

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.176.2:577.151.042

©Коллектив авторов

КОРРЕКЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЕРДЦА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ МИОКАРДА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПРИМЕНЕНИИ ИНГИБИТОРА ЭНДОТЕЛИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

В.А.ПЕТРУХИНА¹, Н.А.МЕДВЕДЕВА¹, Ю.В.ХРОПОВ¹, В.Ф.ПОЗДНЕВ,²
О.А.ГОМАЗКОВ², О.С.МЕДВЕДЕВ³.

¹Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, тел.: (095) 939-28-27;
факс: (095) 932-98-28; эл. почта: vikapet@fbm.msu.ru

²НИИ биомедицинской химии РАМН; факс: (095) 245-08-57

³Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В.Ломоносова;
факс: (095) 932-98-28;

В экспериментах на бодрствующих крысах Вистар показано, что эмболизация коронарного русла пластиковыми микросферами диаметром 15 мкм приводит к достоверному снижению системного ($AD_{\text{сист}}$) и систолического артериального давления в левом желудочке сердца ($САД_{\text{лж/тах}}$) на 10,1 и 21,1 %, соответственно ($p < 0,05$). Ингибитор эндотелин-превращающего фермента (ЭПФ), оригинальный пептидный препарат РР36, вводимый перорально в течение четырех суток (начиная за 2 дня до эмболизации миокарда) нивелировал указанные изменения гемодинамики. На введение добутамина у эмболизированных животных наблюдали значительно меньшее увеличение $САД_{\text{лж/тах}}$ и контрактильности миокарда ($+dP/dt_{\text{тах}}$) по сравнению с ложнооперированными. РР-36 нормализовал ответ ишемизированного сердца на бета-адренергическую стимуляцию. Наибольшее увеличение $AD_{\text{сист}}$ и $САД_{\text{лж/тах}}$ в ответ на введение L-NAME наблюдали у эмболизированных крыс. РР-36 снижал этот эффект и увеличивал реакцию на амингуанидин как у эмболизированных ($AD_{\text{сист}}$: $+12,4 \pm 1,6$ по сравнению с $+6,8 \pm 2,3$ мм рт ст, $p < 0,05$), так и у ложнооперированных животных ($AD_{\text{сист}}$: $+8,5 \pm 1,1$ по сравнению с $+5,6 \pm 0,7$ мм рт ст, $p < 0,05$). Данное исследование свидетельствует о возможности восстановления ишемических нарушений сердца с помощью нового ингибитора ЭПФ - РР36. Один из механизмов такой коррекции может включать в себя системные или регионарные (миокард) изменения вклада оксида азота в поддержание нормального уровня АД.

Ключевые слова: острая ишемия миокарда, микросферы, гемодинамика, ингибитор эндотелин-превращающего фермента, ингибиторы синтаз, NO.

ВВЕДЕНИЕ. При острой ишемии миокарда, исследуемой в клинике или в эксперименте, в плазме крови существенно увеличивается уровень эндотелина-1 (ЭТ-1). Содержание пептида, в основном, коррелирует с тяжестью патологического процесса [1]. В экспериментах обнаружено увеличение сократимости миоцитов желудочка, плотности рецепторов ЭТ-1 и сарколеммы под влиянием пептида при моделировании сердечной недостаточности изопроterenолом [2, 3]. Показано, что неспецифический антагонист рецепторов эндотелина (ЕТА и ЕТВ) бозентан препятствовал ишемическим и реперфузионным поражениям миокарда: снижал коронарospазм и улучшал показатели сократительной активности сердца [4].

Эффекты, связанные с ЭТ-1, можно модулировать, применяя ингибиторы эндотелин-превращающего фермента (ЭПФ). При сравнении терапевтического действия ингибитора ЭПФ и специфических антагонистов ЕТА-рецепторов эндотелина при ишемической болезни сердца выявлено предпочтительное применение ингибитора ЭПФ [5]. Синтез и исследование гемодинамических эффектов новых ингибиторов ЭПФ (препаратов РР-35 и РР-36), а также недостаточное понимание участия эндотелина-1 в патогенезе острой ишемии миокарда явилось основанием для изучения действия препаратов на развитие этой патологии в экспериментах на крысах [6, 7].

