

Рекомендована д. мед. наук, проф. О. М. Олещук
 УДК 591.413 : 615.225.2 : 615.31 : 57.085.2
 DOI

ВПЛИВ БЛОКАДИ NO-СИНТАЗИ НА ВАЗОДИЛАТАЦІЙНИЙ ЕФЕКТ ДІЕТИЛОВОГО ЕСТЕРУ 5-АЛКІЛАМІНО-2-{N-[N-БЕНЗОІЛ-(4-МЕТИЛБЕНЗИЛІДЕН) ГЛІЦИЛ] АМІНОМЕТИЛ}-1,3-ОКСАЗОЛ-4-ІЛФОСФОНОВОЇ КИСЛОТИ НА СЕГМЕНТАХ ІЗОЛЬОВАНОЇ АОРТИ ЩУРІВ

© І. В. Ніженковська¹, О. В. Романенко¹, К. В. Седько¹, М. М. Груша¹,
 В. С. Броварець², О. В. Головченко²

¹ Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

² Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, м. Київ

Резюме: досліджені вазодилатаційні властивості одного з похідних 1,3-оксазолу – діетилового естеру 5-алкіламіно-2-{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден) гліцил] амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти на скоротливу активність гладеньких м'язів ізольованих сегментів грудного відділу низхідної аорти щурів за умов блокади NO-синтази. Виявлено здатність оксазолвмісного пептидоміметика ($1 \cdot 10^{-5}$ М) оборотно знижувати амплітуду ініційованого адреналіном ($5 \cdot 10^{-6}$ М) скорочення гладеньком'язового компонента судинної стінки в присутності в перфузаті блокатора NO-синтази L-NAME ($1 \cdot 10^{-4}$ М). Отримані результати дають підстави вважати перспективним використання даної сполуки в подальших дослідженнях як потенційного лікарського засобу, який може знайти застосування в терапії артеріальної гіпертензії різного генезу.

Ключові слова: оксазолвмісний пептидоміметик, блокада NO-синтази, вазодилатація, ізольовані сегменти аорти.

Вступ. Есенціальна артеріальна гіпертензія, гіпертонічна хвороба з переважним ураженням серця, вторинна гіпертензія та викликані ними супутні захворювання є наслідком низки патологічних змін серцево-судинної системи [1]. Основним ефекторним механізмом, що впливає на рівень артеріального тиску, вважають збільшення тонуусу гладеньком'язового компоненту судинної стінки. Масштабне поширення серед населення патологій серцево-судинної системи, наявність їх різних форм та проградієнтний перебіг захворювань вимагає розробки нових фармакологічних засобів терапії станів, що супроводжуються підвищенням системного артеріального тиску. Останнє зумовлює пошук діючих речовин, здатних корегувати і підтримувати на сталому рівні його значення. Тому синтез та вивчення біологічної активності нових хімічних сполук з метою їх подальшого застосування в створенні лікарських засобів для лікування серцевої недостатності та артеріальної гіпертензії залишається важливим напрямком доклінічних досліджень [2].

Значна кількість ендогенних вазодилататорів проявляють свою активність за рахунок механізмів, прямо або опосередковано пов'язаних з продукцією оксиду азоту ендотеліальними клітинами, тому ефекти, пов'язані з його виділенням, є мішенню для фармакологічної корекції м'язового тонуусу в клінічній практиці [3, 4].

Раніше було встановлено, що фосфорильованим пептидоміметикам із групи похідних 1,3-оксазолу притаманні вазодилатаційні ефекти [5]. Водночас внесок у вазотропну дію цих сполук механізмів продукції та вивільнення NO не був досліджений. У зв'язку із зазначеним, метою наших досліджень було вивчення вазодилатаційних ефектів новосинтезованого похідного 1,3-оксазолу діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден) гліцил] амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти (оксазолвмісного пептидоміметика) в магістральній судині щурів на тлі блокади NO-синтази.

