

2-ЭТИЛТИОБЕНЗИМИДАЗОЛА ГИДРОБРОМИД ПРЕДУПРЕЖДАЕТ СНИЖЕНИЕ ТОНУСА КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ И СОКРАТИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ МИОКАРДА У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

ЛАЗУКО С.С.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2021. – Том 20, №5. – С. 23-33.

2-ETHYLTHIOBENZIMIDAZOLE HYDROBROMIDE PREVENTS A DECREASE IN CORONARY VASCULAR TONE AND MYOCARDIAL CONTRACTILITY IN RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

LAZUKO S.S.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2021;20(5):23-33.

Резюме.

Цель исследования – оценить возможность предупреждения нарушений тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, вызванные сахарным диабетом, с помощью 2-этилтиобензимидазола гидробромида. Материал и методы. Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда исследовали на изолированных по методу Лангендорфа сердцах. Блокаду iNOS осуществляли S-метилизотиомочевинной (S-MT, 10^{-6} М). Сахарный диабет у крыс моделировали с помощью однократного внутрибрюшинного введения стрептозоцина (50 мг/кг). 2-этилтиобензимидазола гидробромида (2-ЭТГ) вводили внутрибрюшинно в дозе 3 мг/кг.

Концентрацию стабильных продуктов деградации NO ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$), супероксиддисмутазы, каталазы, диеновых конъюгатов и малонового диальдегида определяли спектрофотометрическим методом. Содержание индуцибельной и эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), интерлейкина 1 β , C-реактивного белка определяли иммуноферментным методом.

Результаты. В сердцах животных группы «2-ЭТГ+Сахарный диабет» не наблюдалось изменения коронарного перфузионного давления и развиваемого внутрижелудочкового давления до и после использования высокоселективного блокатора iNOS S-MT. В сыворотке крови этих животных наблюдалось увеличение концентрации eNOS, на фоне снижения iNOS, определялось снижение концентрации продуктов перекисного окисления липидов на фоне увеличения активности антиоксидантной системы и уменьшения системного воспаления.

Заключение. Внутрибрюшинное введение 2-этилтиобензимидазола гидробромида предотвращает снижение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, вызванное гиперпродукцией монооксида азота индуцибельной NO-синтазы при сахарном диабете. Этот эффект 2-этилтиобензимидазола гидробромида ассоциирован: с ограничением развития окислительного стресса; с ограничением нитрозативного стресса и со снижением концентрации маркеров воспаления.

Ключевые слова: 2-этилтиобензимидазола гидробромида, индуцибельная NO-синтаза, сахарный диабет, тонус коронарных сосудов.

Abstract.

Objectives. To assess the possibility of preventing the disturbances of coronary vascular tone and myocardial contractile function caused by diabetes mellitus with the help of 2-ethylthio benzimidazole hydrobromide.

Material and methods. Coronary vascular tone and myocardial contractile function were studied on preparations of

rat hearts isolated by the Langendorff method. The iNOS blockade was carried out with S-methylisothiourea (S-MT, 10^{-6} M). Diabetes mellitus in rats was modelled by means of a single intraperitoneal injection of streptozocin (50 mg / kg). 2-ethylthiobenzimidazole hydrobromide (2-ETG) was injected intraperitoneally at a dose of 3 mg / kg. The concentration of stable degradation products of NO ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$), superoxide dismutase, catalase, diene conjugates and malondialdehyde in the left ventricular homogenate was determined by spectrophotometric method. The content of inducible and endothelial NO-synthases (eNOS), interleukin 1β , C-reactive protein in the blood serum of experimental animals was determined by enzyme immunoassay.

Results. In the hearts of «2-ETG + Diabetes mellitus» animal group no changes in the coronary perfusion pressure and developed intraventricular pressure were observed before and after the use of the highly selective iNOS blocker S-methylisothiourea. In the blood serum of these animals group, an increase in the concentration of eNOS was observed, against the background of a decrease in the accumulation of iNOS, a decrease in the concentration of lipid peroxidation products was determined against the background of an increase in the activity of the antioxidant system and a decrease of systemic inflammation.

Conclusions. Intraperitoneal injection of 2-ethylthiobenzimidazole hydrobromide prevents a decrease in coronary vascular tone and myocardial contractile function caused by hyperproduction of nitrogen monoxide of inducible NO-synthase in diabetes mellitus. This effect of 2-ethylthiobenzimidazole hydrobromide is associated with: limiting the formation of oxidative stress; limiting the nitrosative stress; the decrease in the concentration of inflammatory markers.

Key words: 2-ethylthiobenzimidazole hydrobromide, inducible NO-synthase, diabetes mellitus, coronary vascular tone.

По данным Всемирной организации здравоохранения число страдающих диабетом в мире за последние 40 лет выросло в четыре раза. Это единственное серьезное неинфекционное заболевание, при котором риск преждевременной смерти не снижается, а возрастает. Преждевременная смертность, вызванная сахарным диабетом, ассоциирована с «катастрофами» сердечно-сосудистой системы. Патогенез развития сосудистых осложнений, способы их профилактики и лечения активно изучаются. Известно, что при сахарном диабете прогрессирует окислительный и нитрозилирующий стресс, нарушается биодоступность монооксида азота, усиливается образование провоспалительных агентов [1], что неизбежно приводит к развитию дисфункции эндотелия. В частности, она характеризуется снижением экспрессии гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) при увеличении индуцибельной NO-синтазы (iNOS) во многих типах клеток, в том числе в кардиомиоцитах [2], гладких миоцитах [3] и эндотелии кровеносных сосудов [3].