Известно, что большинство химических факторов, синтезируемых в эндотелии или циркулирующих с кровью, реализуют свое действие через экспрессию синтеза оксида азота (NO). NO постоянно секретируется во всех типах эндотелия и принимает участие в поддержании базального тонуса артериальных сосудов. Как правило, NO-зависимое расслабление сосудистой стенки, вызванное эндотелином, опосредуется через ЕТВ-рецепторы пептида, сопряженные с эндотелиальной изоформой NO-синтазы [8]. С другой стороны, показано, что локальное высвобождение NO значительно возрастает при ишемии миокарда. Этот процесс связан с экспрессией индуцибельной изоформы NO-синтазы [9]. Однако, вопросы о роли [10, 11] и взаимодействии [12, 13] систем синтеза эндотелина и оксида азота при патологии миокарда *in vivo* остаются достаточно спорными.

Целью данного исследования явилось изучение NO-зависимого механизма развития острой ишемии миокарда крыс, вызванной эмболизацией коронарных сосудов, и возможность ее коррекции ингибитором эндотелин-превращающего фермента *in vivo*. Предварительное сообщение было представлено ранее [7, 14].

МЕТОДЫ. Исследование проведено на самцах крыс Вистар, массой 300-400 г, полученных из вивария филиала ИБХ РАН г. Пущино. Эмболизацию коронарных сосудов осуществляли пластиковыми микросферами диаметром 15 микрон (NEN Res. Prod., США), вводимых в суспензии в количестве 150-200 тысяч в 0,25 мл физиологического раствора [15]. Непосредственно перед введением суспензии в восходящую дугу аорты микросферы были обработаны ультразвуком для предотвращения образования конгломератов. При использовании такого метода в коронарной системе крысы оседает около 40% массы микросфер, что приводит к развитию мультифокальной острой ишемии миокарда с падением пика систолического давления в левом желудочке.

(САД_{лж/мах}) и скорости развития желудочкового давления ($+dP/dt_{мах}$) [16]. В течение всего срока эксперимента крысы находились в клетках индивидуального размещения с древесной подстилкой, стандартным кормом, температурой помещения 22-24 °С и 12-часовым режимом смены освещения.

Животные были разделены на четыре группы: 1 – ложнооперированные; 2 – крысы с эмболией сосудов коронарного русла; 3 – крысы с эмболией, которые получали препарат РР-36 до и после эмболизации (2+2 суток); 4 – ложнооперированные животные, получавшие ингибитор ЭПФ (препарат РР-36). Препарат добавляли в питьевую воду за двое суток до операции и в последующие двое суток после операции. Доза ингибитора ЭПФ РР-36 составляла 1,7 мг/кг в сутки.

Препараты РР-35 и РР-36 (пероральная форма) были синтезированы в НИИ биомедицинской химии РАМН. Структура ингибитора включает N-бензилсукцинильную группу и дипептид - Leu-Trp-ОН. При исследовании биологической активности выявлено, что соединение РР-35 (инъекционная форма), как и фосфорамидон, нивелировало увеличение системного АД и снижение частоты сердечных сокращений (ЧСС) у бодрствующих нормотензивных крыс, вызываемые болюсным введением "большого эндотелина-1" (непосредственного предшественника активной формы пептида). Реакции на ЭТ-1 оставались неизменными [6]. Соединение РР-36, вводимое *per os*, под воздействием кислой среды желудка животных переходит в форму РР-35 и всасывается в кровяное русло.

