
СПІВЗАСНОВНИКИ

Національна академія медичних наук України •
Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України» •
Державне підприємство «Державний експертний центр
Міністерства охорони здоров'я України» •
Всеукраїнська громадська організація «Асоціація фармакологів України»

ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ЛІКАРСЬКА ТОКСИКОЛОГІЯ PHARMACOLOGY AND DRUG TOXICOLOGY

Науково-практичне видання

Журнал заснований у серпні 2007 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

№ 4–5(50)/2016

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

- Бухтіарова Т. А., Губський Ю. І.* «Ліки-сироти» на основі нових молекулярних субстанцій, схвалені FDA у 2011–2015 роках (аналітичний огляд) 3
- Гладких Ф. В., Степанюк Н. Г.* Вінборон: перший український гастропротектор – агоніст ванілоїдних рецепторів (TRPV1) 20

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

- Каврайський Д. П., Штриголь С. Ю., Цивунін В. В., Георгіянц В. А.* Гостра токсичність та ефективність 1-(4-метоксифеніл)-5-{2-[4-(4-метоксифеніл)піперазин-1-іл]-2-оксоетил}-1,5-дигідро-4Н-піразоло[3,4-*D*]піридин-4-ону на моделі пентилентетразолового кіндлінгу в мишей 30
- Мироненко С. І., Піняжко О. Р., Лесик Р. Б.* Вплив оригінальних похідних 4-тіазолідинону: Les-1205 та Les-2658, леветирацетаму та діазепаму на поведінку умовно-рефлекторного активного уникнення в шурів 35
- Сліпченко Т. Д., Штриголь С. Ю., Кудіна О. В., Таран А. В., Рубан О. А.* Порівняльне доклінічне дослідження психотропних властивостей препаратів шоломниці байкальської 41

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

- Білай І. М., Цис О. В., Михайлюк Є. О., Коваленко С. І., Шабельник К. П.* Дослідження актопротекторної активності похідних 1,2,4-тріазолу в експерименті 50
- Дринь Д. О., Мельник М. І., Соловйов А. І., Прилуцький Ю. І., Жолос О. В.* Вуглецеві наночастинки як новітні блокатори мускаринових катіонних струмів у міоцитах тонкого кишечника 55
- Кононенко А. Г., Кравченко В. М.* Вплив спиртової настойки листеця ряски малої на морфофункціональний стан щитоподібної залози за експериментального гіпотиреозу 62
-

<i>Нагорна О. О., Горчакова Н. О., Бєленічев І. Ф., Чекман І. С.</i> Дія ірбесартану, квінаприлу, ангіоліну та їхніх комбінацій на систему оксиду азоту в міокарді щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією	70
<i>Павлов С. В., Левченко К. В.</i> Цитопротективні ефекти селективних модуляторів естрогенових рецепторів за умов гіпоксії кардіоміоцитів <i>in vitro</i>	78
<i>Фалюш О. А., Полякова Л. І., Сачинська О. В., Резніков О. Г.</i> Зміни епітеліально-стромального співвідношення у трансплантатах раку передміхурової залози людини при застосуванні наночастинок золота	84
РОЗРОБКА НОВИХ МЕТОДИЧНИХ ПРИЙОМІВ	
<i>Кравець Д. С., Лук'янчук В. Д.</i> Новий методичний підхід до оцінки впливу ліків на кінетику вільнорадикальних реакцій у біосубстратах	90
ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛОДИХ УЧЕНИХ	
<i>Садогурська К. В.</i> До питання безпечності нанохрому цитрату за умов повторного введення	95
ПИТАННЯ ФАРМАЦЕВТИКИ, ФАРМАЦЕВТИЧНОГО РИНКУ, ФАРМАКОЕКОНОМІКИ	
<i>Савіна Н. О., Кузнецова О. М., Черемєнко А. М., Брицун В. М., Останіна Н. В.</i> Дослідження кількісного вмісту та супровідних домішок цефепіму методом ВЕРХ	101
ОСОБИСТОСТІ	
До ювілею члена-кореспондента НАН і НАМН України, професора, доктора медичних наук, лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки Івана Сергійовича Чекмана	108
СОДЕРЖАНИЕ	111
CONTENT	112

