

23. Swanson E. A., Izatt J. A. et al. In vivo retinal imaging by optical coherence tomography // Opt. lett. – 1993. – № 18. – P. 1864–1866.

24. Toru baba at al severe olfactory dysfunction is a prodromal symptom of dementia associated with PD: a 3 year longitudinal study // Brain a jour of neur. – 2012. Jan. – P. 161–169.

25. Xiang Gao, Honglei Chen et al. Erectile function and risk of parkinsons disease // Am. j. epidemiol. – 2007. – Dec. № 166 (12). – P. 1446–1450.

26. Wu Y., Le W., Jankovic J. Preclinical biomarkers of parkinson disease // Arch. neurol. – 2011. – № 68. – P. 22–30.

Поступила 17.03.2015

**В. И. ЯКУШЕВ, В. В. ГУРЕЕВ, М. В. ПОКРОВСКИЙ,
М. В. КОРОКИН, О. С. ГУДЫРЕВ, Т. Г. ПОКРОВСКАЯ,
Е. А. БЕСХМЕЛЬНИЦЫНА, А. С. ЛИТВИНОВА, В. В. ЕЛАГИН**

ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТИВНАЯ И КАРДИОПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ СЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА АРГИНАЗЫ II В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Кафедра фармакологии ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный
исследовательский университет»,*

Россия 308014, г. Белгород, ул. Победы, 85; тел. (4722) 30-13-73. E-mail: vladi-yakus@yandex.ru

Исследована эндотелиопротективная и кардиопротективная активность селективного ингибитора фермента аргиназы II, вещества под шифром ZB49-0010C, на модели L-NAME-индуцированного дефиците оксида азота в эксперименте. Результаты исследований доказывают наличие у селективного ингибитора фермента аргиназы II, вещества под шифром ZB49-0010C, дозозависимой эндотелиопротективной и кардиопротективной активности, выраженность которой усиливается с увеличением дозы.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, селективный ингибитор аргиназы II, оксид азота, L-NAME.

**V. I. YAKUSHEV, V. V. GUREEV, M. V. POKROVSKII, M. V. KOROKIN, O. S. GUDYREV,
T. G. POKROVSKAYA, E. A. BESKHMELNITSYNA, A. S. LITVINOVA, V. V. ELAGIN**

**ENDOTHELIOPROTECTIVE AND CARDIOPROTECTIVE ACTIVITY
OF SELECTIVE ARGINASE II INHIBITOR**

*Department of pharmacology Belgorod state national research university,
Russia, 308014, Belgorod, street Victory, 85; tel. (4722) 30-13-73. E-mail: vladi-yakus@yandex.ru*

They researched endothelioprotective and cardioprotective activity of arginase II selective inhibitor (substance code ZB49-0010C) in model of L-NAME-induced deficit of nitric oxide. The results of studies of arginase II selective inhibitor (substance code ZB49-0010C) show the presence dose- dependent endothelioprotective and cardioprotective activity, the severity of which sincreases with increasing dose.

Key words: endothelial dysfunction, arginase II selective inhibitor, nitric oxide, L-NAME.

Введение

На сегодняшний день смертность от заболеваний сердечно-сосудистой системы занимает лидирующие позиции в развитых странах мира. Основным предиктором данной группы заболеваний выступает эндотелиальная дисфункция, которая проявляется нарушением релаксационных, антиагрегационных и ряда других свойств сосудистого эндотелия [1, 2, 4, 5, 6]. Ключевым звеном патогенеза эндотелиальной дисфункции выступает дефицит эндогенного оксида азота. Оксид азота (NO) – это ведущий гуморальный фактор релаксации сосудов, вырабатываемый эндотелием [3,

7, 9, 10]. В организме человека и животных оксид азота синтезируется из аминокислоты L-аргинина под действием фермента эндотелиальной NO-синтазы (e-NOS). При этом фермент аргиназа II катализирует процесс перехода L-аргинина в L-орнитин, что приводит к уменьшению содержания субстрата для синтеза оксида азота. Именно поэтому селективная блокада фермента аргиназы II будет способствовать повышению содержания L-аргинина, что приведет к увеличению выработки оксида азота [11, 15]. В связи с этим целью нашего исследование явилось изучение эндотелиопротективной и кардиопротективной активности

селективного ингибитора фермента аргиназы II в широком диапазоне доз.