В последнее десятилетие с целью профилактики диабетических сосудистых осложнений используются новые классы препаратов с плейотропным действием. Помимо традиционно используемых вазоактивных веществ, в поле зрения находятся производные бензимидазола. Производные бензимидазола представляют собой универсальные азотсодержащие гетероциклические соединения, которые давно известны как перспективный класс биологически активных со-

единений, обладающих широким спектром биологической и фармакологической активностью, такой как антиоксидантная, противовоспалительная, антидиабетическая и др. [4, 5]. В то же время, сведений о регуляции тонуса коронарных сосудов при сахарном диабете, развивающемся на фоне использования производных бензимидазола, не достаточно. В связи с этим цель исследования – оценить возможность предупреждения нарушений тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, вызванные сахарным диабетом, с помощью 2-этилтиобензимидазола гидробромида.

Материал и методы

Исследование проводили на неимбредных белых крысах-самках (*Rattus Muridae*) массой 180 - 240 г, содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом и водно-солевом режиме, в соответствии с требованиями Council for International Organizations of Medical Sciences CIOMS и International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990). Протокол проведения экспериментов был утвержден Комиссией по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными ВГМУ.

Экспериментальных животных распределяли в группы: 1-ая группа – интактные животные (животные, с которыми не проводили манипуля-

ций) (n=8); 2-ая группа – контрольные животные, которым в течение 17 дней внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в объеме 0,2 мл – «Контроль» (n=10); 3-я – группа «Сахарный диабет» (n=8); 4-ая животные, которым в течение 17 дней внутрибрюшинно вводили 2-этилтиобензимидазола гидробромид в дозе 3 мг/кг массы тела животного в эквивалентном объеме – «2-ЭТГ» (n=10); 5-ая – группа животных, которым за три дня до моделирования и в течение моделирования 14-дневного стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета внутрибрюшинно вводили 2-этилтиобензимидазола гидробромид 3 мг/кг, содержащийся в 0,2 мл физиологического раствора – «2-ЭТГ+Сахарный диабет» (n=9). Сахарный диабет у крыс моделировали с помощью однократного внутрибрюшинного введения стрептозоцина (50 мг/кг), разведенного в цитратном буфере (рН 4,5). Концентрацию глюкозы в крови хвостовой вены определяли при помощи глюкометра Finetest (Корея); концентрацию глюкозы в моче – Глюко-Альбу-рН-Уротестом УП «Унитехпром БГУ». Через 14 дней после введения стрептозоцина крыс с уровнем глюкозы в крови выше 20 ммоль/л и глюкозурией брали в эксперимент. Протокол-дизайн эксперимента

представлен на рисунке 1.

Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах сердец крыс, изолированных по методу Лангендорфа. Сердце помещали в установку для перфузии изолированного сердца мелких лабораторных животных ИИ-SR типа 844/1 (HSE-НА, ФРГ), оборудованную датчиками для измерения аортального и развиваемого внутрижелудочкового давления (Isotec pressure transducer). Датчики были соединены с модулями для измерения давления ТАМ-А, HSE-НА. Компьютерную регистрацию и обработку измеряемых показателей осуществляли с помощью программы ACAD (HSE, ФРГ). Сокращающееся в изометрическом режиме сердце перфузировали раствором Кребса-Хензелята стандартного состава в условиях постоянного потока при объемной скорости коронарного потока (ОСКП), составлявшей 6, 8, 10, 15 мл/мин. При каждой величине коронарного потока регистрировали коронарное перфузионное давление (КПД). Развиваемое внутрижелудочковое давление (РВД) регистрировали при помощи латексного баллончика постоянного объема, находящегося в левом желудочке. Вклад iNOS в механизмы регуляции тонуса сосудов сердца и его сократи-

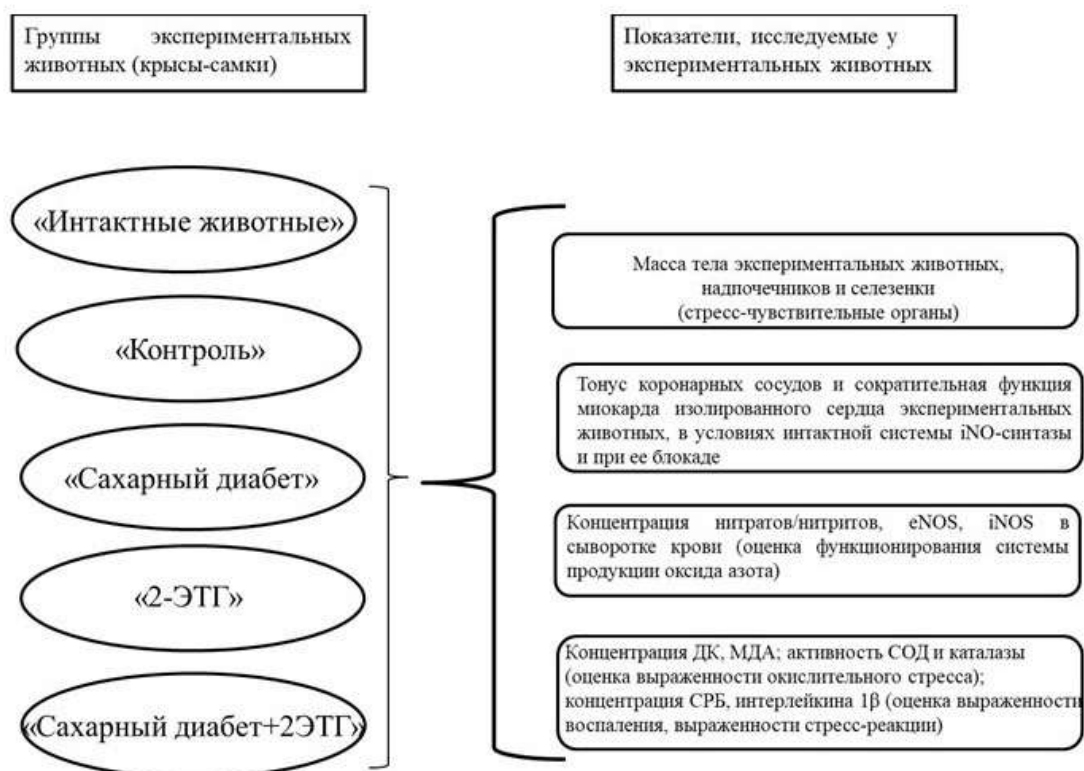


Рисунок 1 – Протокол-дизайн эксперимента.

