

УДК: 611.018.74:615.256.4

DOI: 10.18413/2313-8971-2015-1-4-15-20

Коклин И.С.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ АРГИНАЗЫ 2 И ТАДАЛАФИЛА В КОМБИНИРОВАННОЙ КОРРЕКЦИИ ГОМОЦИСТЕИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

врач-хирург БМУ Курская ОКБ, ул. Сумская, 45а, г. Курск, РФ, 305000. e-mail: ikoklin@mail.ru

Аннотация. Использование селективных ингибиторов аргиназы 2 в сочетании с тадалафилом на фоне моделирование гомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции оказывало эндотелио- и кардиопротективное действие, выражающееся в предотвращении увеличения КЭД, адренореактивности, сохранении миокардиального резерва и нормализации значений биохимических маркеров (Тотал NO, Экспрессия eNOS).

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, селективные ингибиторы аргиназы 2, тадалафил.

Koklin I.S.

USE OF SELECTIVE INHIBITORS OF ARGINASE 2 AND TADALAFIL IN COMBINED COMPENSATION OF HOMOCYSTEINE-INDUCED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

doctor-surgery Regional Kursk Clinic Hospital,, st. Sumskaaya, 45a, 305000, Kursk, Russia. e-mail: ikoklin@mail.ru

Annotation. The use of selective inhibitors of arginase 2 in combination with tadalafil on background modeling homocysteine-induced endothelial dysfunction provided endothelial and cardioprotective effects, manifested in preventing the proliferation of CED, adrenoreactivity, maintaining myocardial reserve and the normalization of the values of biochemical markers (Total of NO, expression of eNOS).

Keywords: endothelial dysfunction, selective inhibitors arginase 2, tadalafil.

Введение: Гипергомоцистеинемия может являться независимым фактором развития эндотелиальной дисфункции или усиливать уже имеющееся повреждение эндотелия [1]. Известных факторов коррекции гипергомоцистеинемии не так много и, пожалуй, к ним следует отнести лишь экзогенное введение витамина B₆ и фолиевой кислоты. В клинических исследованиях применение фолиевой кислоты или 5-метилтетрагидрофолата (5-МТГФ, активная и циркулирующая форма фолиевой кислоты) заслужило наибольшего внимания, так как данные агенты могут оказывать потенциально благоприятное влияние на метаболизм тетрагидробиоптерина (BH₄).

Одновременно, появление в последние годы понятий «эндогенного ингибирования» эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и «разрыва eNOS» привело к интенсификации исследований, направленных на их предотвращение, как ключевых звеньев в коррекции эндотелиальной дисфункции. Метилированные аналоги L-аргинина – ассиметричный диметиларгинин (ADMA) и монометиларгинин (L-NMMA) – являются эндогенными ингибиторами

эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) [2-6] «Разрыв eNOS» представляет собой переключение ферментной активности eNOS на выработку супероксида, а не окиси азота.

Кроме того, ограничение образования оксида азота может быть обусловлено высокой активностью аргиназы. Становится очевидной необходимость подавления высокой активности аргиназы для снижения риска и частоты развития болезней сердца и сосудов. С этой целью возможно использовать ингибиторы аргиназы 2 [7].

В ранее проводимых исследованиях было показано, что L-аргинин как при монотерапии, так и в сочетании с антигипертензивными средствами на ADMA-подобной модели L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции эффективно увеличивал активность эндотелиальной NO-синтазы и продукцию оксида азота, а также предотвращал развитие эндотелиальной дисфункции в эксперименте [2=6].

Методика: Моделирование гомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции проводили путем ежедневного перорального в течение 7 дней введения метионина в дозе

3000 мг/кг [1]. Селективные ингибиторы аргиназы 2 - соединений с лабораторными шифрами С239-0844, L207-0208, L207-0210, L207-0322, L207-0404, L207-0525, L327-0346 в дозе 1 мг/кг и тадалафил 0,1 мг/кг. На 8 день оценивали степень эндотелиальной дисфункции оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД), результаты функциональных проб на адренореактивность и истощение миокардиального резерва, а также динамику значений ТоталNO и экспрессия eNOS [8, 9].