Материалы и методы

Опыты проводились на белых крысах-самцах линии Wistar массой 200–250 г. Для моделирования эндотелиальной дисфункции N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) вводился внутривнутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7 дней. В эксперименте были использованы следующие группы животных: 1) интактные – внутривнутрибрюшинно введение 1%-ной крахмальной слизи раствора хлорида натрия в дозе 10 мл/кг в течение 7 суток (n=10); 2) контрольные – внутривнутрибрюшинно введение L-NAME в дозе 25 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7 дней (n=10); 3) селективный ингибитор фермента аргиназы II, вещество ZB49-0010C внутривнутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7 дней подряд; 4) селективный ингибитор фермента аргиназы II, вещество ZB49-0010C внутривнутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7 дней подряд; 5) селективный ингибитор фермента аргиназы II, вещество ZB49-0010C внутривнутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7 дней подряд. Селективный ингибитор фермента аргиназы II, вещество ZB49-0010C вводилось в течение 7 дней за 30 минут до введения L-NAME (n=10).

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. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и

частоту сердечных сокращений (ЧСС) – измеряли непрерывно посредством датчика TSD104A и аппаратно-программного комплекса MP150 производства «Biopac System, Inc.», США. Помимо измерения АД проводили ряд функциональных тестов с последующей оценкой изменения параметров гемодинамики (САД, ДАД, ЧСС) на эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВД) и на эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭЗВД) [8].

Степень эндотелиальной дисфункции, а также эффективность ее коррекции у экспериментальных животных исследуемыми препаратами оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД) [8].

Для оценки функциональных возможностей миокарда у животных, находящихся на управляемом дыхании, катетеризировали полость левого желудочка и проводили нагрузочные пробы на адренореактивность и нагрузку сопротивлением [8].

Уровень стабильных метаболитов NO (т. е. суммарную концентрацию нитратов и нитритов, NOx) определяли колориметрическим методом в плазме крови крыс.

Статистическую обработку результатов исследования проводили по общепринятым методам, рассчитывая средние значения показателей (M) и ошибку средней арифметической ($\pm m$). Достоверность различий между средними значениями определяли по непарному t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования

Моделирование патологии с помощью блокады эндотелиальной NO-синтазы N-нитро-L-аргинин метиловым эфиром (L-NAME) приводило к развитию артериальной гипертензии (САД – 190,3 \pm 6,7;

Таблица 1

Показатели артериального давления, коэффициента эндотелиальной дисфункции и концентрации стабильных метаболитов оксида азота (Total NOx) при моделировании и коррекции L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота селективным ингибитором фермента аргиназы II, веществом под шифром ZB49-0010C (n=10, M \pm m)

Группы животных	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.	КЭД, у. е.	Total NOx, мкМ
Интактные	137,7 \pm 3,7	101,9 \pm 4,3	1,1 \pm 0,1	114,0 \pm 3,4
Получавшие L-NAME (25 мг/кг) 7 дней	190,3 \pm 6,7*	145,0 \pm 3,9*	5,4 \pm 0,6*	55,0 \pm 2,9*
Получавшие L-NAME + ZB49-0010C (1 мг/кг)	201,5 \pm 10,0*	151,3 \pm 4,9*	4,0 \pm 0,5**	75,2 \pm 3,6**
Получавшие L-NAME + ZB49-0010C (5 мг/кг)	174,1 \pm 5,9**	132,7 \pm 5,0**	3,3 \pm 0,5**	89,5 \pm 2,5**
Получавшие L-NAME + ZB49-0010C (10 мг/кг)	159,5 \pm 7,4**	129,0 \pm 5,8**	2,3 \pm 0,3**	100,8 \pm 3,0**

Примечание: САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, * – достоверное различие с группой интактных животных (p<0,05); ** – достоверное различие с группой животных, получавших L-NAME (p<0,05).

Влияние селективного ингибитора фермента аргиназы II, вещества под шифром ZB49-0010C на функциональные возможности миокарда при проведении нагрузочных проб на фоне моделирования L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота ($M \pm m$, $n=10$)

Группа животных	Адренореактивность (мм рт. ст.)	Исчерпание миокардиального резерва (%)
Интактные	199,2 ± 8,3	83,6 ± 4,3
Получавшие L-NAME (25 мг/кг) 7 дней	247,3 ± 4,8*	66,0 ± 4,6 *
Получавшие L-NAME + ZB49-0010C (1 мг/кг)	239,1 ± 10,0	73,7 ± 7,4 **
Получавшие L-NAME + ZB49-0010C (5 мг/кг)	195,5 ± 12,0**	82,0 ± 7,8 **
Получавшие L-NAME + ZB49-0010C (10 мг/кг)	183,0 ± 8,3**	89,7 ± 7,6**

Примечание: * – достоверное различие с группой интактных животных ($p < 0,05$); ** – достоверное различие с контрольной группой ($p < 0,05$).

