

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

СИТНИК ІННА МИКОЛАЇВНА

УДК 615.225:615.235:616.379-008.64:616.1

ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ
N-АЦЕТИЛЦИСТЕЇНУ ТА ЛОЗАРТАНУ ПРИ КАРДІАЛЬНИХ ПОРУШЕННЯХ
ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1 ТИПУ

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця МОЗ України, м. Київ.

Науковий

керівник:

доктор медичних наук, професор
ХАЙТОВИЧ Микола Валентинович,
Національний медичний університет
імені О.О. Богомольця МОЗ України (м. Київ),
завідувач кафедри клінічної фармакології
та клінічної фармації

Офіційні

опоненти:

доктор фармацевтичних наук, професор
ЩОКІНА Катерина Геннадіївна,
Національний фармацевтичний університет
МОЗ України (м. Харків),
професор кафедри фармакології

доктор медичних наук, професор
ЖИЛЮК Володимир Іванович,
ДЗ "Дніпропетровська медична академія
МОЗ України" (м. Дніпро),
завідувач кафедри фармакології і
клінічної фармакології

Захист відбудеться «21» червня 2019 р. о 10.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «17» травня 2019 р.

Учений секретар спеціалізованої
вченої ради
д. фарм. н., професор

Т. С. Сахарова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Цукровий діабет (ЦД) – найпоширеніше захворювання, розповсюдженість якого продовжує стрімко зростати. За прогнозами експертів Міжнародної діабетичної федерації до 2035 року очікується понад 592 мільйонів хворих на ЦД (В. І. Паньків, 2018). За даними Центру медичної статистики МОЗ України (2018 рік), на ЦД хворіють більше 8 тисяч дітей віком до 18 років. Гостроту проблеми визначає швидкий розвиток ускладнень, які спричиняють інвалідизацію, погіршують якість життя хворих та скорочують її тривалість (J. N. Starčević et al., 2019). Відомо, що діабетична кардіоміопатія (ДК) діагностується у понад 30% хворих на ЦД 1 типу (ЦД1), в т.ч. 20-50% хворих – це діти віком до 15 років (М. В. Хайтович та співавт., 2013; І. С. Сміян, 2013; М. О. Гончарь та співавт., 2016; J. Guanghong et al., 2018).

Згідно сучасних уявлень, оксидативний стрес (ОС) є одним із ключових механізмів виникнення ДК, тому широко розглядаються фармакологічні підходи, спрямовані саме на попередження та корекцію ОС, за допомогою антиоксидантів (Q. Liu, 2014; J. N. Starčević et al., 2019; B. Parim et al., 2019). Одним із таких засобів виступає N-ацетилцистеїн (NAC), антиоксидантні властивості якого широко досліджуються (V. D. Phiwaiyinkosi et al., 2017; S. Pasupathy et al., 2017).

Іншим важливим напрямком фармакотерапії ДК є вплив на патогенетичну ланку ренін-ангіотензин-альдостеронової системи. Перспективним є застосування антагоністів рецепторів до ангіотензину II (АРА), зокрема лозартану (LOS). Окрім антигіпертензивної дії, активно досліджується протективна дія LOS на серце на тлі міокардіального фіброзу (J. Yuichi et al., 2013; C. Y. Shim et al., 2014; L. Wang et al., 2015), доведено його здатність покращувати функції лівого шлуночка (N. Katsiki et al., 2018; Z. Wen et al., 2018) та відновлювати систолічну та діастолічну функцію міокарду (B. Dong et al., 2012).

Важливий інтерес становить комплексне застосування препаратів групи АРА та антиоксидантів, сполучення яких зумовлює потенціювання кардіопротективного ефекту перших (A. Matouk et al., 2013; M. Dianat et al., 2014; M. Sleem et al., 2014; J. McLachlana et al., 2014; Q. Zhao et al., 2019).

Таким чином, викладена вище інформація вказує на перспективи застосування NAC та LOS для оптимізації лікарської терапії кардіальних порушень при ЦД1, зокрема ДК. Крім того, залишається невирішеним питання щодо застосування даних препаратів при ранніх кардіальних ускладненнях на тлі ЦД1. Не з'ясовано ефективність сумісного застосування NAC та LOS при кардіальних порушеннях ЦД1.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом держбюджетної фундаментальної науково-дослідної теми, виконаної за планом Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, затвердженої МОЗ України: «Вивчити механізми розвитку кардіоміопатії при цукровому діабеті 1 типу та оптимізувати схему фармакологічної корекції» (№ держреєстрації 0115U000913, 2015-2017), в якій автор є співвиконавцем.

Мета і завдання дослідження. Мета дослідження – експериментально обґрунтувати доцільність застосування N-ацетилцистеїну та лозартану для фармакокорекції кардіальних порушень при ЦД1.

Для реалізації поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Провести порівняльну оцінку антиоксидантної активності антагоністів рецепторів ангіотензину II (лозартану, валсартану) та антиоксидантних засобів (N-ацетилцистеїну, тіотриазоліну) за умов *in vitro* та *in silico*.

2. Порівняти вплив N-ацетилцистеїну та лозартану на електрофізіологічні показники функції серця; вуглеводний та енергетичний обмін у щурів на моделі стрептозотоцинового ЦД1.

3. Дослідити механізми кардіопротекторної дії N-ацетилцистеїну та лозартану у щурів із стрептозотоциновим ЦД1.

4. Визначити вплив N-ацетилцистеїну та лозартану на активність та експресію матриксних металопротеїназ, ультраструктурні зміни тканин міокарда при стрептозотоциновому ЦД1.

5. Дослідити механізми кардіопротекторної дії сумісного застосування N-ацетилцистеїну та лозартану на моделі стрептозотоцинового ЦД1.

Об'єкт дослідження: фармакокорекція кардіальних порушень при ЦД1.

Предмет дослідження: кардіопротекторні властивості N-ацетилцистеїну та лозартану при стрептозотоциновому ЦД1.

Методи дослідження. Фармакологічні (моделювання експериментального ЦД1 введенням стрептозоточину); квантово-хімічні (енергія вищої зайнятої молекулярної орбіталі (НОМО), енергія нижчої вакантної молекулярної орбіталі (LUMO); ΔE електронного переходу між НОМО та LUMO; потенціал іонізації (IP); жорсткість (η); значення зарядів за Mulliken); електрофізіологічні (оцінка ритму; тривалості та амплітуди зубця P; тривалості комплексу QRS; амплітуди зубця R; тривалості інтервалу QT; амплітуди зубця T; корегованого інтервалу QTc); фізико-хімічні (визначення швидкості генерування супероксидних радикалів та NO, газохроматографічне визначення жирнокислотного спектру ліпідів; визначення активності матриксних металопротеїназ (ММР) методом желатин-зимографії, визначення експресії ММР-2 методом Western blot); біохімічні (визначення вмісту глюкози, глікозильованого гемоглобіну (HbA1C), активності аспартатамінотрансферази (АСТ), аланінамінотрансферази (АЛТ), лактатдегідрогенази (ЛДГ), креатинфосфокінази (КФК), креатинфосфокінази фракції МВ (КФК-МВ), вміст тіобарбітуратактивних продуктів (ТБК-АП), відновленого глутатіону (ГЛТ), активності каталази (КАТ), супероксиддисмутази (СОД), 8-оксогуаніну [8-охоG]; електронно-мікроскопічні (дослідження ультраструктурних змін тканин лівого шлуночка методом електронної мікроскопії); статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше експериментально обґрунтовано доцільність застосування N-ацетилцистеїну та лозартану, а також їх комбінації для фармакокорекції кардіальних порушень при ЦД1.

Отримано нові дані щодо кардіопротекторної дії N-ацетилцистеїну та лозартану на тлі експериментального ЦД1. З'ясовано, що N-ацетилцистеїн та лозартан ефективно запобігають деструктивним процесам у міокарді, на тлі

експериментального ЦД1. Кардіопротекторна дія N-ацетилцистеїну переважно досягається відновленням серцевого ритму (підвищення ЧСС на 16,2% порівняно до групи контрольної патології, $p < 0,05$), гальмуванням розвитку гіпертрофії лівого шлуночку (зменшення показнику масового коефіцієнта міокарда на 21,5%, $p < 0,05$), пригніченням кардіодеструктивних процесів (зменшення активності ЛДГ та КФК в 3 рази та в 1,6 разу відповідно, $p < 0,05$) та цитолізу (зниження активності АСТ та АЛТ в 2 рази та 1,8 разу відповідно, $p < 0,05$), посиленням енергетичного забезпечення (покращення стану мітохондрій) та скоротливої функції міокардіоцитів (за даними електронної мікроскопії). Лозартан виявляє кардіопротективний вплив переважно за рахунок відновлення шлуночкової скоротливої активності (скорочення QTc на 18,9%, порівняно до групи контрольної патології, $p < 0,05$), зменшення кардіодеструктивних процесів (зниження активності ЛДГ в 3 рази та КФК-МВ в 1,3 разу, $p < 0,05$). Окрім кардіопротективної дії, доведено антигіперглікемічний ефект N-ацетилцистеїну при стрептозотоциновому ЦД1 (зниження рівня глюкози крові в 4,7 разу та HbA1C в 1,3 разу, $p < 0,05$).