С. В. Павлов, К. В. Левченко

Цитопротективні ефекти селективних модуляторів естрогенових рецепторів за умов гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro*

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: кардіоміоцити, гіпоксія *in vitro*, селективні модулятори естрогенових рецепторів

Захворюваність на ішемічну хворобу серця в Україні, зокрема на гострий інфаркт міокарда, неухильно зростає впродовж останніх років. За даними В. М. Коваленка частота ішемічної хвороби серця в структурі смертності в Україні становить близько 60 %, що дає підстави вважати розвиток та дестабілізацію цього захворювання провідною проблемою сучасної медицини. Щорічно в Україні реєструють 50 тисяч випадків інфаркту міокарда [1], з них вмирає 30 % пацієнтів, не дивлячись на те, що більшість з них отримували терапію. Тому вивчення та створення нових кардіопротективних лікарських засобів є актуальним [1, 2]. Сьогодні пошук нових кардіо- та нейропротекторів проводиться серед так званих «природних модуляторів», а саме нейроактивних стероїдних гормонів [3, 4]. Виявлення великої кількості естрогенових рецепторів у тканинах, які не є класичними мішенями естрогенів, причому в індивідів як жіночої, так і чоловічої статі, свідчить про те, що естрогени регулюють в організмі не тільки репродуктивні процеси [4–7]. Звертає увагу велика щільність естрогенових рецепторів обох типів (α та β типів) у серці, а також ендотелії коронарних судин [8]. Все це зумовлює перспективність подальшого вивчення кардіопротективних властивостей естрогенів. Однак впровадження в клініку естрогенів як кардіопротективних препаратів обмежується їхньою прямою гормональною активністю, а також неоднозначним впливом на систему згортання крові.

У зв'язку з цим перспективним видається застосування як агоністів

естрогенових рецепторів так званих селективних модуляторів естрогенових рецепторів (SERM). Селективні модулятори естрогенових рецепторів – хімічні сполуки з вибірковою, як естроген-агоністичним, так і естроген-антагоністичним впливом на різні органи та тканини, це залежить від дози та типу ER-рецепторів [7, 9, 10].

Мета дослідження – вивчення цитопротективної дії SERM за умов моделювання гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro*.

Матеріали та методи. Експериментальну частину виконано на статевозрілих білих нелінійних щурах-самцях масою 190–230 г, отриманих з ПП «Біомодельсервіс» (м. Київ). Усі маніпуляції з тваринами виконували під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг/кг внутрішньочеревинно) [11, 12]. Гіпоксію *in vitro* моделювали шляхом внесення в суспензію кардіоміоцитів роз'єднувача тканинкового дихання – 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (МФП) у концентрації 0,6 мкмоль/л. З цією метою подрібнені шматочки міокарда розміром 1–2 мм³ вносили в буферний розчин об'ємом 7 мл, який містить 0,3 моль/л сахарози, 250 мкмоль/л ЕДТА, 5 ммоль/л трис, рН 7,4; додавали 0,6 мкмоль/л МФП та інкубували – 120 хв при 20 °С. Досліджувані препарати – тамоксифену цитрат (серія № 52093Д) та референс-препарат – естрадіолу валерат (серія № EF3300) в інкубаційне середовище вносили в концентрації 10⁻⁷ моль/л. Кардіопротективні ефекти досліджуваних препаратів оцінювали за їхньою здатністю впливати на енергетичний метаболізм, зменшувати явища оксидативного стресу та вміст у суспензії кардіоміоцитів гомоцистеїну [11, 12].

Експериментальні серії суспензій:

- інтактна (інкубація суспензії кардіоміоцитів 120 хв без додавання МФП), (n = 10);
- контрольна (120-хв інкубація з МФП), (n = 10);
- МФП-гіпоксія + естрадіолу валерат (120-хв інкубація з МФП з додаванням 10^{-7} моль/л естрадіолу), (n = 10);
- МФП гіпоксія + тамоксифену цитрат (120-хв інкубація з МФП з додаванням 10^{-7} моль/л тамоксифену), (n = 10).