тельной активности изучали, используя высокоселективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевину (S-MT, Sigma, USA) так, чтобы его конечная концентрация в перфузионном растворе составляла 10^{-6} М. Вещества, добавляемые в раствор Кребса-Хензелята при перфузии изолированного сердца представлены в таблице 1.

У наркотизированных уретаном животных извлекали надпочечники и селезенку. Далее органы помещали на титровальную бумагу и аккуратно освобождали от окружающих тканей. Взвешивание органов проводили на торсионных весах (Techniprot WT 400 mg, Польша). Относительную массу органов рассчитывали как отношение абсолютной массы органа на 100 г массы животного и выражали в мг/100 г.

Концентрацию ферментов iNOS и eNOS и интерлейкина 1β (ИЛ- 1β) определяли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя тест-системы (табл. 2).

Содержание С-реактивного белка в сыворотке крови определяли иммунотурбидиметрическим методом при использовании диагностического набора C-Reactive Protein (CRP), BioSystems (Испания) по инструкции производителя. Содержание С-реактивного белка выражали в мг/л. Концентрацию стабильных продуктов деградации NO ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) определяли в сыворотке крови спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса при длине волны 540 нм [6]. Об активации перекисного окисления

липидов в миокарде судили по накоплению в нем диеновых конъюгатов и малонового диальдегида [7-9]. Об антиоксидантной активности (АОА) (супероксиддисмутазы и каталазы) косвенно судили по их концентрации в гомогенатах левого желудочка, методики описаны ранее [10].

Содержание гликированного гемоглобина в крови определяли методом быстрого разделения гемолизата на ионообменной смоле при помощи набора реагентов для определения гликированного гемоглобина «Анализ плюс».

При изучении тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда в группах «Интактные животные» и «Контроль» показатели коронарного перфузионного давления, развиваемого внутрижелудочкового давления, а также скорость сокращения и расслабления левого желудочка между группами не различались. Поскольку различий в изучаемых показателях между группами «Интактные животные» и «Контроль» не наблюдалось, сравнение будем проводить с группой контрольных животных.

Сравнение показателей между группами осуществляли, используя пакет статистических программ «STATISTICA 10.0» и «MS Excel». Количественные показатели выражали как медиана (Me), интерквартильный интервал [25%; 75%]. Статистически достоверными различиями в сравнении с контрольной группой считали по критерию Манна-Уитни (U) (для несвязанных выборок) и Уилкоксона (W) (для связанных выборок) при $p \leq 0,05$.

Таблица 1 – Вещества, добавляемые в раствор Кребса-Хензелята при перфузии изолированного сердца

Группа животных	Вещества, добавляемые в раствор Кребса-Хензелята	
	Без блокатора	С блокатором
Контроль (n=10)	–	S-метилизотиомочевина
Сахарный диабет (n=8)	–	S-метилизотиомочевина
2-ЭТГ (n=10)	–	S-метилизотиомочевина
2-ЭТГ+сахарный диабет (n=9)	–	S-метилизотиомочевина

Таблица 2 – Характеристика исследуемых наборов для ИФА

Определяемое вещество	Производитель, наименование набора	Минимальная определяемая концентрация
eNOS	Cloud-Clone Corp. USA, Usn, Life Science Inc., Lot L141013209	0,65 пг/мл
iNOS	Usn, Life Science Inc. China, Lot L130827587	0,78 пг/мл
ИЛ- 1β	Thermo Scientific, USA, Lot LD145322	≤ 1 пг/мл

Результаты

В группе животных «Сахарный диабет» определялось увеличение относительной массы надпочечников на 70%, и снижение относительной массы селезенки на 23% ($p < 0,05$, для сравнения в контрольной группе животных относительная масса надпочечников составляла 20,79 мг, селезенки – 553,75 мг на 100 г массы тела животного). В группе животных «2-ЭТГ» как относительная масса надпочечников, так и относительная масса селезенки не отличались от контрольных показателей. Относительная масса надпочечников в группе животных «2-ЭТГ+Сахарный диабет» не отличалась от контрольных значений и составляла 22,3 мг/100 г, а относительная масса селезенки снижалась на 25% ($p < 0,05$, в сравнении с контрольными значениями). Таким образом, предварительное использование 2-ЭТГ частично предупреждало вызванное стойкой гипергликемией увеличение относительной массы стресс-реагирующих органов, в частности надпочечников.

В крови животных группы «Сахарный диабет» уровень глюкозы крови составлял более 20 ммоль/л, наблюдались глюкозурия и кетонурия (для сравнения, уровень глюкозы крови контрольных животных – 5,7 (5,8;5,0) ммоль/л). Концентрация глюкозы в крови животных группы «2-ЭТГ» статистически достоверно не отличалась от показателей контрольной группы животных и составляла 5,0 (4,8;5,1) ммоль/л. В группе животных с сахарным диабетом, развивающимся на фоне внутрибрюшинного введения 2-ЭТГ, уровень глюкозы крови составлял 12,3 (12,5;10,2) ммоль/л ($p < 0,05$, по сравнению с группой «Контроль» и с группой «Сахарный диабет»), определялась глюкозурия. В группах «Сахарный диабет» и «2-ЭТГ+Сахарный диабет» выявлялось снижение массы тела крыс на 19% ($p < 0,05$, в сравнении с контролем) и 10% ($p < 0,05$, в сравнении с группой «Контроль» и «Сахарный диабет») соответственно. Выживаемость животных с экспериментальным сахарным диабетом и с сахарным диабетом, воспроизводимым на фоне внутрибрюшинного введения 2-ЭТГ, составляла 70 и 100%, соответственно.

