

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА “УНИФУЗОЛ” НА МОДЕЛИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ N-НИТРО-L-АРГИНИН МЕТИЛОВОГО ЭФИРА

А. Г. Васильев¹, А. П. Трашков¹, А. Л. Коваленко², Н. А. Верлов¹,
А. Ю. Петров¹, В. В. Валеев¹

Проведено исследование специфической фармакологической активности натрия-L-аргинина сукцината (препарат “Унифузол”) в качестве средства терапии эндотелиальной дисфункции в эксперименте на лабораторных крысах. Моделирование дисфункции эндотелия производили путем введения подопытным животным N-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME). Эффективность проводимой экспериментальной терапии оценивали путем анализа динамики артериального давления, продолжительности эндотелийзависимой и эндотелийнезависимой вазодилатации и содержанию в крови крыс маркеров эндотелиальной дисфункции — VEGF, NO, эндотелина-1 и десквамированных эндотелиоцитов. Показано, что применение унифузола способствует коррекции работы эндотелия кровеносных сосудов, заключающейся в нормализации функциональной активности эндотелиоцитов. Помимо этого, полученные результаты исследования убедительно доказывают значительный вазодилатирующий и антигипертензивный эффекты унифузола.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция; артериальная гипертензия; вазодилатация; аргинин; маркеры эндотелия; натрия-L-аргинина сукцинат; унифузол; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

В классической патофизиологии патологические изменения работы эндотелия кровеносных сосудов различной этиологии и степени тяжести объединяются термином “эндотелиальная дисфункция” (ЭД). ЭД может выражаться в нарушении структурной целостности эндотелиального слоя, изменении транскапиллярного обмена между плазмой крови и интерстициальным пространством тканей и баланса между его вазоконстрикторными и вазодилатирующими, про- и антигемостатическими механизмами [7, 9, 13, 14, 20].

Данное нарушение может провоцироваться повышенным артериальным давлением (АД) при гипертонической болезни [4, 17] и в то же время ЭД, вызванная другими причинами [19, 21], в свою очередь, может являться одной из причин развития артериальной гипертензии (АГ) [4, 8]. Недостаточное понимание роли эндотелиальной дисфункции в развитии различных заболеваний сосудистого генеза зачастую приводит к однобокому, прямолинейному подходу к фармакологической коррекции наблюдаемых патологических процессов, не учитывающей особенностей их патогенеза.

Согласно литературным данным, универсальным механизмом повышения АД и ремоделирования сердца, вызванных структурно-функциональными нарушениями

эндотелия, является стойкое изменение баланса местных сосудодвигательных факторов — снижение концентрации вазодилататоров (NO, EDHF, простагландины) с одновременным увеличением продукции вазоконстрикторных соединений (эндотелины, 20-НЕТЕ) в плазме крови, приводящее к увеличению общего периферического сопротивления в системе кровообращения [2 – 4]. С учетом этого, применение при заболеваниях системы кровообращения вазодилатирующих и эндотелиопротекторных средств представляется весьма перспективным.

Несмотря на большое количество экспериментальных исследований [1, 5, 22] по изучению действия различных ангиопротекторных и вазодилатирующих лекарственных средств на функцию эндотелия, клинические данные по применению препаратов данной группы противоречивы [15, 16, 18].

С учетом вышеизложенного целью настоящего исследования стало изучение эндотелио- и ангиопротекторных свойств нового лекарственного средства — натрия-L-аргинина сукцината (препарат “Унифузол, раствор для инфузий”), при моделировании эндотелиальной дисфункции, индуцированной N-нитро-L-аргинин метиловым эфиром (L-NAME), сопровождающейся резким угнетением продукции оксида азота — основного эндогенного вазодилататора.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 102 самца альбиноса серых крыс (*Rattus norvegicus*, John Berkenhout, 1769), массой тела 200 – 220 г. Были выделены 3 экспериментальные группы:

¹ ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук; Россия, 194223, Санкт-Петербург, проспект Тореза, д. 44.

² ФГБУН Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства, Россия, 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1.