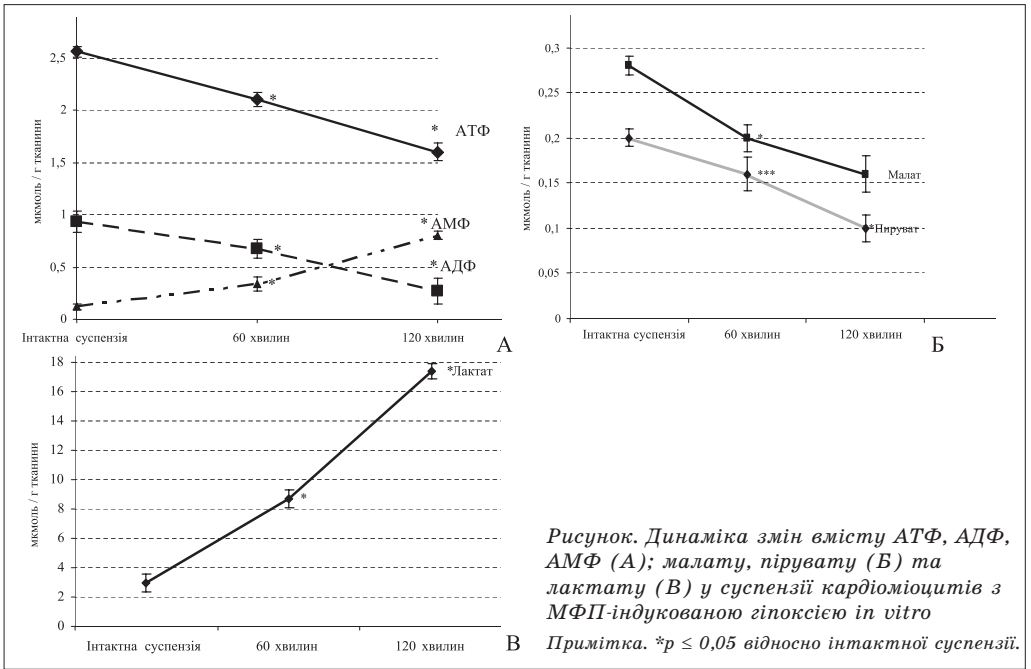
Стан енергетичного метаболізму визначали за рівнем макроергічних фосфатів (АТФ, АДФ, АМФ), а також лактату, малату та пірувату; інтенсивність оксидативного стресу оцінювали за допомогою імуоферментного визначення нітротирозину (НТЗ) та гомоцистеїну (ГЦ) [12].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Достовірність відмінностей проводили з використанням t-критерію Стьюдента [13].

Результати та їх обговорення. Розроблені натепер методи моделювання гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro* дозволяють отримати якісно нову та достовірну інформацію про стан кардіоміоцитів за умов патологічних процесів та

вплив на них медикаментозних препаратів, що досліджуються. З літературних джерел відомо, що модель МФП-індукованої гіпоксії відображає патологічні процеси в клітині, що відбуваються за умов ішемії *in vivo* [7, 12, 14].

Дійсно, внесення в інкубаційне середовище 0,6 мкмоль/л МФП призвело до каскаду патобіохімічних змін кардіоміоцитів, характерних для гіпоксичного пошкодження тканин. Так, на 120 хв МФП-індукованої гіпоксії було зареєстровано виражений енергодефіцит, який є невід'ємною частиною гіпоксії, оскільки виникає внаслідок порушення трофіки тканини [3]. Енергодефіцит проявлявся дисбалансом умісту в клітинах макроергічних фосфатів, а саме, статистично вірогідно зменшувалися концентрації АТФ та АДФ на тлі збільшення концентрації АМФ. Крім того, внаслідок гальмування аеробного окиснення виникла компенсаторна активація гліколізу та порушення функціонування циклу Кребса, що спричиняло значний перерозподіл його проміжних продуктів. Результатом цих процесів було значне падіння вмісту пірвиноградної кислоти та малату на тлі значного накопичення концентрації лактату, як «тупікового» продукту енергетичного метаболізму кардіоміоцитів (рисунок, А-В).



