарату на фрагменти ізольованої аорти щура.

Таким чином, результати проведеного дослідження вказують на те, що вінборон в концентраціях 10⁻⁸–10⁻⁴ М спричинює стійкий дозозалежний вазодилатуючий ефект. Разом з посиленням спроможності ендотелію депонувати NO препарат, що вивчається, стимулює утворення активних форм азоту, що врешті-решт сприяє пролонгації релаксації гладком'язових структур кровоносних судин. Враховуючи ключову роль NO у вазодилатації, гальмуванні агрегації тромбоцитів, його антигіпоксичну дію [10], можна вважати, що виявлена нами в попередніх дослідженнях захисна дія вінборону на щурів в умовах іше-

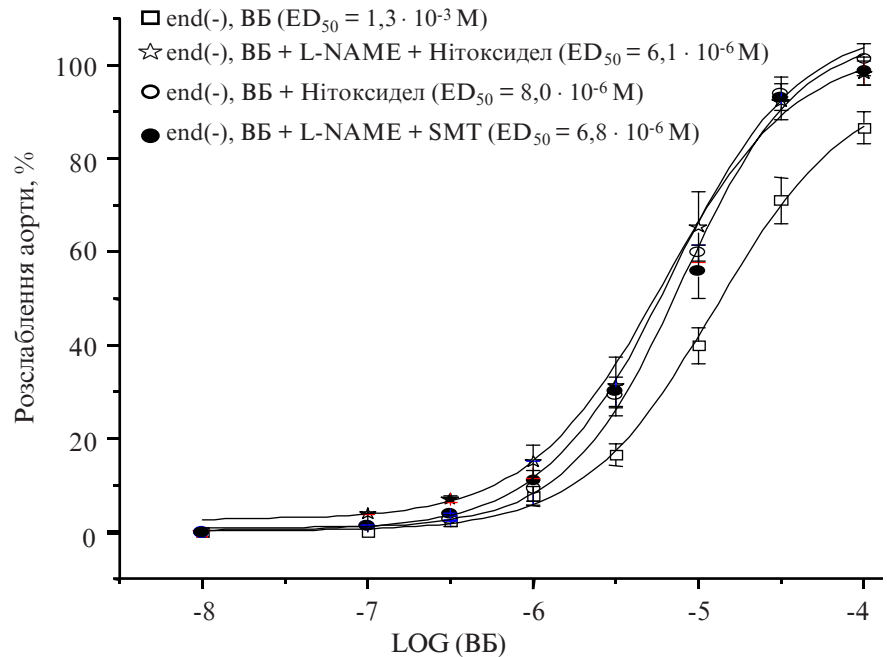


Рис. 3. Криві дозозалежного ефекту розслаблення передскорочувальних мезатонем деендотелізованих фрагментів грудного відділу аорти щура під дією вінборону (ВБ): □ — контрольні фрагменти аорти; ☆ — фрагменти аорти, які обробляли L-NAME (5·10⁻⁵ М) та нітоксиделом (4·10⁻⁵ М); ○ — фрагменти аорти, які обробляли нітоксиделом (4·10⁻⁵ М); ● — фрагменти аорти, які обробляли L-NAME (5·10⁻⁵ М) і SMT (5·10⁻⁵ М)

мічних і гіпоксичних станів [4; 9] пов'язана, певною мірою, з модулюючим впливом препарату на синтез NO та його ендотеліозалежною дією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вінборон — лікарський засіб з політропними фармакологічними властивостями / Г. І. Степанюк, І. Л. Черешнюк, Н. Г. Степанюк та ін. // Вісн. Вінниц. держ. мед. ун-ту. — 2002. — Т. 1, № 6. — С. 111-114.
2. Новый лекарственный препарат феникаберан / А. Н. Гринев, Е. К. Панишева, А. А. Столярчук и др. // Химфарм. журнал. — 1979. — Т. 13, № 11. — С. 118-121.
3. Биологическая активность нового препарата — акцептора оксида азота / Н. П. Дмитренко, С. Г. Шандренко, С. Н. Кузьминский и др. // Журн. АМН Украины. — 1996. — Т. 2, № 4. — С. 722-731.
4. Дякова О. В., Степанюк А. Г. Оцінка терапевтичної ефективності вінборону при гіпоксії замкнутого простору // Вісн. Вінниц. держ. мед. ун-ту. — 2002. — № 1. — С. 161.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства. — М.: Нов. волна, 2000. — Т. 1. — С. 398.
6. Степанюк Г. И., Иванова Н. И., Степанюк Н. Г. Оценка спазмолитического действия винборона в экспери-

менте // II Укр. наук. конф. з міжнар. участю «Актуальні проблеми клінічної фармакології». 6–8 жовтня. Вінниця. — 1998. — С. 198-199.

7. Степанюк Г. І., Коцьков Д. Г. Експериментальне дослідження рано-загоювальної дії мазей, що містять вінборон // Ліки. — 2004. — № 3-4. — С. 69-74.

8. Степанюк Н. Г. Фармакотерапевтична ефективність вінборону при ерозивно-виразкових ушкодженнях гастродуоденальної зони (клініко-експериментальне дослідження): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — К., 2002. — 20 с.