Поглиблено знання щодо молекулярних механізмів кардіопротекторної дії N-ацетилцистеїну та лозартану. Встановлено, що N-ацетилцистеїн та лозартан проявляють антиоксидантну дію, яка здійснюється за рахунок наростання рівня ненасичених жирних кислот (підвищення вмісту лінолевої кислоти в 2,5 разу та ліноленової у 2,3 разу, $p < 0,05$) та зниження вмісту арахідонової кислоти (в 1,4 разу, $p < 0,05$), що свідчить про зменшення активності ліпопероксидації (зменшення вмісту ТБК-АП в 2,2 рази $p < 0,05$) та підвищення системи ендogenous антиоксидантного захисту тканин міокарда (підвищення рівня ГЛТ в 2,5 разу, активності СОД в 1,6 та 1,7 разу відповідно, $p < 0,05$), підвищення екскреції 8-охоG з сечею в 2,2 та 2,6 разів відповідно ($p < 0,05$). Доведено, що кардіопротекторний ефект досягається впливом на активність матриксних металопротейназ, що запобігає процесам ремоделювання в міокарді. Антипроліферативна дія N-ацетилцистеїну у дозі 1500 мг/кг/добу здійснюється зменшенням експресії білка MMP-2 на 20% та підвищенням активності MMP-2 та MMP-9 в 1,4 та 1,6 разів відповідно ($p < 0,05$). Лозартан у дозі 20 мг/кг/добу виявляє антипроліферативні властивості, збільшуючи активність MMP-9 в 1,5 разу ($p < 0,05$). Доповнено нові дані щодо мембраностабілізуючого ефекту N-ацетилцистеїну, який досягається переважно за рахунок збільшення вмісту стеаринової кислоти в 1,3 разу ($p < 0,05$), а лозартану – за рахунок мінорних насичених жирних кислот (міристинової, пентадеканової, гептадеканової) у 2,7 разу ($p < 0,05$). За результатами електронно-мікроскопічного дослідження встановлено вплив N-ацетилцистеїну на активацію аутофагії у кардіоміоцитах щурів, що проявлявся підвищеною кількістю аутофагосом, з чим може бути пов'язаний його кардіопротекторний ефект.

Розширено уявлення щодо антиоксидантної активності N-ацетилцистеїну та лозартану шляхом квантово-механічного підходу. Уточнено квантово-хімічні дескриптори антиоксидантної активності молекули N-ацетилцистеїну (енергія НОМО, -9,628 eV; дипольний момент μ , 2,663 дебай). Виявлено фармакофорну групу молекули лозартану (гідроксиметильний ланцюг імідазольного кільця) та дескриптори антиоксидантної активності (енергія НОМО, -8,854 eV; IP, -8,854 eV; жорсткість η , 4,06 eV).

Отримано нові дані, які обґрунтовують доцільність сумісного застосування N-ацетилцистеїну (750 мг/кг/добу) та лозартану (2 мг/кг/добу). Сумісне застосування N-ацетилцистеїну та лозартану за умов кардіальних порушень ЦДІ, сприяє кращій виживаності тварин (95%), нормалізації серцевого ритму (підвищення ЧСС на 20,7% по відношенню до контрольної патології, $p < 0,05$), відновленню скорочувальної здатності шлуночків (скорочення QTc 20,2% по відношенню до контрольної патології, $p < 0,05$) за рахунок корекції окисного балансу (зменшення вмісту ТБК-АП на 52%, підвищення активності СОД на 60% та рівня ГЛТ, $p < 0,05$), покращує глікемічний контроль (зменшення HbA1C на 30%, $p < 0,05$), енергетичні процеси у кардіоміоцитах (зниження активності КФК-МВ в 1,8 разу, $p < 0,05$) та гальмує процеси гіпертрофії та фіброзу міокарда (зменшення експресії MMP-2 на 33%, $p < 0,05$), покращує регенеративні і трофічні процеси міокардіоцитів (за даними електронної мікроскопії).

Практичне значення отриманих результатів. За результатами проведених експериментальних досліджень доведено перспективність застосування N-ацетилцистеїну і лозартану та їх комбінації у попередженні та лікуванні кардіальних порушень при ЦДІ.

Запропоновано метод доклінічної оцінки ефективності кардіопротекторних властивостей фармакологічних засобів за ранніми проявами діабетичної кардіоміопатії на підставі даних ЕКГ (інформаційний лист МОЗ України № 233-2017, 2017 р.).

Результати дослідження впроваджено у науково-дослідну та науково-педагогічну роботу кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (протокол № 7 від 20.11.2017); кафедри фармакології і клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (протокол №11 від 07.06.2018); лабораторії промислової токсикології і гігієни праці при використанні хімічних речовин ДУ «Інститут медицини праці імені Ю. І. Кундієва НАМН України» (протокол №1 від 04.09.2017), НДІ експериментальної та клінічної фармакології НМУ імені О.О. Богомольця (протокол №10 від 19.10.2017).

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, аналітичний огляд вітчизняної та зарубіжної літератури за темою дисертаційної роботи. Головна ідея та напрям досліджень визначені дисертантом спільно з науковим керівником д.мед.н., професором М.В. Хайтовичем. Разом із науковим керівником сформульовано мету та завдання дослідження, здійснено планування та проведення поставлених етапів експериментальних досліджень. Автор брав участь у виконанні експериментальних досліджень, проведенні статистичної обробки даних, здійсненні наукової інтерпретації одержаних результатів, формулюванні основних положень і висновків. Співавторами наукових праць є науковий керівник М. В. Хайтович та науковці, спільно з якими проведено деякі дослідження: П. А. Черновол, Н. П. Черновол, Г. Р. Ламазян, Л. В. Натрус, Т. С. Брюзгіна, І. М. Рижко, А. П. Бурлака, А. В. Вовк, Л. О. Стеченко, О. І. Кривошеева, А. М. Шиш. Особистий внесок дисертанта зазначено у переліку праць, опублікованих за темою дисертації.

Робота виконана на базі Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О.О. Богомольця (директор, д.мед.н, професор Л. В. Натрус). Визначення антиоксидантної активності досліджуваних лікарських засобів *in vitro*, біохімічні дослідження було здійснено за консультативної допомоги наукового співробітника лабораторії біохімії НДІ експериментальної та клінічної медицини П. А. Черновола (зав. лабораторії І. М. Рижко). Аналіз жирнокислотного спектру у тканині міокарда щурів здійснено за участю та консультативної допомоги провідного співробітника лабораторії газової хроматографії к.т.н., Т. С. Брюзгіної. Електронно-мікроскопічні дослідження – за участю та консультативної допомоги д.біол.н., професора Л. О. Стеченко. Активність та експресію матриксних металопротеїназ вивчали за участю та консультативної допомоги к.біол.н., А. М. Шиш (Інститут фізіології імені О.О. Богомольця). Швидкість генерування вільних радикалів та екскреції 8-оксогуаніну було здійснено за участю та консультативної допомоги д.біол.н., А. П. Бурлаки (Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України). Автор висловлює щире подяку вищезазначеним співробітникам за консультативну та практичну допомогу в проведенні експериментальних досліджень.

Апробація матеріалів дисертації. Результати роботи викладено і обговорено на: 7-му Міжнародному медичному форумі «Інновації в медицині – здоров'я нації» (м. Київ, 19-21 квітня 2016 р.); VII Національному конгресі патофізіологів України «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (м. Харків, 5-7 жовтня 2016 р.); IV Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини» (м. Чернівці, 5-7 квітня 2017 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць: 6 статей у фахових журналах, рекомендованих МОН України, з них 3 у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз; 6 тез доповідей, 1 інформаційний лист.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація містить анотації українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів дослідження, 3 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновки та перелік використаних джерел літератури (240 посилань, з них 60 – кирилицею, 180 – латиницею), додатки. Обсяг основного тексту дисертації складає 163 сторінки друкованого тексту. Дисертація ілюстрована 18 таблицями та 45 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проведені на 234 щурах-самцях лінії Wistar масою 220-250 г. Щури вирощувались і утримувались у віварії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця на стандартному збалансованому харчовому раціоні з вільним доступом до води, що відповідає чинним санітарно-гігієнічним нормам утримання лабораторних тварин. Усі маніпуляції з тваринами були проведені згідно з діючими біоетичними принципами. Дотримання біоетичних норм засвідчено висновком Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного

медичного університету імені О. О. Богомольця (протоколи № 90 від 07 жовтня 2015 р.; №117 від 21 грудня 2018 р.).

Об'єктами вивчення на етапі скринінгу *in vitro* було обрано такі препарати: N-ацетилцистеїн (АЦ-ФС, таблетки, 200 мг, ТОВ «Фарма Старт»), тіотриазолін (Тіотриазолін, таблетки, 200 мг, Arterium), лозартан (Лозап, таблетки, 50 мг, Zentiva), валсартан (Валсартан-Зентива, таблетки, 80 мг, Zentiva); на етапах *in vivo* N-ацетилцистеїн (АЦ-ФС, таблетки, 200 мг, ТОВ «Фарма Старт»), лозартан (Лозап, таблетки, 50 мг, Zentiva). Дослідження виконано в 4 етапи, які представлено на рис. 1.



Рис.1 Схема дизайну дослідження експериментального вивчення лікарських засобів.

На першому етапі в рамках скринінгу було проведено порівняльну оцінку антиоксидантної активності (АОА) АРА (лозартану, валсартану) та антиоксидантних засобів (N-ацетилцистеїну, тіотриазоліну) за ступенем інгібування супероксидного радикалу *in vitro* в концентраціях 10^{-3} , 10^{-6} та 10^{-9} моль/л. Визначення АОА проводили відповідно до методики (Ю. І. Губський та співавт., 2001), яка була нами модифікована (І. М. Ситник, М. В. Хайтович., 2015). Квантово-хімічні параметри молекулярних структур ЛЗ *in silico* розраховували за допомогою програми Hyperchem Release 8.0. із використанням напівемпіричного методу – гамільтоніану РМЗ (М. Е. Соловьев, 2005).

Після визначення препаратів-лідерів на першому етапі дослідження (N-ацетилцистеїн, лозартан) було проведено наступний етап – вивчення

кардіопротекторних властивостей N-ацетилцистеїну та лозартану на моделі стрептозотоцинового ЦД1 *in vivo*.

ЦД1 моделювали введенням стрептозоточину (Streptozotocin, порошок, 500 мг, «Sigma», США, S0130-500MG) у дозі 50 мг/кг одноразово інтраперитоніально відповідно до методичних рекомендацій (О. В. Стефанов, 2001). В ході другого та третього етапів дослідження дослідні тварини були розподілені на 4 групи: ІК (інтактний контроль, група інтактних щурів, які отримували 0,9% фізіологічний розчин); КП (контрольна патологія, група тварин із стрептозотоциновим ЦД1, які отримували плацебо – 0,9% фізіологічний розчин); NAC (група щурів із індукованим ЦД1, які отримували N-ацетилцистеїн у дозі 1500 мг/кг); LOS (група щурів із індукованим ЦД1, які отримували лозартан у дозі 20 мг/кг). Підбір дозування NAC здійснювали на основі проведених раніше досліджень співробітниками кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації НМУ імені О.О. Богомольця. Обрана доза 1500 мг/кг є найбільш ефективною щодо попередження гіперглікеміє-індукованого оксидативного стресу, що співпадає з даними літератури (J. Xu et al., 2013; W. Su et al., 2016; J. Lin et al., 2016; S. Wang et al., 2017). Підбір дозування LOS проводили відповідно до даних літератури (M. Kamper et al., 2010; M. Sleem et al., 2014; M. Lodovici et al., 2015).