Основную часть исследования проводили на бодрствующих животных с предварительно имплантированными катетерами в бедренную артерию (регистрация системного давления из брюшной аорты), в бедренную вену (для введения веществ) и в левый желудочек сердца (запись показателей сократительной функции: САД_{лж/мах} и $+dP/dt_{мах}$). После 20-минутной фоновой регистрации проводили фармакологические тесты с болюсным внутривенным введением следующих веществ: (а) добутамин, агонист бета-адренорецепторов, 4 мкг/кг ("Hexal", Германия); (б) нитро-аминогуанидин, который в низких дозах преимущественно блокирует активность индуцибельной формы синтазы оксида азота, 10 мг/кг ("Реахим", Россия; перед использованием препарат был очищен многократной экстракцией этанол-вода); (в) нитро-L-аргинин-метилвый эфир (L-NAME), неселективный ингибитор NO-синтаз, 10 мг/кг ("Sigma", США).

Данные представлены в виде: среднее±ошибка среднего. Статистическую обработку проводили, используя двухфакторный анализ ANOVA пакета программ STATISTICA 4.0 (Statistica Inc., США). Для межгруппового сравнения использовали критерий Ньюмена-Кейсла. Уровень доверительной вероятности $p<0,05$ рассматривали как статистически значимый.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Пероральное введение препарата РР-36 в течение 4-х суток не вызывало изменений в величинах АД_{сист} и САД_{лж/мах}, но приводило к достоверному увеличению ЧСС на 14,3 %, ($p<0,05$) (сравнение групп 1 и 4; табл.1). Эмболизация крыс существенно влияла на все исследуемые показатели и, в первую очередь, достоверно снижала САД_{лж/мах} на 21,1 % ($p<0,05$), что свидетельствует о нарушении сократительной активности левого желудочка сердца. Хроническое применение препарата РР-36 у эмболизированных

животных приводило к увеличению системного АД и САД_{удж/мах}, которые в этом случае уже не отличались от контрольных значений (группа 2, 3 и 4, табл. 1).

Таблица 1. Показатели гемодинамики и сократительной функции сердца крыс с экспериментальной ишемией миокарда при использовании ингибитора ЭПФ.

Группы крыс	АД _{сист} , мм рт ст	САД _{удж/мах} , мм рт ст	+dP/dt _{мах} , мм рт ст/сек	ЧСС, уд/мин
1, n=8	91±6	132±8	7,3±0,8	370±15
2, n=8	82±4 * vs. 3	105±4 * vs. 1, 3	5,5±0,8	356±12
3, n=5	98±8	129±9	6,5±1,4	380±24
4, n=5	99±6	137±2	6,9±1,3	423±13 * vs. 1

Группы животных: 1 - ложнооперированные, 2- эмболизированные, 3 – эмболизированные + РР-36, 4- ложнооперированные + РР-36. Статистически значимыми (отмечено *) принимали различия при уровне доверительной вероятности $p < 0,05$. vs. - versus - по сравнению.

Увеличение САД_{удж/мах} и +dP/dt_{мах} в ответ на введение добутамина (агониста бета-адренорецепторов) у эмболизированных животных по сравнению с группой ложнооперированных крыс было достоверно уменьшено в среднем на 10,2 мм рт ст и 1,27 мм рт ст/сек, соответственно. Потребление препарата РР-36 снимало достоверные различия в реакции на добутамин между эмболизированными и ложнооперированными животными (рис. 1).

На рисунке 2 представлены данные о влиянии неселективной (L-NAME) и селективной (аминогуанидин) в отношении индуцибельной NO-синтазы блокады синтеза оксида азота. В ответ на общую блокаду синтеза NO системное АД и максимальное давление в левом желудочке достоверно возрастали. Самой большой эта реакция оказалась у эмболизированных крыс (группа 2): 23,6±5,8 по сравнению с 17,3±2,6 мм рт ст ($p < 0,05$) у контрольных животных (группа 1). Однако у эмболизированных животных, получавших РР-36, увеличение реакции на фоне L-NAME оказывалось сопоставимым с такими же показателями в контрольных группах ложнооперированных крыс и ложнооперированных, получавших ингибитор ЭПФ (группы 1 и 4).