Достоверность изменений абсолютных параметров определяли разностным методом вариационной статистики с нахождением средних значений сдвигов (M), средней арифметической ($\pm m$) и вероятности возможной ошибки (p) по таблицам Стьюдента. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$. Статистические расчёты проводились с использованием программы Microsoft Excel 7.0.

Результаты: Ингибиторы аргиназы 2 умеренно снижали АД и КЭД. Наибольшую активность показали соединения L207-0525, L327-0346 в дозе 1 мг/кг, где значения КЭД составили $1,5 \pm 0,3$ у.е. и $1,9 \pm 0,4$ у.е. тогда как в

контроле $3,5 \pm 0,4$ у.е. (табл. 1). Одновременно, соединения обнаружили кардиопротективное действие, предотвращая увеличение адренореактивности и истощение миокардиального резерва и отрицательную динамику значений конечных метаболитов оксида азота NOx и экспрессии NOS (табл. 2, 3). Комбинированное применение препаратов усилило защитное действие в отношении предотвращения повышения КЭД и снижения АД и конечных метаболитов оксида азота NOx и экспрессии eNOS., однако не дало усиления кардиопротективного эффекта (табл. 1-3).

Обсуждение полученных результатов: Как показано на рисунке 1, увеличение активности аргиназы может привести к использованию L-аргинина, необходимого для выработки NO eNOS и, следовательно к развитию эндотелиальной дисфункции. Учитывая, что снижение биодоступности NO при эндотелиальной дисфункции патогенетически участвует в целом ряде сердечно-сосудистых заболеваний, активация аргиназы 2 может быть важным пусковым фактором их развития.