При сахарном диабете в крови экспериментальных животных определялось повышение содержания гликированного гемоглобина до 5,4% ($p < 0,05$, в контрольной группе животных этот показатель составлял 2,6%). В крови животных

группы «2-ЭТГ» уровень гликированного гемоглобина не отличался от контрольных значений и составлял 2,2%. При экспериментальном сахарном диабете, воспроизводимым на фоне внутрибрюшинного введения 2-ЭТГ, уровень гликированного гемоглобина крови составлял 4% ($p < 0,05$, сравнение с контролем, а также статистически значимо не отличался от значений гликированного гемоглобина группы «Сахарный диабет»). Обнаруженная нами тенденция к снижению содержания гликированного гемоглобина в крови животных группы «2-ЭТГ+Сахарный диабет» может быть обусловлена способностью производных бензимидазола ингибировать образование конечных продуктов гликирования [11].

В сердцах контрольных животных ступенчатое повышение ОСКП приводило к закономерному увеличению коронарного перфузионного давления на 35% – при увеличении ОСКП от 6 до 8 мл/мин, на 42% – при ее увеличении от 8 до 10 мл/мин, и на 68% при увеличении ОСКП от 10 до 15 мл/мин, что свидетельствует о повышении тонуса сосудов сердца (табл. 3).

В сердцах, изолированных из организмов крыс с сахарным диабетом, наблюдалось снижение коронарного перфузионного давления при ОСКП, равной 8, 10 и 15 мл/мин на 12, 16 и 21% соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с группой «Контроль», табл. 3). При этом развиваемое внутрижелудочковое давление при всех уровнях ОСКП снижалось в среднем на 26% ($p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой животных), наряду со снижением первой производной $+dP/dt$ в среднем на 34%, и $-dP/dt$ в среднем на 29% ($p < 0,05$, по сравнению с контролем) [12]. Эти данные указывают на снижение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда у крыс с сахарным диабетом.

В изолированных сердцах, выделенных из организмов крыс, которым внутрибрюшинно вводили 2-ЭТГ, наблюдалось увеличение коронарного перфузионного давления в диапазоне ОСКП от 6 до 15 мл/мин в среднем на 49%, данные были сопоставимы со значениями контрольной группы животных (табл. 3). Развиваемое внутрижелудочковое давление, так же, как и скорость сокращения и расслабления миокарда, не отличались от контрольных показателей.

В изолированных сердцах, выделенных из организмов животных с экспериментальным сахарным диабетом, воспроизводимым на фоне внутрибрюшинного введения 2-ЭТГ, ступенчатое

Таблица 3 – Изменение коронарного перфузионного давления (КПД) у крыс с сахарным диабетом и диабетом, развивающимся на фоне внутрибрюшинного введения 2- этилтиобензимидазола гидробромида (2-ЭТГ)

Группы экспериментальных животных	Показатель	Объемная скорость коронарного потока, мл/мин			
		6 мл/мин	8 мл/мин	10 мл/мин	15 мл/мин
Интактные (n=8)	Медиана, %	36,5	55,0	70,0	130,0
	Размах (Min-Max), %	33,0-54,0	47,0-60,0	55,0-120,0	81,0-166,0
	95% ДИ для медианы, %	35,0-40,0	47,0-56,0	59,0-73,0	114,0-136,0
	25-75 перцентиль, %	33,0;43,0	47,0;62,0	68,0;80,0	155,0;130,0
Контроль (n=10)	Медиана, %	41,0	56,0	74,0	125,0
	Размах (Min-Max), %	33,0-54,0	46,0-66,0	65,0-85,0	110,0-135,0
	95% ДИ для медианы, %	36,0-41,0	47,0-56,0	57,0-74,0	118,0-131,0
	25-75 перцентиль, %	35,0;44,0	48,0;61,0	68,0;79,0	120,0;130,0
Сахарный диабет (n=8)	Медиана, %	38,0	49,0	62,0	98,0
	Размах (Min-Max), %	20,0-41,0	23,0-56,0	33,0-67,0	55,0-109,0
	95% ДИ для медианы, %	31,0-46,0	50,0-58,0	52,0-72,0	81,0-114,0
	25-75 перцентиль, %	31,0;40,0	42,0;53,0	56,0;65,0	81,0;101,0
	p		p=0,003	p=0,005	p=0,004
2-ЭТГ (n=10)	Медиана, %	35,0	64,5	81,5	113,5
	Размах (Min-Max), %	30,0-40,0	52,0-87,0	76,0-90,0	110,0-120,0
	95% ДИ для медианы, %	32,3-37,6	55,3-73,6	77,1-85,0	110,0-116,0
	25-75 перцентиль, %	34,7;37,2	56,7;69,0	78,7;87,5	110,0;116,2
2-ЭТГ + Сахарный диабет (n=9)	Медиана, %	32,0	59,0	77,0	120,0
	Размах (Min-Max), %	29,0-35,0	52,0-65,0	75,0-89,0	110,0-130,0
	95% ДИ для медианы, %	30,0-33,0	55,7-62,2	73,0-80,9	114,4-125,5
	25-75 перцентиль, %	30,0;34,0	56,0;62,0	77,0;80,0	110,0;124,0

Примечание: p – по сравнению с группой «Контроль».

повышение ОСКП от 6 до 15 мл/мин увеличивало коронарное перфузионное давление в среднем на 56%. Развиваемое внутрижелудочковое давление, так же, как и скорость сокращения и расслабления миокарда, были сопоставимы с контрольными значениями. Таким образом, внутрибрюшинное введение 2-ЭТГ предупреждало характерное для сахарного диабета снижение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции сердца.

Введение в перфузионный раствор высокоселективного блокатора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевинины не сопровождалось изменением тонуса коронарных сосудов (табл. 4) и сократительной функции сердца контрольных крыс.