Методи дослідження. В дослідженні використано ізольовані кільцеві сегменти (n=5) грудного відділу низхідної аорти 5 білих щурів лінії Вістар середньою вагою 200-250 г. Догляд за тваринами та їх етаназію (шляхом декапітації з попереднім застосуванням ефірного інгаляційного наркозу) здійснювали відповідно до Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, і Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Тварини утримувалися на звичайному збалансованому харчовому раціоні і вільному доступі до води в умовах віварію Національного медичного університету імені О. О. Богомольця [6]. Вазомоторний вплив досліджуваних спо-

лук вивчали в ізометричному режимі на ізольованих препаратах гладеньких м'язів [7].

Ізольований повношаровий м'язовий препарат отримували із низхідної частини грудного відділу аорти. Фрагмент низхідної аорти, після попереднього ретельного промивання у фізіологічному розчині Кребса та охолодження протягом 40 хв при температурі 6–8° С, розрізали під бінокулярним стереомікроскопом на кільцеві сегменти довжиною 2 мм [8].

Отримані сегменти аорти до початку експерименту витримували не менше, ніж 30 хвилин при температурі 35–37 °С в проточній камері для досліджень, що містила розчин Кребса наступного складу (ммоль/л): NaCl – 133; KCl – 4,7; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1,2; NaHCO₃ – 10; NaH₂PO₄ – 1,38; C₆H₁₂O₆ – 7,8 (рН 7,4).

Для реєстрації тонузу кільцевих сегментів аорти використали установку, що складається із проточної камери об'ємом 2 мл, яка термостатується при температурі 36,5 °С. Фіксацію положення препарату в камері здійснювали сталевими гачками, з'єднаними з тензодатчиком. Стандартизацію вихідного напруження ізольованого препарату, яке складало 10 мН, проводили шляхом його порівняння з калібрувальним сигналом. Вазоактивні реакції реєстрували в ізометричному режимі скорочень з використанням програмного забезпечення для USB-осцилографа – Iris Waveware. Вазодилатаційна активність засобу оцінювалась за впливом на базальний тонус та амплітуду скорочення гладеньких м'язів судин у відповідь на внесення в інкубаційне середовище агоніста α₁-адренорецепторів адреналіну (5·10⁻⁶ М). При оцінці ефективності вазоактивного впливу досліджуваних речовин за 100 % приймали амплітуду тонічного скорочення м'язового препарату в контролі у відповідь на аплікацію адреналіну 5·10⁻⁶ М тривалістю 10 с (А, рис. 1).

У роботі використано 1·10⁻⁵ М діетиловий естер 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоїл-(4-метилбензиліден) гліцил] амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти, який був синтезований за методикою, описаною в літературі [5], 5·10⁻⁶ М адреналін (розчин для ін'єкцій «Здоров'я») та 1·10⁻⁴ М L-NAME («Sigma»). У зв'язку з гідрофобними властивостями оксазолвмісний пептидоміметик перед внесенням у розчин Кребса попередньо розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Об'єм ДМСО відповідних максимальних аліквот сполук не перевищував 0,05 %, що в контрольних експериментах не впливає на судинний тонус [5].

При проведенні статистичного аналізу результатів дослідження використовували спеціалізоване програмне забезпечення SPSS 17.0 for Windows. Перед розрахунками дескриптивних характеристик вибірок даних визначали їх відповідність закону нормального розподілу з використанням Z-критерію Колмогорова-Смирнова. Результати розрахунків дескриптивних характеристик представлені у вигляді M±m, мінімально статистичний значимим рівнем вважали p≤0,05.