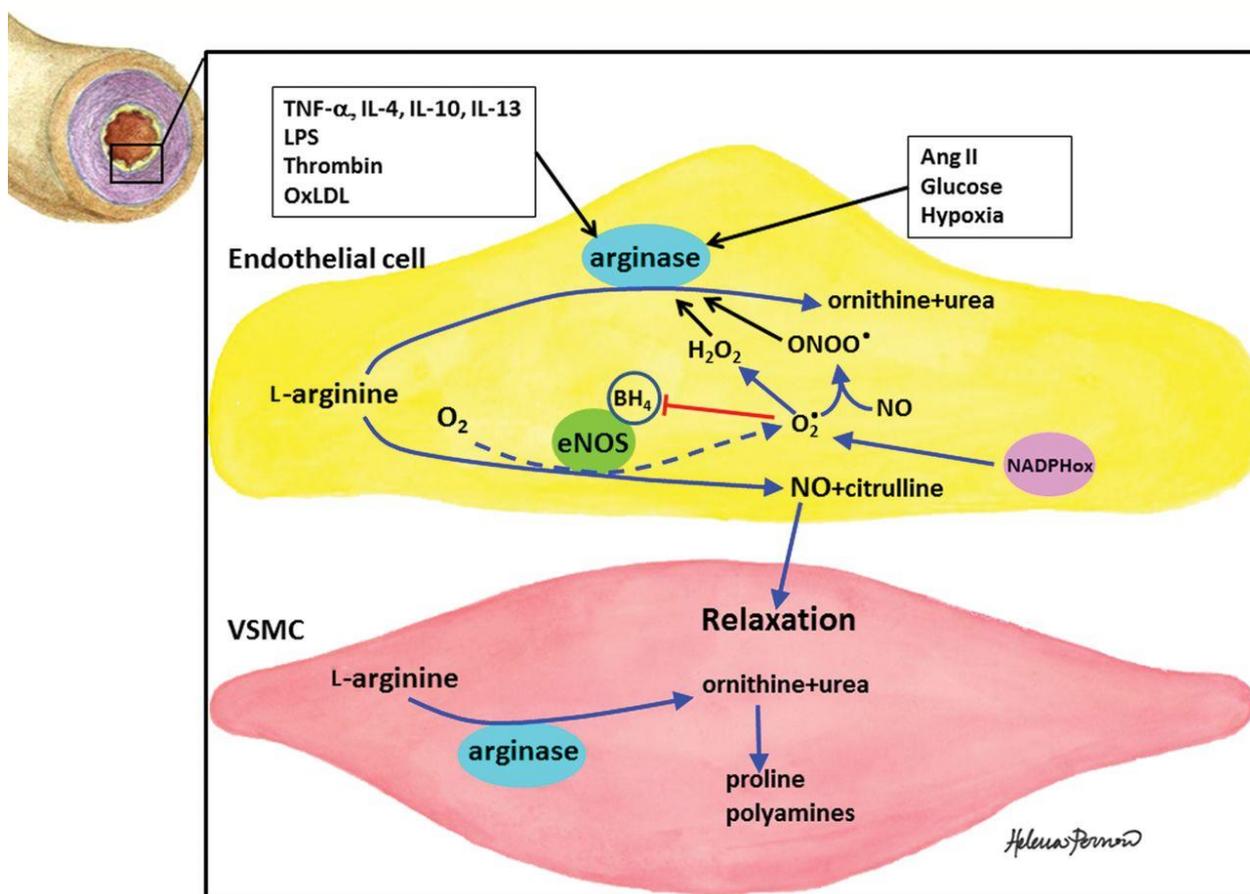


Рисунок 1. Схематическое изображение действием аргиназы в регуляции биодоступности NO и функции гладкомышечных элементов сосудистой стенки.

Повышенная активность аргиназы будет с помощью гидролиза L-аргинина и орнитина и мочевины снижают доступность L-аргинина для NO-синтазы (NOS), тем самым снижая выработку NO. Отсутствие L-аргинина также приведет к "разобщению" eNOS в результате чего фермент продуцирует супероксид вместо NO. Генерация супероксида несвязанного с eNOS и НАДФН-оксидазы и пероксинитрита из супероксида и NO приведет к дальнейшему увеличению активности аргиназы. В совокупности эти изменения будут уменьшать биодоступность NO и способствуют эндотелиальной дисфункции. В гладкомышечных клетках сосудов, орнитин увеличивает формирование L-пролина и полиаминов, которые стимулируют пролиферацию клеток. Ангиотензин - ангиотензина II; ВН 4, тетрагидробиоптерин; ЛПНП, липопротеинов низкой плотности; ЛПС, липополисахарид; NADPHox, никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидаза; HET, оксид азота; ONOO - пероксинитрита; VSMC, сосудистая клетка гладкой мышцы.

Ряд исследований убедительно показали, что увеличение активности аргиназы приводит к развитию эндотелиальной дисфункцией на экспериментальных моделях гипертонии [10], атеросклероза [11], диабета [12], и старения [13]. Кроме того, повышение цитозольного уровня аргиназы II при гипоксии совместно «разобщают eNOS» [14]. Наконец, аргиназа может также ингибировать транспорт L-аргинина в эндотелиальных клетках, что приводит к дальнейшему сокращению доступности субстрата для eNOS [14].

Как указывалось выше, ингибирование аргиназы может потенциально оказывать благотворное влияние при ряде патологических сердечно-сосудистых заболеваний. Терапевтический эффект ингибирования аргиназы был исследован в ряде экспериментальных моделей сердечно-сосудистых заболеваний с положительными результатами. Данные клинических исследований являются весьма ограниченными. Пилотные клинические исследования правильности концепции были проведены с местным использованием ингибиторов аргиназы через кожный микродиализ у пациентов с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа [15], сердечной недостаточностью [16] и гипертонией [17]. Эти наблюдения позволяют предположить, что ингибирование активности аргиназы имеет

важное значение в развитии сердечно-сосудистых заболеваний человека. Более крупные клинические исследования с системным назначением ингибиторов аргиназы, таким образом, становятся многообещающими.

На наш взгляд наибольший интерес могут иметь результаты использования их при легочной гипертензии в том числе с ингибиторами фосфодиэстеразы 5. Результаты наших исследований убедительно свидетельствуют в пользу эффективности данного сочетания при коррекции эндотелиальной дисфункции.

Несколько фармакологических ингибиторов доступны для экспериментальных исследований. Они принадлежат к двум основным классам: борной кислоты и аналоги $N\omega$ -гидрокси L-аргинин [13,18]. Важным ограничением доступных в настоящее время аргиназы ингибиторов том, что они обладают малой или вообще не обладают селективностью к аргиназе 2. По этой причине, остается неясным, какие изоформы должны быть направлены на достижение наиболее благоприятное воздействие. Поскольку оба аргиназы I и II аргиназы выражены в сосудистой, ингибиторы аргиназы 2 изоформы необходимы, чтобы полностью исследовать биологическую важность этих двух изоформ.