При подавлении активности iNOS в изолированных сердцах крыс группы «Сахарный диабет» величины коронарного перфузионного

давления и развиваемого внутрижелудочкового давления не отличались от таковых в контроле (табл. 4). Однако в группе «Сахарный диабет» показатели первой производной (dP/dt) все же оставались сниженными при ОСКП, составлявшей 8, 10 и 15 мл/мин. (+dP/dt на 17, 18 и 29% соответственно, -dP/dt на 15, 21, 26% соответственно, p<0,05, по сравнению с контролем). Этот факт позволяет предположить, что важнейшим механизмом ослабления миогенного тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда при стрептозоцин-индуцированном сахарном диабете является гиперпродукция оксида азота индуцибельной NO-синтазы.

Добавление в раствор для перфузии сердец, выделенных из организмов животных группы «2-ЭТГ», S-метилизотиомочевинины не оказывало влияния, как и в контрольной группе животных,

Таблица 4 – Изменение коронарного перфузионного давления (КПД) у крыс с сахарным диабетом и диабетом, развивающимся на фоне внутрибрюшинного введения 2-этилтиобензимидазола гидробромида (2-ЭТГ), в условиях блокированной системы iNO-синтазы

Группы экспериментальных животных	Показатель	Объемная скорость коронарного потока, мл/мин			
		6 мл/мин	8 мл/мин	10 мл/мин	15 мл/мин
Контроль + S-MT (n=10)	Медиана, %	43,0	62,0	90,0	126,0
	Размах (Min-Max), %	36,0-53,0	45,0-80,0	63,0-100,0	110,0-150,0
	95% ДИ для медианы, %	39,0-47,0	52,0-71,0	80,0-100,0	118,0-134,0
	25-75 процентиль, %	38,0;47,0	53,0;75,0	79,0;100,0	123,0;134,0
Сахарный диабет + S-MT (n=8)	Медиана, %	39,0	55,0	90,0	128,0
	Размах (Min-Max), %	34,0-49,0	50,0-85,0	70,0-109,0	100,0-152,0
	95% ДИ для медианы, %	34,0-44,0	42,0-68,0	76,0-104,0	113,0-143,0
	25-75 процентиль, %	37,0;44,0	51,0;70,0	78,0;103,0	120,0;135,0
ЭТГ + S-MT (n=10)	Медиана, %	38,0	57,5	82,5	126,0
	Размах (Min-Max), %	30,0-45,0	45,0-76,0	63,0-96,0	110,0-150,0
	95% ДИ для медианы, %	34,8-41,1	50,9-64,1	75,0-89,9	118,0-133,9
	25-75 процентиль, %	36,2;42,2	50,0;62,2	76,2;89,2	123,0;133,7
2-ЭТГ + Сахарный диабет + S-MT (n=9)	Медиана, %	34,5	64,5	79,5	115,0
	Размах (Min-Max), %	30,0-37,0	52,0-69,0	76,0-89,0	110,0-120,0
	95% ДИ для медианы, %	30,2-33,7	55,7-62,2	73,0-80,9	114,0-125,5
	25-75 процентиль, %	32,7;35,0	56,7;66,7	78,7;82,5	115,0;120,0

на показатели коронарного перфузионного давления (табл. 4) и развиваемого внутрижелудочкового давления при всех уровнях объемной скорости коронарного потока. Вероятно, при использовании 2-ЭТГ, так же, как и в сердцах контрольной группы животных, образование индуцибельной NO-синтазы либо не происходит, либо синтезируется в незначительных концентрациях.

Подавление активности индуцибельной NO-синтазы в группе «2-ЭТГ+Сахарный диабет» животных не сопровождалось изменениями как тонуса коронарных сосудов (табл. 4), так и сократительной функции сердца. Вероятно, использование 2-ЭТГ ограничивало образование гиперпродукции оксида азота индуцибельной NO-синтазы, наблюдаемое при сахарном диабете.

В сыворотке крови животных с сахарным диабетом определялось увеличение продуктов деградации монооксида азота на 89%, содержание iNOS увеличивалось в 2,8 раза на фоне снижения концентрации eNOS на 73% (p<0,05, по сравнению с контролем, табл. 5). В гомогенате левого желудочка животных с сахарным диабетом концентрация диеновых конъюгатов и малонового диальдегида увеличивалась на 98 и 64%

соответственно. При этом снижалась активность супероксиддисмутазы и каталазы на 50 и 56% соответственно (p<0,05, по сравнению с контролем, табл. 5), а также определялись признаки системного воспаления низкой интенсивности (увеличение содержания С-реактивного белка и ИЛ-1β в сыворотке экспериментальных животных) (p<0,05, по сравнению с контролем, табл. 5).

В сыворотке крови животных группы «2-ЭТГ» содержание NO₂⁻/NO₃⁻, концентрации eNOS и iNOS статистически достоверно не отличались от контрольных показателей (табл. 5). Концентрация продуктов перекисного окисления липидов в миокарде левого желудочка группы «2-ЭТГ» была сопоставима со значениями группы «Контроль». Обращает на себя внимание и тот факт, что, хотя между показателями активности каталазы и супероксиддисмутазы в крови животных групп «Контроль» и «2-ЭТГ» отсутствовали статистически значимые изменения, все же тенденция к увеличению их активности в группе «2-ЭТГ» очевидна (табл. 5). В сыворотке крови крыс группы «2-ЭТГ» маркеры воспаления (интерлейкин 1β, С-реактивный белок) не определялись.

В группе животных с сахарным диабетом,

воспроизведенным на фоне внутрибрюшинного введения 2-ЭТГ, концентрация продуктов деградации монооксида азота в сыворотке крови животных увеличивалась на 19% на фоне двукратного увеличения содержания iNOS и снижения eNOS на 53% ($p < 0,05$, по сравнению с контролем и группой «Сахарный диабет», табл. 5). Содержание диеновых конъюгатов не отличалось от контрольных показателей, а концентрация малонового диальдегида увеличивалась на 26% ($p < 0,05$, по сравнению с контролем и группой «Сахарный диабет», табл. 5). В гомогенате левого желудочка животных группы «2-ЭТГ+сахарный диабет» определялось снижение концентрации супероксиддисмутазы на 14% ($p < 0,05$, по сравнению с контролем и группой «Сахарный диабет», табл. 5), при этом активность каталазы не изменялась (табл. 5). В сыворотке животных группы «2-ЭТГ+сахарный диабет» определялось увели-

чение концентрации интерлейкина 1 β , однако содержание С-реактивного белка статистически не отличалось от показателей контрольной группы животных.

