

GENEL PATOLOJİ VE PATOFİZYOLOJİ

İzole Sıçan Kalbinin İskemi ve Reperfüzyon Modelinde Humik Kökenli Maddelerin Kardiyoprotektif Etkisinde NO Sentazın Rolü TV Lasukova^{1,2}, MV Zykova³, MV Belousov³, LA Logvinova³, and AM Dygai⁴, AS Gorbunov²,

Byulleten ' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny, Vol. 166, hayır. 11, s. 537-540, Kasım 2018

Hümik kökenli yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklere dayanan standardize edilmiş aktif doğal maddenin kardiyoprotektif ve inotropik etkileri, global iskemi (40 dakika) ve izole perfüze edilmiş sıçan kalbinin reperfüzyonu modelinde incelenmiştir. İskemi/reperfüzyon modellemesinden önce test maddesinin (0.1 mg/ml) önleyici uygulaması, kardiyomiyositlerin reperfüzyon kontraktürünü ve nekrotik ölümünü azalttı ve miyokardiyal kontraktilitenin iyileşmesini destekledi. NO sentazın L-NAME (100 uM) ile bloke edilmesi, test maddesinin yukarıdaki etkilerini ortadan kaldırdı. NO sentazın, test edilen doğal maddenin kardiyoprotektif ve inotropik etkilerinin gelişmesinde önemli bir rol oynadığı varsayılmıştır.

Anahtar Kelimeler: etkin madde; kalp; iskemi; reperfüzyon; sentaz YOK

İskemik ve reperfüzyon yaralanmalarına karşı kalp direncini artıran yeni ilaçların araştırılması, modern tıbbın acil bir sorunu olmaya devam etmektedir. Şu anda, potansiyel olarak düşük toksisite ile karakterize edilen doğal kaynaklı ilaçların kardiyoprotektif özellikleri yoğun bir şekilde incelenmektedir. Hümik bileşiklerin farmakolojik etkileri: bir iltihap önleyici, bağıışıklık uyarıcı, hepatoprotektif, antioksidan, antihipoksik iyi belgelenmiştir [1,15]. Son zamanlarda hümik asitlerin (HA) beyin nöronları ve nefronlarının iskemi ve reperfüzyona karşı direncini arttırdığı [6,11] ve oksidatif stres koşulları altında kardiyomiyositlerin zarar görmesini önlediği gösterilmiştir [9]. Bu gerçekler, HA'nın sergileyebileceğini düşündürmektedir.

kardiyoprotektif aktivite. HA'nın farmakolojik etkilerinin mekanizmaları genellikle, endotelial NO sentazın [10] HA kaynaklı aktivasyonuna ve NO üretiminin uyarılmasına [5] atfedilir. Bu, bu bileşiklerin miyokard etkilerine, NO sentazın aktivasyonu ile ilişkili bir sinyal mekanizması aracılığıyla aracılık edildiğini düşündürür.

Yüksek moleküler ağırlıklı humik bileşiklere ve bunların gerçekleştirilmesine ilişkin olası mekanizmalara dayanan standartlaştırılmış doğal kaynaklı aktif maddenin (ASNO) kalp koruyucu aktivitesini inceledik.

MALZEMELER VE YÖNTEMLER

Tomsk bölgesinin Tagan yatağından ova odunsu tip turbanın HA'sına dayalı ASNO'nun ekstraksiyonu ve standardizasyonu daha önce açıklandığı gibi gerçekleştirildi [15]. Yöntemler, kızılötesi spektroskopisi (FSM 1201, IK-Fourier spektrometre, In fraspek), geri titrasyon analizi (asit fonksiyonu içeriği) sonuçlarına dayanmaktadır.

1 Tomsk Devlet Pedagoji Üniversitesi; 2 Kardiyoloji Araştırma Enstitüsü, Tomsk Ulusal Araştırma Tıp Merkezi, Rusya Bilimler Akademisi; 3 Sibirya Devlet Tıp Enstitüsü, Tomsk Ulusal Araştırma Tıp Merkezi, Rusya Bilimler Akademisi, Tomsk; 4 Rusya Bilimler Akademisi, Tomsk; ASNO'nun ekstraksiyonu ve standardizasyonu için teşekkürler. TV Lasukova

temel gruplar), element analizi (C,H,N-analyzer Carlo Erba Strumentazione 1106) ve adsorpsiyon spektroskopisi (Unico 2800 spektrofotometre).