Препарати вводили внутрішньошлунково у лікувальному режимі протягом 4 тижнів, починаючи з 8 доби після відтворення модельної патології з метою виявлення ранніх проявів кардіоміопатії при ЦД1.

Було проведено реєстрацію ЕКГ, яку здійснювали у II стандартному відведенні на електрокардіографі EDAN SE-1, у динаміці кожного тижня протягом місяця, на моделі стрептозотоцинового ЦД1. Проводили оцінку ритму; тривалості та амплітуди зубця Р; тривалості комплексу QRS; амплітуди зубця R; тривалості інтервалу QT; амплітуди зубця Т; корегованого інтервалу QTc (Н. Н. Каркищенко, 2010). На даному етапі також проводилась оцінка масових коефіцієнтів міокарда та інтегральні показники (показники виживаності, маса тіла щурів).

Вплив досліджуваних препаратів на концентрацію глюкози, активність цитолітичних ферментів (АСТ, АЛТ) визначали загальноприйнятими біохімічними методами за допомогою біохімічних наборів (Diagnosticum Zrt., Угорщина). Глікозильований гемоглобін HbA1C сироватки крові, маркери кардіодеструктивних процесів (активність ЛДГ, КФК, КФК-МВ) визначали загальноприйнятими біохімічними методами за допомогою біохімічних наборів (Biosystems, Іспанія).

На третьому етапі було встановлено механізми кардіопротекторної дії NAC та LOS. З метою виявлення первинної ланки ОС було визначено швидкість генерування супероксидного радикалу (СР) та рівня NO в мітохондріях клітин аорти та печінки методом електронного парамагнітного резонансу (А. П. Бурлака та співавт., 2016). Молекулярний маркер окисного пошкодження ДНК – 8-оксогуанін (8-охоG) визначали методом аналізу ультрафіолетових спектрів елюатів після їх твердофазної екстракції спектрофотометрично (А. П. Бурлака та співавт., 2006).

Дослідження механізмів кардіо- та органопротекції на кінцевому етапі ОС здійснювали за жирнокислотним складом тканин міокарда, станом ліпопероксидації та антиоксидантної системи (АОС). Аналіз жирнокислотного складу тканин міокарда щурів проводили методом газової хроматографії (О. Б. Яременко та

співавт., 2005). Інтенсивність ліпопероксидації визначали за накопиченням тіобарбітуратактивних продуктів (ТБК-АП) в сироватці крові, тканині міокарда та печінки (И. Д. Стальная и соавт., 1977). Стан АОС сироватки, тканини міокарда та печінки визначали за рівнем відновленого глутатіону (ГЛТ) (Ф. И. Гимерх, 1967); активності каталази (КАТ) (М. А. Королюк и соавт., 1998) та супероксиддисмутази (СОД) (Т. В. Сирота, 1999).

Даний етап дослідження також включав визначення активності та експресії матриксних металопротеїназ 2 та 9 типу в сироватці та тканині міокарда (U. K. Laemmli, 1970); ультраструктурні зміни міокардіоцитів визначали методом електронної мікроскопії (В. Я. Карупу, 1984; М. А. Науат, 2000).

На четвертому етапі було оцінено кардіопротекторний вплив при сумісному застосуванні N-ацетилцистеїну і лозартану та визначено їх ефективні дози на моделі стрептозотоцинового ЦД1. Дослідні щури були розподілені на такі групи: ІК; КІ; Comb1 (група тварин із індукованим ЦД1, які отримували комбінацію N-ацетилцистеїну (1500 мг/кг) та лозартану (20 мг/кг); Comb2 (група тварин із індукованим ЦД1, які отримували комбінацію N-ацетилцистеїну (750 мг/кг) та лозартану (2,0 мг/кг). Дози препаратів у комбінації були обрані за результатами попередніх скринінгових досліджень.

Статистичну обробку отриманих даних проводили методами варіаційної статистики за допомогою програм Medstat, IBM SPSS Statistics Base version 22.0 з використанням Т-критерію Стюдента (у разі нормального закону розподілу) для 2-х груп порівнянь, однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA за критерієм Шеффе та Даннета (для груп порівнянь з ІК та КІ). При обліку результатів в альтернативній формі (виживаність) використовували кутове перетворення Фішера. Перевірку розподілу значень на нормальність визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Точкову оцінку результатів представляли у вигляді середніх значень та стандартної похибки середнього ($M \pm m$) (С. Гланц, 1998).

Результати та їх обговорення. Аналіз результатів першого етапу дослідження дозволив встановити, що найбільшу АОА виявляє НАС у концентрації 10^{-6} моль/л (79,1%), перевершуючи АОА тіотриазоліну у тій же концентрації ($p < 0,05$). З двох досліджених препаратів групи антагоністів рецепторів до ангіотензину ІІ (АРА) лише LOS виявив АОА, яка становила відповідно 22,5% та 25,1% за концентрацій 10^{-6} та 10^{-3} моль/л ($p < 0,05$). За результатами дослідів *in vitro* визначено препарати-лідери НАС (серед двох ЛЗ із антиоксидантними властивостями) та лозартан (серед групи АРА).

Дослідженнями *in silico* було визначено квантово-хімічні дескриптори АОА засобів-лідерів. Молекула LOS містить гідроксиметильний бічний фрагмент, а локалізація енергії НОМО на даному фрагменті визначає електроноакцепторні властивості, зокрема у реакціях із активними формами кисню. Молекула НАС має невисоке значення дипольного моменту (2,663 дебай), що може пояснити її високу АОА (79,1%) *in vitro*, на відміну від молекули LOS, яка має високе значення дипольного моменту (6,027 дебай) та відповідно нижчі значення АОА (25,1%). Виявлено локалізацію енергії НОМО на сульфгідрильній групі, яка буде взаємодіяти із електроноакцепторними угрупованнями, що і пояснює АОА молекули НАС (Т. Ю. Небесна, 2007).

Отже, на першому етапі визначено препарати-лідери, що стало обґрунтуванням для подальшого їхнього дослідження *in vivo*.

Застосування NAC та LOS із першого тижня на моделі ЦД1 мало позитивний вплив на ЧСС. Амплітуда зубця Т, тривалість інтервалу QT наближались до відповідних значень інтактної групи ІК. У групах тварин, які отримували NAC та LOS, вірогідно зменшувалася величина корегованого інтервалу QTс в 1,1 разу порівняно з групою КП. Результати представлені в табл.1.

При дослідженні інтегральних показників встановлено зменшення летальності тварин у групах LOS та NAC на 30-35%, виявлено достовірне підвищення маси тіла дослідних щурів ($p < 0,05$).

Зміни маркерів ЦД вказували, що застосування NAC і LOS пов'язано із зниженням рівня НbA1С ($p < 0,05$). У групі дослідних тварин, які отримували NAC, вірогідно зменшувався НbA1С в 1,3 разу ($p < 0,01$), що підтверджує його антигіперглікемічну активність ($5,0 \pm 0,7$ ммоль/л). Імовірно, отриманий антигіперглікемічний ефект пов'язаний із антиоксидантною дією та зменшенням апоптозу β -клітин підшлункової залози (Y. Fang et al., 2014).

Таблиця 1

Вплив N-ацетилцистеїну (1500 мг/кг) та лозартану (20 мг/кг) на зміни ЕКГ на 2 тижні експериментального ЦД1 (M \pm m)

Показники ЕКГ	ІК (n=6)	КП (n=7)	NAC (n=8)	LOS (n=7)
ЧСС, уд/хв	436,9 \pm 8,6	399,3 \pm 8,8 [#]	428,8 \pm 26,6	423,3 \pm 10,0
T, mV	0,23 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02 [#]	0,22 \pm 0,01 [*]	0,21 \pm 0,03
QT, мс	69,8 \pm 0,63	77,3 \pm 3,3	68,8 \pm 3,4	67,3 \pm 1,6 [*]
QTс, мс	185,5 \pm 3,5	204,5 \pm 4,8 [#]	182,6 \pm 4,7 [*]	178,5 \pm 5,5 [*]

Примітка.* – різниця показників вірогідна порівняно із контрольною патологією ($p < 0,05$); # – різниця показників вірогідна порівняно із інтактним контролем ($p < 0,05$); n – кількість тварин у групі.

Достовірно зменшувались процеси цитолізу у групі NAC, зокрема активність АЛТ та АСТ знижувалась у 1,8-2,0 разу відповідно, відносно групи контрольної патології ($p < 0,01$). Застосування LOS не виявило вірогідного впливу на активність цитолітичних ферментів, дія LOS вірогідно поступалась NAC в 1,4 разу ($p < 0,05$).

При дослідженні електрокардіографічних показників, масового коефіцієнту міокарда та біохімічних маркерів кардіодеструктивних процесів після 4 тижнів введення досліджуваних лікарських засобів (ЛЗ), встановлено, що кардіопротекторна дія NAC проявлялась відновленням серцевого ритму (підвищення ЧСС на 16,2% порівняно до контрольної патології; $p < 0,05$), зменшенням проявів гіпертрофії міокарда тварин (зменшення масового коефіцієнту міокарда (МКМ) на 21,5% порівняно до контрольної патології; $p < 0,05$), що, можливо, пояснюється покращенням глікемічного контролю (зниження НbA1С в 1,3 разу, $p < 0,05$), зменшенням кардіодеструктивних процесів (зниження активності ЛДГ в 3 рази, КФК в 1,6 разу; $p < 0,05$). Кардіопротекторна дія LOS полягала у відновленні процесів реполяризації міокарда (вдвічі підвищився вольтаж зубця Т,

зменшився маркер кардіотоксичності QTc на 10%; $p < 0,05$), а також за рахунок пригнічення кардіодеструктивних процесів міокарда (зниження активності ЛДГ в 3 рази, КФК-МВ - в 1,3 разу, $p < 0,05$).

