

90% раствор метанола (В). Постоянная скорость потока составляла 0,2 мл/мин. ВЭЖХ-МС анализ проводился в режиме градиентного элюирования: 0 мин. – (В) 40%; 8 мин. – (В) 90%; 9 мин. – (В) 90%; 12 мин. – (В) 40%; 18 мин. – (В) 40%; общее время анализа составляло 18 мин.

При хромато-масс-спектрометрическом анализе ионизация осуществлялась электрораспылением при атмосферном давлении в режиме регистрации положительных ионов. Напряжение на капилляре – 4,0 кВ; температура капилляра – 245°C; скорость потока, осушающего газа (азот) – 0,45 л/мин.; скорость потока газа (аргон) в камере соударения – 0,075 л/мин.; температура в камере ионизации – 200°C; давление на распылителе – 2,0 атм.

Детектирование проводилось в режиме регистрации селективных реакций (SRM).

Извлечение десмопрессина из биологических образцов плазмы человека проводили методом твердофазной экстракции. Твердофазную экстракцию осуществляли на колонках Strata-X 8B-S100-TAK C18-E (33 мкм, 30 мг) фирмы «Phenomenex» (Torrance, CA, США). Кондиционирование колонки проводили путем последовательного пропускания через нее 3,0 мл метано-

ла с последующим кондиционированием 3,0 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора (рН= 6,0). Далее через колонку медленно (1-2 мл/мин) пропускали образец плазмы, затем колонку промывали 3,0 мл воды деионизованной со скоростью 3-5 мл/мин. и подкисляли 2,0 мл 1М раствора уксусной кислоты. После колонку просушивали в токе азота при 20 psi в течение 2 мин. Далее через колонку последовательно пропускали 3,0 мл гексана и 1,7 мл смеси, состоящей из метилхлорида, изопропилового спирта и гидроксида аммония (78:20:2) со скоростью 3-5 мл/мин.

Элюирование десмопрессина проводили 1,7 мл смеси гексан-этилацетат (1:1) при скорости потока 1-2 мл/мин. Собранный элюат высушивали в токе азота при комнатной температуре и перерастворили в 100 мкл подвижной фазы. Образец объемом 50 мкл вводили в ВЭЖХ-МС систему.

Предел детектирования десмопрессина в плазме человека составил 1,0 пг/мл, а предел количественного определения десмопрессина в плазме человека – 2,0 пг/мл.

Таким образом, подобраны условия хромато-масс-спектрометрического определения десмопрессина в плазме крови человека.

Determination of concentration in biological samples desmopressin with a method for LC/MS

Nguyen Chi Thanh

Chromatographic separation was performed at a constant temperature of 30°C on a column Phenomenex Luna C18. With gas chromatography-mass spectrometry analysis was carried out electrospray ionization at atmospheric pressure in the learning mode of positive ions. Detection was carried out in the learning mode selective reactions (SRM). Extraction of desmopressin from biological samples of human plasma was performed by solid-phase extraction. Detection limit of desmopressin in human plasma was 1,0 pg/ml and limit of quantification in human plasma desmopressin – 2,0 pg/ml.

Key words: desmopressin, method for LC/MS.

Фармакологическая коррекция метаболического пути L-аргинин/eNOS/NO

М.В. Покровский², М.В. Корокин², Т.Г. Покровская², Л.В. Корокина²,
Е.Н. Пашин¹, О.С. Гудырев², А.П. Григоренко², Ю.А. Хощенко²,
Т.П. Голивец², В.В. Гуреев¹, В.И. Кочкаров², А.В. Файтельсон¹,
А.А. Арустамова²

