

# ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КАРВЕДИЛОЛА И ПРОКСОДОЛОЛА НА МЕТАБОЛИЗМ ОКИСИ АЗОТА (NO) В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ В УСЛОВИЯХ ИШЕМИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Д. А. Шашурин<sup>1</sup>, А. А. Тимошин<sup>2</sup>, О. С. Медведев<sup>1</sup>, А. Ф. Ванин<sup>3</sup>

Высокая эффективность  $\beta$ -адреноблокаторов с  $\alpha$ -адреноблокирующим эффектом (вазодилатирующих  $\beta$ -адреноблокаторов) при хронической сердечной недостаточности (ХСН) может объясняться их влиянием на метаболизм окиси азота (NO). Поэтому целью настоящего исследования было изучение влияния карведилола и проксодолола на содержание NO в различных органах в условиях модели ХСН. Сердечную недостаточность моделировали на крысах методом лигирования коронарной артерии. Оперированных животных распределяли по экспериментальным группам — либо получали карведилол или проксодолол, либо не получали лечения (контрольная группа). Дополнительно была сформирована группа ложнооперированных животных. После 28 дней лечения проводили измерение содержания NO в сердце, печени и почке методом ЭПР с применением спиновой ловушки. Установлено, что у животных, получавших карведилол, содержание NO в печени существенно ниже, чем у животных из других групп, что может объясняться ингибирующим действием карведилола на метаболизм NO в этом органе. Содержание NO в миокарде и ткани почки в контрольной группе было выше, чем у ложнооперированных животных, что подтверждает имеющиеся данные об увеличении содержания NO при ХСН. Оба изученных препарата значительно снижали содержание NO в миокарде и ткани почки по сравнению с контрольными животными.

**Ключевые слова:** окись азота, карведилол, проксодолол,  $\beta$ -адреноблокаторы

### ВВЕДЕНИЕ

Среди препаратов, применяемых в терапии хронической сердечной недостаточности, одно из важных мест занимают средства, блокирующие  $\beta$ -адренорецепторы. Наряду с классическими препаратами этой группы, воздействующими исключительно на  $\beta_1$  или на  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -адренорецепторы, с 1980-х годов в клинической практике применяют  $\beta$ -блокаторы, обладающие  $\alpha_1$ -адреноблокирующим компонентом, или вазодилатирующие  $\beta$ -адреноблокаторы.

Несмотря на то что вазодилатирующие  $\beta$ -адреноблокаторы используют для лечения хронической сердечной недостаточности (ХСН) уже более 20 лет, многое в механизме их действия до сих пор остается не изученным. В частности, имеются сведения о том, что

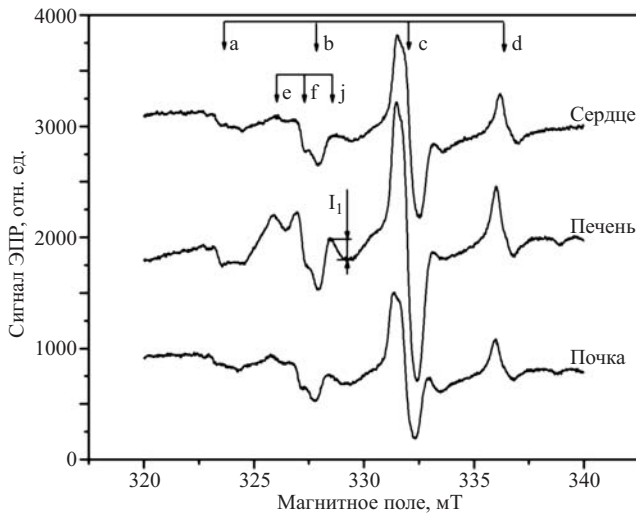
вазодилатирующий эффект, увеличивающий эффективность этих средств при ХСН по сравнению с классическими бета-блокаторами, связан не только с их действием на  $\alpha$ -адренорецепторы, но и частично объясняется их способностью стимулировать выброс эндотелием окиси азота (NO), обладающей вазодилатирующим действием [5]. Есть данные и о влиянии вазодилатирующих бета-блокаторов на метаболизм NO в миокарде [12]. С учетом данных о том, что NO принимает участие в большинстве процессов, лежащих в основе патогенеза ХСН, можно предположить, что способность вазодилатирующих  $\beta$ -блокаторов влиять на метаболизм NO может играть определенную роль в отношении других направлений их действия при ХСН, например, замедления ремоделирования миокарда и восстановления чувствительности кардиомиоцитов к действию адреномиметиков. Дополнительным аргументом в пользу такого предположения является создание небиволола — бета-адреноблокатора, обладающего выраженной способностью стимулировать выброс NO и отличающегося весьма высокой эффективностью при ХСН [14].