Таблица 1. Влияние препарата “Унифузол, раствор для инфузий” на летальность подопытных крыс, обусловленную введением N-нитро-L-аргинин метилового эфира

Группа	Период наблюдений, сут	Летальность		
		количество павших особей	процент от исходного объема выборки в группе	95 % доверительный интервал
Контроль	0 – 13	нет	-	-
L-NAME	0 – 13	9	20	9,58 – 34,6
Унифузол	0 – 13	2*	4	0,54 – 15,15

* Отличия с показателями группы “L-NAME” достоверны на принятом уровне значимости.

1. Контроль ($n = 12$) — интактные животные без признаков инфекционной и/или соматической патологии для получения нормальных (“физиологических”) показателей.

2. L-NAME ($n = 45$) — животные, которым моделировали эндотелиальную дисфункцию путем введения N-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME) в дозе 25 мг/кг ежедневно внутривенно.

3. Унифузол ($n = 45$) — животные, которым моделировали эндотелиальную дисфункцию и в течение 12 сут проводили профилактику и лечение препаратом унифузол (натрия-L-аргинина сукцинат, раствор для инфузий, ООО “НТФФ “ПОЛИСАН”, Санкт-Петербург, Россия) в объеме 12,5 мл/кг, внутривенно, однократно со скоростью 1 мл/мин.

Всем животным проводили регистрацию АД в сонной артерии инвазивным способом под зоветиловым наркозом (0,7 мл/кг) с применением программно-аппаратного комплекса “PhysExp”. Для анализа функциональной активности эндотелия животным из каждой группы проводили функциональные фармакологические пробы [6, 10, 11]: эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВД) — путем внутривенного введения ацетилхолина в дозе 40 мкг/кг, а также эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД) — путем внутривенного введения нитропрусида натрия в дозе 30 мкг/кг. Оценивали продолжительность индуцированных сосудодвигательных реакций и рассчитывали величину коэффициента эндотелиальной дисфункции (КЭД, по [10]).

Таблица 2. Влияние препарата “Унифузол, раствор для инфузий” на показатели системной гемодинамики у крыс при моделировании эндотелиальной дисфункции путем введения L-NAME ($M \pm SE$)

Исследуемый показатель	Период наблюдений, сут	Исследуемые группы крыс		
		контроль	L-NAME	унифузол
САД, мм рт. ст.	7	124 ± 9,6	192 ± 14,1*	134 ± 19,2**
	13		191 ± 5,0*	140 ± 13,3**
ДАД, мм рт. ст.	7	88 ± 7,0	120 ± 17,1*	118 ± 18,9*
	13		111 ± 6,9*	97 ± 10,0
ЧСС, уд/мин	7	402 ± 19,5	438 ± 30,1	411 ± 53,2
	13		425 ± 21,8	396 ± 32,1

* Отличия от группы “контроль” достоверны на принятом уровне значимости.

** Отличия с показателями группы “L-NAME” достоверны на принятом уровне значимости.

Анализ гематологических маркеров эндотелиальной дисфункции осуществляли путем определения содержания в крови подопытных крыс сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), оксида азота (NO), эндотелина 1 типа (ЭТ-1) и циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов (ЦЭЦ). Концентрацию VEGF, NO и ЭТ-1 измеряли в плазме крови методом иммуноферментного анализа при помощи наборов реактивов компании Technoclone (Австрия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Концентрацию циркулирующих эндотелиоцитов определяли по методике Н. Sinzinger (1988) в модификации Т. Д. Власова (1998).

Взятие крови у подопытных животных производили путем транскутанной пункции сердца животных в условиях общего обезболивания в вакуумную систему Monovette в объеме 6 мл. Обработку крови производили общепринятым способом, описанным ранее [15].

Оценку исследуемых показателей производили на 1 сут у крыс контрольной группы, на 7 и 13 сут в экспериментальных группах животных.