В этой связи, изученные нами соединения новой химической структуры представляют несомненный интерес для дальнейших исследований.

Теоретически ингибирование аргиназы может быть связано с побочными эффектами, в частности, с учетом той роли, которую аргиназы играют в в цикле мочевины. Тем не менее, экспрессия аргиназы и активность в печени в несколько раз выше, чем в сосудистой стенке и поэтому маловероятно, что клинически значимые дозы ингибиторов могут подавить печеночные аргиназы до такой степени, что нарушит цикл мочевины [13,18]. Это подтверждается отсутствием токсических эффектов длительного назначения ингибиторов аргиназы в животных моделях гипертонии [19] и атеросклероза [20]. Кроме того, длительное ингибирование аргиназы, по-видимому, не вызывает компенсаторного повышения активности фермента [19].

Выводы: Результаты исследований свидетельствуют о развитии аддитивного эффекта сочетанного использования селективных ингибиторов аргиназы 2 и малых

доз ингибитора ФДЭ-5 в отношении развития гомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции.

Таблица 1

Влияние селективных ингибиторов аргиназы 2 и тадалафила на динамику гемодинамических показателей у животных с моделированием гомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции (M±m, n=10)

Группы животных	САД	ДАД	КЭД
Интактные	129,5±2,2	89,1±1,1	1,1 ± 0,1
Гомоцистеин-индуцированная эндотелиальная дисфункция (ГИЭД) (n=10)	119,4±2,3*	84,3±2,2	3,5 ± 0,4*
ГИЭД + C239-0844 1 мг/кг (n=10)	117,4±2,2	79,9±2,1	2,9±0,3*
ГИЭД L207-0208 1 мг/кг (n=10)	123,3±2,4	85,3±1,9	2,3±0,5*
ГИЭД + L207-0210 1 мг/кг (n=10)	120,3±3,0	85,9±2,4	2,8±0,3*
ГИЭД + L207-0322 1 мг/кг (n=1)	125,3±3,2	83,7±2,3	2,7±0,5*
ГИЭД + L207-0404 1 мг/кг (n=10)	125,6±3,3	84,7±2,4	2,5±0,2*
ГИЭД + L207-0525 1 мг/кг (n=10)	122,4±3,3	84,8±2,3	1,5±0,3#
ГИЭД + L327-0346 1 мг/кг (n=10)	127,6±3,1	87,4±2,3	1,9±0,4#
ГИЭД + тадалафил 0,1 мг/кг (n=1)	116,9±3,0	80,3±2,4	1,9±0,4#
ГИЭД + L327-0525 1 мг/кг + тадалафил 0,1 мг/кг (n=10)	124,4±3,6	84,3±2,4	1,2±0,2#

Примечание: САД – систолическое артериальное давление (мм.рт.ст.), ДАД – диастолическое артериальное давление (мм.рт.ст.), КЭД – коэффициент эндотелиальной дисфункции (усл. ед.), * – достоверное различие с группой интактных животных (p<0,05); # – достоверное различие с группой гомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции (ГИЭД) (p<0,05).

Таблица 2

Влияние селективных ингибиторов аргиназы 2 и тадалафила на динамику показателей сократимости при проведении нагрузочных проб у животных с моделированием гомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции (M±m, n=10)

Группа животных	дренореактивность (мм. рт. ст.)	Исчерпание миокардиального резерва (%)
Интактные	189,4±9,1	87,4±10,9
Гомоцистеин-индуцированная эндотелиальная дисфункция (ГИЭД) (n=10)	239,2±8,6*	69,1±3,9*
ГИЭД + C239-0844 1 мг/кг (n=10)	241,5±7,9*	72,0±4,7*
ГИЭД L207-0208 1 мг/кг (n=10)	239,1±8,8*	77,1±4,2*
ГИЭД + L207-0210 1 мг/кг (n=10)	227,9±8,4*	78,0±4,7*
ГИЭД + L207-0322 1 мг/кг (n=1)	229,4±8,5*	79,4±5,0*
ГИЭД + L207-0404 1 мг/кг (n=10)	239,1±8,7*	79,6±5,3*
ГИЭД + L207-0525 1 мг/кг (n=10)	201,4±6,5#	99,0±4,9#
ГИЭД + L327-0346 1 мг/кг (n=10)	201,0±6,3#	97,5±4,5#
ГИЭД + тадалафил 0,1 мг/кг (n=1)	197,7±5,9#	98,1±4,7#
ГИЭД + L327-0525 1 мг/кг + тадалафил 0,1 мг/кг (n=10)	196,8±5,8#	100,1±5,1#