ASNO'nun miyokardiyal etkileri, 250-300 g ağırlığındaki erkek Wistar sıçanları üzerinde incelenmiştir. Hayvanlar, Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlarla Kullanılan Omurgalı Hayvanların Korunmasına İlişkin Avrupa Sözleşmesine (Strasburg, 1986) göre tutuldu. Tüm ağırlı işlemler eter narkozu altında yapıldı. Eter narkozu altında torakotomi sonrası kalp çıkarıldı ve soğukta (4oC) tutuklandı.

Krebs—Henseleit çözümü. Kalbin retrograd Langendorff perfüzyonu, %95'lik bir karışımla doyurulmuş Krebs—Henseleit solüsyonu ile gerçekleştirildi.

O₂ ve %5 CO₂ (37± 0,5o C) (pH 7,5). Kalp kontraktilite parametrelerini kaydetmek için sol ventriküle damıtılmış su ile doldurulmuş lateks balonlu bir kateter yerleştirildi; balondaki su hacmi, 10-15 mm Hg'lik bir diyastol sonu basıncı (EDP) oluşturmak için yeterliydi. Kalbin pompalama fonksiyonunun parametreleri, balona bağlı bir SS13L basınç transdüseri (Biopac System Inc.) kullanılarak izovolümik rejimde ölçüldü. Sol ventrikül basıncındaki değişiklikler, elektrofizyolojik çalışmalar için bir MP35 cihazı (Biopac System Inc.) kullanılarak kaydedildi. Daha önce açıklandığı gibi standardize edilmiş ve Krebs solüsyonunda (0,1 mg/ml) çözünmüş ASNO'nun miyokardiyal kasılma kuvveti, EDP (mm Hg) üzerindeki etkilerini analiz ettik. Bu konsantrasyon in vitro çalışmaların ön taraması sonucunda seçilmiştir [3]. Normoksik perfüzyon koşullarına 20 dakikalık adaptasyondan sonra, kalpler 10 dakika boyunca belirtilen konsantrasyonda ASNO içeren Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edildi ve ardından 45 dakikalık global iskemiye ve ardından 30 dakikalık reperfüzyona tabi tutuldu. Kontraktıl kuvvet, sistolik ve diyastolik basınçlar arasındaki fark olarak hesaplanan sol ventriküler gelişmiş basınç (mm Hg) ile değerlendirildi. Küresel normotermik iskemi, perfüzyonun 45 dakika süreyle durdurulmasıyla modellendi; reperfüzyon süresi 30 dakikaydı. Kardiyomiyositlerdeki geri dönüşümsüz hasar, reperfüzyon sırasında perfüzyon solüsyonunda kreatin fosfokinaz ölçülerek değerlendirildi. Bu enzimin aktivitesi, standart ticari kitler (Biocon) kullanılarak X=340'ta bir Smart Spec Plus spektrofotometre (Bio-Rad) üzerinde ölçülmüştür. Sonuçlar, 30 dakikalık reperfüzyon (U/g) boyunca 1 g ıslak doku başına enzim aktivite birimleri (U, µmol NADH/dk) cinsinden ifade edildi.

Kontraktilite parametreleri, perfüzyon koşullarına 20 dakikalık adaptasyondan sonra, ASNO içeren Krebs solüsyonu ile füzyon başına 10. dakikada ve ardından 5, 15 ve 30. reperfüzyon dakikalarında belirlendi. Aynı şekilde ASNO içermeyen Krebs solüsyonu ile perfüze edilen izole sıçan kalpleri şema kontroller olarak görev yaptı.

NO sentaz bloker L-NAME perfüzyon solüsyonuna 100x10⁻³ nihai konsantrasyonda eklendi.

ASNO'nun miyokardiyal etkilerinin gerçekleştirilmesinde bu enzimin rolünün değerlendirilmesi için mM [7].

Veriler, Statis tica 6.0 yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak işlendi. Gruplar arası farklılıklar, parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar M±SEM olarak sunulmuştur . Farklılıklar p<0.05'te anlamlıydı.