Для повноти уявлення про метаболічні порушення, що виникають у кардіоміоцитах за умов гіпоксії *in vitro*, було досліджено вміст деяких маркерів оксидативного стресу, а саме нітротирозину та гомоцистеїну. Проведені дослідження показали, що на 120 хв гіпоксії в кардіоміоцитах інтенсифікуються процеси вільнорадикального окиснення, внаслідок чого реєструвалося накопичення цито- та геномотоксичних маркерів окисного стресу – НТЗ та ГЦ (табл. 1).

Звертає увагу значне накопичення цитотоксичної сполуки – ГЦ (на 83 %), що відіграє провідну роль у порушенні енергопродукуючої функції мітохондрій, виснаженні енергетичних запасів клітини; призводить до посилення оксидативного пошкодження функціонально-активних білків [15, 16]. Дійсно, паралельно зі збільшенням вмісту ГЦ відбувалося значне підвищення вмісту маркера окисної деструкції білкових молекул – НТЗ (табл. 1), що є також однією з основних ланок розвитку енергодефіциту за гіпоксії, враховуючи те, що нітрозуючому стресу під-

давалися не тільки білки мембрани кардіоміоцитів та їхніх органел, але й білки дихального ланцюга мітохондрій.

Внесення до інкубаційного середовища тамоксифену (10^{-7} моль/л) та естрадіолу (10^{-7} моль/л) призводило до певного обмеження оксидативного стресу, що проявлялось у статистично вірогідному зменшенні концентрації як нітротирозину, так і гомоцистеїну. Дія досліджуваних препаратів була односпрямованою, однак, різного ступеня. Так, тамоксифен більш ефективно, ніж естрадіол впливав на вміст гомоцистеїну, зменшуючи його концентрацію на 76 та 65 % відповідно. Зменшення вмісту НТЗ у суспензії кардіоміоцитів за внесення тамоксифену та естрадіолу в середньому складало 50 %.

Встановлений вплив тамоксифену та естрадіолу на прояви оксидативного стресу певною мірою пояснює їхню здатність покращувати енергетичний метаболізм кардіоміоцитів за умов гіпоксичного пошкодження. Як видно з таблиці 2, естрадіол та, особливо, тамоксифен призводять до збільшення концентрації АТФ на 11 та 20 % відповідно, АДФ у

Таблиця 1

*Уміст нітротирозину та гомоцистеїну в кардіоміоцитах за умов МФП-індукованої гіпоксії *in vitro* та впливу тамоксифену (10^{-7} моль/л) та естрадіолу (10^{-7} моль/л), $M \pm m$, $n = 10$*

Суспензія кардіоміоцитів	Гомоцистеїн, ммоль/л	Нітротирозин, ум. од./г білка
Інтактна	0,81 ± 0,07	0,47 ± 0,02
Контрольна (МФП-гіпоксія)	4,76 ± 0,21	1,50 ± 0,21
МФП-гіпоксія + естрадіол	1,66 ± 0,18*	0,730 ± 0,036*
МФП-гіпоксія + тамоксифен	1,096 ± 0,014**	0,70 ± 0,04*

Примітка. Тут і в табл. 2: * $p \leq 0,05$ відносно контрольної суспензії; ** $p \leq 0,05$ відносно естрадіолу.