Среди всех вазодилатирующих бета-адреноблокаторов можно особо выделить два препарата — карведи-

<sup>1</sup> ГУНУ Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, 119192, Москва, Ломоносовский проспект, 31, корп. 5.

<sup>2</sup> ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Москва.

<sup>3</sup> Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва.



**Рис. 1.** Спектры ЭПР образцов замороженной ткани органов крыс с введенной спиновой ловушкой NO (без нормировки на массу образца).

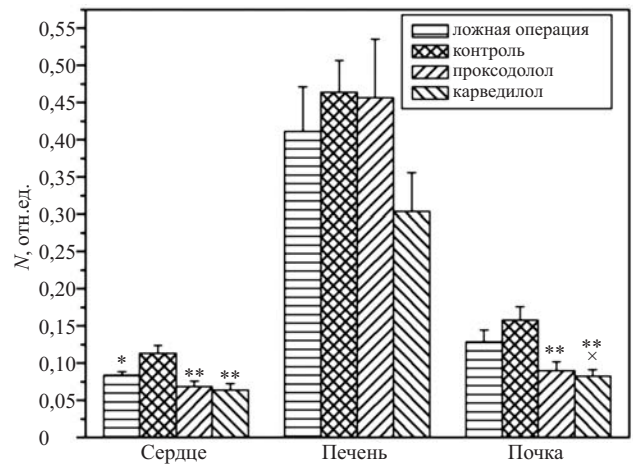
лол и проксодолол. Карведилол является одним из наиболее известных представителей данной группы лекарственных препаратов, обладающим, помимо  $\beta$ -адреноблолирующего и вазодилатирующего эффектов, выраженным антиоксидантным свойством [17]. Этот препарат считается одним из наиболее эффективных средств для лечения ХСН [16]. Проксодолол представляет новый отечественный вазодилатирующий  $\beta$ -адреноблокатор, применяемый для лечения артериальной гипертензии и недавно разрешенный к применению в качестве средства для лечения ХСН [4]. Согласно результатам доклинических и клинических исследований, по эффективности при данной патологии он сопоставим с карведилолом [1, 3].

Целью настоящего исследования было изучение влияния карведилола и проксодолола на содержание NO в различных тканях животных с экспериментально смоделированной хронической сердечной недостаточностью.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве метода создания ХСН избрана модель, основанная на перманентном нарушении коронарного кровотока. Для регистрации уровня NO в ткани органов был выбран метод спиновых ловушек с использованием метода ЭПР. В качестве спиновой ловушки использовали липофильный комплекс ионов железа и диэтилдитиокарбамата — ДЭТК ( $\text{Fe}^{3+}$ -ДЭТК<sub>2</sub>), переходящий в квазистабильную форму парамагнитного аддукта NO- $\text{Fe}^{2+}$ -ДЭТК<sub>2</sub> в результате взаимодействия с нестабильным радикалом NO [2, 19].

Эксперименты выполняли на крысах Вистар (самцы массой 250 – 300 г), содержащихся на стандартной диете в условиях 12-часового светового дня, в соответствии с этическими требованиями к проведению исследований на лабораторных животных.



**Рис. 2.** Усреднённые значения амплитуды высокопольной компоненты сигнала ЭПР парамагнитного аддукта NO, нормированной на массу ткани в активной зоне резонатора, для трёх органов животных различных экспериментальных групп.

Различия достоверны: \* — с группой “контроль”,  $p < 0,05$ ; \*\* — с группой “контроль”,  $p < 0,01$ ; x — с группой “ложная операция”,  $p < 0,05$ .