В ответ на селективное торможение активности индуцибельной изоформы синтазы оксида азота у эмболизированных животных 2-ой группы показано почти двукратное увеличение ответа САД_{удж/мах} по сравнению с контрольной группой (1). В то время в реакции системного АД достоверных различий в ответ на аминогуанидин в этих группах выявлено не было (рисунок 2). У животных с хроническим применением РР-36 возрастание САД_{удж/мах} на введение аминогуанидина достоверно не отличалось между группами эмболизированных и ложнооперированных животных, не было отличий и от групп животных, не получавших этот препарат. Увеличение системного АД на введение аминогуанидина у животных, потреблявших РР-36 с питьевой водой (группы 3 и 4), было достоверно выше по сравнению с группами 1 и 2.

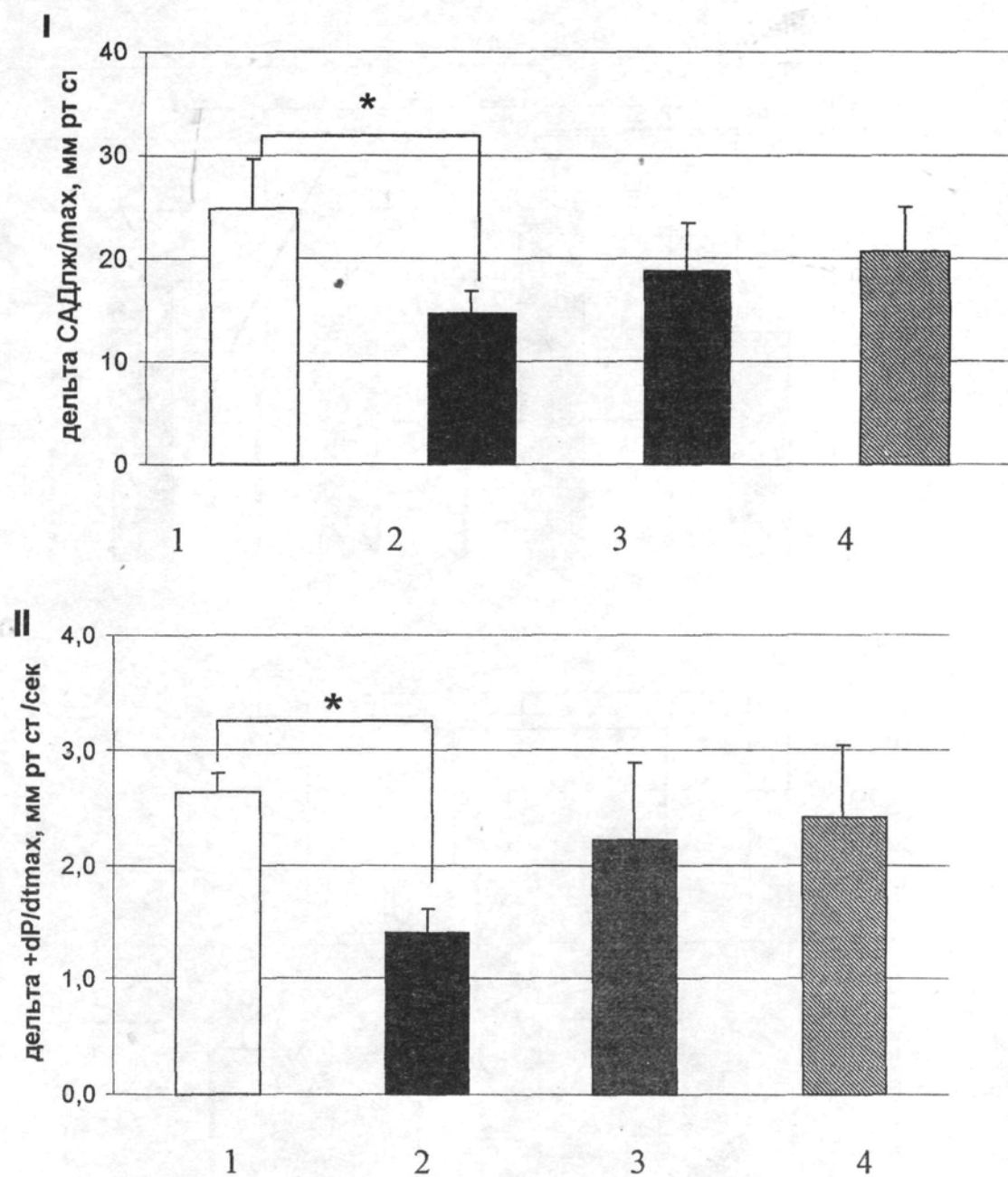


Рисунок 1.

Влияние добутина на величину максимального систолического давления в левом желудочке (САД_{лж/мах}) и показатели сократительной функции сердца (+dP/dt_{мах}) крыс после эмболизации и на фоне ингибитора ЭПФ

I - дельта САД_{лж/мах} в мм рт ст, II - дельта +dP/dt_{мах} в мм рт ст/сек, где дельта - разность между уровнем показателя до и после введения бета-агониста добутина в дозе 4 мкг/кг. Группы животных - см. табл.1. В группах 1 и 2 - n=8, в группах 3 и 4 - n=5.

* - p<0.05.

