

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНОГО ОКСАТРИАЗОЛИУМ-5-ОЛАТА 3-(3-[1,2,4]-ТРИАЗОЛО)-ОКСАТРИАЗОЛИУМ-5-ОЛАТА У ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС ЛИНИИ SHR

М. М. Артемьева¹, А. Б. Постников², О. В. Акинфиева², И. Л. Далигер³,
С. А. Шевелев³, О. С. Медведев¹, Н. А. Медведева²

Показан сосудорасширяющий эффект 3-(3-[1,2,4]-триазоло)-оксатриазолиум-5-олата (азасиднона-6, АС-6) на сегментах изолированных хвостовых артерий крыс линии SHR. Проанализирован один из возможных механизмов действия препарата на гладкую мышцу сосудов через растворимую форму фермента гуанилатциклазы (pGC) с использованием гем-зависимого ингибитора pGC ODQ (1H-[1,2,4]оксадиазоло[4,3-а]хиноксалин-1-она).

Ключевые слова: оксатриазолиум-5-олат; крысы; SHR; pGC; хвостовая артерия; сосудорасширяющее действие

ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота (NO) является одним из основных эндогенных сосудорасширяющих факторов, участвующих в регуляции сосудистого тонуса и артериального давления. Постоянный синтез NO из L-аргинина обеспечивается каталитической активностью эндотелиальной формы NO-синтазы. NO свободно диффундирует к гладкомышечным клеткам сосудов, где активирует образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) и вызывает реакцию эндотелий-зависимого расслабления (ЭЗР) [7]. Дисфункция NO-цГМФ-зависимого механизма расслабления сосудов, выражающаяся в уменьшении ЭЗР, является одним из этапов патогенеза таких заболеваний, как эссенциальная и лёгочная гипертензия, сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца и др. [8]. Исследование регуляции центрального звена NO-цГМФ пути — растворимой гуанилатциклазы (pGC) — важно не только для фундаментального понимания механизмов расслабления гладких мышц сосудов, но и для клинической практики.

В предыдущих работах нами был выявлен длительный гипотензивный эффект одного из активаторов

pGC АС-6 у бодрствующих крыс линии Wistar и SHR в условиях острого и хронического эксперимента [2, 6]. В данной работе мы решили изучить возможность прямого действия азасиднона-6 на стенку сосуда и исследовать влияние АС-6 при хроническом (21 день) введении препарата *per os* на реактивность изолированных перфузируемых сегментов хвостовых артерий крыс линии SHR.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на самцах гипертензивных крыс линии SHR массой 250 – 300 г, полученных из питомника филиала ИБХ в г. Пушкино (Московская обл., Россия). Сосудорасширяющее действие АС-6 изучали на изолированных сегментах хвостовой артерии (*arteria caudalis ventralis*) крыс при проточной перфузии [5]. При этом сосуды последовательно перфузировали растворами АС-6 в возрастающих концентрациях (10^{-7} М, 10^{-6} М, 10^{-5} М, $3 \cdot 10^{-5}$ М, $6 \cdot 10^{-5}$ М, 10^{-4} М) и донора NO нитропруссид натрия (НП, 10^{-9} М, 10^{-8} М, 10^{-7} М, 10^{-6} М, 10^{-5} М) на фоне сосудосуживающего эффекта $2,5 \cdot 10^{-6}$ М фенилэфрина (ФЭ).

Для исследования влияния хронического введения АС-6 на реактивность периферических сосудов крыс линии SHR делили на 2 группы. Крысы группы SHR-опыт на протяжении 3 недель 2 раза в день получали АС-6 в дозе 5 мг/кг *per os* через желудочный зонд. Крысы группы SHR-контроль получали соответствующий объем растворителя – дистиллированной воды. На 22-й день эксперимента у крыс на льду выделяли сегменты хвостовой артерии и перфузировали их растворами АС-6 ($6 \cdot 10^{-5}$ М) и НП ($1 \cdot 10^{-6}$ М) на

¹ Кафедра фармакологии (зав. — О. С. Медведев) МГУ им. М. В. Ломоносова, факультет Фундаментальной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский проспект, 31, корп. 5.

² Кафедра физиологии человека и животных (зав. — А. А. Каменский); кафедра биоорганической химии (зав. — В. Л. Воейков) МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, 119192, Москва, Воробьевы горы, 1, корп. 12.

³ Лаборатория ароматических азотосодержащих соединений (зав. — С. А. Шевелев) Ордена Трудового Красного Знамени Институт Органической Химии им. Н. Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 47.