Под наркозом этаминал-натрием (45 мг/кг внутривенно) в условиях искусственной вентиляции легких животным лигировали левую нисходящую коронарную артерию (ЛНКА) на уровне ушка левого предсердия. Развитие ишемии миокарда в области нарушения кровотока подтверждалось визуально и электрокардиографически. У части животных выполняли аналогичную по методике операцию, однако, наложенную на коронарную артерию лигатуру не затягивали, т.е. нарушения коронарного кровотока не происходило. Эти животные формировали группу “ложная операция”. После завершения операции все животные получали внутривенно гентамицин (4 мг/кг) в виде водного раствора для профилактики инфекционных осложнений.

Животных, которым было выполнено лигирование коронарной артерии и у которых в ходе операции было подтверждено развитие ишемии миокарда, случайным образом распределяли в 3 равные по численности экспериментальные группы. Животные из первой группы получали внутривенно проксодолол (2 мг/кг в изотоническом растворе NaCl с концентрацией препарата 2 мг/мл), группа “проксодолол”. Животные второй группы внутривенно получали карведилол в дозе 2 мг/кг в форме суспензии в 0,5 % водном растворе метилцеллюлозы с концентрацией карведилола 2 мг/мл (группа “карведилол”). Дозы препаратов были выбраны в соответствии с результатами пилотных экспериментов, в ходе которых с помощью фармакологических проб с изадрином было показано, что в дозе 2 мг/кг оба препарата вызывают полную блокаду  $\beta_1$ -адренорецепторов сердца. Животным из третьей группы (группа “контроль”), а также животным из группы “ложная операция” вводили физиологический раствор в объёме, соответствующем объёму вводимых

другим животным раствором препаратов (2 мл/кг). Первую инъекцию выполняли всем животным непосредственно после окончания операции, в дальнейшем препараты или физиологический раствор, соответственно, вводили с интервалом 12 ч в течение 28 дней.

По окончании периода введения препаратов животных вновь наркотизировали этаминал-натрием (45 мг/кг внутривенно), после чего им вводили компоненты спиновой ловушки NO — ДЭТК (630 мг/кг, водный раствор с концентрацией 315 мг/мл, внутривенно) и  $\text{FeSO}_4$  с цитратом натрия (25 и 125 мг/кг соответственно, общий водный раствор с концентрациями 12,5 и 62,5 мг/мл соответственно, введение подкожно в области плеча). Через 30 мин после инъекций животных забивали, после чего у них экстрагировали сердце, печень и почки. Ткань этих органов измельчали механически, после чего её фрагменты помещали в пластиковые трубки внешним диаметром 5 мм, которые сразу замораживали и хранили в жидком азоте. При подготовке образца ткани сердца рубцовую ткань, сформировавшуюся в области ишемического повреждения, удаляли.

В ходе экстракции сердца визуально оценивали степень ишемического повреждения миокарда. В том случае, если у животного из группы с инфарктом миокарда по визуальной оценке площадь постинфарктного рубца составляла менее 15 – 20 % от площади поверхности левого желудочка, результаты анализов образцов тканей данного животного не учитывали при общем анализе результатов исследования.

Спектры ЭПР образцов при температуре жидкого азота регистрировали на спектрометре E-109E фирмы “Varian” (США). Амплитуда модуляции магнитного поля составляла 0,2 мТл при частоте 100 кГц. Частота СВЧ-поля спектрометра была 9,33 ГГц, а её мощность устанавливалась на уровне 10 мВт. Сканирование магнитного поля при регистрации сигналов ЭПР проводили в области  $g = 2,03$ . После регистрации спектров ЭПР образцы размораживали и определяли массу ткани в активной зоне резонатора.

Сравнение полученных в разных экспериментальных группах результатов проводили с использованием теста ANOVA.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты были проведены таким образом, чтобы в каждую из четырех экспериментальных групп на момент окончания исследования было включено по 10 животных.

В ходе операции по лигированию ЛНКА погибли 8 животных (21 % от общего числа животных, которым выполняли данную операцию). Случаев гибели животных, которым была выполнена ложная операция, а также случаев гибели животных после завершения операции, отмечено не было. В целом эти результаты соответствуют результатам предшествующих исследо-

ваний с использованием данного метода моделирования инфаркта миокарда [3].