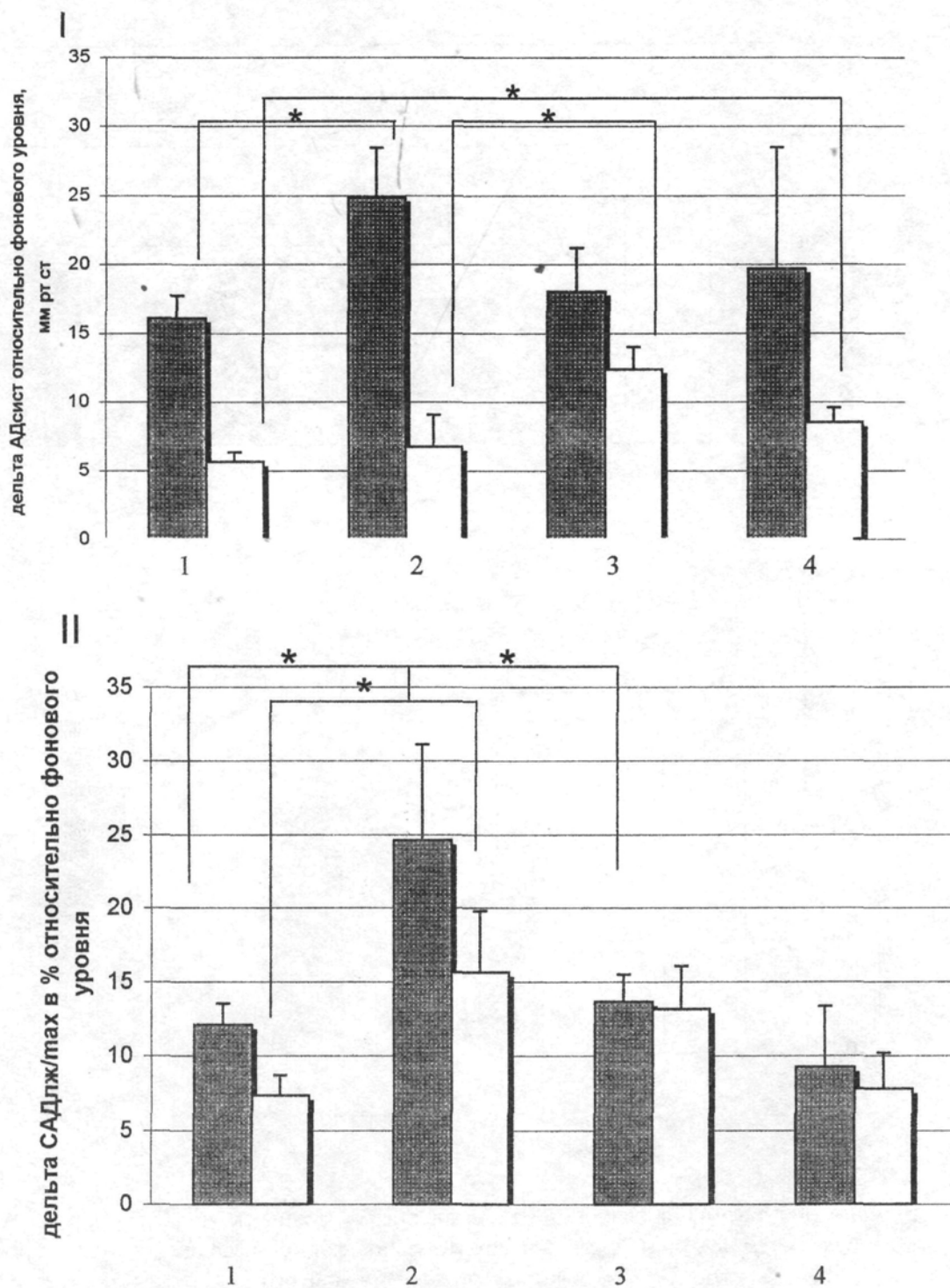


Рисунок 2.

Влияние L-NAME (10 мг/кг) и амингуанидина (10 мг/кг) на показатели гемодинамики и сократительной функции сердца у крыс после эмболизации и на фоне ингибитора ЭПФ.

I - АД_{сис}, II - САД_{лж/мах} (увеличение в % от фонового уровня параметра). Группы животных - см. табл. 1. В группах 1 и 2 - n=8, в группах 3 и 4 - n=5. * - p<0,05.

ОБСУЖДЕНИЕ. Согласно полученным данным, ингибитор эндотелин-превращающего фермента, препарат РР-36, не влиял на величину системного артериального давления, но достоверно увеличивал ЧСС у ложнооперированных животных. Можно предположить, что эндогенный эндотелин в норме у бодрствующих животных оказывает влияние на частоту сердечных сокращений, вызывая отрицательный хронотропный эффект. Существует несколько объяснений подобного факта. Показано прямое тормозящее действие эндотелина на пейсмекерную область предсердия у кроликов [17]. Механизм реализации этого эффекта не зависит от NO [18]. Еще одним механизмом наблюдаемого эффекта может быть активация В-типа рецепторов эндотелина, приводящая к позитивным хронотропным сдвигам и десенситизация А-типа рецепторов, связанная с негативными изменениями ЧСС [19]. Таким образом, отрицательное хронотропное действие эндогенного эндотелина может быть обусловлено как непосредственным его влиянием на работу пейсмекеров сердца, так и опосредовано через активацию разного подтипа рецепторов к ЭТ-1.

Хроническое применение ингибитора ЭПФ достоверно улучшало показатели системной гемодинамики и сократительной активности миокарда у крыс с острой ишемией. Повышенная функциональная активность ишемизированного миокарда (согласно косвенной оценке по ответу на бета-адреностимуляцию) у крыс, получивших РР-36, по-видимому, обусловлена вызванным ингибитором ЭПФ снижением синтеза эндотелина-1, продукция и секреция которого значительно возрастают в острую фазу повреждения сердца [20, 21].