9. Шеремета Р. О., Дякова О. В., Кирничний А. І. Порівняльна оцінка церебропротекторної дії кавінтону, вінборону, пірацетаму, пентоксифіліну, емоксипіну та натрію оксидитрату на моделі гострого порушення мозкового кровоотоку // Актуальні питання фармакології: Мат. IV Укр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю з клін. фармакології. — Ч. 2. — Вінниця, 2004. — С. 166-167.

10. Шимановский Н. Л., Гуревич К. С. Роль оксида азота в механизмах действия лекарственных веществ // Междунар. мед. журнал. — 2000. — № 1. — С. 104-107.

11. Hydrogen peroxide- and peroxy-nitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells / S. W. Ballinger, C. Patterson, C.-N.

Yan et al. // *Circ. Res.* — 2000. — Vol. 86. — P. 960-966.

12. *The soluble* guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4] Oxadiazolo-[4,3,-a]-quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation / M. Feelisch, P. Kotsonis, J. Siebe et. al. // *Molecular Pharmacology.* — 1999. — Vol. 56. — P. 243-253.

13. *Gryglewski R. J. Palmer R. M., Moncada S.* Superoxide anion is in-

involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor // *Nature.* — 1986. — Vol. 320. — P. 454-456.

14. *Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia.* Nitric Oxide / E. B. Manukhina, I. Yu. Malyshchev, B. V. Smirin et al. // *Biology and Chemistry.* — 1999. — Vol. 3, N 5. — P. 393-401.

15. *Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology //

Pharmacol. Rev. — 1991. — Vol. 43, N 1. — P. 109-142.

16. *Rubanyi G. M., Lorenz R. R., Vanhoutte P. M.* Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines // *Am. J. Physiol.* — 1985. — Vol. 249, N 18. — H95-H101.

17. *Soloviev A. I., Parshikov A. V., Stefanov A. V.* Evidence for the involvement of protein kinase C in depression of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats // *J. Vasc. Res.* — 1998. — Vol. 35. — P. 325-331.

УДК 616.831-005.001.5:615.717

Г. І. Степанюк, О. В. Дякова, Д. Г. Коньков, О. В. Паршиков

ВИВЧЕННЯ ЕНДОТЕЛІЙЗАЛЕЖНИХ МЕХАНІЗМІВ ВАЗОДИЛАТАТОРНОЇ АКТИВНОСТІ ВІНБОРОНУ IN VITRO

У дослідах на фрагментах аорти шурів проведено вивчення ендотеліязалежної та дилатаційної дії вінборону. Встановлено, що йому притаманний стимулювальний вплив на рівень NO та NOS. Це призводить до стійкого вазодилатуючого ефекту. На кільцях аорти з інтактним ендотелієм спостерігається повільне та поступове відновлення сили м'язового скорочення, тимчасом як на деендотелізованих фрагментах відновлення відбувалося значно повільніше.

Ключові слова: вінборон, оксид азоту, NO-синтаза, вазодилатація.

UDC 616.831-005.001.5:615.717

G. I. Stepanyuk, O.V. Dyakova, D. G. Konkov, O.V. Parshikov

STUDING OF ENDOTHELIUM-DEPENDENT AND DILATATION EFFECTS OF VINBORON IN VITRO

Endothelium-dependent and dilatation effects of vinboron were studied on rat aorta fragments in the experiment. It was determined that vinboron produced stimulating effect on NO and NOS levels resulting in persistent vasodilating effect. Vinboron injection produce persistent and dose-dependent relaxation of rat aortic rings. Slow and gradual rehabilitation of muscle contractive strength was observed in the ends of aorta with intact endothelium while in endothelium-denuded rings of aorta that was much slower.

Key words: vinboron, NO, NOS, vasodilatation.

УДК 617.735-007.281-018-092.9

О. О. Путієнко, канд. мед. наук,
О. В. Артёмов, канд. мед. наук

РЕЗУЛЬТАТИ ГІСТОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛЮВАННЯ РЕГМАТОГЕННОГО ВІДШАРУВАННЯ СІТКІВКИ, УСКЛАДНЕНОГО ПРОЛІФЕРАТИВНОЮ ВІТРЕОРЕТИНОПАТІЄЮ

*Інститут очних хвороб і тканинної терапії
ім. В. П. Філатова АМН України, Одеса*

Проліферативна вітреоретинопатія (ПВР) є головною причиною невдач у хірургічному лікуванні регматогенного відшарування сітківки. Патогенетичні механізми розвитку цього ускладнення ґрунтуються на міграції у вітреальну

порожнину з подальшою трансформацією у фібробласти клітин пігментного епітелію сітківки. Колагенсинтезувальна активність фібробластів призводить до утворення епіретинальних мембран на обох поверхнях сітківки і в

порожнині склистого тіла. Цей процес відбувається за участі багатьох факторів (компоненти крові, цитокіни, клітини імунної системи, фактори запалення та ін.) [4; 5].

Відомо, що процес ПВР прогресує протягом 8–10 тиж,