На третьому етапі, з метою визначення імовірних редокс-залежних механізмів кардіо- та органопротекторної дії NAC та LOS, нами було проведено дослідження на етапі ініціації формування CP та синтезу NO в мітохондріях тканини аорти та печінки дослідних щурів. Застосування NAC в дозі 1500 мг/кг та LOS у дозі 20 мг/кг виявляло антирадикальний ефект у тканині аорти порівняно з групою контрольної патології (знижувалась швидкість генерації CP у 1,8-2,0 разу, $p < 0,01$). NAC виявив виражену ендотелієпротекторну дію, сприяв підвищенню рівня NO в 1,4 разу у тканині аорти ($p < 0,01$). NAC та LOS спричиняли протекторний вплив на печінку, що проявлялось у зниженні швидкості генерації вільних радикалів у її тканині (в середньому вдвічі проти групи контрольної патології, $p < 0,01$) та свідчило про метаболічний захист (C. Liu et al., 2015). При цьому екскреція із сечею 8-охоG при застосуванні NAC та LOS зростала, порівняно із групою контрольної патології, в 2,2 та 2,6 разу відповідно ($p < 0,05$). Підвищена екскреція 8-охоG із сечею, імовірно, пов'язана активацією 8-охо-7,8-дегідрогіуанін-глікозилази, і відповіддю організму на проведену терапію (M. S. Cooke et al., 2009; K. Roszkowski, R. Olinski, 2012). Можливо, NAC та LOS активують захисні компенсаторні механізми організму, спрямовані на видалення модифікованих основ, та захищають клітини від руйнівної дії АФК.

Отримані зрушення жирнокислотного (ЖК) складу ліпідів тканин міокарда щурів вказували, що застосування LOS сприяло достовірному перерозподілу мінорних ЖК: міристинової (C14:0), пентадеканової (C15:0), гептадеканової (C17:0) ЖК (збільшувалась сума насичених ЖК у 2,7 разу, $p < 0,05$). Використання NAC вірогідно збільшувало вміст стеаринової ЖК C18:0 (у 1,3 разу), що свідчить про стабілізацію мембран міокардіоцитів та посилення енергетичних можливостей міокарда. Вірогідне підвищення вмісту лінолевої ЖК (в 2,5 разу) у групах NAC та LOS на тлі підвищення ліноленової (омега-3) ($p < 0,05$) забезпечує підвищення еластичності клітинних мембран (табл. 2). Крім того, позитивні зрушення у ЖК складі під впливом досліджуваних ЛЗ пояснюють зменшення токсичних проявів стрептозотоцину на тканини міокарда (A. L. Al-Malki et al., 2016).

Отже, позитивні зрушення у складі насичених та ненасичених ЖК у тканині міокарда щурів свідчить про активацію АОС тканин міокарда від ОС, а зменшення кількісного вмісту арахідонової ЖК (в 1,4 рази) вказує на зменшення процесів перекисного окиснення ліпідів у тканині міокарда.

При дослідженні маркерів ОС тканин міокарда щурів із ЦД1 встановлено, що і NAC, і LOS знижували процеси ліпопероксидації, що досягалось за рахунок зменшення ТБК-АП у 2,2 разу ($p < 0,01$) та активували ендогенну систему антиоксидантного захисту шляхом підвищення рівня ГЛТ в 2,5 разу ($p < 0,01$). LOS більш активно сприяв утилізації CP у сироватці крові (збільшував активність СОД в 2,3 разу, $p < 0,01$), а NAC краще нейтралізував H_2O_2 (збільшував активність КАТ у сироватці крові в 2,1 разу, $p < 0,01$), порівняно до групи контрольної патології. LOS вірогідно поступався препарату NAC за впливом на процеси ліпопероксидації в тканинах печінки (в 1,3 разу, $p < 0,05$), що підтверджує

виразні гепатопротекторні та антитоксичні властивості NAC, визначені в ряді досліджень (A. Falach-Malik et al., 2016; M. F. Chughlay, 2016).

Таблиця 2

Вплив N-ацетилцистеїну (1500 мг/кг) та лозартану (20 мг/кг) на зміни жирнокислотного складу ліпідів тканин міокарда на тлі експериментального ЦДІ (M ± m)

ЖК %	ІК (n=6)	КП (n=6)	NAC (n=6)	LOS (n=6)
C14:0	0,32±0,03	0,20±0,01 [#]	0,44±0,04 [*]	0,60±0,02 [*]
C15:0	0,34±0,03	0,20±0,01 [#]	0,43±0,04 [*]	0,54±0,03 [*]
C16:0	22,4±1,5	13,9±0,9 [#]	17,5±0,6 ^{*,#}	15,3±0,9 [#]
C17:0	0,33±0,03	0,14±0,02 [#]	0,44±0,04 [*]	0,50±0,03 ^{*,#}
C18:0	13,2±0,8	9,6±0,2 [#]	12,0±0,3 [*]	10,2±0,4 [#]
C18:1	16,8±1,1	15,2±0,3	15,1±0,2	15,4±0,4
C18:2	30,8±0,5	21,7±0,8 [#]	38,8±2,4 ^{*,#}	40,0±1,3 ^{*,#}
C18:3	0,32±0,03	0,21±0,01 [#]	0,50±0,02 ^{*,#}	0,52±0,04 ^{*,#}
C20:4	17,9±2,2	25,9±3,0 [#]	18,1±2,7 [*]	17,9±1,8 [*]
ΣНЖК	36,6±2,0	24,1±1,1 [#]	30,7±0,8 ^{*,#}	27,1±0,8 [#]
ΣННЖК	65,8±2,4	62,9±2,9	72,4±2,8 ^{*,#}	73,8±0,9 ^{*,#}
ΣПНЖК	48,9±2,7	47,7±3,0	57,3±2,9 ^{*,#}	58,4±0,7 ^{*,#}

Примітка. * – різниця показників вірогідна порівняно із контрольною патологією (p<0,05); # – різниця показників вірогідна порівняно із інтактним контролем (p<0,05); НЖК – сума насичених ЖК; ННЖК – сума ненасичених ЖК; ПНЖК – сума поліненасичених ЖК; n – кількість тварин у групі.

Наступним кроком було визначення активності матрикс-деградуючих ферментів, які беруть участь у регуляції клітинної функції кардіоміоцитів. Отримані дані свідчать про наявність активності матриксної металопротеїнази 2 типу (MMP-2) у сироватці крові усіх досліджуваних груп, експресія її відбувається за конституціональним типом після 5-ти тижнів експериментального ЦДІ. Застосування NAC сприяло вірогідному збільшенню в крові щурів активності матриксних металопротеїназ 2-го та 9-типів (MMP-2 та MMP-9) в 1,4 та 1,6 разів відповідно, порівняно із групою контрольної патології (p<0,01), в групі LOS відмічено зростання активності MMP-9 в 1,4 разу (p<0,01) (рис. 2). В групі дослідних тварин, які отримували LOS, MMP-2 мала тенденцію до збільшення активності та вірогідно відрізнялась від групи NAC у 1,3 разу (p<0,05). Висока активність MMP-2 та MMP-9 у експериментальних тварин, які отримували NAC та LOS, скоріше за все, зумовлена компенсаторними механізмами, спрямованими на пригнічення деструкції системи колагену та запобігання перебудови сполучної тканини міокарда (Li. Ch-jun et al., 2012; I. A. Криворучко та співавт., 2015).

Достовірні зміни експресії MMP-2 у тканині міокарда лівого шлуночка щурів виявлено лише у групі тварин, які отримували NAC: рівень експресії білка MMP-2 знижувався у 1,2 разу порівняно до контрольної патології (p<0,05), що вказує на зменшення процесів ремоделювання міокарда під впливом NAC (рис.2).