Статистический анализ выполняли с применением пакета программ SPSS. Проверку характера распределения данных производили путем расчета критерия Колмогорова — Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок осуществляли при помощи t-критерия Стьюдента (при нормальном характере распределения вариант в выборочной совокупности) и U-критерия Манна — Уитни (при распределении вариант в выборочной совокупности, отличном от нормального). Сравнение средних данных зависимых выборок производили при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (при нормальном характере распределения вариант в выборочной совокупности) и χ^2 -критерия Фридмана (при распределении вариант в выборочной совокупности, отличном от нормального). Достоверным уровнем отличий принимали вероятность не менее 95 % ($p < 0,05$), что является стандартом в медико-биологических исследованиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение крысам N-нитро-L-аргинин метилового эфира вызывало значительные нарушения работы системы кровообращения, приводящие в ряде случаев к гибели подопытных животных. Интегральным показателем, по-

Таблица 3. Влияние препарата “Унифузол, раствор для инфузий” на продолжительность эндотелийзависимой и эндотелийнезависимой вазодилатации после введения L-NAME (M ± SE)

Группа	ЭЗВД			ЭНВД			КЭД, усл. ед
	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.	ЭЗВД, с	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.	ЭНВД, с	
Контроль	76,20 ± 4,12	32,50 ± 3,30	50,70 ± 5,08	92,00 ± 4,13	38,30 ± 4,06	60,20 ± 5,11	1,80 ± 0,11
L-NAME	131,50 ± 5,42*	85,00 ± 3,07*	28,50 ± 5,21*	121,10 ± 7,05*	73,70 ± 5,15*	89,40 ± 8,12*	5,80 ± 0,32*
Унифузол	96,70 ± 9,26***	67,00 ± 3,17***	49,40 ± 5,88**	85,10 ± 8,02**	45,40 ± 5,57**	65,90 ± 6,11**	2,00 ± 0,19**

* Отличия от группы “контроль” достоверны на принятом уровне значимости.

** Отличия с показателями группы “L-NAME” достоверны на принятом уровне значимости.

звляющим оценить степень тяжести патологического процесса и, как следствие, уровень напряженности используемой модели, является уровень летальности крыс в обследуемых группах (табл. 1).

Результаты определения уровня летальности в экспериментальных группах указывают на умеренную напряженность использованной модели эндотелиальной дисфункции. Полиорганная недостаточность, сформированная введением L-NAME, привела к гибели 20 % подопытных животных, не получавших лечение (LD₂₀, табл. 1). Применение унифузола для профилактики и лечения эндотелиальной дисфункции оказало эффект, что выразилось в статистически значимом снижении показателя летальности крыс в 4,5 раза, по сравнению с группой животных, не получавших фармакологической поддержки ($p < 0,001$).

Структурно-функциональные нарушения работы эндотелия кровеносных сосудов, сформированных на фоне введения L-NAME, способствовали развитию стойкой артериальной гипертензии, регистрируемой на всем протяжении исследования, и выраженной тенденции к увеличению частоты сердечных сокращений (ЧСС), имеющему, вероятно, компенсаторный характер (табл. 2).

Применение препарата унифузол приводило к статистически значимому снижению систолического АД и его приближению к значениям в группе интактных животных. На уровне тенденции происходило уменьшение показателей диастолического АД и ЧСС у животных, получавших лечение (табл. 2).

Результаты проведенных фармакологических сосудистых проб у животных с поражением эндотелия указывают на статистически значимое увеличение систолического и диастолического АД как после ЭЗВД, так и после ЭНВД по сравнению с контрольными крысами (табл. 3).

При этом имело место достоверное уменьшение длительности эндотелийзависимой и увеличение длительности эндотелийнезависимой вазодилатации. Эти данные прямо указывают не только на нарушение продукции оксида азота эндотелиоцитами, но и на изменение всего комплекса регуляции тонуса кровеносных сосудов. Экспериментальная терапия эндотелиальной дисфункции приводила к статистически значимому увеличению продолжительности ЭЗВД и уменьшению продолжительности ЭНВД (табл. 3).

Анализ значений КЭД показал, что у животных группы “L-NAME” происходило его достоверное увеличение в среднем на 4,0 усл. ед. (в 2,2 раза), по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$). Введение подопытным животным препарата унифузол приводило к нивелированию наблюдаемых нарушений работы эндотелия, отражающихся в статистически значимом уменьшении КЭД до уровня, сопоставимого с контрольными значениями (табл. 3).