SONUÇLAR

Turba HA etiyolojik olarak deterministik polimorfik yapılar olduğundan, turba HA'dan türetilen ASNO'nun biyolojik aktivite analizinin güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlarının elde edilmesi için bir dizi parametre ile ön standardizasyon gerçekleştirilmiştir [15].

Ardından, standardize edilmiş ASNO'nun kalp kontraktilite parametreleri üzerindeki etkilerini ve izole kalbin iskemi/reperfüzyon modeli üzerindeki kardiyoprotektif özelliklerini analiz ettik. ASNO'nun önleyici uygulaması, kontrole kıyasla reper füzyon sırasında kalbin inotropik fonksiyonunun daha etkili bir şekilde iyileşmesini destekledi (Tablo 1). Postiskemik dönemde, deney serilerindeki kalp kasılma kuvveti karşılık gelen kontrol değerlerini ~1,5 kat aşarken, postiskemik kontraktür daha az belirgindi, bu da EDP'de %30 oranında güvenilir bir düşüşten görüldü (Tablo 1). ASNO'nun sitoprotektif etkisi de deneyler sırasında ortaya çıktı. İncelenen bileşiklerin kardiyoprotektif etkisi, reperfüzyon sırasında kreatin fosfokinaz salınımında güvenilir bir düşüşle kendini gösterdi: kontrolde 51.1±3.4 U/g'den deney serisinde 42.3±3.2 U/g'ye (p<0.05).

Bunun ışığında, ASNO'nun gözlemlenen etkilerinin olası mekanizması hakkında bir soru ortaya çıkıyor. Endotelial NO sentazın aktivasyonu ve HA'nın [5,10] etkisi altında NO üretiminin uyarılması hakkında yayınlanmış verileri dikkate alarak, bu sinyal mekanizmasının ASNO'nun miyokardiyal etkilerinin uygulanmasında rol oynadığını varsaydık. L-NAME ile NO sentaz blokajı koşullarında ASNO'nun kalp koruyucu etkisi gözlenmedi çünkü bu serideki kreatin kinaz salınımı kontrolden farklı değildi (49.7±4.1 U/g; p>0.05). Bu nedenle, kardiyomiyositlerin azalmış nekrotik ölümü, bu bileşikler tarafından NO sentaz sinyalinin aktivasyonunun bir sonucu olabilir. Elde edilen sonuçlar NO'nun kalp iskemisindeki olumlu rolüne ilişkin verileri dolaylı olarak kanıtlamaktadır [8,12].

NO donörünün kalbi koruyucu etkisi daha önce bölgesel iskemi ve reperfüzyon modelinde gösterilmişti [8,12]; miyokard nekrozunun boyutunda bir azalma ile kendini gösterdi [12].

ASNO'nun inotropik etkilerinin uygulanmasında NO sentazın rolünü değerlendirirken, miyokardiyal kontraktilite parametrelerinde değişiklikler olduğunu bulduk.

TABLO 1. NO sentaz Bloker L-NAME (100 uM) ve ASNO'nun (0,1 mg/ml) İzole Kalbin Sol Ventrikül Geliştirilmiş Basıncı ve EDP'si Üzerindeki Etkisi

Parametre		Kontrol (n=14) EŞEK (n=14)	göt+sol İSİM	L-AD	
Sol ventrikül gelişmiş basınç, mm Hg					
perfüzyon	10 dk	91.0±5.8	93.0±3.2	90,9±6,1	92.0±2.2
	20 Dakika	90,9±4,0	70,8±4,0*	90,8±6,9	87.0±5.2
reperfüzyon	5 dakika	10,3±2,7+	37,4±11,0***	12,2±4,4+	10,2±3,0+
	15 dakika	18,5±2,4+	45,3±9,0***	19,5±3,8+	16,5±2,4+
	30 dk	25,7±3,0+	37,7±4,2*+	28,4±3,5+	20,7±3,0+
EDP, mm Hg					
perfüzyon	10 dk	15,6±0,3	15,3±0,3	14,0±0,3	15,7±0,6
	20 Dakika	13,6±0,2	12,4±0,5*	13,4±0,9	14,7±0,8
reperfüzyon	5 dakika	79,2±7,1+	65,8±1,4***	77,0±3,6+	79,0±3,6+
	15 dakika	75,8±5,4+	60,0±7,1***	74,0±6,3+	76,0±6,6+
	30 dk	64,0±8,2+	59,8±4,5+	62,9±8,0+	65,9±5,0+

Not. *p<0,05, kontrol ile karşılaştırıldığında; Başlangıç değerleri ile karşılaştırıldığında +p<0,001.