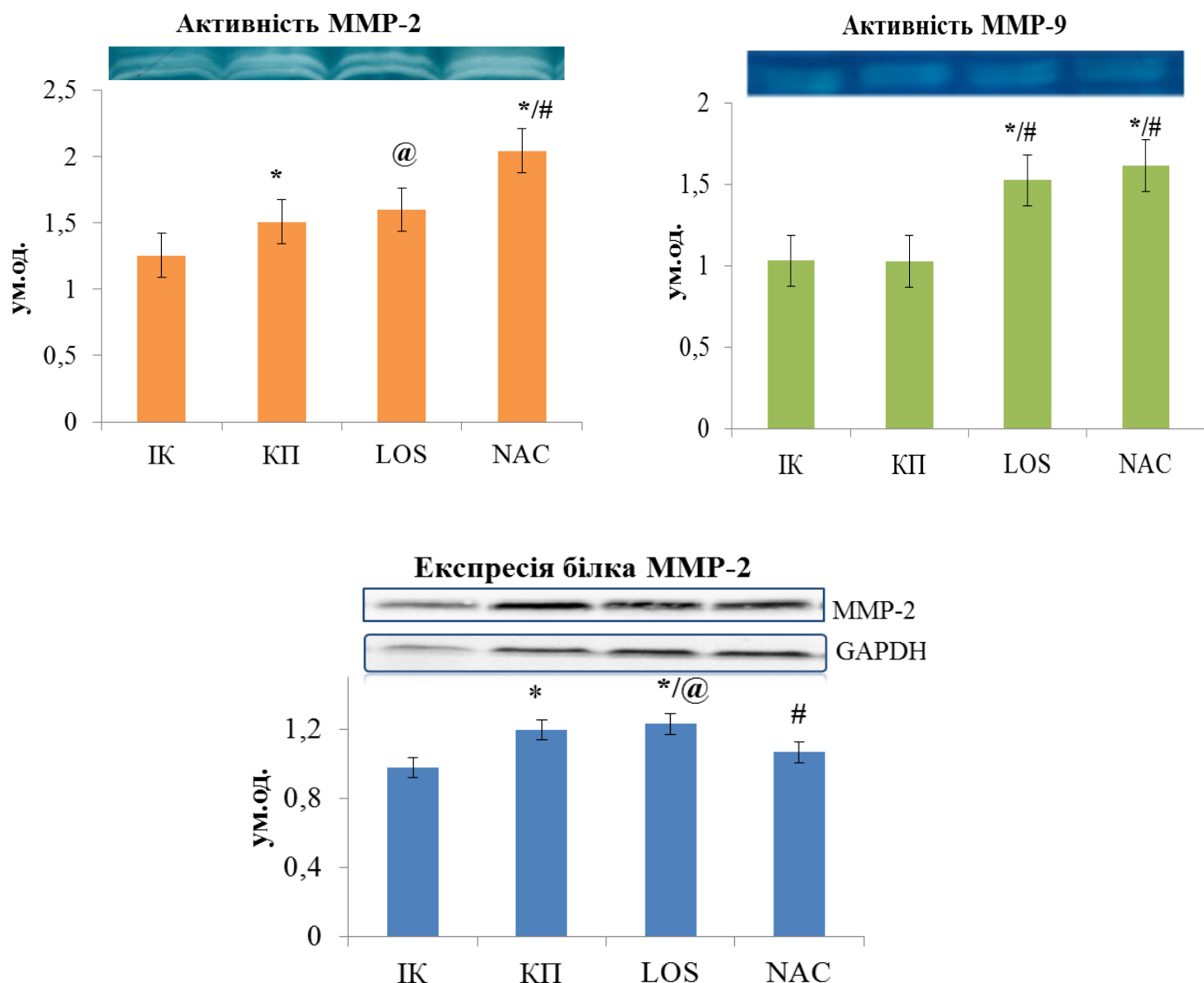


Рис. 2 Зміни активності та експресії матриксних металопротеїназ за дії N-ацетилцистеїну (NAC, 1500 мг/кг) та лозартану (LOS, 20 мг/кг) на тлі ЦД1, n=6.

Примітка. * – різниця показників вірогідна порівняно із інтактним контролем ($p < 0,05$); # – різниця показників вірогідна порівняно із контрольною патологією ($p < 0,05$); @ – різниця показників вірогідна порівняно із групою NAC ($p < 0,05$); GAPDH – гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназа, контрольний білок; n – кількість тварин у групі.

Електронно-мікроскопічне дослідження кардіоміоцитів щурів із експериментальним ЦД1 показало ознаки активації білоксинтетичних процесів на тлі застосування NAC. Більшість кардіоміоцитів містили міофібрили, організовані у чітко структуровані саркомери, які суттєво не відрізнялися від групи інтактного контролю. При цьому виявлялась активація аутофагально-лізосомальної системи, на що вказувало збільшення кількості аутофагосом (рис. 3.в). На відміну від групи щурів, які отримували NAC, в частині кардіоміоцитів щурів, які отримували LOS,

спостерігали значне перескорочення міофібрил, серед яких траплялись поодинокі мітохондрії та розширені каналці гладенької ендоплазматичної сітки в зоні триад, а також зменшення кількості аутофагосом (рис. 3.г). Більша ефективність NAC порівняно до LOS у відновленні аутофаготичної цитопротекторної системи, можливо, пояснюється його модулюючим впливом на мішень ОС-аутофагія (S. Wang, 2017).

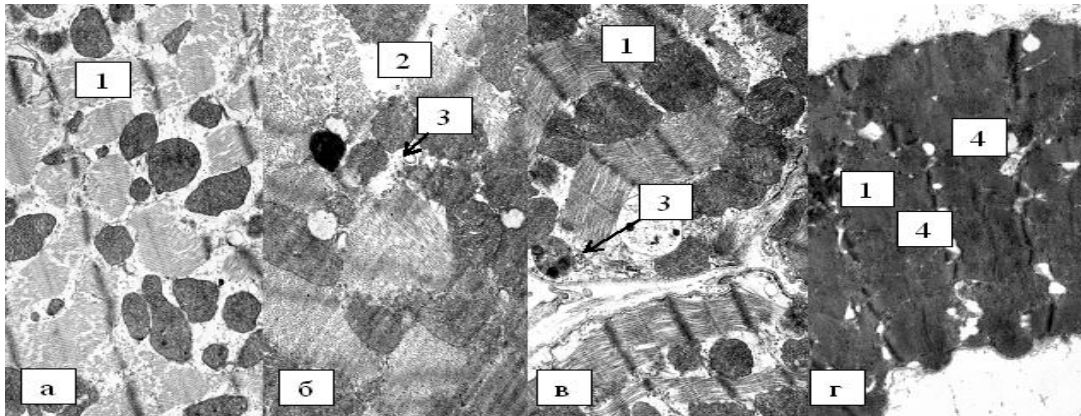


Рис. 3 Фрагменти міокарда лівого шлуночка у інтактного щура (а), при ЦД1 (б), за дії NAC (в) та LOS (г) на тлі ЦД. 1 – міофібрили, 2 – лізис міофібрил, 3 – аутофагосома, 4 – каналці гладенької ендоплазматичної сітки. Зб. а,б - x18000; в,г- x12000.

З метою оцінки дії сумісного застосування NAC та LOS при кардіальних порушеннях на тлі ЦД було досліджено дві комбінації досліджуваних препаратів для вибору найбільш оптимального дозового режиму.

При застосуванні Comb1 відмічено загальне покращення фізичного стану дослідних щурів, на що вказує достовірне підвищення маси тіла, зниження рівня глюкози крові, зменшення проявів гіпертрофії, виявлено тенденцію до нормалізації ЧСС, скорочувальної здатності міокарда порівняно із групою контрольної патології. Комбінація Comb2 відрізнялася більшою ефективністю щодо нормалізації серцевого ритму (підвищення ЧСС на 20,7% по відношенню до контрольної патології, $p < 0,05$), процесів деполіаризації та реполіаризації шлуночків; покращення електричної систоли міокарда (за рахунок зменшення інтервалу QTc на 20,2% по відношенню до контрольної патології, $p < 0,05$), зменшення проявів гіпертрофії міокарда (зменшення масового коефіцієнту міокарда на 20,2% порівняно до контрольної патології, $p < 0,05$), сприяла збільшенню виживаності тварин (95,0%, тоді як у групи Comb1 даний показник був 89,5%). Щодо показників глікемії, обидві групи тварин Comb1 та Comb2 достовірно знижували рівень глюкози крові в 2,5 та 4,4 разу відповідно, порівняно до групи щурів контрольної патології ($p < 0,05$). За антигіперглікемічною дією Comb2 вірогідно перевершувала Comb1 в 1,7 разу ($p < 0,05$) (табл.3).

Застосування Comb1 виявляло кардіопротекторну дію, імовірно, за рахунок зменшення кардіодеструктивних процесів (вдвічі зниження активності ЛДГ, $p < 0,05$), тоді як Comb2 – переважно за рахунок кращого метаболічного контролю глюкози (на 30% знижувався HbA1C порівняно до групи контрольної патології, $p < 0,05$) та вираженої дії на пригнічення кардіодеструктивних процесів (активність ЛДГ була

у 3,3 разу нижчою за значення контрольної патології, $p < 0,05$). Вплив на гіпоксію та цитоліз у Comb2 був достовірно кращим порівняно із Comb1 (активність ЛДГ була нижчою в 1,6 разу, а АСТ в 1,3 разу, $p < 0,05$).

Таблиця 3

Вплив комбінацій Comb1 (1500 мг/кг NAC; 20 мг/кг LOS) та Comb2 (750 мг/кг NAC; 2,0 мг/кг LOS) на показники загального фізичного стану щурів та показники ЕКГ на моделі ЦД1 ($M \pm m$)

Параметри	ІК (n=6)	КП (n=7)	Comb1 (n=6)	Comb2 (n=6)
Маса, г	253,2±9,6	200,9±2,8 [#]	231,3± 6,5 [*]	261,5± 16,5 ^{*,&}
Глюкоза, ммоль/л	5,1± 0,1	24,2±1,9 [#]	9,5±1,5 ^{*,*}	5,5 ± 0,5 ^{*,&}
Вживаність, %	100,0	57,1 [#]	89,5 [*]	95,0 [*]
МКМ, %	0,31±0,01	0,38±0,01 [#]	0,34±0,01 [*]	0,30±0,01 ^{*,&}
ЕКГ-показники				
ЧСС, уд/хв	441,6±8,0	368,3±5,2 [#]	413,8±19,7 [*]	444,6±11,0 [*]
P, mV	0,09±0,01	0,03±0,01 [#]	0,06±0,01 ^{*,#}	0,08±0,01 ^{*,&}
T, mV	0,23±0,01	0,13±0,01 [#]	0,15±0,04	0,22±0,01 [*]
QT, мс	69,0±0,9	80,3±0,8 [#]	74,2±1,7 [*]	66,8±1,3 ^{*,&}
QTc, мс	184,1±6,3	198,8±1,9 [#]	194,2±1,3	181,6±3,0 ^{*,&}
QRS, мс	20,7±0,4	27,7±1,3 [#]	24,9±1,4 [#]	20,6±0,3 ^{*,&}

Примітка. * – різниця показників вірогідна порівняно із контрольною патологією ($p < 0,05$); # – різниця показників вірогідна порівняно із інтактним контролем ($p < 0,05$); & – різниця показників вірогідна порівняно із групою Comb1 ($p < 0,05$); n – кількість тварин у групі.

При дослідженні показників ОС в тканині міокарда було виявлено, що Comb2 більш інтенсивно, ніж Comb1 ($p < 0,05$), зменшувала вміст вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (вдвічі зменшувала ТБК-АП, $p < 0,05$), підвищувала антиоксидантний захист (на 60% підвищувала активність СОД та рівень ГЛТ, $p < 0,05$). Comb2 достовірно (в 1,4 разу, $p < 0,05$) збільшувала загальну суму насичених ЖК, переважно за рахунок стеаринової кислоти, тоді як Comb1 перерозподіляла вміст пальмітинової кислоти ($p < 0,05$). Група Comb2 знижувала вміст арахідонової кислоти у 1,4 разу, її значення наближались до інтактного контролю та достовірно відрізнялись від Comb1 ($p < 0,05$), що свідчить про зменшення процесів ліпопероксидації. Застосування Comb2 пов'язано із вираженою мембраностабілізуючою та антиоксидантною дією, а отже, кращою здатністю протистояти ОС в міокарді.