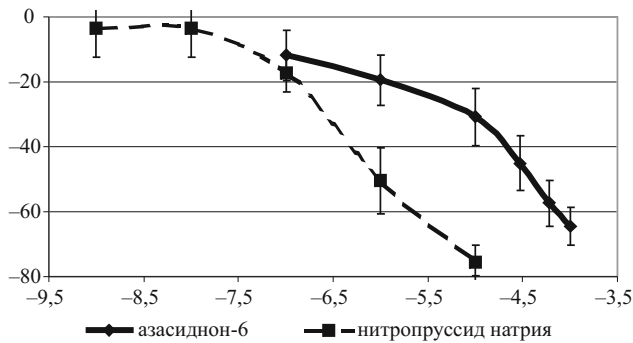


Рис. 1. Расслабление изолированных сегментов хвостовой артерии крыс линии SHR в ответ на перфузию растворами азасиднона-6 и нитропруссид натрия в условиях проточной перфузии.

По оси абсцисс — Δ перфузионного давления в % от исходного уровня перфузионного давления, по оси ординат — десятичный логарифм концентрации (в моль/л) растворов азасиднона-6 и нитропруссид натрия.

фоне действия ФЭ в концентрации $2,5 \cdot 10^{-6}$ М. Далее сосуды в течение 10 мин перфузировали раствором ФЭ ($5 \cdot 10^{-6}$ М) с ингибитором фермента рГЦ ODQ ($3 \cdot 10^{-6}$ М) и на его фоне повторно перфузировали хвостовые сосуды АС-6 ($6 \cdot 10^{-5}$ М) и НП ($1 \cdot 10^{-6}$ М).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение сосудорасширяющего действия азасиднона-6 на сегментах изолированных сосудов

Перфузия изолированных сегментов хвостовой артерии крыс линии SHR растворами азасиднона-6 приводит к дозозависимому уменьшению перфузионного давления (ПД) (рис. 1). Уже в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М АС-6 статистически значимо уменьшает ПД на 19 ± 8 % относительно исходного уровня ПД, который составил 96 ± 12 мм рт. ст. (табл. 1). При этом донор NO НП также вызывает дозозависимое уменьшение ПД изолированных сегментов сосудов крыс линии SHR в условиях проточной перфузии (табл. 1). Для

азасиднона-6 концентрация, соответствующая 50 % расслаблению сосуда, составляет $10^{-4,2}$ М, а для нитропруссид натрия — 10^{-6} М. Таким образом, эффективность азасиднона-6 как сосудорасширяющего средства в экспериментах на изолированных сосудах несколько ниже, чем нитропруссид натрия.

Таким образом, показано, что АС-6 способен действовать непосредственно на стенку изолированного сосуда, вызывая дозозависимое уменьшение ПД, что свидетельствует о возможности его периферического действия на уровне целого организма. Для АС-6 концентрация, соответствующая 50 % расслаблению сегмента хвостовой артерии, составляет $10^{-4,2}$ М, а для НП — 10^{-6} М. Эти концентрации мы использовали в дальнейших экспериментах по изучению влияния хронического применения АС-6 на реактивность сосудов крыс линии SHR.

Изучение эффектов хронического применения АС-6 *per os* на сосудорасширяющие реакции изолированных перфузируемых хвостовых артерий крыс линии SHR

Сократительная реакция изолированных артерий хвоста крыс линии SHR, хронически получавших АС-6 (группа SHR-опыт), в ответ на перфузию ФЭ ($2,5 \cdot 10^{-6}$ М) составляет $90,4 \pm 7$ мм рт. ст. и статистически значимо не отличается от значений сосудосуживающей реакции в контрольной группе (группа SHR-контроль, $78,0 \pm 6,5$ мм рт. ст.). Крысы этой группы на протяжении 21 дня получали *per os* дистиллированную воду.