L-NAME blokajının arka planına karşı, deney boyunca kontroldekilere benzerdi (Tablo 1). NO sentaz bloker uygulaması kontraksiyon kuvvetini ve diyastol sonu basıncını etkilemedi (Tablo 1). Bu nedenle, ASNO'nun miyokardiyal kontraktilite üzerindeki etkisine de bu sinyal yolu aracılık eder.

Deneysel verilerimize ve yayınlanmış raporlarımıza dayanarak, ASNO'nun tanımlanan etkilerinin mekanizmasını açıklayan bir hipotez öne sürüldü. Kalbin pompalama fonksiyonunun baskılanması, reperfüzyon sırasında EDP'deki artışın büyük ölçüde kardiyomiyositlerin aşırı Ca²⁺ yüklenmesi ile belirlendiği bilinmektedir [4]. Ca²⁺'daki artış, Ca²⁺'ye bağlı fosfolipaz aktive ederek kardiyomiyositlerde membran hasarına neden olur [4,13]. Yukarıdaki fenomeni de kaydettik ve bu nedenle deneylerimizde aşırı Ca²⁺-yükünün de gözlemlendiğini varsaydık. ASNO uygulamasını, kardiyomiyosit miyoplazmasındaki [Ca²⁺]'deki postishemik azalmaya bağlı olabilecek reperfüzyon kontraktürünün önemli ölçüde zayıflaması, kontraktilitenin etkili bir şekilde geri kazanılması ve antinekrotik etki izledi. Varsayımımız, ASNO etkilerinin uygulanmasında NO sentaz sinyal sisteminin kilit rolü hakkında elde edilen verilerle doğrulandı. Bir kontraktilite modülatörü olarak NO'nun rolünün, L-tipi Ca²⁺ kanallarından Ca²⁺ girişindeki bir azalma yoluyla cGMP'ye bağlı bir mekanizmanın aracılık ettiği negatif bir inotropik etkinin geliştirilmesinden oluştuğu bilinmektedir [2,14]. Bu nedenle, test maddesinin perfüzyon çözeltisine uygulanmasından sonra kasılma kuvveti ve EDP'deki azalma, kalsiyumun perfüzyon çözeltisine girişinin bastırılmasıyla belirlenebilir.

kardiyomiyosit miyoplazması (Tablo 1). Bu sonuçta, iskemi ve reperfüzyon sırasında kardiyomiyositlerin Ca²⁺ aşırı yüklenmesinde önemli bir azalmaya katkıda bulunmuştur .

Bu nedenle, ASNO'nun önleyici uygulaması, reperfüzyon kontraktürünün zayıflaması ve kontraktilitenin daha tam bir iyileşmesi ile karakterize edilen iskemi/reperfüzyona karşı kalp direncini iyileştirmiştir. ASNO'nun ön uygulaması, kardiyomiyositlerin postiskemik yıkımının daha düşük yoğunluğunu ifade eden bir kardiyokoruyucu etki üretti. ASNO'nun miyokardiyal etkileri, NO sentazın aktivasyonu ile ilişkili bir sinyal mekanizması ile gerçekleştirilir.

Çalışma, Devlet Görevi No. AAAA-A17-117032210074-6 ve AAAA-A15-115120910024-0.