Примечание: * – достоверное различие с группой интактных животных (p<0,05); # – достоверное различие с группой гомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции (ГИЭД) (p<0,05).

Таблица 3

Влияние селективных ингибиторов аргиназы 2 и тадалафила на динамику значений биохимических маркеров (Тотал NO, Экспрессия eNOS) у животных с гомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции (M±m, n=10)

Группа животных	NOx	Экспрессия eNOS
Интактные	121,5±10,4	5,4±0,21
Гомоцистеин-индуцированная эндотелиальная дисфункция (ГИЭД) (n=10)	82,1±9,4*	2,05±0,21*
ГИЭД + C239-0844 1 мг/кг (n=10)	82,4±9,3*	2,11±0,22*
ГИЭД L207-0208 1 мг/кг (n=10)	92,0±8,9*	1,99±0,32*
ГИЭД + L207-0210 1 мг/кг (n=10)	90,0±9,9*	2,17±0,41*
ГИЭД + L207-0322 1 мг/кг (n=1)	92,1±9,7*	2,84±0,45*
ГИЭД + L207-0404 1 мг/кг (n=10)	92,6±8,3*	2,01±0,66*
ГИЭД + L207-0525 1 мг/кг (n=10)	121,7±9,5#	4,17±0,66#
ГИЭД + L327-0346 1 мг/кг (n=10)	122,8±9,4#	4,25±0,67#
ГИЭД + тадалафил 0,1 мг/кг (n=1)	129,6±9,3#	4,97±0,73#
ГИЭД + L327-0525 1 мг/кг + тадалафил 0,1 мг/кг (n=10)	137,1±10,0#	5,92±0,87#

Примечание: NOx – конечные метаболиты NO (мкмоль/л); экспрессия eNOS (%); * - достоверное различие с группой интактных животных (p<0,05); #- достоверное различие с группой животных с гомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции (ГИЭД) (p<0,05).

Литература

1. Корокин М.В., Покровский М.В., Новиков О.О., Гудырев О.С., Гуреев В.В., Денисюк Т.А., Корокина Л.В., Даниленко Л.М., Рагулина В.А., Коновалова Е.А., Белоус А.С. Модель гипергомоцистеининдуцированной эндотелиальной дисфункции у крыс. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т. 152. № 8. С. 173-175.

2. Кочкаров В.И., Покровский М.В., Корнеев М.М., Покровская Т.Г., Гладченко М.П., Артюшкова Е.Б., Метельская В.А., Туманова Н.Г., Файтельсон А.В., Дудка В.Т., Клявс Ю.П., Зеленкова Т.И., Гудырев О.С. Эндотелиопротективные эффекты резвератрола и его комбинаций с эналаприлом и лозартаном при экспериментальном моделировании дефицита оксида азота. //Кубанский научный медицинский вестник. 2006. № 9. С. 150-152.

3. Корокин М.В., Пашин Е.Н., Бобраков К.Е., Покровский М.В., Рагулина В.А., Артюшкова Е.Б., Покровская Т.Г., Даниленко Л.М., Цыбульский И.В., Цепелев В.Ю. Эндотелиопротективные, кардиопротективные и коронаролитические эффекты производных 3-оксипиридина. // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". 2009. № 4. С. 11-19.

4. Гуманова Н.Г., Артюшкова Е.Б., Метельская В.А., Кочкаров В.И., Покровская Т.Г., Даниленко Л.М., Корнеев М.М., Покровский М.В., Пашин Е.Н. Влияние антиоксидантов q510 и резвератрола на регуляторную функцию эндотелия у крыс с моделированной артериальной гипертонией // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. Т. 143. № 6. С. 619-622.