Однако мы наблюдали значительные индивидуальные различия в исходном уровне сократительной реакции у крыс внутри групп. Эффективность сосудорасширяющих агентов мы оценивали в % от исходного уровня сократительного тонуса (табл. 2). Уменьшение ПД в ответ на перфузию сосудов АС-6 в концентрации $6 \cdot 10^{-5}$ М в контрольной группе (SHR-контроль) составило $48,2 \pm 5,1$ % от исходного уровня ПД, вызванного перфузией ФЭ. В группе SHR-опыт сосудорас-

Таблица 1. Сосудорасширяющая реакция (в % от исходного уровня сократительной реакции на ФЭ) изолированных перфузируемых сегментов хвостовых артерий крыс линии SHR в ответ на АС-6 и НП

Показатель	ΔПД, в % от исходного уровня			Среднее	Стандартное отклонение	Ошибка среднего
	1	2	3			
АС-6, $1 \cdot 10^{-7}$ М	-9	-26	0	-12	13	8
АС-6, $1 \cdot 10^{-6}$ М	-23	-31	-5	-19	13	8
АС-6, $1 \cdot 10^{-5}$ М	-44	-35	-14	-31	15	9
АС-6, $3 \cdot 10^{-5}$ М	-60	-44	-31	-45	15	9
АС-6, $6 \cdot 10^{-5}$ М	-70	-56	-46	-57	12	7
АС-6, $1 \cdot 10^{-4}$ М	-74	-65	-54	-64	10	6
НП, $1 \cdot 10^{-9}$ М	6	-21	4	-3,6	16	9
НП, $1 \cdot 10^{-8}$ М	6	-21	4	-3,6	16	9
НП, $1 \cdot 10^{-7}$ М	-7	-29	-15	-17,1	11	6
НП, $1 \cdot 10^{-6}$ М	-31	-57	-64	-50,4	17	10
НП, $1 \cdot 10^{-5}$ М	-65	-81	-81	-75,6	9	5

ширяющий ответ на перфузию АС-6 составил $49,0 \pm 4,7\%$. Статистически значимых различий между группами обнаружено не было. В ответ на перфузию НП в концентрации 10^{-6} М расслабление сосудов было несколько больше, чем при перфузии АС-6. В группе SHR-контроль расслабление составило $73,4 \pm 4\%$, в опытной группе — $74,9 \pm 3,3\%$. Однако и в этом случае достоверных различий между группами обнаружено не было.

Таким образом, показано, что хроническое 3-недельное применение АС-6 *per os* не влияет на величину расширяющей реакции изолированных сосудов этих животных ни на это вещество, ни на НП, т.е. толерантность к этим агентам не развивается.

Это, несомненно, является положительным свойством изучаемого вещества для его дальнейшего рассмотрения в качестве антигипертензивного средства. Ранее нами было показано, что в опытах на бодрствующих крысах линии SHR хроническое применение АС-6 в течение 3 недель вызывает статистически значимое увеличение гипотензивной реакции на НП при его внутривенном введении [1]. Мы предположили, что это связано с увеличением активности растворимой формы гуанилатциклазы (рГЦ) гладкой мышцы сосудов, которая является важным звеном в NO-цГМФ-зависимой реакции расслабления гладкомышечных клеток сосудов. Входящий в состав рГЦ гем связывается с NO, что активирует синтез цГМФ. Этот циклический нуклеотид опосредует процессы, приводящие, в конечном счете, к уменьшению внутриклеточной концентрации кальция и чувствительности сократительного аппарата к нему, что реализуется в расслаблении ГМК [4]. Для оценки вклада рГЦ в сосудорасширяющую реакцию АС-6 и НП мы использовали блокатор рГЦ ODQ (1Н-[1,2,4]оксадиазол[4,3-а]хиноксалин-1-он) (3 мкМ). ODQ окисляет железо гема рГЦ, что приводит к потере способности NO активировать фермент, уменьшению сродства гемовой группы к рГЦ, что выражается в уменьшении синтеза цГМФ. Опыты проводили на изолированных сегмен-

Таблица 2. Уменьшение перфузионного давления изолированных сегментов хвостовых артерий крыс линии SHR в ответ на перфузию АС-6 ($6 \cdot 10^{-5}$ М) и НП ($1 \cdot 10^{-6}$ М)

Группа	Δ перфузионного давления от исходного сократительного тонуса сегментов сосудов на фенилэфрин ($3 \cdot 10^{-6}$ М)			
	Азасиднон-6		Натрия нитропруссид	
	мм рт. ст.	Δ %	мм рт. ст.	Δ %
SHR-контроль	37,8	48,2	55,1	73,4
Ошибка среднего	4,7	5,1	5,5	4,0
SHR-опыт	42,5	49,0	62,2	74,9
Ошибка среднего	4,5	4,7	5,4	3,3