¹ – Курский государственный медицинский университет, Курск

² – Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

Контактная информация: Покровский Михаил Владимирович mpokrovskiy@yandex.ru

Проведено изучение возможности коррекции метаболического пути L-аргинин/eNOS/NO при L-NAME-индуцированной ADMA-ассоциированной эндотелиальной дисфункции с помощью внутрибрюшинного введения тетрагидробиоптерина (BH4) в дозе 10 мг/кг, L-аргинина в дозе 200 мг/кг, L-норвалина в дозе 10 мг/кг и комбинаций L-аргинина с BH4 и L-норвалином. Выявлено, что исследованные препараты по отдельности, оказывая эндотелиопротективное действие при ADMA-ассоциированной патологии, и при сочетанном применении проявляют положительное фармакодинамическое взаимодействие.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, тетрагидробиоптерин, L-аргинин, L-норвалин, ADMA.

Появление в последние годы понятий «эндогенного ингибирования» эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и «разобщение eNOS» привело к интенсификации исследований, направленных на предотвращение указанных процессов, как ключевых звеньев в коррекции эндотелиальной дисфункции. При этом на ключевую роль в регуляции функции eNOS выдвигается кофактор птерина – тетрагидробиоптерин (BH4) [2, 3]. Для обеспечения оптимальной активности eNOS предложены две стратегии – экзогенное введение L-аргинина и L-норвалина [4] для преодоления ингибирования e-NOS и тетрагидробиоптерина (BH4) – для преодоления разобщения e-NOS.

Материалы и методы

Опыты проводились на белых крысах-самцах линии Wistar массой 200-250 г.

Блокатор NO-синтазы N-нитро-L-аргинин-метиловый эфир (L-NAME) вводился внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг/сут., один раз в сутки, в течение семи дней. Животные были разделены на группы (n=10): 1-я – интактные; 2-я – с введением L-NAME; 3-я – L-NAME + L-аргинин (200 мг/кг/сут. внутрибрюшинно 7 дней); 4-я – L-NAME+L-норвалин (10 мг/кг/сут. внутривенно 7 дней); 5-я – L-NAME+BH4 (10 мг/кг/сут. внутрибрюшинно 7 дней); 6-я – L-NAME+ L-аргинин 200 мг/кг + BH4 10 мг/кг в течение семи дней; 7-я – L-NAME+L-аргинин 200 мг/кг + L-норвалин 10 мг/кг в течение семи дней.

На 8-й день от начала эксперимента под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД), болюсное введение фармакологических агентов

осуществляли в бедренную вену. Систolicкое артериальное давление (САД) и диastolicкое артериальное давление (ДАД) измеряли посредством аппаратно-программного комплекса «Віорас». Помимо измерения АД проводили ряд функциональных проб в представленной последовательности: 1. Проба на эндотелийзависимое расслабление сосудов (в/в введение раствора ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг). 2. Проба на эндотелий-независимое расслабление сосудов (в/в введение раствора нитропруссиды натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг) [1]. Степень эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных, а также степень ее коррекции исследуемыми препаратами оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД). Данный коэффициент рассчитывался по формуле: $KЭД = \frac{САД\text{ НП} - САД\text{ АХ}}{САД\text{ АХ}}$, где САДНП – площадь треугольника над кривой восстановления АД в ответ на внутривенное введение нитропруссиды натрия, САДАХ – площадь треугольника над кривой восстановления АД в ответ на внутривенное введение ацетилхолина [1].

Результаты и их обсуждение

Блокада NO-синтазы, вызванная семидневным введением L-NAME, приводила к выраженной артериальной гипертензии (САД – $190,3 \pm 6,7$, ДАД – $145,0 \pm 3,9$, $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных) и увеличению КЭД до $5,4 \pm 0,6$, в то время как в группе интактных животных КЭД составлял $1,1 \pm 0,1$. При монотерапии исследуемыми препаратами статистически значимого снижения артериального давления в экспериментальных группах не обнаружено, а значения САД и ДАД в группах животных, получав-