5. Корокин М.В., Носов А.М., Покровский М.В., Артюшкова Е.Б., Покровская Т.Г., Метельская В.А., Кочкаров В.И., Корокина Л.В., Файтельсон А.В., Гудырев О.С., Пашин Е.Н., Дудка В.Т., Туманова Н.Г. Сравнительное исследование эндотелио- и кардиопротективных свойств фураностаноловых гликозидов из культуры клеток растения Dioscorea

Deltoidea и 17 β -эстрадиола // Кубанский научный медицинский вестник. 2006. № 9. С. 137-140.

6. Покровский М.В., Покровская Т.Г., Гуреев В.В., Барсук А.А., Проскуракова Е.В., Корокин М.В., Белоус А.С., Корокина Л.В., Рагулина В.А., Гудырев О.С., Левашова О.В., Королев А.Е., Мальцева Н.В., Полянская О.С., Терехова Е.Г., Бабко А.В., Новиков О.О., Жилякова Е.Т., Сорокопудов В.Н., Колесник И.М. и др. Фармакологическая коррекция ADMA-ENOS-ассоциированных мишеней при преэклампсии // Акушерство и гинекология. 2011. № 2. С. 16-20.

7. Pokrovskiy M.V., Pokrovskaya T.G., Kochkarov V.I., Korokin M.V., Gureev V.V., Gudyrev O.S., Tsepeleva S.A., Konovalova E.A., Korokina L.V., Dudina E.N., Babko A.V., Terehova E.G Arginase inhibitor in the pharmacological correction of endothelial dysfunction.// International Journal of Hypertension. 2011. Т. 2011. С. 515047

8. Покровский М.В., Артюшкова Е.Б., Покровская Т.Г. Способы экспериментального моделирования эндотелиальной дисфункции // Аллергология и иммунология. 2008. Т. 9. № 3. С. 327.

9. Артюшкова Е.Б., Покровский М.В., Артюшкова Е.Б., Корокин М.В., Гудырев О.С., Белоус А.С. Эндотелио- и кардиопротективные эффекты мельдония и триметазида при L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции в эксперименте // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". 2010. № 3. С. 5-10.

10. Michell DL, Andrews KL, Chin-Dusting JP. Endothelial dysfunction in hypertension: the role of arginase. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011;3:946-960. Santhanam L,

11. Lemmon CA, Soucy KG, Gupta G, White AR, Nyhan D, et al. Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling. *Circ Res* 2006;99:951-960.

12. Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, et al. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res* 2008;102:95-102.

13. Christianson DW, Nyhan D, Berkowitz DE. Arginase and vascular aging *J Appl Physiol* 2008;105:1632-1642.

14. Prieto CP, Krause BJ, Quezada C, Santarín R, Sobrevia L, Casanello P. Hypoxia-reduced nitric oxide synthase activity is partially explained by higher arginase-2 activity and cellular redistribution in human umbilical vein endothelium. *Placenta* 2011;32:932-940.

15. Shemyakin A, Kovamees O, Rafnsson A, Bohm F, Svenarud P, Settergren M, et al. Arginase inhibition improves endothelial function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2012;126:2943-2950.

16. Quitter F, Figulla HR, Ferrari M, Pernow J, Jung C. Increased arginase levels in heart failure represent a therapeutic target to rescue microvascular perfusion. *Clin Hemorheol Microcirc*. Advance Access published October 17, 2012, doi: 10.3233/CH-2012-1617.

17. Holowatz LA, Kenney WL. Up-regulation of arginase activity contributes to attenuated reflex cutaneous vasodilatation in hypertensive humans. *J Physiol* 2007; 581:863-872.

18. Schade D, Kotthaus J, Clement B. Modulating the NO generating system from a medicinal chemistry perspective: current trends and therapeutic options in cardiovascular disease. *Pharmacol Therap* 2010; 126:279-300.

19. Bagnost T, Ma L, da Silva RF, Rezakhaniha R, Houdayer C, Stergiopoulos N, et al. Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension. *Cardiovasc Res* 2010; 87:569-577.

20. Ryoo S, Gupta G, Benjo A, Lim HK, Camara A, Sikka G, et al. Endothelial arginase II: a novel target for the treatment of atherosclerosis. *Circ Res* 2008; 102:923-932.