Визуальная оценка степени повреждения миокарда у экспериментальных животных, проводимая перед измельчением его ткани, показала, что у крыс через 28 дней после лигирования ЛНКА на левом желудочке наблюдалась инфарктная зона площадью до 45 % от общей поверхности желудочка, что, согласно результатам предшествующих исследований, достаточно для развития постинфарктной ХСН [3]. У ложнооперированных животных признаки повреждения миокарда практически отсутствовали. Кроме того, в группе “карведилол” были выявлены 2 особи, у которых степень ишемического повреждения миокарда составила менее 15 – 20 %. Данные животные были исключены из последующего анализа. Таким образом, при статистической обработке результатов учитывали данные по 10 животным из групп “ложная операция”, “контроль” и “проксодолол” и по 8 животным из группы “карведилол”.

Спектры, полученные при анализе образцов тканей, представлены на рис. 1. Видно, что они представляют собой суперпозицию сигналов парамагнитных комплексов  $\text{Cu-ДЭТК}_2$  (линии a, b, c, d; см. рис. 1), свободнорадикальных сигналов от убисемихинона и фавосемихинонов в дыхательной цепи митохондрий [18], сигналов комплекса молибдена, а в области  $g = 2,03$  во всех образцах регистрировался триплетный сигнал (линии e, f, j; см. рис. 1), соответствующий квазистабильным парамагнитным аддуктам  $\text{NO-Fe}^{2+}$ -ДЭТК<sub>2</sub>, образующимся в результате взаимодействия молекул ловушки и короткоживущего радикала окиси азота.

Содержание в исследуемых образцах ткани органов окиси азота оценивали по амплитуде высокопольной компоненты сигнала ЭПР парамагнитного аддукта NO ( $I_1$ , см. рис. 1), нормированной на массу ткани в активной зоне резонатора. Усреднённые значения этой величины (параметр N) для трёх органов животных всех четырёх экспериментальных групп представлены на рис. 2.

При сравнении между собой разных органов животных из рис. 2 можно видеть, что для всех групп максимальные значения параметра N, характеризующего содержание NO в ткани, были получены для ткани печени по сравнению с сердцем и почками. Ранее такой эффект отмечался в работах других авторов [11, 19]. Вероятно, это может быть обусловлено тем, что содержание NO в печени выше, чем в других органах. В то же время можно предположить, что в ткани печени содержание образовавшихся комплексов ловушки NO выше, чем в других органах, что также может приводить к увеличению сигнала парамагнитного аддукта NO. При анализе результатов исследования образцов тканей печени обнаружено, что амплитуда сигналов парамагнитного аддукта NO в них в группе “карведилол” достоверно ниже, чем в других группах. Это наблюдение согласуется с имеющимися в литературе

данными о том, что хроническое применение карведилола угнетает связанные с выбросом NO метаболические процессы в печени, особенно в условиях патологии этого органа [13]. Однако в целом выраженное влияние карведилола при хроническом применении на фоне ХСН на содержание NO в ткани печени при отсутствии аналогичного эффекта у проксодолола пока не может быть объяснено.

Наиболее интересными с учетом поставленной задачи представляются результаты анализа содержания NO в образцах миокарда животных из разных экспериментальных групп. Так, при анализе образцов было обнаружено, что амплитуда сигнала комплекса Fe-ДЭТК-NO в миокарде животных группы “контроль” статистически достоверно выше, чем в миокарде животных группы “ложная операция”. Данный результат соответствует имеющимся в литературе сведениям о повышении на фоне хронической сердечной недостаточности содержания NO в миокарде [7, 8]. Кроме того, показано, что на фоне применения обоих исследуемых препаратов содержание NO в миокарде снижается относительно уровня, наблюдаемого как на фоне нелеченой постинфарктной сердечной недостаточности (группа “контроль”), так и на фоне ложной операции. Одним из возможных объяснений этого эффекта может быть следующий механизм. Как известно, на фоне хронической сердечной недостаточности и сопровождающего ее ремоделирования миокарда наблюдается усиление влияния на кардиомиоциты факторов ренин-ангиотензин-альдостероновой и симпатoadrenalовой систем, стимулирующих процесс ремоделирования [15]. Одновременно с этим наблюдается усиление выброса окиси азота, обладающего противоположным эффектом [7]. Применение бета-адреноблокаторов приводит к выраженному угнетению процесса ремоделирования (что подтверждается, например, уменьшением под действием данных препаратов степени гипертрофии миокарда у животных с экспериментальной ХСН [3]), что влечет компенсаторное угнетение синтеза NO.