За даними зимографічного дослідження було виявлено, що Comb1 мала тенденцію до зниження активності MMP-2. Натомість при застосуванні Comb2 активність MMP-2 достовірно знижувалась на 25% порівняно до групи контрольної патології ($p < 0,05$). Експресія білку MMP-2 у групі Comb1 була на 22% нижчою, порівняно із групою контрольної патології ($p < 0,05$), а у дослідних щурів, які отримували Comb2, відмічено зниження експресії білку MMP-2 на 33% порівняно

до групи КП ($p < 0,05$), що наближалось до групи інтактного контролю (за даними Western-blot аналізу) (рис.4).

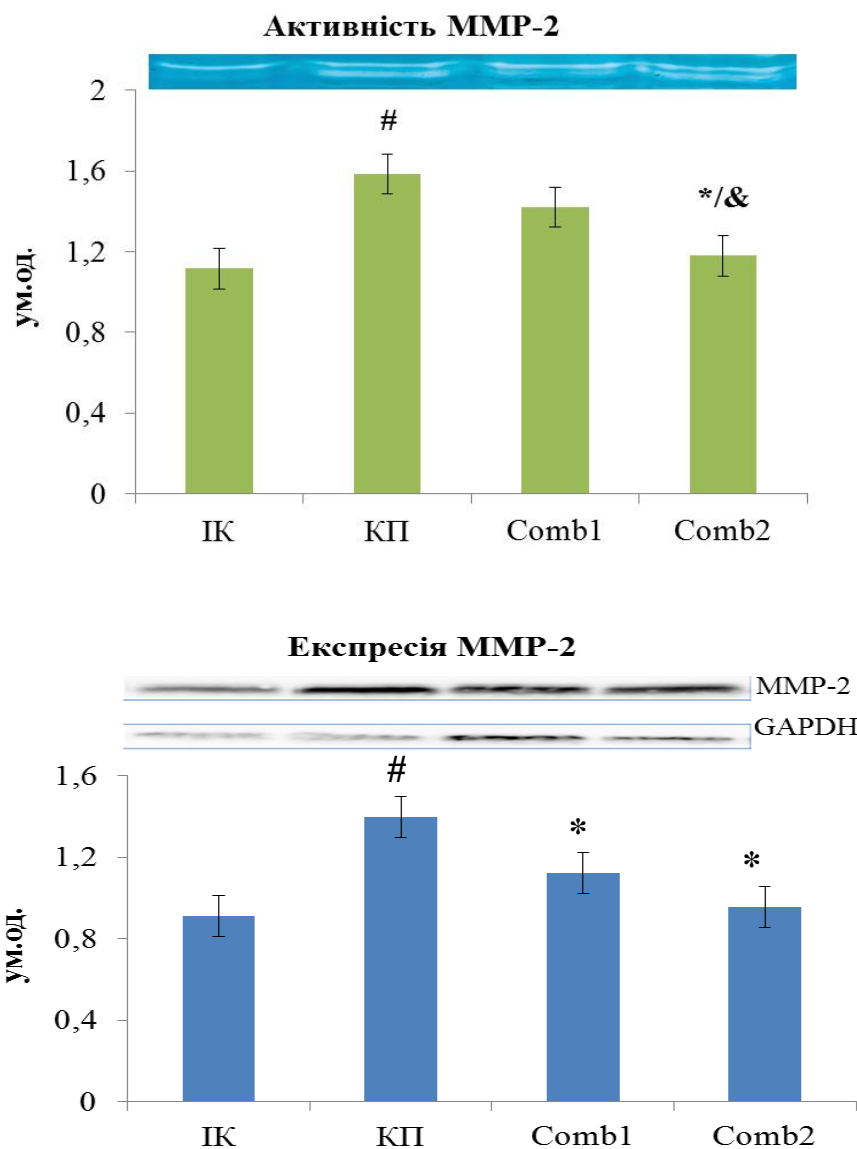


Рис. 4 Зміни активності та експресії матриксних металопротеїназ за дії комбінацій Comb1 (1500 мг/кг NAC; 20 мг/кг LOS) та Comb2 (750 мг/кг NAC; 2,0 мг/кг LOS) на тлі ЦД, $n=6$.

Примітка. * – різниця показників вірогідна порівняно із контрольною патологією ($p < 0,05$); # – різниця показників вірогідна порівняно із інтактним контролем ($p < 0,05$); & – різниця показників вірогідна порівняно із групою Comb1 ($p < 0,05$); GAPDH – гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназа, контрольний білок; n – кількість тварин у групі.

На ультраструктурному рівні, у внутрішньому вистеленні кровоносних капілярів спостерігались клітини з електронощільним хроматином, які характеризують переапоптозний стан ендотеліоцитів, як і в групі щурів контрольної патології (рис. 5.б, 5.в). На тлі застосування Comb2 спостерігався просвіт капілярів без особливих змін, заповнений електронощільним вмістом, який відповідає групі

інтактного контролю (рис. 5.г). Крім того, наявне стоншене ендотеліальне вистелення, у якому чітко локалізовані трансендотеліальні пухирці, які пов'язані із переносом поживних речовин.

Отже, Comb2 мала суттєві переваги порівняно з Comb1, що підтверджується покращенням гемімікроциркуляторного русла, посиленням енергетичного забезпечення та скоротливої функції міокардіоцитів, індукції регенеративних та трофічних процесів у міокарді дослідних щурів на тлі ЦД1.

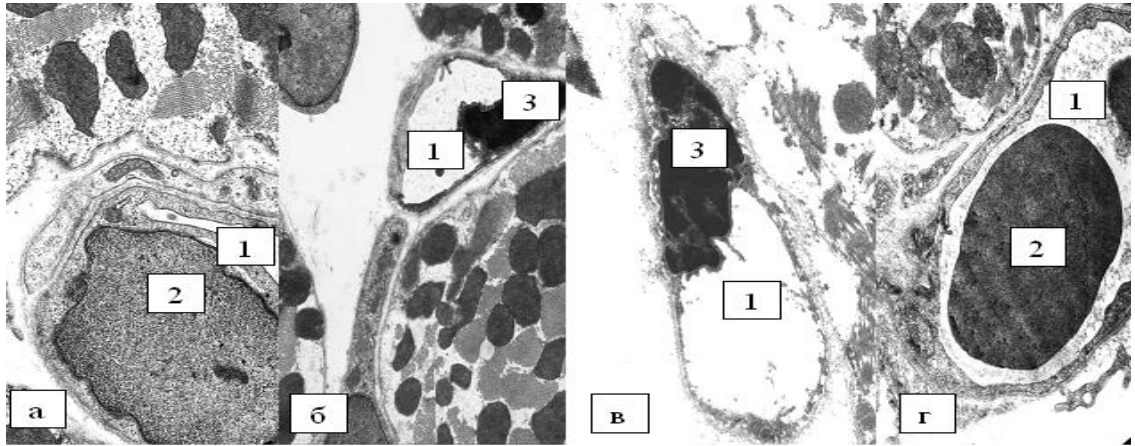


Рис. 5 Фрагменти міокарда лівого шлуночка у інтактного щура (а), при ЦД1 (б), за дії Comb1 (в) та Comb2 (г) на тлі ЦД. 1 – просвіт капіляру, 2 – еритроцит, 3 – шоковий ендотеліоцит. Зб. а, б - x14000; в, г - x12000.

Таким чином, проводячи підсумок отриманих результатів дослідження, можна стверджувати про перспективи застосування NAC (у дозі 1500мг/кг) та LOS (у дозі 20 мг/кг) та їх комбінації (у дозах 750 мг/кг NAC та 2,0 мг/кг LOS) для попередження та лікування ранніх кардіальних ускладнень при ЦД1, з метою протидії розвитку гіпертрофії міокарду і, як наслідку, діастолічної дисфункції, та зменшення ризику спонтанної зупинки серця.

ВИСНОВКИ

Гіперглікемія і викликана нею генерація активних форм кисню має важливе значення у розвитку ЦД та формуванню тяжких серцево-судинних ускладнень, що часто є причиною інвалідизації, погіршення якості та скорочення тривалості життя хворих. На даний момент існують схеми лікування серцево-судинних ускладнень при ЦД 2 типу. Зважаючи на значне прогресування ЦД1 та швидкий розвиток його кардіальних ускладнень, актуальним є питання створення схем для попередження і лікування кардіоміопатії при ЦД1. Корекція оксидативного стресу та блокування ефектів ангіотензину II є важливими ланками для реалізації кардіопротекторного впливу при ДК. Застосування N-ацетилцистеїну та лозартану є перспективним напрямком оптимізації лікарської терапії кардіальних порушень при ЦД1. Крім того, перспективним є комбіноване застосування лозартану із антиоксидантами, як N-ацетилцистеїн, з метою потенціювання кардіопротективного ефекту та оптимізації профілактики та лікування серцево-судинних ускладнень при ЦД1.

У дисертації наведено теоретичне обґрунтування та експериментальне вирішення актуальної задачі сучасної медицини - удосконалення фармакологічної кардіопротекції при ЦДІ із використанням N-ацетилцистеїну та лозартану.

1. За результатами порівняльної оцінки АОА виявлено, що N-ацетилцистеїн (серед групи антиоксидантів) та лозартан (серед групи АРА) виявили найбільшу активність в інгібуванні супероксидних радикалів *in vitro*. Встановлено, що N-ацетилцистеїн виявив виразну АОА (79,0%) у концентрації 10^{-6} моль/л. Лозартан виявляв помірну АОА (25,1%) за концентрації 10^{-3} моль/л. Квантово-хімічними аналізом встановлено, що антиоксидантні властивості лозартану пов'язані із локалізацією енергії вищої зайнятої молекулярної орбіталі гідроксиметильного бічного ланцюга. Антиоксидантна дія N-ацетилцистеїну пов'язана із невисоким значенням дипольного моменту та локалізацією енергії вищої зайнятої молекулярної орбіталі на сульфгідрильній групі.