ДАД – 145,0 ± 3,9 мм рт. ст.). Тогда, как у интактных животных значения САД и ДАД находились в пределах физиологической нормы. Влияние селективного ингибитора фермента аргиназы II, вещества под шифром ZB49-0010C на исходные показатели артериального давления, коэффициента эндотелиальной дисфункции и концентрацию стабильных метаболитов оксида азота (Total NOx) в плазме крови у наркотизированных крыс при моделировании L-NAME-индуцированной патологии представлено в таблице 2.

Обнаружено, что ежедневное введение селективного ингибитора фермента аргиназы II, вещества под шифром ZB49-0010C на фоне моделирования L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота предотвращает повышение КЭД и снижение концентрации стабильных метаболитов оксида азота. При этом данные эффекты носили дозозависимый характер. Так, в дозе 10 мг/кг селективный ингибитор фермента аргиназы II, вещество под шифром ZB49-0010C, наиболее выраженно предотвращал повышение КЭД и снижение концентрации стабильных метаболитов оксида азота на фоне моделирования L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции, тогда как в дозе 1 мг/кг воздействие на данные показатели было незначительным, а в дозе 5 мг/кг эффективность была промежуточной между дозой 1 и 10 мг/кг (табл. 1). Также установлено, что селективный ингибитор фермента аргиназы II, вещество под шифром ZB49-0010C предотвращает повышение АД, причем в дозе 10 мг/кг наиболее выраженно, тогда как в дозе 1 мг/кг не оказывает влияния на данный показатель.

Для оценки влияния селективного ингибитора фермента аргиназы II, вещества под шифром

ZB49-0010C на функциональные показатели сократимости миокарда левого желудочка на фоне моделирования L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота проводились пробы на адренореактивность и нагрузку сопротивлением, результаты которых представлены в таблице 2.

Проба на адренореактивность характеризовалась выраженным повышением абсолютных значений ЛЖД в группе животных, получавших L-NAME, в сравнении с группой интактных животных. При этом ежедневное введение селективного ингибитора фермента аргиназы II, вещества под шифром ZB49-0010C на фоне моделирования L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота предотвращало повышение адренореактивности, причем наиболее выраженно в дозе 10 мг/кг, тогда как в дозе 1 мг/кг не отмечено статистически достоверных отличий по сравнению с контрольной группой.

При проведении пробы на нагрузку сопротивлением установлено, что введение селективного ингибитора фермента аргиназы II, вещества под шифром ZB49-0010C предотвращало падение сократимости миокарда левого желудочка от 5-й до 25-й секунды пережатия восходящей аорты. При этом влияние носило дозозависимый характер. Так, в дозе 10 мг/кг отмечалось наиболее выраженное предотвращение падения миокардиального резерва, тогда как в дозе 1 мг/кг влияние на сократительную активность миокарда было минимальным.

Обсуждение

Таким образом, проведенные исследования показали, что селективный ингибитор фермента аргиназы II, вещество под шифром ZB49-0010C

обладает выраженной дозозависимой эндотелиопротективной активностью, которая проявляется в предотвращении нарушений взаимоотношения эндотелиозависимой и эндотелионезависимой вазодилатации и улучшении NO-синтезирующей функции эндотелия на ADMA-подобной модели патологии. При этом данные эффекты наиболее выражены в дозе 10 мг/кг. Исследование влияния селективного ингибитора аргиназы II на сократимость миокарда выявило его выраженное дозозависимое кардиопротективное действие, которое проявлялось в уменьшении чувствительности миокарда к адреналину и сохранении миокардиального резерва при проведении пробы на нагрузку сопротивлением. При этом также данные эффекты были максимальны в дозе 10 мг/кг. Данные эффекты в первую очередь связаны с повышением биодоступности L-аргинина как основного субстрата для синтеза оксида азота за счет блокирования его биотрансформации аргиназой II.