Обсуждение

Обнаруженное нами снижение миогенного тонуса коронарных сосудов, нарушение сократительной функции миокарда при экспериментальном сахарном диабете в значительной мере были обусловлены гиперпродукцией оксида азота индуцибельной NO-синтазы. Так, использование высокоселективного блокатора iNOS приводило к повышению ослабленного тонуса коронарных сосудов, увеличению сниженного внутрижелудочкового давления в группе животных «Сахарный диабет». Продолжительная гипергликемия сопровождалась гиперпродукцией NO, продуци-

Таблица 5 – Концентрации индуцибельной (iNOS), эндотелиальной (eNOS) NO-синтаз, ИЛ-1 β , С-реактивного белка (СРБ), NO₂⁻/NO₃⁻ в сыворотке крови; продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты (ДК); малоновый диальдегид (МДА) и антиоксидантной активности (супероксиддисмутаза (СОД); каталаза (КАТ) в гомогенате миокарда различных групп экспериментальных животных

Группы	Концентрация eNOS, пг/мл в сыворотке крови	Концентрация iNOS, нг/мл в сыворотке крови	Концентрация NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ мкМ в миокарде	Концентрация ДК, нМ/г липидов в миокарде	Концентрация МДА, нМ/г белка в миокарде	Концентрация СОД с учетом коэф. разведения в 41 раз ЕД/г миокарда	Концентрация КАТ мкМ/г миокарда	Концентрация С-РБ, мг/л в сыворотке крови	Концентрация ИЛ-1 β , пг/мл в сыворотке крови
Контроль (n=9)	47,20 (41,6; 63,3)	2,66 (2,39; 2,93)	24,30 (23,0; 24,5)	100,44 (76,0; 128,1)	77,66 (74,3; 93,1)	70,27 (66,2; 77,8)	68,12 (37,7; 80,9)	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
Сахарный диабет (n=8)	12,50 (10,6; 14,8) $p_1=0,003$	10,10 (10,0; 11,5) $p_1=0,0004$	43,06 (39,3; 54,9) $p_1=0,002$	199,00 (180,3; 274,7) $p_1=0,003$	128,57 (118,3; 258,3) $p_1=0,004$	34,59 (29,5; 39,4) $p_1=0,0001$	29,86 (28,9; 33,8) $p_1=0,0007$	0,34 (0,25; 0,37) $p_1=0,003$	31,46 (28,35; 33,23) $p_1=0,002$
2-ЭТГ (n=10)	28,70 (27,0; 35,0) $p_3=0,001$	3,30 (2,9; 5,8) $p_3=0,003$	23,80 (21,6; 24,3) $p_3=0,006$	106,10 (101,0; 118,0) $p_3=0,003$	74,40 (54,5; 97,8) $p_3=0,0001$	100,30 (97,2; 103,7) $p_1=0,005$ $p_3=0,003$	81,00 (73,8; 90,5) $p_3=0,007$	$p \leq 0,001$ $p_3=0,003$	$p \leq 0,001$ $p_3=0,002$
2-ЭТГ + Сахарный диабет (n=9)	22,00 (16,0; 22,0) $p_1=0,003$ $p_3=0,003$	8,00 (5,2; 8,6) $p_1=0,0004$ $p_2=0,001$ $p_3=0,0013$	29,0 (27,2; 30,5) $p_1=0,0007$ $p_2=0,001$ $p_3=0,003$	132,1 (128,7; 138,4) $p_3=0,003$	98,4 (95,7; 100,6) $p_1=0,0001$ $p_2=0,003$ $p_3=0,002$	59,9 (58,1; 65,5) $p_1=0,0007$ $p_2=0,001$ $p_3=0,005$	44,1 (41,7; 47,0) $p_2=0,034$ $p_3=0,003$	$p \leq 0,001$ $p_3=0,001$	8,0 (6,5; 9,5) $p_1=0,002$ $p_2=0,001$ $p_3=0,0002$

Примечание: p_1 – по сравнению с группой «Контроль»; p_2 – по сравнению с группой «2-ЭТГ»; p_3 – по сравнению с группой «Сахарный диабет»; n – количество животных в группе.

руемого iNOS, о чем свидетельствует существенное повышение концентрации продуктов деградации NO и увеличение концентрации iNOS в крови экспериментальных животных. Пусковым механизмом повышенного образования iNOS может быть как стойкая гипергликемия, так и обнаруженное увеличение концентрации маркеров воспаления низкой интенсивности – ИЛ-1 β и СРБ. Вероятно, в то же время повышается образование супероксидного радикала, о чем косвенно свидетельствует увеличение концентрации продуктов ПОЛ в миокарде животных группы «Сахарный диабет». Ранее Zhu M. и соавт. при инкубации культуры эндотелиоцитов, полученных из пупочной вены, в среде с высоким содержанием в ней глюкозы, доказали факт увеличения образования в этих клетках супероксидного радикала [13]. Высокие концентрации активных форм кислорода способны подавлять активность гена eNOS с последующим снижением содержания этого фермента в крови, что было обнаружено в нашем исследовании.