Результати й обговорення. Перед початком аплікації речовини проводили адренореакцію в розчині Кребса. Середнє значення амплітуди адренореакції в контролі складало 3,34±1,07 мН. Внесення в розчин Кребса блокатора NO-синтази L-NAME (1·10⁻⁴ М) не чинило впливу на базальний тонус гладеньких м'язів ізольованого сегмента грудного відділу низхідної аорти. Водночас додавання L-NAME (1·10⁻⁴ М) в перфузат очікувано (враховуючи збережений ендотелій) спричиняло на 90-й хвилині збільшення амплітуди (рис. 1.) адренореакції в середньому на 71 % від вихідного рівня (p=0,077). Отримані зміни амплітуди імовірно пов'язані з блокадою L-NAME продукції і вивільнення NO, та зменшення представництва вазодилатаційного компоненту у забезпеченні судинної

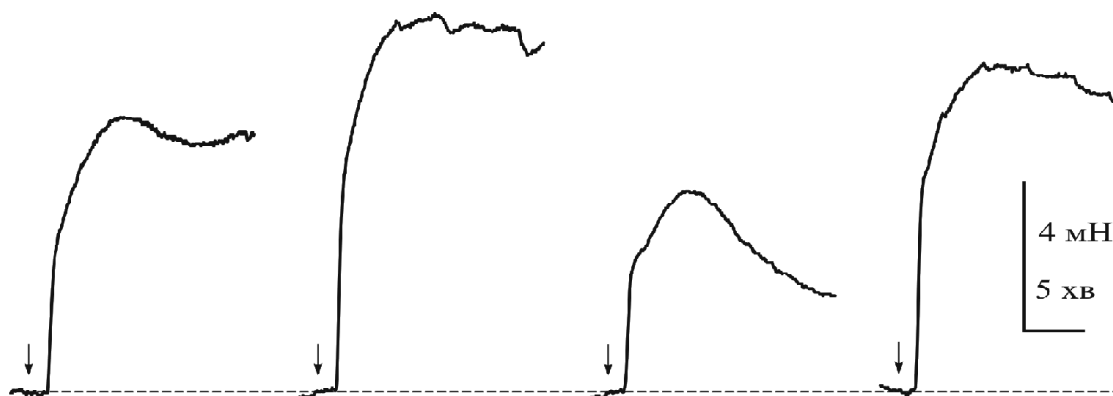


Рис. 1. Ініційоване адреналіном (5·10⁻⁶ М) скорочення ізольованих сегментів аорти щурів.

Примітка. А – контроль в розчині Кребса; В – за умов присутності в перфузаті L-NAME (1·10⁻⁴ М), 30 хв; С – за умов присутності в перфузаті оксазолвмісного пептидоміметика (1·10⁻⁵ М) та L-NAME (1·10⁻⁴ М), 60 хв; D – за умов присутності в перфузаті тільки L-NAME (1·10⁻⁴ М), 30 хв після вилучення з перфузату оксазолвмісного пептидоміметика (1·10⁻⁵ М).

Стрілкою позначено момент початку перфузії адреналіну (5·10⁻⁶ М); тривалість перфузії 10 с.

Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин
Pharmacological researches of biologically active substances

реактивності на дію агоніста α_1 -адренорецепторів адреналіну ($5 \cdot 10^{-6}$ М) [9].

Додаткове внесення в перфузат, оксазолвісного пептидоміметика ($1 \cdot 10^{-5}$ М) через 30 хв від початку аплікації викликало зниження амплітуди адренореакції на 33 % порівняно з її амплітудою за умов присутності в перфузаті лише L-NAME ($1 \cdot 10^{-4}$ М). Отримані результати свідчать, що вазоактивна дія оксазолвісного пептидоміметика не залежить від процесів, пов'язаних з продукцією та вивільненням NO. Привертає увагу той факт, що на тлі блокади NO-синтази амплітуда адренореакції за присутності в перфузаті розчині досліджуваної сполуки ($1 \cdot 10^{-5}$ М) залишається вищою за контрольні її значення і в середньому складає ($4,62 \pm 0,38$) мН (рис. 1). Останнє може вказувати на різний внесок в процеси дила-

тації магістральних судин NO-залежних та NO-неопосередкованих механізмів, що беруть участь в забезпеченні вазореактивності на дію агоніста α_1 -адренорецепторів адреналіну ($5 \cdot 10^{-6}$ М) (табл. 1).