L-NAME-индуцированная эндотелиальная дисфункция у крыс сопровождалась достоверным угнетением вазодилатирующего и репаративного потенциала эндотелия сосудов и увеличением продукции вазоконстрикторных соединений (табл. 4).

На всем протяжении эксперимента наблюдалось прогрессивное уменьшение содержания в крови эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) — естественного митогена и стимулятора метаболизма эндотелиоцитов, продукции оксида азота — основного регионарного вазодилататора с одновременным увеличением синтеза и секреции вазоконстрикторного соединения — эндотелина 1-го типа.

Отрицательная динамика сывороточных маркеров эндотелиальной дисфункции подтверждалась данными

Таблица 4. Влияние препарата “Унифузол, раствор для инфузий” на структурно-функциональные особенности эндотелия кровеносных сосудов у подопытных крыс с эндотелиальной дисфункцией, вызванной введением L-NAME (M ± SE)

Группа	Период наблюдений, сут	Исследуемые показатели			
		VEGF, пг/мл	NO, мкмоль/л	ЦЭЦ, п/мл	ЭТ-1, фмоль/л
Контроль	0	56,5 ± 4,3	70,0 ± 9,06	24,9 ± 4,00	1,4 ± 0,03
L-NAME	7	30,6 ± 3,18*	23,1 ± 7,16*	125,5 ± 20,11*	2,9 ± 0,21*
	13	21,0 ± 3,30*	14,6 ± 8,05*	193,6 ± 31,18*	3,4 ± 0,21*
Унифузол	7	62,5 ± 5,02**	115,5 ± 13,46***	63,7 ± 7,93***	1,9 ± 0,20***
	13	87,7 ± 9,68***	184,2 ± 33,10***	37,2 ± 12,11***	1,2 ± 0,17***

* Отличия с показателями группы “контроль” достоверны на принятом уровне значимости.

** Отличия с показателями группы “L-NAME” достоверны на принятом уровне значимости.

морфологического анализа крови крыс, указывающими на активацию процессов клеточной гибели эндотелиоцитов (лавинообразное увеличение количества десквамированных клеток) у животных на фоне введения L-NAME.

Проводимая экспериментальная терапия приводила к выраженной, статистически достоверной нормализации всех изучаемых в рамках исследования показателей функциональной активности эндотелиоцитов подопытных животных. Это проявлялось в увеличении продукции VEGF и NO с одновременным ингибированием секреции эндотелина-1 (табл. 4). На фоне введения исследуемого препарата содержание десквамированных эндотелиоцитов снизилось в 5,2 раза, по сравнению с группой нелеченных животных ($p < 0,001$) и было сопоставимо с контрольными значениями.

ВЫВОДЫ

1. Модель эндотелиальной дисфункции характеризовалась удовлетворительной степенью напряжения (LD_{20}), значительными гемодинамическими нарушениями, структурно-функциональными нарушениями работы эндотелия кровеносных сосудов (увеличение продукции вазоконстрикторных соединений, уменьшение продукции физиологических вазодилаторов, активация механизмом клеточной гибели эндотелиоцитов).

2. Унифузол нормализовал гемодинамические показатели, продемонстрировал выраженное эндотелиопротекторное и ангиопротекторное действие, способствуя увеличению продукции эндогенных вазодилаторов.

3. По результатам проведенного исследования, инфузионный препарат натрия-L-аргинина сукцинат — “Унифузол”, производства ООО “НТФФ ПОЛИСАН” (Россия), может быть рекомендован к проведению клинических исследований в качестве лекарственного средства, обладающего эндотелиопротекторным и ангиопротекторным действием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Г. Алмакаева, Е. В. Литвинова, *Ліки України*, **1**(5), 23 – 26 (2011).
2. Е. И. Амчиславский, *Мед. иммунол.*, **5**(5 – 6), 493 – 506 (2003).