Таблиця 2

*Показники енергетичного метаболізму в кардіоміоцитах за умов МФП-індукованої гіпоксії *in vitro* та впливу тамоксифену (10^{-7} моль/л) та естрадіолу (10^{-7} моль/л), $M \pm m$, $n = 10$*

Показник	Контрольна суспензія (МФП)	МФП-гіпоксія + естрадіол	МФП-гіпоксія + тамоксифен
АТФ, мкмоль/г тканини	1,60 ± 0,07	1,80 ± 0,09*	2,0 ± 0,11**
АДФ, мкмоль/г тканини	0,30 ± 0,02	0,70 ± 0,04*	0,80 ± 0,03*
АМФ, мкмоль/г тканини	0,90 ± 0,025	0,60 ± 0,03*	0,40 ± 0,02**
Малат, мкмоль/г тканини	0,17 ± 0,02	0,21 ± 0,03*	0,25 ± 0,05**
Піруват, мкмоль/г тканини	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,04*	0,180 ± 0,015*
Лактат, мкмоль/г тканини	18,90 ± 1,56	11,50 ± 0,74*	8,56 ± 0,70**

середньому на 63 % та зменшення вмісту АМФ на 33 та 55 % відповідно. Важливо відзначити, що паралельно з відновленням внутрішньоклітинного балансу макроергів, досліджувані препарати достовірно підвищували кількість пірувату та малату на фоні зниження концентрації молочної кислоти (на 39 та 54 % відповідно), що обмежувало розвиток лактат-ацидозу за умов гіпоксії.

Таким чином, проведеними експериментами було встановлено кардіопротективну дію естрадіолу та селективного модулятора естрогенових рецепторів – тамоксифену цитрату за умов МФП-індукованої гіпоксії *in vitro*, що проявлялося їхньою здатністю обмежувати розвиток оксидативного стресу та нормалізувати енергетичний обмін клітин. На нашу думку, подібні ефекти досліджуваних препаратів реалізуються за рахунок, перш за все, їхньої прямої антиоксидантної дії [5, 6, 8]. По-друге, естрадіол та тамоксифену цитрат здатні впливати на експресію глобальних факторів транскрипції, зокрема AP-1, який є відповідальним за синтез ключових ензимів антиоксидантної та тіол-дисульфідної систем [5, 7, 14]. Крім того, досліджувані

препарати за рахунок геномних та позагеномних ефектів здатні збільшувати за умов гіпоксії вміст у клітинах факторів ендогенної цитопротекції, особливо HSP- та HIF-білків, що було показано нами в попередніх роботах [7, 14, 15, 17].

Встановлені нами кардіопротективні ефекти SERM обумовлюють перспективність подальших досліджень у цьому напрямі з метою впровадження даних препаратів у клінічну практику як кардіопротекторів.

Висновки

1. Встановлено цитопротективну дію естрадіолу та селективного модулятора естрогенових рецепторів – тамоксифену цитрату за умов МФП-індукованої гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro*, що проявлялося їхньою здатністю обмежувати розвиток оксидативного стресу та нормалізувати енергетичний обмін клітин.
2. Встановлені цитопротективні ефекти SERM обумовлюють перспективність подальших досліджень у цьому напрямі з метою впровадження даних препаратів у клінічну практику як кардіопротекторів.