Ефект, викликаний внесенням у розчин Кребса оксазолвісного пептидоміметика ($1 \cdot 10^{-5}$ М), мав зворотний характер. Через 30 хв після вилучення останнього з перфузату значення амплітуди адренореакції за умов знаходження в перфузаті L-NAME ($1 \cdot 10^{-4}$ М) збільшувалося в середньому на 26 % ($p=0,372$) порівняно з її значенням за умов одночасної присутності в розчині обох зазначених сполук і становила ($5,47 \pm 1,11$) мН (табл.1). Вилучення з розчину Кребса L-NAME призвело до закономірного зменшення амплітуди адренореакції, що узгоджується з уявленнями про роль механізмів продукції NO в вазодилатації [10].

Таблиця 1. Дослідження вазоактивної дії діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил] амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонові кислоти ($1 \cdot 10^{-5}$ М) на гладенькі м'язи аорти щура за умов блокади NO-синтази

Параметри	Амплітуда адренореакції, мН		M±m, мН	% від вихідного скорочення
	min	max		
Контроль (розчин Кребса)	1,40	7,37	3,34±1,07	100
L-NAME	3,68	9,91	5,72±1,11	171
L-NAME+ оксазолвісний пептидоміметик	3,58	5,60	4,62±0,38	138
L-NAME (після вилучення з перфузата оксазолвісного пептидоміметика)	3,94	8,66	5,47±1,11	164

Примітка. * – позначено статистично достовірні розбіжності ($p \leq 0,05$) порівняно з попереднім етапом дослідження; n=5.

Висновок. Експерименти проведено з використанням ізольованих сегментів грудної частини низхідної аорти щурів дають підстави вважати, що діетиловий естер 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил] амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонові кислоти в концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ М здатний зберігати свої вазодилатаційні властивості за умови блокади NO-синтази. Збереження ефективної дії оксазолвісного

пептидоміметика на тлі блокади NO-синтази L-NAME ($1 \cdot 10^{-4}$ М) дає підстави припускати, що вазодилатаційний вплив цих двох хімічних сполук реалізується через різні мішені. Тому подальше вивчення механізму судинорозширюючої дії досліджуваної сполуки, що може бути використана як потенційний антигіпертензивний лікарський засіб, залишається перспективним для подальших досліджень.

Список літератури

1. Международная классификация болезней 10-го пересмотра [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://mkb-10.com/>.
2. Nizhenkovskaya I.V. The influence of sufan on myocardial energetic metabolism in case of case of adriamycin-induced heart failure. / Nizhenkovskaya I. V. // Research Trends. Current Topics in Pharmacology. Short Communication. SCOPUS. – 2013. – Vol. 17, 1. – P. 103–108.
3. Мышечные ткани: учебное пособие для вузов / Ю. С. Ченцов, Е. А. Шубникова, Н. А. Юрина, Н. Б. Гусев. – М. : Медицина, 2001. – 256 с.
4. Рябов Г. А. Роль оксида азота как регулятора

- клеточных процессов при формировании полиорганной недостаточности / Г. А. Рябов, Ю. М. Азизов // Анестезиология и реаниматология. – 2008. – № 1. – С. 8–13.
5. Синтез і дослідження вазоактивних властивостей нових фосфорильованих пептидоміметиків / І. Н. Яковенко, О. І. Лукашук, К. М. Кондратюк [та ін.] // Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry. – 2013. – Vol. 11, Iss. 3 (43). – P. 43–50.
6. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / за ред. О. В. Стефанова. – К. : ВД «Авіцена», 2002. – 527 с.
7. Эксперименты на изолированных препаратах

гладких мышц / Р. Блаттнер, Х. Классен, Х. Денерт и др. – М. : Мир, 1983. – 206 с.

8. Динамика сократительной активности изолированного кольцевого препарата аорты крыс под влиянием амилина / Г. В. Лукьянцева, И. Ю. Сергеев, В. А. Пастухова, Л. М. Гунина // Український морфологічний альманах. – 2013. – Т. 11, № 1. – С. 77–78.