2. При порівнянні дії N-ацетилцистеїну і лозартану за електрокардіографічними показниками, вуглеводного та енергетичного обміну, виявлено, що кардіопротекторна дія N-ацетилцистеїну у дозі 1500 мг/кг/добу проявлялась відновленням серцевого ритму (підвищення ЧСС на 16,2% порівняно до групи контрольної патології, $p < 0,05$), зменшенням проявів гіпертрофії міокарду (зменшення показнику МКМ на 21,5%, $p < 0,05$), що можливо пояснюється покращенням глікемічного контролю (зниження HbA1C в 1,3 рази, $p < 0,05$), пригніченням кардіодеструктивних процесів (зменшення активності ЛДГ в 3 рази, КФК - в 1,6 рази, $p < 0,05$). Кардіопротекторна дія лозартану у дозі 20 мг/кг/добу пов'язана із відновленням деполяризації і реполяризації міокарда (скорочення QTc на 18,9% порівняно до групи контрольної патології, $p < 0,05$), зменшенням кардіодеструктивних процесів (зниження активності ЛДГ в 3 рази, КФК-МВ – в 1,3 рази, $p < 0,05$).

3. Застосування N-ацетилцистеїну (1500 мг/кг/добу) та лозартану (20 мг/кг/добу) протягом 4 тижнів виявляло антирадикальний ефект у тканині аорти порівняно з щурами контрольної патології (за зниженням швидкості генерування супероксидного радикалу у 1,8-2,0 рази, $p < 0,05$). Застосування N-ацетилцистеїну виявило кращий ендотелієпротекторний ефект (рівень NO підвищувався в 1,4 рази у тканині аорти, $p < 0,05$). Застосування LOS сприяло перерозподілу мінорних жирних кислот (міристинової, пентадеканової, гептадеканової) в тканині міокарда, збільшувало вміст насичених жирних кислот у 2,7 рази ($p < 0,05$). Використання N-ацетилцистеїну сприяло достовірному збільшенню вмісту стеаринової кислоти (у 1,3 рази), порівняно з групою контрольної патології, що свідчить про мембранопротекторний вплив на кардіоміоцити. В групах N-ацетилцистеїну та лозартану знижувались процеси ліпопероксидації (за зменшенням вмісту ТБК-АП у 2,2 рази, $p < 0,05$), а система антиоксидантного захисту активувалась (за підвищенням вмісту відновленого глутатіону у 2,5 рази, $p < 0,05$).

4. Встановлено, що застосування N-ацетилцистеїну спричинювало підвищення активності матриксних металопротеїназ 2 та 9 типу (в 1,4 та 1,6 рази, $p < 0,05$), що протидіяло розвитку фіброзу міокарда. Антипроліферативна дія лозартану пов'язана із підвищенням активності матриксної металопротеїнази 9 типу в 1,5 рази ($p < 0,05$). Антипроліферативна дія NAC досягала за рахунок зменшення кількості

колагенових волокон, гальмування активності фібробластів на тлі активації аутофагальної системи (за даними електронно-мікроскопічних досліджень).

5. Виявлено ефективність комбінації N-ацетилцистеїну (750 мг/кг) та лозартану (2 мг/кг) при експериментальному ЦД1. Її застосування сприяло кращій виживаності експериментальних тварин (95%) за рахунок корекції оксидативного стресу, про що свідчать зменшення процесів ліпопероксидації (зменшення ТБК-АП на 52%), підвищення рівня відновленого глутатіону та активності СОД (на 60%), каталази (на 68%), покращення глікемічного контролю (зниження HbA1C на 30%, $p < 0,05$), підвищення стійкості мембран (збільшення відсоткового вмісту насичених жирних кислот в 1,4 разу, $p < 0,05$), зменшення активності КФК та КФК-МВ в 1,6 та 1,8 разу ($p < 0,05$), гальмування процесів гіпертрофії та фіброзу міокарда, запобігання ремоделювання (рівень експресії білку MMP-2 був на 33% нижчим порівняно до групи контрольної патології, $p < 0,05$), покращення регенеративних і трофічних процесів міокардіоцитів (за даними електронно-мікроскопічних досліджень).

6. Результати досліджень експериментально обґрунтовують перспективність подальшого клінічного вивчення N-ацетилцистеїну та лозартану, та їх комбінації у пацієнтів для попередження та лікування ранніх ускладнень діабетичної кардіоміопатії при ЦД1, в т.ч. з метою зменшення проявів кардіотоксичності (маркеру QTc).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Ситник І. М., Хайтович М. В. Застосування антиоксидантів за цукрового діабету І типу. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2015. № 6 (46). С. 3–11. (Особистий внесок: аналіз літератури, підготовка матеріалів до публікації).
2. Ситник І. М., Хайтович М. В., Черновол П. А. Антиоксидантна активність інгібіторів ангіотензину II та метаболітотропних кардіопротекторів за умов *in vitro* та *in silico*. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016. № 2 (48). С. 80–85. (Особистий внесок: аналіз літератури, дослідження антиоксидантної активності та квантово-хімічних розрахунків, підготовка матеріалів до публікації).
3. Ситник І. М., Хайтович М. В., Черновол Н. П. Вплив N-ацетилцистеїну та лозартану на ранні електрокардіографічні зміни у щурів із стрептозотоциновим цукровим діабетом 1 типу. *Український науково-медичний молодіжний журнал*. 2016. № 3 (96). С. 5–11. (Особистий внесок: аналіз літератури, реєстрації електрокардіограми, статистична обробка даних, підготовка матеріалів до публікації).
4. Ламазян Г. Р., Ситник І. М., Натрус Л. В., Брюзгіна Т. С., Черновол П. А., Рижко І. М. Дослідження механізмів антиоксидантного захисту плодів *Citrullus Colocynthis* та N-ацетилцистеїну на моделі цукрового діабету в щурів. *Запорозький медичний журнал*. 2016. № 5 (98). С. 69–77. (Особистий внесок: аналіз літератури, участь в експерименті, підготовка матеріалів до публікації).
5. Sytnyk I., Burlaka A., Vovk A., Khaitovych M. Study of superoxide- and NO-dependent protective mechanisms of N-acetylcysteine and losartan in rat's aorta and liver under streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Scientific Journal*

- «*ScienceRise: Pharmaceutical Science*». 2017. № 6 (10). Р. 25–31. (Особистий внесок: аналіз літератури, участь в експерименті, підготовка матеріалів до публікації).
6. Ситник І. М., Стеченко Л. О., Кривошеєва О. І., Натрус Л. В., Хайтович М. В. Вплив N-ацетилцистеїну та лозартану на модулювання цитопротекторної аутофагії в міокарді щурів при експериментальному цукровому діабеті 1 типу (за даними електронної мікроскопії). *Український науково-медичний молодіжний журнал*. 2017. № 2 (101). С. 25–32. (Особистий внесок: аналіз літератури, участь в експерименті, підготовка матеріалів до публікації).
 7. Ситник І. М., Шиш А. М., Хайтович М. В. Вплив N-ацетилцистеїну, лозартану та їх комбінації на активність матриксних металопротеїназ- 2 та -9 у щурів при експериментальному цукровому діабеті. *Развитие науки в XXI веке: материалы XXXI Международной научно-практической конференции*. г. Харьков, 17 января 2018 г. *Сборник статей научно-информационного центра «Знание»*. Х.: НИЦ «Знание», 2018. Ч. 2. С. 76–84.
 8. Хайтович М. В., Ситник І. М., Черновол П. А. Порівняльна оцінка антиоксидантної активності інгібіторів ангіотензину II та метаболітотропних кардіопротекторів за умов *in vitro* та *in silico*. *Інновації в медицині – здоров'я нації*: матеріали 7-го Міжнародного медичного форуму. м. Київ, 19-21 квітня 2016 р. Київ, 2016. С. 109.
 9. Хайтович М. В., Ситник І. М., Шаповалов В. В. Зміни електрокардіограми у щурів на ранній стадії стрептозотоцинового цукрового діабету. *Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції*: матеріали VII Національного конгресу патофізіологів України. м. Харків, 5-7 жовтня 2016 р. Х.: НФаУ, 2016. С. 254.
 10. Ситник І. М., Вовк А. В., Бачило Д. М. Вплив N-ацетилцистеїну та лозартану на стан антиоксидантного захисту міокарду щурів на ранній стадії цукрового діабету 1 типу. *Інновації та перспективи сучасної медицини*: матеріали IV Міжнародного медико-фармацевтичного конгресу студентів і молодих учених ВІМСО. м. Чернівці, 5-7 квітня 2017 р. *Хист*. 2017. Вип. 19. С. 487.
 11. Ситник І. М., Вовк А. В. Редокс-залежні механізми кардіопротекції при експериментальному цукровому діабеті 1 типу. *Трансфер медичних та стоматологічних технологій в охорону здоров'я України*: матеріали конференції. м. Київ, 27 квітня 2017 р. *Український науково-медичний молодіжний журнал*. 2017. Спец. випуск № 1 (100). С. 192.
 12. Хайтович М. В., Ситник І. М., Шиш А. М. Вплив сумісної дії N-ацетилцистеїну та лозартану на активність матриксних металопротеїназ- 2 та -9 у щурів при експериментальному цукровому діабеті. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція*: матеріали I Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю. м. Харків, 18 жовтня 2018 р. Х.: НФаУ, 2018. С. 249.
 13. Хайтович М. В., Ситник І. М. Доклінічна оцінка ефективності кардіопротекторних властивостей фармакологічних засобів за ранніми проявами діабетичної кардіоміопатії: інформ. лист про нововведення у сфері охорони здоров'я № 233 – 2017. Укрмедпатентінформ МОЗ України, 2017. 4 с.

(Особистий внесок: участь в експерименті, аналізі даних та підготовці листа до видання).

АНОТАЦІЯ

Ситник І.М. Фармакологічне обґрунтування застосування N-ацетилцистеїну та лозартану при кардіальних порушеннях цукрового діабету 1 типу – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2019.