1. Коваленко В. М. Хвороби системи кровообігу у структурі смертності населення України: міфи і реальність / В. М. Коваленко, Ю. М. Сіренко А. П. Дорогой // Матеріали XIV Національного конгресу кардіологів України. – Київ, 2013.
2. Красуля О. І. Дослідження сучасного стану надання лікарської допомоги хворим на інфаркт міокарда в країнах світу та в Україні / О. І. Красуля, А. А. Котвіцька, О. О. Суриков // Запорозький медичинський журнал. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 8–10.
3. Мойбенко О. О. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / О. О. Мойбенко, В. Э. Досенко, О. М. Пархоменко. – Киев : Наук. думка, 2008. – 520 с.
4. Шимановский Н. Л. Комплексное влияние женских половых гормонов на сердечно-сосудистую систему: польза и риск / Н. Л. Шимановский // Международный медицинский журнал. – 2007. – № 3. – С. 51–55.
5. Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies / J. L. Turgeon, M. C. Carr, P.M. Maki [et al.] // Endocrine reviews. – 2006. – V. 27. – P. 575–605.
6. The role of estrogen in cardiovascular disease / L. Baler, K. Meldrum, M. Wang [et al.] // J. Surg. Res. – 2003. – V. 115 (2). – P. 325–44.
7. Pavlov S. Molecular and Biochemical Aspects of the Neuroprotective Effect of the Selective Estrogen Receptor Modulator Tamoxifen in a Model of Acute Cerebral Ischemia / S. Pavlov, I. Belenichev // Neurochemical Journal. – 2014. – V. 8, № 1. – P. 28–32.
8. Беленичев И. Ф. Модуляторы эстрогеновых рецепторов – перспективные нейропротекторы / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, А. С. Красняк // Патология. – 2009. – Т. 6, № 2. – С. 11–13.
9. Токмаков А. А. Внегеномные механизмы действия прогестерона / А. А. Токмаков, Я. Фуками // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 5. – С. 403–416.
10. Harris H. A. Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, in estrogen target tissues *in vivo* through the use of an ERalpha-selective ligand / H. A. Harris, J. A., B. S. Katzenellenbogen // Endocrinology. – 2002. – № 143. – P. 4172–4177.
11. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації); за ред. О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.
12. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. – Киев : ДФЦ МЗ Украины, 2010. – 81 с.

13. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев : МОРИОН, 2002. – 640с.
14. The Neuroprotective Activity of Tamoxifen and Tibolone during Glutathione Depletion *in vitro* / I. Belenichev, O. Odnokoz, S. Pavlov [et al.] // *Neurochemical Journal*. – 2012. – V. 6, № 3. – P. 202–212.
15. Павлов С. В. Вплив тіольних антиоксидантів на розвиток мітохондріальної дисфункції при моделюванні гострої ішемії головного мозку / С. В. Павлов // *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. – 2013. – № 1 (18). – С. 112–115.
16. Giulivi C. Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by protease / C. Giulivi, V. J. Davies // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 12, № 11. – P. 8759–8762.
17. Беленичев И. Ф. Нейропротективная активность модуляторов эстрогеновых рецепторов при депривации системы глутатиона *in vitro* / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов // *Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти*. – 2010. – Т. 6, № 1. – С. 12–17.

С. В. Павлов, К. В. Левченко

Цитопротективні ефекти селективних модуляторів естрогенових рецепторів за умов гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro*

Сьогодні пошук нових кардіо- та нейропротекторів проводиться серед так званих «природних модуляторів», а саме нейроактивних стероїдних гормонів. Виявлення великої кількості естрогенових рецепторів у тканинах, які не є класичними мішенями естрогенів, причому в індивідів як жіночої, так і чоловічої статі, свідчить про те, що естрогени регулюють в організмі не тільки репродуктивні процеси. У зв'язку з цим перспективним напрямом є застосування як агоністів естрогенових рецепторів так званих селективних модуляторів естрогенових рецепторів (SERM).

Мета дослідження – вивчення цитопротективної дії SERM за умов моделювання гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro*.

Експериментальну частину виконано на статтевозрілих білих нелінійних щурах – самцях масою 190–230 г. Гіпоксію *in vitro* моделювали шляхом внесення в суспензію кардіоміоцитів роз'єднувача тканевого дихання – 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (МФП) у концентрації 0,6 мкмоль/л. Час інкубації – 120 хв. Досліджувані препарати (тамоксифену цитрат та референс-препарат – естрадіолу валерат) в інкубаційне середовище вносили в концентрації 10^{-7} моль/л. Кардіопротективні ефекти досліджуваних препаратів оцінювали за їхньою здатністю впливати на енергетичний метаболізм; зменшувати явища оксидативного стресу.