ших тетрагидробиоптерин, L-аргинин и L-норвалин, соответственно составили: $170,3 \pm 6,7$ и $128,8 \pm 5,2$, $173,3 \pm 8,3$ и $137,3 \pm 9,4$, $180 \pm 4,7$ и $144,6 \pm 10,2$ мм рт.ст. При анализе функциональных проб с внутривенным введением ацетилхолина и нитропруссиды натрия и последующем расчете коэффициента эндотелиальной дисфункции обнаружено выраженное эндотелиопротективное действие тетрагидробиоптерина, L-норвалина и L-аргинина в качестве монотерапии, а КЭД в данных группах составил $2,8 \pm 0,4$, $2,5 \pm 0,05$, $2,1 \pm 0,2$ ($p < 0,05$ в сравнении с группой L-NAME). При комбинированном использовании L-аргинина с тетрагидробиоптерином и L-аргинина с L-норвалином обнаружено положительное фармакодинамическое взаимодействие выразившееся в статистически значимом ($p < 0,05$) снижении САД и ДАД ($149,1 \pm 4,1$ и $112,4 \pm 5,1$ мм рт.ст. – в группе животных, получавших ВН4+L-аргинин; $135,6 \pm 10,1$ и $102,5 \pm 5,8$ мм рт.ст. – в группе животных, получавших L-норвалин+L-аргинин) и максимальном приближении коэффициента эндотелиальной дисфункции к уровню интактных животных. Так, КЭД в группе животных, получавших ВН4+L-аргинин, составил $1,6 \pm 0,3$ усл.ед.; в группе животных получавших L-норвалин+L-аргинин, – $1,7 \pm 0,2$ усл.ед.

Выводы

Таким образом, реализация стратегий фармакологической коррекции метаболического пути L-аргинин/eNOS/NO, направленных на предотвращение разобщения eNOS с субстратом, влияние на метаболизм оксида азота и его биодоступность по отдельности позволяют добиться выраженной коррекции функционирования сосудистого эндотелия.

Реализация комбинированного подхода к коррекции эндотелиальной дисфункции позволяет обнаружить положительное фармакодинамическое взаимодействие, обусловленное влиянием изучаемых препаратов на разные патогенетические звенья развития эндотелиальной дисфункции и нарушений метаболизма оксида азота.

Список литературы

1. **М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская, и др.** Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели

дефицита оксида азота в эксперименте // Кубанский научный медицинский вестник. 2006. № 10. С. 72-77.

2. **Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ.** The L-arginine paradox: importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. Pharmacol Ther. 2007. 114:295-306.

3. **Porkert M, et al.** Tetrahydrobiopterin: a novel antihypertensive therapy. J Human Hyperten. 2008. 22:401-407.

4. The vascular effects of different arginase inhibitors in rat isolated aorta and mesenteric arteries / N.N. Huynh, E.E. Harris, J.F.Chin-Dusting, K.L. Andrews // British Journal of Pharmacology. 2009. №156. P. 84-93.

Pharmacological correction of metabolic pathway L-arginine/eNOS/NO

M.V. Pokrovskiy, M.V.Korokin, T.G.Pokrovskaya, L.V.Korokina, E.N. Pashin, O.S.Gudyrev, A.P. Grigorenko, Yu.A. Hoschenko, T.P. Golivets, V.V. Gureev, V.I. Kochkarov, A.V. Faitelson, A.A. Arustamova

The study of the possibility of correcting metabolic pathway L-arginin/eNOS/NO with L-NAME-induced ADMA-associated endothelial dysfunction by means of intraperitoneal introduction tetrahydrobiopterine (BH4) in a dose of 10 mg/kg, L-arginine at a dose of 200 mg/kg, L-norvalin at a dose of 10 mg/kg and combinations of L-arginine with tetrahydrobiopterine and L-norvaline is spent. Revealed that the studied drugs separately providing endothelioprotective action at ADMA associated pathology, with the concomitant use of pharmacodynamic interaction exhibit positive.

Key words: endothelial dysfunction, tetrahydrobiopterine, L-arginine, L-norvaline, ADMA.