9. Regression of L-NAME-induced hypertension: the role of Nitric oxide and endothelium-derived constricting factor / L. Paulis, J. Zicha, J. Kunes [et al.] // Hipertension research. – 2008. – № 31. – P. 793–803.

10. Moslemi F. Inhibition of Nitric oxide synthase by L-NAME in male rats / F. Moslemi, M. Nematbakhsh // International scholarly research notices: Toxicology. – 2013. – Vol. 2013. – P. 227–232.

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ NO - СИНТАЗЫ НА ВАЗОДИЛАТИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ДИЭТИЛОВОГО ЭФИРА 5-АЛКИЛАМИНО-2- {N- [N-БЕНЗОИЛ- (4-МЕТИЛБЕНЗИЛИДЕН) ГЛИЦИЛ] АМИНОМЕТИЛ} -1,3-ОКСАЗОЛ-4-ИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА СЕГМЕНТ ИЗОЛИРОВАННОЙ АОРТЫ КРЫС

**И. В. Ниженковська¹, А. В. Романенко¹, К. В. Седько¹, М. М. Груша¹, В. С. Броварець²,
А. В. Головченко²**

¹Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца

²Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев

Резюме: исследованы вазодилатационные свойства одного из производных 1,3-оксазола – диэтилового эстера 5-алкиламино-2- {N- [N-бензоил- (4-метилбензилиден) глицил] аминометил} -1,3-оксазол-4-илфосфоновой кислоты на сократительную активность гладких мышц изолированных сегментов грудного отдела нисходящей аорты крыс при условии блокады NO-синтазы. Обнаружено свойство оксазолсодержащего пептидомиметика ($1 \cdot 10^{-5}$ M) обратно понижать амплитуду инициированного адреналином ($5 \cdot 10^{-6}$ M) сокращения гладкомышечного компонента сосудистой стенки в присутствии в перфузате блокатора NO-синтазы L-NAME ($1 \cdot 10^{-4}$ M). Полученные результаты дают основания считать перспективным использование данного соединения в дальнейших исследованиях в качестве потенциального лекарственного средства, которое может найти применение в терапии артериальной гипертензии различного генеза.

Ключевые слова: оксазолсодержащий пептидомиметик, блокада NO-синтазы, вазодилатация, изолированные сегменты аорты.

INFLUENCE BLOCKADE NO-SYNTASE ON VASODILATION EFFECT OF DIETHYL ESTER 5-ALKYLAMINO-2- {N- [N-BENZOYL (4-METHYL BENZYLIDENE) HLYCYL] AMINOMETHYL} - 1,3-OXAZOL-4-IL-PHOSPHONIC ACID ON SEGMENTS OF ISOLATED AORTA IN RATS

**I. V. Nizhenkovska¹, O. V. Romanenko¹, K. V. Sedko¹, M. M. Hrusha¹, V. S. Brovarets²,
O. V. Holovchenko²**

¹National Medical University by O. O. Bohomolets

²Institute of Bioorganic Chemistry and Oil Chemistry of NAS of Ukraine

Summary: there were investigated the vasodilatory properties of one of the derivatives of 1,3-oxazole - diethyl ester of 5-alkylamino-2- {N- [N-benzoyl- (4-methylbenzylidene) glycy] aminomethyl} -1,3-oxazol-4-il-phosphonic acid on smooth muscle contractile activity of isolated segments of the descending thoracic aorta of rats under conditions of blockade of NO-synthase. It was found oxazole containing peptidomimetic ($1 \cdot 10^{-5}$ M) property to back reducing of amplitude initiated by epinephrine ($5 \cdot 10^{-6}$ M) contraction of smooth muscle component of the vascular wall in the presence of NO-synthase blocker L-NAME ($1 \cdot 10^{-4}$ M) in perfusate. The results are the base to consider the prospects of usage of this compound for further researches as a potential medicine which can be used in the treatment of hypertension of various origins.

Key words: oxazole containing peptidomimetic, blockade NO-synthase, vasodilation, isolated segments of aorta.

Отримано 29.10.2015