Внесення в інкубаційне середовище 0,6 мкмоль/л МФП призвело до каскаду патобіохімічних змін кардіоміоцитів, характерних для гіпоксичного пошкодження тканин. Так, на 120 хв МФП-індукованої гіпоксії було зареєстровано виражений енергодефіцит, який проявлявся дисбалансом умісту в клітинах макроергічних фосфатів, а саме, статистично вірогідно зменшувалися концентрації АТФ та АДФ на тлі збільшення концентрації АМФ. Паралельно з цим на 120 хв гіпоксії в кардіоміоцитах інтенсифікувалися процеси вільнорадикального окиснення, внаслідок чого реєструвалося накопичення цито- та геномотоксичних маркерів окисного стресу – нітротирозину (НТЗ) та гомоцистеїну. Внесення до суспензій кардіоміоцитів з моделлю гіпоксії *in vitro* тамоксифену (10^{-7} моль/л) та естрадіолу (10^{-7} моль/л) призводило до певного обмеження оксидативного стресу, що проявлялося в статистично вірогідному зменшенні концентрації як нітротирозину, так і гомоцистеїну. Дія досліджуваних препаратів була односпрямованою, однак різного ступеня. Так, тамоксифен більш ефективно ніж естрадіол впливав на вміст гомоцистеїну, зменшуючи його концентрацію на 76 та 65 % відповідно. Зменшення НТЗ у суспензії кардіоміоцитів з внесенням тамоксифену та естрадіолу в середньому складало 50 %. За рахунок високої антиоксидантної активності досліджувані препарати покращували енергообмін клітини, збільшуючи вміст у суспензії кардіоміоцитів АТФ, АДФ та зменшуючи вміст АМФ.

Встановлені цитопротективні ефекти тамоксифену цитрату та естрадіолу валерату є експериментальним обґрунтуванням актуальності та перспективності подальших досліджень у цьому напрямі.

Ключові слова: кардіоміоцити, гіпоксія *in vitro*, селективні модулятори естрогенових рецепторів

С. В. Павлов, Е. В. Левченко

Цитопротективные эффекты селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов в условиях гипоксии кардиомиоцитов *in vitro*

На сегодняшний день поиск новых кардио- и нейропротекторов проводится среди так называемых «природных модуляторов», а именно нейроактивных стероидных гормонов. Обнаружение большого количества эстрогеновых рецепторов в тканях, которые не являются классическими мишенями эстрогенов, причем у индивидов как женского, так и мужского пола, свидетельствуют о том, что эстрогены регулируют в организме не только репродуктивные процессы. В связи с этим, перспективным направлением является применение в качестве агонистов эстрогеновых рецепторов так называемых селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов (SERM).

Цель исследования – изучение цитопротективных свойств SERM в условиях моделирования гипоксии кардиомиоцитов *in vitro*.

Экспериментальная часть выполнена на половозрелых белых нелинейных крысах-самцах массой 190–230 г. Гипоксию *in vitro* моделировали путем внесения в суспензию кардиомиоцитов разоб-

шителя тканевого дыхания – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФП) в концентрации 0,6 мкмоль/л. Время инкубации – 120 мин. Исследуемые препараты (тамоксифена цитрат и референс-препарат эстрадиола валерат) в инкубационную среду вносили в концентрации 10^{-7} моль/л. Кардиопротективные эффекты исследуемых препаратов оценивали по их способности влиять на энергетический метаболизм; уменьшать явления оксидативного стресса.

Внесение в инкубационную среду 0,6 мкмоль/л МФП приводило к каскаду патобиохимических изменений кардиомиоцитов, характерных для гипоксического повреждения тканей. Так, на 120 мин МФП-индуцированной гипоксии был зарегистрирован выраженный энергодефицит, который проявлялся дисбалансом содержания в клетках макроэргических фосфатов, а именно, статистически достоверно уменьшались концентрации АТФ и АДФ на фоне увеличения концентрации АМФ. Параллельно с этим, на 120 мин гипоксии в кардиомиоцитах интенсифицировались процессы свободнорадикального окисления, в результате чего регистрировалось накопление цито- и геномотоксичных маркеров окислительного стресса – нитротирозина (НТЗ) и гомоцистеина. Внесение в суспензию кардиомиоцитов с моделью гипоксии *in vitro* тамоксифена (10^{-7} моль/л) и эстрадиола (10^{-7} моль/л) приводило к определенному ограничению оксидативного стресса, что проявлялось в статистически достоверном уменьшении концентрации как нитротирозина, так и гомоцистеина. Действие исследуемых препаратов было однонаправленным, однако выражено в различной степени. Так, тамоксифен эффективнее, чем эстрадиол влиял на содержание гомоцистеина, уменьшая его концентрацию на 76 и 65% соответственно. Уменьшение НТЗ в суспензии кардиомиоцитов с внесением тамоксифена и эстрадиола в среднем составляло 50%. За счет высокой антиоксидантной активности исследуемые препараты улучшали энергообмен клетки, увеличивая содержание в суспензии кардиомиоцитов АТФ, АДФ и уменьшая содержание АМФ. Установленные цитопротекторные эффекты тамоксифена цитрата и эстрадиола валерата являются экспериментальным обоснованием актуальности и перспективности дальнейших исследований в этом направлении.