3. О. А. Гомазков, *Успехи физиол. наук*, № 4, 48 – 61 (2000).
4. Ж. Д. Кобалава, Ю. В. Котовская, В. С. Моисеев, *Артериальная гипертензия: ключи к диагностике и лечению*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2009).
5. Л. Ф. Коноплева, Е. В. Андреев, *Therapia*, **10**(51), 64 – 68 (2010).
6. М. В. Корокин, Е. В. Артюшкова, М. В. Покровский, *Курский научно-практический вестник “Человек и его здоровье”*, № 3, 6 – 9 (2007).
7. В. И. Мазуров, Н. Н. Петрищев, О. Е. Хорева, *Клиническая эндотелиопротекция*, в кн.: дисфункция эндотелия. Патогенетическое значение и методы коррекции, Н. Н. Петрищев (ред.), ИИЦ ВМА, Санкт-Петербург (2007).
8. Е. Б. Манухина, И. Ю. Малышев, В. И. Бувальцев, *Кардиоваск. тер. и профилактика*, **2**(4), 26 – 30 (2003).
9. Н. Н. Петрищев, *Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция*, Изд-во СПбГМУ, Санкт-Петербург (2003).
10. М. В. Покровский, В. И. Кочкаров, Т. Г. Покровская, *Кубанский науч. мед. вестник*, № 10, 72 – 77 (2006).
11. О. А. Старосельцева, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Курск (2012).
12. А. П. Трашков, А. Г. Васильев, Е. А. Дементьева, *Вестник Рос. военно-мед. академии*, **1**(33), 148 – 153 (2011).
13. А. П. Трашков, А. Г. Васильев, Н. В. Цыган, *Педиатр*, **3**(2), 3 – 19 (2017).
14. М. А. Хорева, Р. И. Воробьев, Е. В. Нечунаева, *Бюл. СО РАМН*, № 5, 153 – 157 (2008).
15. О. И. Шушляпин, М. А. Турчинская, Л. Г. Кононенко, *Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина, Фармация*, № 22, 117 – 121 (2010).
16. Y. Hirooka, K. Egashira, T. Imaizumiet, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **24**(4), 948 – 955 (1994).
17. K. Iiyama, M. Nagano, Y. Yo, et al., *Am. Heart. J.*, **132**(4), 779 – 782 (1996).
18. W. Kiowski, L. Linder, R. Nuesch, *Eur. Heart J.*, **14**(Issue suppl C), 5 – 9 (1993).
19. X. F. Ming, A. G. Rajapakse, J. M. Carvas, et al., *BMC cardiovascular disorders*, **9**(12), 1147 – 1203 (2009).
20. G. M. Rubany, *J. Cardiovas. Pharmacol.*, **22** (suppl. 4), 1 – 14 (1993).
21. A. V. Santhanam, L. A. Smith, M. Akiyama, et al., *Stroke*, **36**(12), 2731 – 2737 (2005).
22. A. Tenenbaum, E. Z. Fisman, M. Motro, *Cardiology*, **90**(3), 153 – 159 (1998).

Поступила 13.09.16

ASSESSMENT OF SPECIFIC PHARMACOLOGIC ACTIVITY OF UNIFUSOL ON ENDOTHELIUM DYSFUNCTION MODEL INDUCED BY N-NITRO-L-ARGININE METHYL ETHER

A. G. Vasil'ev¹, A. P. Trashkov¹, N. A. Verlov¹, A. L. Kovalenko², A. Yu. Petrov¹, and V. V. Valeev¹

¹ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Maurice Thorez 44, St. Petersburg, 194223 Russia;

² Institute of Toxicology, Federal Medico-Biological Agency, ul. Bekhtereva 1, St. Petersburg, 192019 Russia

Specific pharmacologic activity of sodium-L-arginine succinate (unifusol) was studied on endothelium dysfunction model (EDM) in rats. EDM was induced by daily administration of N-nitro-L-arginine methyl ether (L-NAME). The effectiveness of experimental therapy with unifusol was assessed by changes in the arterial pressure level, duration of endothelium-dependent and -independent vasodilation, and the blood concentration of endothelial dysfunction markers including VEGF, NO, endothelin-1 and the number of desquamated endotheliocytes. Administration of unifusol favors correction of blood vessel endothelium state as manifested by normalization of its functional activity and reduction of the apoptosis of endotheliocytes. In addition, the obtained results unambiguously confirm considerable vasodilating and antihypertensive effects of unifusol.

Keywords: endothelial dysfunction; arterial hypertension; vasodilation; sodium-L-arginine succinate; unifusol; rats.