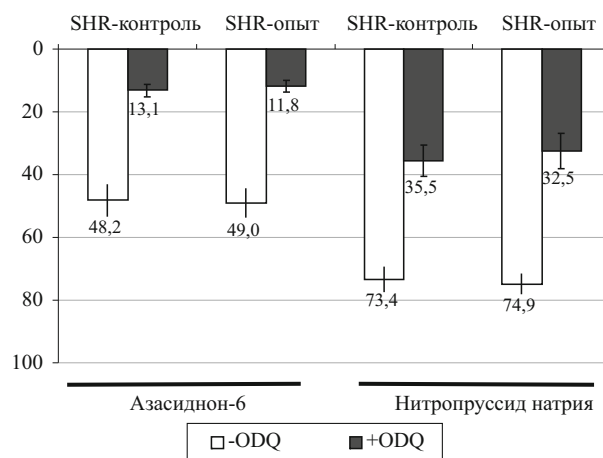


Рис. 2. Изменение перфузионного давления изолированных сегментов хвостовых артерий крыс линии SHR в ответ на перфузию растворами азасиднона-6 ($6 \cdot 10^{-5}$ М) и нитропруссид натрия ($1 \cdot 10^{-6}$ М) на фоне тонуса, создаваемого раствором фенилэфрина ($3 \cdot 10^{-6}$ М) без и с добавлением гем-зависимого ингибитора растворимой гуанилатциклазы ODQ ($3 \cdot 10^{-6}$ М). По оси абсцисс — Δ перфузионного давления в % от исходного уровня перфузионного давления.

тах хвостовых артерий крыс двух групп — получавших АС-6 в течение 21 дня *per os* (SHR-опыт) и контрольной группы (SHR-контроль), на протяжении 21 дня получавших растворитель — дистиллированную воду. Перфузию блокатором начинали за 10 мин до тестирования сосудорасширяющего ответа сосудов на АС-6 в концентрации 60 мкМ и НП в концентрации 1 мкМ.

Изучение эффектов хронического применения АС-6 на сосудорасширяющую реакцию изолированных перфузируемых сегментов хвостовых артерий крыс линии SHR на фоне действия блокатора рГЦ ODQ

Реакция расслабления сосудов в ответ на АС-6 на фоне действия ODQ уменьшается как в контрольной, так и в опытной группе (табл. 3). В контрольной груп-

Таблица 3. Уменьшение перфузионного давления в изолированных сегментах хвостовых артерий крыс линии SHR в ответ на перфузию АС-6 ($6 \cdot 10^{-5}$ М) и НП ($1 \cdot 10^{-6}$ М) в присутствии ингибитора рГЦ ODQ ($3 \cdot 10^{-6}$ М) в условиях проточной перфузии

Группа	Δ перфузионного давления от исходного сократительного тонуса на фенилэфрин ($3 \cdot 10^{-6}$ М) в присутствии ODQ			
	Азасиднон-6		Натрия нитропруссид	
	мм рт. ст.	Δ %	мм рт. ст.	Δ %
SHR-контроль	10,7	13,1	27,4	35,5
Ошибка среднего	1,6	2,0	3,9	5,0
SHR-опыт	11,1	11,8	30,3	32,5
Ошибка среднего	1,5	1,8	5,8	5,6

Таблица 4. Степень уменьшения сосудорасширяющей реакции в ответ на перфузию изолированных сегментов хвостовых артерий крыс АС-6 ($6 \cdot 10^{-5}$ М) и НП ($1 \cdot 10^{-6}$ М) на фоне ингибитора рГЦ ODQ ($3 \cdot 10^{-6}$ М)

Группа	Степень уменьшения реакции расслабления, %	
	Азасиднон-6	Натрия нитропруссид
SHR-контроль	65,3	53,0
Ошибка среднего	8,2	6,2
SHR-опыт	71,4	58,2
Ошибка среднего	5,0	6,6

пе на фоне действия блокатора рГЦ реакция на АС-6 составляет $13,1 \pm 2\%$ от исходного уровня сосудосуживающей реакции на ФЭ. В группе SHR-опыт хвостовые артерии крыс в среднем расслабляются на $11,8 \pm 1,8\%$ от исходного уровня реакции на ФЭ.