Внутрибрюшинное введение 2-ЭТГ не сопровождалось изменением тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда до и после использования высокоселективного блокатора iNOS S-метилизотиомочевин. Ранее нами было установлено, что предварительное использование производного бензимидазола 2-ЭТГ сопровождалось увеличением уровня экспрессии гена iNOS, но умеренным накоплением этого фермента в гладкомышечных клетках коронарных сосудов [14]. Этот факт был расценен нами как «подготовительный этап» сосудов сердца и миокарда к последующим неблагоприятным воздействиям, биологическая целесообразность которого заключается в ограничении возможной вазоконстрикции.

При моделировании сахарного диабета на фоне внутрибрюшинного введения 2-ЭТГ было установлено, что величины коронарного перфузионного давления и развиваемого внутрижелудочкового давления не отличались от контрольных значений. Недавние исследования Z. Zhang и соав. при использовании производных бензимидазола перед и во время моделирования гипоксии обнаружили, что исследуемое вещество предупреждает нарушения тонуса коронарных сосудов мышцей и человека, вызванные гипоксией/реоксигенацией [15]. Возможно, механизмы ограничения нарушения тонуса коронарных сосудов при использовании производных бензимидазола при

различных формах патологии сходны, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Добавление в раствор, которым перфузировали сердца, выделенные из организмов животных группы «2-ЭТГ+Сахарный диабет» S-МТ, не оказывало влияния на величины коронарного перфузионного давления и давления, развиваемого левым желудочком. Таким образом, использование 2-ЭТГ ограничило гиперпродукцию NO индуцибельной NO-синтазы, характерную для сахарного диабета. В пользу этого вывода свидетельствуют как статистически достоверное увеличение концентрации eNOS, так и снижение накопления iNOS в сыворотке крови животных группы «2-ЭТГ+Сахарный диабет», в сравнении с группой «Сахарный диабет». Не наблюдалось и столь массивной гиперпродукции NO, о чем косвенно свидетельствует существенно меньшее содержание нитратов/нитритов в сыворотке крыс с сахарным диабетом, воспроизведенным на фоне внутрибрюшинного введения 2-ЭТГ (сравнение с группой «Сахарный диабет»). Недавние исследования Richa Minhas и соав. *in vitro* показали, что производные бензимидазола способны ингибировать продукцию NO и iNOS [16], что продемонстрировано и в нашем исследовании. Кроме того, использование 2-ЭТГ ограничило не только нитрозилирующий, но и окислительный стресс, характерный для сахарного диабета. В пользу этого заключения свидетельствует и тот факт, что при использовании 2-ЭТГ в условиях диабета наблюдалось снижение концентрации продуктов ПОЛ на фоне увеличения активности антиоксидантной системы и уменьшения воспаления низкой интенсивности (отсутствия белков острой фазы воспаления – С-реактивного белка), по сравнению с соответствующими показателями группы «Сахарный диабет». Наши экспериментальные данные согласуются с данными, полученными другими исследователями, которые показали, что производные бензимидазола обладают антиоксидантной активностью, а также способны ограничить развитие окислительного стресса и воспаления в сосудистой стенке при других формах патологии [4].

Заключение

Внутрибрюшинное введение 2-этилтио-бензимидазола гидробромида предотвращает снижение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда, вызванное гипер-

продукцией монооксида азота индуцибельной NO-синтазы при сахарном диабете. Этот эффект 2-этилтиобензимидазола гидробромида ассоциирован: с ограничением развития окислительного стресса (снижение диеновых конъюгатов и малонового диальдегида на фоне увеличения активности супероксиддисмутазы и каталазы); с ограничением нитрозативного стресса (увеличение концентрации эндотелиальной NO-синтазы и уменьшение содержания индуцибельной); со снижением концентрации маркеров воспаления (С-реактивного белка и интерлейкина 1 β).

Литература

- Sun, J. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production / J. Sun, L. J. Druhan, J. L. Zweier // Arch. Biochem. Biophys. – 2010 Feb. – Vol. 494, N 2. – P. 130–137.
- Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat / A. Ceriello [et al.] // Diabetes. – 2002 Apr. – Vol. 51, N 4. – P. 1076–1082.
- Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes / P. R. Nagareddy [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2005 Nov. – Vol. 289, N 5. – P. H2144–H2152.
- Novel coumarin-benzimidazole derivatives as antioxidants and safer anti-inflammatory agents / R. K. Arora [et al.] // Acta Pharm. Sin. B. – 2014 Oct. – Vol. 4, N 5. – P. 368–375.
- Potential antidiabetic activity and molecular docking studies of novel synthesized 3,6-dimethyl-5-oxo-pyrido[3,4-f][1,2,4]triazepino[2,3-a]benzimidazole and 10-amino-2-methyl-4-oxo pyrimido[1,2-a]benzimidazole derivatives / Y. E. Bakri [et al.] // J. Mol. Model. – 2018 Jun. – Vol. 24, N 7. – P. 179.
- Восстановление NO₃ в NO₂ цинковой пылью в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди / И. С. Веремей [и др.] // 40 лет фармацевтическому факультету : сб. науч. тр. / Витеб. гос. мед. ун-т ; под ред. А. Н. Косинца. – Витебск, 1999. – С. 274–276.
- Гаврилов, В. Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропиловых экстрактов / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Н. Ф. Хмара // Лаб. дело. – 1988. – № 2. – С. 60–64.
- Андреева, Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте тиобарбитуровой кислоты / Л. И. Андреева, В. А. Кожемякин // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 41–43.
- Стальной, М. Д. Метод определения малонового альдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / М. Д. Стальной, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – Москва : Медицина, 1977. – С. 66–68.
- Методы биохимических исследований, основанные на применении специализированного оборудования : метод. рекомендации для выполнения лаб. работ / Е. О. Данченко [и др.]. – Витебск : ВГУ им. П. М. Машерова, 2018. – 51 с.
- Towards multi-target antidiabetic agents: Discovery of biphenyl-benzimidazole conjugates as AMPK activators / D. A. Babkov [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2019 Sep. – Vol. 29, N 17. – P. 2443–2447.
- Лазуко, С. С. Особая роль индуцированной NO-синтазы в механизмах регуляции тонуса коронарных сосудов крыс при иммобилизационном стрессе, развивающемся на фоне сахарного диабета / С. С. Лазуко, Л. Е. Беляева, А. П. Солодков // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2014. – Т. 100, № 4. – С. 433–444.
- Propofol protects against high glucose-induced endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells / M. Zhu [et al.] // Anesth Analg. – 2012 Feb. – Vol. 114, N 2. – P. 303–309.
- Лазуко, С. С. Механизмы регуляции тонуса сосудов сердца: роль iNOS и калиевых каналов: монография / С. С. Лазуко. – Витебск : ВГМУ, 2019. – 215 с.
- Coronary endothelial dysfunction prevented by small-conductance calcium-activated potassium channel activator in mice and patients with diabetes / Z. Zhang [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2020 Dec. – Vol. 160, N 6. – P. e263–e268.
- Minhas, R. Inhibition of iNOS by Benzimidazole Derivatives: Synthesis, Docking, and Biological Evaluations / M. Richa, Y. Bansal // Med. Chem. – 2021 Sep.