Говоря о возможном механизме наблюдаемого эффекта, необходимо вспомнить, что существует связанная с ЕТА-рецепторами прямая корреляция между содержанием эндотелина-1 и L-NAME-зависимым синтезом NO [22, 23]. Действительно, и в наших экспериментах был выявлен эффект увеличения системного АД и САД_{лж/мах} в ответ на введение L-NAME у эмболизированных животных по сравнению с контролем. Это свидетельствует об увеличении вклада NO в формирование величины системного АД и САД_{лж/мах}. Важно отметить, что последний эффект связан, по-видимому, с активацией индуцибельной формы NO-синтазы (опыты с введением селективного блокатора этой формы фермента - аминугуанидина), в то время, как изменения системного АД не определялись этой формой фермента. Полученные данные свидетельствуют о локальном увеличении индуцибельной формы оксида азота в эмболизированном сердце, что может быть связано с развивающимся воспалением миокарда [11].

У эмболизированных животных после применения ингибитора ЭПФ наблюдали уменьшение вклада оксида азота в величину возросшего системного АД и САД_{лж/мах} (в экспериментах с введением L-NAME) по сравнению с контролем на фоне возросшей роли аминугуанидин-зависимой синтазы оксида азота в поддержании периферического уровня давления в организме. Последнее подтверждает полученные ранее *in vitro* данные об угнетении эндотелином продукции NO через влияние на индуцибельную изоформу синтазы оксида азота [13, 24]. Такая реструктуризация вкладов L-NAME- и аминугуанидин-чувствительных изоформ NO-синтаз в гемодинамику сопряжена, как уже

говорилось выше, с увеличением сократительной активности сердца. Таким образом, можно предположить, что одним из эффектов увеличения ЭТ-1, которое наблюдается в острой стадии ишемии сердца, является повышение L-NAME-зависимого синтеза оксида азота, что приводит к уменьшению величины системного и левожелудочкового АД. Этот процесс можно рассматривать как один из факторов патогенеза ишемического состояния сердца. Кроме того, увеличенное содержание эндотелина ухудшает функциональное состояние сердца, вызывая отрицательный хронотропный эффект. Можно предположить, что ингибирование ЭПФ в острую фазу развития ишемии сердца приводит к нормализации содержания эндогенного эндотелина и коррекции связанных с ним нарушений в работе сердца через амингуанидин-чувствительный механизм.

Работа поддержана грантами 98-04-48131 и 99-04-49619 Российского Фонда Фундаментальных Исследований и грантом 5491 фонда "Университеты России - фундаментальные исследования".

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Гомазков О.А. (1999), *Вопр. мед. химии*, **45**, 290-303.
- 2 Thomas P.B., Liu E., Webb M.L., Mukherjee R. (1996) *Amer. J. Physiol.-Heart. Circ. Phy.*, **40**, H2629-H2637
- 3 Suzuki M., Ohte N., Wang Z. (1998) *Cardiovasc. Res.*, **39**, 589-599
- 4 Li X.S., Wang Q.D., Pernow J. (1995) *Eur. J. Pharmacol.*, **283**, 161-168.
- 5 Wada A., Tsutamoto T., Ohnishi M., Sawaki M. et al. (1999) *Circulation*, **99**, 570-577.
- 6 Поздnev В.Ф., Гомазков О.А., Давыдова М.П., Медведева Н.А. (1998) *Бюлл.эксп.биол.мед.*, **126**, 526-529.
- 7 Petrukhina V., Medvedeva N., Gomazkov O., Medvedev O. (1999) 10th European conference for students and young doctors, Berlin; C24 (050).
- 8 Warner T.D. (1999), *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **26**, 247-252.
- 9 Kelly R.A., Balligand J.-L., Smith T. (1996) *Circ. Res.*, **79**, 363-380.
- 10 Wildhirt S.M., Weismueller S., Schulze C., Conrad N. et al. (1999) *Cardiovasc. Res.*, **43**, 698-711.
- 11 Kanno S., Lee P.C., Zhang Y., Ho C. et al. (2000) *Circulation*, **101**, 2742-2748.
- 12 Brunner F. (1997), *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 2363-2374.
- 13 Murayama T., Oda H., Sasaki Y., Okada T., Nomura Y. (1998) *Life. Sci.*, **62**, 1491-1495.
- 14 Gomazkov O., Pozdnev V., Medvedeva N., Davydova M. (1999) *Deutsch. Med. Wochenschr.*, **124**(S3), P64.
- 15 Gorodetskaya E.A., Dugin S.F., Medvedev O.S., Allabergenova A.E (1990) *J. Pharmacol. Meth.*, **24**, 43-52.
- 16 Дугин С.Ф., Городецкая Е.А., Медведев О.С., Ройтштейн М.Б., Боровиков Д.В. (1989) *Бюл. эксп. биол. мед.*, **107**, 550-552.
- 17 Tanaka H., Habuchi Y., Nishio M., Yamamoto T. (1998) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **31** Suppl 1, S440-442.