Как показано в предыдущей серии, уменьшение ПД в ответ на перфузию сосудов АС-6 в отсутствие ODQ в контрольной группе (SHR-контроль) составляет $48,2 \pm 5,1\%$ от исходного уровня сосудосуживающей реакции, вызванного перфузией ФЭ. В группе SHR-опыт сосудорасширяющий ответ на перфузию АС-6 составляет $49,0 \pm 4,7\%$. Чтобы оценить степень уменьшения сосудорасширяющей реакции, за 100% уровень вазодилатации мы принимали изменение ПД (в %) в ответ на перфузию сосудов АС-6 без ODQ. Исходя из этого, реакция на АС-6 в группе SHR-контроль на фоне перфузии ODQ уменьшается на $65,3 \pm 8,2\%$, а в опытной группе (SHR-опыт) — на $71,4 \pm 5\%$ (табл. 4) от исходного уровня сосудорасширяющей реакции без ингибитора рГЦ ODQ. Достоверных различий между группами обнаружено не было.

Блокатор рГЦ ODQ уменьшает реакцию расслабления сегментов хвостовых артерий крыс в ответ на перфузию донором NO НП. В ответ на перфузию НП на фоне ODQ сосуды опытной группы (SHR-опыт) расслабляются на $32,5 \pm 5,6\%$ от исходного уровня сосудосуживающей реакции на ФЭ (табл. 3). В контрольной группе реакция расслабления сосудов на НП со-

ставила $35,5 \pm 5\%$ от сократительного тонуса на ФЭ (табл. 3). Достоверных различий между группами обнаружено не было.

Степень уменьшения реакции расслабления была рассчитана так же, как и в случае реакции на АС-6. В группе SHR-опыт степень уменьшения реакции расслабления на НП блокатором рГЦ составила $58,2 \pm 6,6\%$. В контрольной группе реакция расслабления сосудов на НП уменьшалась на $53,0 \pm 6,2\%$ (табл. 4).

ВЫВОДЫ

1. Азасиднон-6 вызывает доза-зависимое расширение изолированных сегментов хвостовой артерии гипертонических крыс линии SHR.

2. Хроническое применение азасиднона-6 (5 мг/кг) в течение 21 дня крысам линии SHR не изменяет расширяющей реакции изолированных сосудов, т.е. не вызывает развития толерантности к веществу.

3. Механизм реализации расширяющего действия азасиднона-6, так же как и экзогенного донора NO нитропруссид натрия опосредуется активностью гема гуанилатциклазы гладкой мышцы сосуда.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. М. Артемьева, А. Б. Постников, О. В. Акинфиева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **71**(5), 25 – 27 (2008).
2. М. М. Артемьева, А. Б. Постников, О. В. Акинфиева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**(3), 13 – 15 (2009).
3. L. G. Bongartz, B. Braam, M. C. Verhaar, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **299**(6), pp. 2037 – 45 (2010).
4. J. W. Denninger, M. A. Marletta, *Biochim. Biophys. Acta. May 5*; **1411**(2 – 3), pp. 334 – 50 (1999).
5. M. A. Nesterova, A. A. Chuiko, O. S. Medvedev, et al., *Acta Physiologica Scandinavica*, **167**, Issue 3, pp. 195 – 202 (1999).
6. A. B. Postnikov, M. M. Artemieva, A. P. Bonartsev, et al., *American Journal of Hypertension*, volume 18, Issue 5, Pages A71-A72 (2005).
7. U. Simonsen, R. Rodriguez-Rodriguez, Th. Dalsgaard, et al., *Pharm. Reports*, **61**, pp. 105 – 115 (2009).

Поступила 31.01.12

PERIPHERAL MECHANISMS OF ACTION OF OXATRIAZOLIUM-5-OLATE DERIVATIVE 3-(3-[1,2,4]-TRIAZOLO)OXATRIAZOLIUM-5-OLATE IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

M. M. Artem'eva¹, A. B. Postnikov², O. V. Akinfieva², I. L. Daliger³, S. A. Shevelev³, O. S. Medvedev¹, and N. A. Medvedeva²

¹ Department of Fundamental Medicine, Moscow State University, Lomonosvskii prosp. 31/5, Moscow, 119192, Russia

² Department of Biology, Moscow State University, Vorob'evy Gory 1/12, Moscow, 119192, Russia

³ Zelinski Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 47, Moscow, 119991, Russia

It is shown that 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolium-5-olate (azasidnon-6) can act directly on the vascular wall of isolated segments of caudal ventral artery of SHR rats. Using heme-dependent soluble guanyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), it has been found that one of the possible mechanisms of azasidnon-6 vasodilatory action includes heme-dependent activation of a soluble form of guanylate cyclase.

Key words: Oxatriazolium-5-olate; rats; SHR; guanylate cyclase; tail artery; vasodilatory effect