Полученные данные полностью перекликаются с результатами, полученными другими авторами [12, 13, 14, 16], и свидетельствуют о перспективности создания лекарственных препаратов, подавляющих активность аргиназы II. Селективность исследуемого препарата делает его более предпочтительным, т. к. нет влияния на обмен мочевины [11, 15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабко А. В. Влияние сочетанного применения ингибитора аргиназы L-норвалина и фиксированной комбинации лозартана и гидрохлоротиазида в одной таблетке на эндотелиальную дисфункцию при экспериментальном моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота / А. В. Бабко, М. В. Покровский, Е. Г. Терехова и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2011. – № 4. – С. 24–28.

2. Бокарев И. Н. Артериальная гипертония – болезнь или фактор риска? // Клинич. медицина. – 2004. – № 9. – С. 69–71.

3. Покровская Т. Г. Использование L-аргинина в профилактике нарушений функции эндотелия в условиях ингибирования эндотелиальной и индуцибельной NO-синтаз / Т. Г. Покровская, В. И. Кочкаров, М. В. Покровский и др. // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9. № 3. – С. 328.

4. Покровская Т. Г. Роль фармакологической коррекции метаболического пути L-аргинин/NO при моделировании дефицита оксида азота // Кубанский науч. мед. вестн. – 2008. – № 4. – С. 122–125.

5. Покровская Т. Г. Эндотелиопротективное действие L-аргинина при фармакологическом способе моделирования дефицита оксида азота / Т. Г. Покровская, В. И. Кочкаров, Л. М. Даниленко и др. // Научные ведомости Белгородского гос. ун-та. – 2006. – № 3 (23). Вып. 4. – С. 43–51.

6. Покровский М. В. Эндотелиопротективные эффекты L-аргинина при экспериментальном моделировании дефицита оксида азота / М. В. Покровский, Т. Г. Покровская, В. И. Кочкаров, Е. Б. Артюшкова // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2008. – Т. 71. № 2. – С. 29–31.

7. Покровский М. В. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / М. В. Покровский, В. И. Кочкаров, Т. Г. Покровская и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – Краснодар, 2006. – № 10. С. 72–77.

8. Солонин Д. Л. Роль оксида азота в регуляции растяжимости артериальных сосудов у нормо- и гипертензивных крыс / Д. Л. Солонин, А. В. Сыренский, М. М. Галагудза и др. // Артериальная гипертония. – 2002. – № 6. – С. 57–64.

9. Цепелева С. А. Кардио- и эндотелиопротективные эффекты ингибитора аргиназы L-норвалина при моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота / С. А. Цепелева, М. В. Покровский, Т. Г. Покровская и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2011. – № 4. – С. 185–187.

10. Якушев В. И. Аргиназа – новая мишень для фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции / В. И. Якушев, М. В. Покровский, М. В. Корокин и др. // Научные ведомости БелГУ. Сер. «Медицина. Фармация». – 2012. – № 22 (141). Вып. 22/3. – С. 36–41.

11. Arginase inhibition mediates renal tissue protection in diabetic nephropathy by a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism / H. You, T. Gao, T. K. Cooper (et al.) // Kidney int. – 2013. – Vol. 84 (6). – P. 1189–1197. doi: 10.1038/ki.2013.215.

12. Arginase inhibition improves endothelial function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus / A. Shemyakin, O. Kövamees, A. Rafnsson (et al.) // Circulation. – 2012; vol. 126 (25). – P. 2943–2950. doi: 10.1161/Circulationaha.112.140335.

13. Arginase II inhibition prevents nitrate tolerance / S. M. Khong, K. L. Andrews, N. N. Huynh (et al.) // Br. j. pharmacol. – 2012. – Vol. 166 (7). – P. 2015–2023. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01876.x.

14. Bivalacqua T. Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum in diabetic-associated erectile dysfunction / T. Bivalacqua, W. Hellstrom, P. Kadowitz et al. // Biochem biophys. res. commun. – 2001. – Vol. 283. – P. 923–927.

15. Effect of arginase inhibition on ischemia-reperfusion injury in patients with coronary artery disease with and without diabetes mellitus / O. Kövamees, A. Shemyakin, J. Pernow // PLoS one. – 2014. – Jul. 29. № 9 (7). – P. 103–260. doi: 10.1371/journal.pone.0103260.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ № МД-4711. 2015.7 и Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14. 578.21.0012, уникальный идентификатор соглашения RFMEFI57814X0012).

Поступила 23.04.2015