- 18 Zhu Y., Yang H.T., Endoh M. (1997) *Eur. J. Pharmacol.*, **332**, 195-199.
- 19 Ono K., Sakamoto A., Masaki T., Satake M. (1998) *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 787-797.
- 20 Miyauchi T., Yanagisawa M., Tomizawa T. (1989) *Lancet*, **2**, 53-54.
- 21 Lerman A., Edwards B.S., Hallett J.W., Heublein D.M. et al. (1991) *N. Engl. J. Med.*, **325**, 997-1001.
- 22 Marshall J.L., Johns E.J. (1999) *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 809-815.
- 23 Montanari A., Biggi A., Carra N., Fasoli E. et al. (2000) *Hypertension*, **35**, 518-523.
- 24 Markewitz B.A., Michael J.R., Kohan D.E. (1997) *Am. J. Physiol.*, **272**, L1078-L1083.

Поступила 23.05.2000.

CORRECTION OF RAT HEART FUNCTIONAL STATE AFTER EXPERIMENTAL MYOCARDIAL ISCHEMIA IN CHRONICLE TREATMENT WITH ENDOTHELIN-CONVERTING ENZYME INHIBITOR

V.A.PETRUKHINA¹, N.A. MEDVEDEVA¹, Y.V. KHROPOV¹, V.F. POZDNEV,²
O.A. GOMAZKOV², O.S. MEDVEDEV³

¹School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Vorobjovy Gory, Moscow, 119899 Russia;

tel./fax: +7 /095/ 932-98-28; e-mail: vikapet@fbm.msu.ru

²Institute of Biomedical Chemistry RAMS, fax: (095) 245-08-57

³School of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University

Experiments on chronically instrumented Wistar rats demonstrated that 15mm microsphere embolization of coronary arteries led to a significant decrease in the systemic (AP_{syst}) and maximal left ventricular systolic pressures (LVSP_{max}) to 10.1 and 21.1 % , respectively (p<0.05). To evaluate the role of endothelin in this pathology, the inhibitor of endothelin-converting enzyme (ECE), PP-36, was used. PP-36 abolished hemodynamic changes caused by embolization after 4 days *per os* treatment (starting 2 days before surgical procedure). Dobutamine test revealed marked decreases of LVSP_{max} and +dP/dt_{max} responses in the embolized versus sham operated animals. PP-36 normalized ischemic heart response to beta-adrenergic stimulation. Maximal AP_{syst} and LVSP_{max} increases were observed in embolized rats. PP-36 abolished this effect and led to parallel rising reaction to aminoguanidine in embolized (AP_{syst}: +12.4±1.6 vs. +6.8±2.3 mmHg, p<0.05) as well as in sham operated rats (AP_{syst}: +8.5±1.1 vs. +5.6±0.7 mmHg, p<0.05). Thus, the present research showed the possibility to correct ischemic heart disturbance by using a new ECE inhibitor, PP-36. One possible mechanism of this drug's action may include systemic or myocardial changes in NO contribution to the maintenance of normal arterial pressure.

Key words: acute myocardial ischemia, microsphere, hemodynamic, endothelin-converting enzyme inhibitor, nitric oxide inhibitors