Ключевые слова: кардиомиоциты, гипоксия *in vitro*, селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов

S. V. Pavlov, K. V. Levchenko

Cytoprotective effects of selective modulators of estrogen receptors in hypoxia of cardiomyocytes *in vitro*

Today, the search of new cardio- and neuroprotectors are held among the so-called «natural modulators», namely neuroactive steroid hormones. Detection of a large number of estrogen receptors in tissues that are not classic targets of estrogen in individuals both female and male, indicates that estrogens regulate not only the reproductive processes in the body. The use of so-called selective estrogen receptor modulators (SERM) as agonists of estrogen receptors is an interesting direction.

The aim of research is to study the cytoprotective action of SERM on the cardiomyocytes' hypoxia model *in vitro*.

Experimental part was made on nonlinear mature white rats – males weighing 190–230 g. Hypoxia *in vitro* was modeled by introducing into the suspension of the cardiomyocytes of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MFD) at a concentration of 0,6 mM as tissue respiration uncoupler. Incubation time was 120 min. The studied drugs (tamoxifen citrate and reference-drug estradiol valeras) were added to the incubation medium at a concentration of 10^{-7} M. Cardioprotective effects of studied drugs were evaluated for their ability to influence on energy metabolism; to reduce the effects of oxidative stress.

Adding 0,6 mM of MFD to the incubation medium has led to a cascade of pathobiochemical changes of cardiomyocytes characteristic for hypoxic tissue damage. Thus, for 120 min of hypoxia-induced MFD were registered the pronounced energy deficit which expressed by imbalance of macroergic phosphates content in the cells, namely statistically significant decrease in the concentration of ATP and ADP against the background of increasing of AMP concentration. Parallel to this in 120 min of hypoxia the processes of free radical oxidation were intensified in cardiomyocytes, therefore, the accumulation of cyto- and genotoxic markers (nitrotyrosine and homocysteine) of oxidative stress were recorded. Adding of tamoxifen (10^{-7} M) and estradiol (10^{-7} M) to the cardiomyocytes suspension with modeling of hypoxia *in vitro* has resulted in some extent the limitation of oxidative stress, which manifested in a statistically significant decrease of nitrotyrosine and homocysteine concentrations. Action of studied drugs was unidirectional, but with different degree of action. So, tamoxifen better than estradiol affects to the content of homocysteine, reducing its concentration respectively to 76 and 65%. The reduction of nitrotyrosine in suspension of cardiomyocytes with the introduction of tamoxifen and estradiol averaged 50%. Due to the high antioxidant activity studied drugs have improved the energy exchange of cells, increasing the content of ATP, ADP in cardiomyocytes suspension and reducing AMP content. Determined effects of tamoxifen citrate and estradiol valeras are an experimental substantiation of relevance and perceptivity for further research in this area.

Key words: cardiomyocytes hypoxia *in vitro*, selective estrogen receptor modulators

Надійшла: 29 червня 2016 р.

Контактна особа: Павлов Сергій Васильович, доктор біологічних наук, доцент, кафедра клінічної лабораторної діагностики, Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: +38 0 97 797 08 84. Електронна пошта: zsmu.smu@yandex.ua.