Поступила 10.09.2021 г.
Принята в печать 11.10.2021 г.

References

- Sun J, Druhan LJ, Zweier JL. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production. Arch Biochem Biophys. 2010 Feb;494(2):130-7. doi: 10.1016/j.abb.2009.11.019
- Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F, et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. Diabetes. 2002 Apr;51(4):1076-82. doi: 10.2337/diabetes.51.4.1076
- Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Nov;289(5):H2144-52. doi: 10.1152/ajpheart.00591.2005
- Arora RK, Kaur N, Bansal Y, Bansal G. Novel coumarin-benzimidazole derivatives as antioxidants and safer anti-inflammatory agents. Acta Pharm Sin B. 2014 Oct;4(5):368-75. doi: 10.1016/j.apsb.2014.07.001
- Bakri YE, Anouar EH, Marmouzi I, Sayah K, Ramli Y, Faouzi MEA, et al. Potential antidiabetic activity and molecular docking studies of novel synthesized 3,6-dimethyl-5-oxo-pyrido[3,4-f][1,2,4]triazepino[2,3-a]benzimidazole and 10-amino-2-methyl-4-oxo pyrimido[1,2-a]benzimidazole derivatives. Mol Model. 2018 Jun;24(7):179. doi: 10.1007/

- s00894-018-3705-9
6. Veremei IS, Solodkov AP, Deiuu GV, Golman VI. Reduction of NO₃ to NO₂ by zinc dust in the presence of ammonia complex of copper sulfate. V: Viteb gos med un-t; Kosinets AN, red. 40 let farmatsevticheskomy fakul'tetu: sb nauch tr. Vitebsk, RB; 1999. P. 274-6. (In Russ.)
 7. Gavrilov VB, Gavrilova AR, Khmara NF. Measurement of diene conjugates in plasma by ultraviolet absorption of heptane and isopropyl extracts. Lab Delo. 1988;(2):60-4. (In Russ.)
 8. Andreeva LI, Kozhemiakin VA. Modification of the method for the determination of lipid peroxides in the thiobarbituric acid test. Lab Delo. 1988;(1):41-3. (In Russ.)
 9. Stalnoi MD, Garishvili TG. Method for determination of malonic aldehyde with thiobarbituric acid. V: Orekhovich VN, red. Sovremennye metody v biokhimi. Moscow, RF: Meditsina; 1977. P. 66-8. (In Russ.)
 10. Danchenko EO, Chirkin AA, Balaeva-Tikhomirova OM, Tolkacheva TA. Methods of biochemical research based on the use of specialized equipment: metod rekomendatsii dlia vypolneniia lab rabot. Vitebsk, RB: VGU im PM Masherova; 2018. 51 p. (In Russ.)
 11. Babkov DA, Zhukovskaya ON, Borisov AV, Babkova VA, Sokolova EV, Brigadirova AA, et al. Towards multi-target antidiabetic agents: Discovery of biphenyl-benzimidazole conjugates as AMPK activators. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Sep;29(17):2443-2447. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.07.035
 12. Lazuko SS, Beliaeva LE, Solodkov AP. Specific role of induced NO synthase in the mechanisms of regulation of coronary vascular tone in rats under immobilization stress developing against the background of diabetes mellitus. Ros Fiziol Zhurn im IM Sechenova. 2014;100(4):433-44. (In Russ.)
 13. Zhu M, Chen J, Tan Z, Wang J. Propofol protects against high glucose-induced endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells. Anesth Analg. 2012 Feb;114(2):303-9. doi: 10.1213/ANE.0b013e31823f0c42
 14. Lazuko SS. Mechanisms of cardiac vascular tone regulation: role of iNOS and potassium channels: monografiia. Vitebsk, RB: VGMU; 2019. 215 p. (In Russ.)
 15. Zhang Z, Shi G, Liu Y, Xing H, Kabakov AY, Zhao AS, Agbortoko V. Coronary endothelial dysfunction prevented by small-conductance calcium-activated potassium channel activator in mice and patients with diabetes. J Thorac Cardiovasc Surg. 2020 Dec;160(6):e263-8. doi: 10.1016/j.jtcvs.2020.01.078
 16. Minhas R, Bansal Y. Inhibition of iNOS by Benzimidazole Derivatives: Synthesis, Docking, and Biological Evaluations. Med Chem. 2021 Sep. doi: 10.2174/1573406417666210927123137

Submitted 10.09.2021

Accepted 11.10.2021

Сведения об авторах:

Лазуко С.С. – доцент, кандидат биологических наук, заведующая кафедрой нормальной физиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Information about authors:

Lazuko S.S. – Candidate of Biological Sciences, associate professor, head of the Chair of Normal Physiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра нормальной физиологии. E-mail: Lazuko71@mail.ru – Лазуко Светлана Степановна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Normal Physiology. E-mail: Lazuko71@mail.ru – Svetlana S. Lazuko.