Дисертація присвячена експериментальному обґрунтуванню доцільності застосування N-ацетилцистеїну та лозартану для фармакокорекції кардіальних ускладнень при цукровому діабеті 1 типу. За результатами дослідів *in vitro* визначено препарати-лідери за антиоксидантною активністю (N-ацетилцистеїн та лозартан) та визначено квантово-хімічні дескриптори *in silico*. Кардіопротекторна дія N-ацетилцистеїну (у дозах 1500 мг/кг) досягалась відновленням серцевого ритму, зменшенням проявів гіпертрофії, відновленням HbA1C, маркерів кардіодеструктивних процесів та цитолізу. Мембранопротективні властивості N-ацетилцистеїну пов'язані із перерозподілом стеаринової кислоти. N-ацетилцистеїн виявив кращий ендотеліепротективний ефект; запобігав ремоделюванню лівого шлуночка (зменшував експресію MMP-2). Ультраструктурними дослідженнями було підтверджено кардіопротекторну дію N-ацетилцистеїну на тлі активації аутофагії. Кардіопротекторна дія лозартану (у дозі 20 мг/кг) досягалася відновленням шлуночкової деполаризації та реполаризації, зменшенням активності КФК-МВ. Мембранопротективні властивості лозартану пов'язані із перерозподілом мінорних насичених жирних кислот. Антипроліферативна дія лозартану пов'язана зі збільшенням активності матриксної металопротеїнази 9 типу. Комбіноване застосування N-ацетилцистеїну у дозі 750 мг/кг та лозартану у дозі 2,0 мг/кг виявило виражений кардіопротекторний ефект, на що вказує відновлення показників загально-фізичного стану, нормалізація скорочувальної функції, зменшення проявів гіпертрофії та фіброзу, покращення енергетичних та трофічних властивостей міокарда.

Ключові слова: експериментальний цукровий діабет 1 типу, кардіопротекція, оксидативний стрес, антиоксидантна активність, N-ацетилцистеїн, лозартан.

АННОТАЦИЯ

Сытник И.Н. Фармакологическое обоснование применения N-ацетилцистеина и лозартана при кардиальных нарушениях сахарного диабета 1 типа. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 - фармакология. - Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2019.

Диссертация посвящена экспериментальному обоснованию целесообразности применения N-ацетилцистеина и лозартана для фармакокоррекции кардиальных

нарушений сахарного диабета 1 типа. По результатам опытов *in vitro* определено препараты-лидеры по антиоксидантной активности (N-ацетилцистеин и лозартан) и определены квантово-химические дескрипторы *in silico*. Кардиопротекторное действие N-ацетилцистеина (в дозах 1500 мг/кг) достигалась восстановлением сердечного ритма, уменьшением проявлений гипертрофии, восстановлением HbA1C, маркеров кардиодеструктивных процессов и цитолиза. Мембранопротекторные свойства N-ацетилцистеина связаны с перераспределением стеариновой кислоты. N-ацетилцистеин имел лучший эндотелиопротекторный эффект; предотвращал ремоделирование левого желудочка (уменьшал экспрессию MMP-2). Ультраструктурными исследованиями было подтверждено кардиопротекторное действие N-ацетилцистеина на фоне активации аутофагии. Кардиопротекторное действие лозартана (в дозе 20 мг/кг) достигалась восстановлением желудочковой деполяризации и реполяризации, уменьшением активности КФК-МВ. Мембранопротекторные свойства лозартана связаны с перераспределением минорных насыщенных жирных кислот. Антипролиферативное действие лозартана связано с увеличением активности матриксной металлопротеиназы 9 типа. Сочетанное применение N-ацетилцистеина в дозе 750 мг/кг и лозартана в дозе 2,0 мг/кг вызвало выраженный кардиопротекторный эффект, на что указывает восстановление показателей общего физического состояния, нормализация сократительной функции, уменьшение проявлений гипертрофии и фиброза, улучшение энергетических и трофических свойств миокарда.

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет 1 типа, кардиопротекция, оксидативный стресс, антиоксидантная активность, N-ацетилцистеин, лозартан.

SUMMARY

Sytnyk I.M. Pharmacological approach into administration of N-acetylcysteine and losartan in cardiac disorders of type 1 diabetes mellitus. – The manuscript.

The thesis for a Candidate of Pharmaceutical Sciences Degree by the speciality 14.03.05 – Pharmacology. – National University of Pharmacy of the Ministry of Healthcare of Ukraine, Kharkiv, 2019.

The dissertation deals with experimental studying of cardioprotective properties of N-acetylcysteine and losartan for pharmaco-correction of cardiac disorders in case of type 1 diabetes mellitus (DM1).

On the model of superoxide inhibition *in vitro* was fixed the highest antioxidant activity for N-acetylcysteine at 10^{-6} M (79%, $p < 0.01$). Among angiotensin II receptor blockers such activity was detected for losartan only and amounted to 22.51 % and 25.07 % at the concentration of 10^{-6} M and 10^{-3} M respectively ($p < 0.01$). The results *in vitro* were indicated drugs-leaders for the antioxidant activity (N-acetylcysteine and losartan). It was provided in-depth analysis of antioxidant activity of drugs-leaders due to quantum-chemical approach. The quantum-chemical descriptors of the antioxidant activity of N-acetylcysteine were made more exact (energy of highest occupied molecular orbital, -9,628 eV; dipolar moment, 2,663 debye). The pharmacophore group of molecule of losartan (hydroxymethyl side chain of imidazole ring) and

descriptors of its antioxidant activity (energy of highest occupied molecular orbital, 8,854 eV; ionization potential, -8,854 eV; hardness, η , 4,06 eV) were indicated.

Both N-acetylcysteine and losartan (at doses of 1500 mg/kg and 20 mg/kg, respectively) generally had a positive effect on myocardial function in streptozotocin DM1. The cardioprotective effect of N-acetylcysteine at a dose of 1500 mg/kg/day was shown by the restoration of the cardiac rhythm (elevation of heart rate by 16,2% compared to control pathology group), decreasing the manifestations of myocardial hypertrophy (reduce of heart-to-body weight ratio by 21.5%), which may be explained by improvements in glycemic control (1.3-fold and 4.7-fold reduction in HbA1C and glucose level respectively), decrease the cardiac damage markers (3.0-fold reduction in lactate dehydrogenase (LDH) activity as well as 1.6 –fold decrease in creatine phosphokinase (CPK) activity). Cardioprotective effect of losartan at a dose of 20 mg/kg/day was associated with restoration of myocardial repolarization (decrease in QTc interval by 18.9% compared to control pathology), a 3.0-fold decrease in cardiac damage markers, including 1.3-fold reduce of CPK-MB activity.

Administration of N-acetylcysteine (1500 mg/kg/day) and losartan (20 mg/kg/day) for 4 weeks showed the antiradical effects in the aortic tissue, the level of superoxide radicals decreased in 1.8-2.0 times less than in group of the control pathology respectively. The enhancement of NO level (1.4-fold increase) of aorta tissue in diabetic animals has pointed out the endothelial protection effect of N-acetylcysteine. The use of losartan have indicated membrane protective effects contributed to the redistribution of minor fatty acids (myristic, pentadecanoic and heptadecanoic acids) in myocardial tissue, increased the content of saturated fatty acids by 2.7 times more than in control pathology group. The use of N-acetylcysteine contributed to significant 1.3-fold increase in the stearic acid content compared with the control pathology group, indicating membrane-protective effects of cardiomyocytes. The lipoperoxidation processes were decreased by 2.2 times (by the content of tiobarbiturate-active products) along with 2.5-fold activation of the antioxidant defense system (by the content of reduced glutathione) in the N-acetylcysteine and losartan groups. It was found that N-acetylcysteine administration resulted in increase of the activity of matrix metalloproteinase type 2 and 9 in 1.4 and 1.6 times respectively, that inhibit the development of myocardial fibrosis. The antiproliferative effect of losartan was associated with an increase activity of matrix metalloproteinase type 9 by 1.5 times. The cardioprotective effect of N-acetylcysteine was realized through the restoration of the protein-synthetic processes in cardiomyocytes following the activation of the autophagal system (by methods of electron microscopy).

The combined administration of N-acetylcysteine at a dose of 750 mg/kg and losartan at a dose of 2.0 mg/kg/day caused the most significant cardioprotective effect in case of the streptozotocin-induced DM1. Their administration contributed to a better survival of experimental animals (95%) due to correction of oxidative stress, including decreased the content of lipoperoxidation products (decreased the content of tiobarbiturate-active products by 52%), increased levels of reduced glutathione and superoxide dismutase activity (by 60%), catalase (by 68%) as well as improvement in glycemic control (reduction in HbA1C by 30%) and energy processes in cardiomyocytes (increase in the percentage of saturated fatty acids in 1,4 times, decrease in the activity of CPK and CPK-MB in 1,6 and 1,8 times respectively), inhibition of hypertrophy and

myocardial fibrosis, prevention of remodeling (expression of MMP-2 was reduced by 33%) compared to the control pathology group, restoration regenerative and trophic processes of cardiomyocytes (by methods of electron microscopy).

The results of the manuscript experimentally provide evidence for further clinical research of N-acetylcysteine and losartan as well as their combination in patients for the prevention and treatment of early complications of diabetic cardiomyopathy in case of type 1 diabetes mellitus, including reduction of cardiotoxicity signs (by QTc marker).

Key words: experimental type 1 diabetes mellitus, cardioprotection, oxidative stress, antioxidant activity, N-acetylcysteine, losartan.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АОА	–	антиоксидантна активність;
АОС	–	антиоксидантна система;
АРА	–	антагоністи рецепторів до ангіотензину II;
ГЛТ	–	відновлений глутатіон;
ДК	–	діабетична кардіоміопатія;
ЖК	–	жирні кислоти;
КАТ	–	каталаза;
ЛОС	–	лозартан;
ММР-2	–	матриксна металопротеїназа 2 типу;
ММР-9	–	матриксна металопротеїназа 9 типу;
МКМ	–	масовий коефіцієнт міокарда;
НЖК	–	насичені ЖК;
ННЖК	–	ненасичені ЖК;
НАС	–	N-ацетилцистеїн;
ОС	–	оксидативний стрес;
ПНЖК	–	поліненасичені жирні кислоти;
СОД	–	супероксиддисмутаза;
СР	–	супероксидний радикал;
ТБК-АП	–	тіобарбітуратактивні продукти;
ЧСС	–	частота серцевих скорочень;
ЦД	–	цукровий діабет;
ЦД1	–	цукровий діабет 1-го типу;
8-охоG	–	8-оксогуанін.