REFERANSLAR

- Buzlama AV, Çernov UN. Hüyük maddeler: Farmakolojik özellikler, etki mekanizmaları ve tıpta kullanım beklentileri. Eksp. Klin. Farmakol. 2010;73(9):43-48. Rusça.
- Zaripova RI, Ziyatdinova NI, Zefirov TL. β -Adrenoreseptörlerin Uyarılması Sırasında Hipokinetik Sıçanların Miyokard Kasılması Üzerinde NO Sentez Blokajının Etkisi. Boğa. Tecrübe. Biol. İle. 2016;161(2):215-217.
- Zykova MV, Belousov MV, Lasukova TV, Gorbunov AS, Logvinova LA, Dygai AM. Hüyük Doğanın Yüksek Moleküler Ağırlıklı Bileşiklerinin Kardiyovasküler Etkileri. Boğa. Tecrübe. Biol. İle. 2017.163(2):206-209.
- Litvitskii PF. Bölgesel iskemi ve ardından koroner kan akışının yeniden başlaması koşulları altında kalpte patojenik ve adaptif değişiklikler. Devriye. Fiziol. Eksp. Ter. 2002;(2):2-12. Rusça.

5. Trofimova ES, Zykova MV, Ligacheva AA, Sherstoboev EY, Zhdanov VV, Belousov MV, Yusubov MS, Krivoshchekov SV, Danilets MG, Dygai AM. Çeşitli Kökenli Turbalardan İzole Edilen Hümik Asitlerin Nitrik Oksit in Vitro Üretimine Etkileri: Bir Tarama Çalışması. *Boğa. Tecrübe. Biol. Med.* 2016;161(5):687-692.
 6. Akbaş A, Silan C, Gülpınar MT, Sancak EB, Özkanlı SS, Çakır DU. Hümik asidin renal iskemi - reperfüzyon hasarı üzerindeki renoprotektif etkisi: sıçanlarda deneysel bir çalışma. *Enflamasyon.* 2015;38(6):2042-2048.
 7. Andelová E, Barteková M, Pancza D, Styk J, Ravingerová TD. İzole sıçan kalbinde iskemi/reperfüzyon hasarında NO'nun rolü. *General Physiol. biyografiler.* 2005;24(4):411-426.
 8. Bell RM, Maddock HL, Yellon DM. Fare kalbindeki eksojen nitrik oksidin kardiyoprotektif ve mitokondriyal depolarizan özellikleri. *Kardiyovasküler Res.* 2003;57(2):405-415.
 9. Çağın YF, Şahin N, Polat A, Erdoğan MA, Atayan Y, Eyol E, Bilgiç Y, Seçkin Y, Çolak C. Hümik asidin sıçanlarda demir birikimine akut etkisi. *Biol. Elem'i İzleyin. Res.* 2016;171(1):145-155.
 10. Hseu YC, Wang SY, Chen HY, Lu FJ, Gau RJ, Chang WC, Liu TZ, Yang HL. Hümik asit, insan göbük damarı endotel hücrelerinde nitrik oksit oluşumunu indükler: hücre yaralanması sırasında nitrik oksit sentaz. *Serbest Radikal. Biol. Med.* 2002;32(7):619-629.
 11. Özkan A, Sen HM, Şehitoğlu İ, Alaçam H, Güven M, Aras AB, Akman T, Silan C, Coşar M, Karaman HI. Hümik Asidin fokal serebral iskemi hasarı üzerindeki nöroprotektif etkisi: sıçanlarda deneysel bir çalışma. *Enflamasyon* 2015;38(1):32-39.
 12. Qin Q, Yang XM, Cui L, Critz SD, Cohen MV, Browner NC, Lincoln TM, Downey JM. Eksojen NO, cGMP ve mitoKATP'ye bağlı bir mekanizma aracılığıyla ön koşullandırmayı tetikler. *Am. J. Physiol. Kalp Sirk. Fizyol.* 2004;287(2):H712-H718.
 13. Turer AT, Tepe JA. Miyokardiyal iskemi-yeniden perfüzyon hasarının patogenezi ve tedavi gereksesi. *Am. J. Kardioloji.* 2010;106(3):360-368.
 14. Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H. Nitrik oksit sinyali ve miyokardiyal fonksiyonun düzenlenmesi. *J. Mol. Hücre. Kardiol.* 2008;45(5):625-632.
 15. Zykova MV, Schepetkin IA, Belousov MV, Krivoshchekov SV, Logvinova LA, Bratishko KA, Yusubov MS, Romanenko SV, Quinn MT. Çeşitli orijinli turbalardan izole edilen hümik asitlerin fizikokimyasal karakterizasyonu ve antioksidan aktivitesi. *moleküller.* 2018;23(4). Pi: E753. doi: 10.3390/ay lekül23040753.
-