Аналогичная миокарду картина наблюдалась при анализе образцов тканей почки. Так, амплитуда ЭПР-сигнала комплексов Fe-ДЭТК-NO в образцах почки животных из группы “контроль” оказалась выше, чем у животных из группы “ложная операция”, хотя статистически достоверной разницы между этими группами обнаружено не было. Амплитуды данных сигналов образцов тканей почки крыс из групп “проксодолол” и “карведилол”, оказались статистически достоверно ниже данных показателей для группы “контроль”, причем в группе “карведилол” данный показатель оказался также статистически достоверно ниже, чем в группе “ложная операция”. Данных, на основании которых можно было бы выработать гипотезу, позволяющую объяснить эти результаты, на настоящий момент недостаточно, в первую очередь из-за отсутствия сведений по влиянию карведилола и проксодо-

лола в условиях экспериментальной ХСН и использованных в эксперименте дозах на почечную гемодинамику. Можно предположить, что увеличение содержания NO в ткани почек у животных из группы “контроль” объясняется компенсаторным увеличением выброса NO эндотелием почечных сосудов в ответ на нарушения гемодинамики, характерные для сердечной недостаточности, в частности, на усиление процессов эндотелин-зависимой вазоконстрикции и уменьшение почечного кровотока [9]. Применение карведилола и проксодолола, оказывающих вазодилатирующий эффект, приводит к нормализации почечного кровотока [6, 10], что в свою очередь снижает интенсивность синтеза NO. С другой стороны, нельзя исключить возможность того, что отмеченное на фоне применения бета-адреноблокаторов снижение амплитуды ЭПР-сигнала комплексов Fe-ДЭТК-NO объясняется не влиянием данных препаратов на синтез NO, а снижением по сравнению с группами “контроль” и “ложная операция” содержания в ткани почки комплексов Fe-ДЭТК. Такой механизм возможен в случае преобладания в действии проксодолола и карведилола на почечный кровоток бета-, а не альфа-блокирующего эффекта, который приводит к угнетению почечного кровообращения [6].

## ВЫВОДЫ

1. Развитие постинфарктной хронической сердечной недостаточности приводит к значительным изменениям в метаболизме окиси азота в миокарде и ткани почки.

2. Хроническое применение проксодолола и карведилола вызывает снижение содержания окиси азота в тканях этих органов по сравнению с состоянием при хронической сердечной недостаточности без лечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, гранты № 08-04-00665-а и 05-04-49809-а.

Авторы выражают признательность Э. К. Рууге (ФГУ “РКНПК” Минздравсоцразвития России) за внимание к этой работе и поддержку при ее проведении.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. И. Ольбинская, З. М. Сизова, *Кардиология*, **46**(12), 17 – 20 (2006).
2. А. А. Тимошин, Е. Г. Доркина, Е. О. Паукова и др., *Биофизика*, **50**, 1145 – 1149 (2005).
3. Д. А. Шашурин, О. С. Медведев, С. Д. Южаков, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(2), 27 – 33 (2006).
4. С. Д. Южаков, О. В. Долгун, Е. В. Дородникова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **57**, 30 – 33 (1997).
5. R. A. Alfonso, R. S. Patarrao, M. P. Macedo, et al., *Rev. Port. Cardiol.*, **25**(10), 911 – 917 (2006).
6. K. N. Bernstein and D. T. O'Connor, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **24**, 105 – 120 (1984).
7. E. J. Birks and M. H. Yacoub, *Coron. Art. Dis.*, **8**(6), 389 – 402 (1997).
8. V. da Cunha, I. Stefanon, J. G. Mill, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **82**(6), 372 – 379 (2004).

9. S. S. Ding, C. Qiu, P. Hess, et al., *Cardiovasc. Res.*, **53**(4), 963 – 970 (2002).
10. A. G. Dupont, *Clin. Investig.*, **70**, S127 – S131 (1992).
11. A. M. Komarov, *Mol. Cel. Biochem.*, 234 / 235, 387 – 392 (2002).
12. K. Kurosaki, U. Ikeda, Y. Maeda, et al., *J. Mol. Cell Cardiol.*, **32**(2), 333 – 339 (2000).
13. H. C. Lin, Y. T. Huang, H. C. Wei, et al., *J. Gastroenterol.*, **41**(4), 361 – 368 (2006).
14. A. Maffei and G. Lembo, *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.*, **3**(4), 317 – 327 (2009).
15. M. Metra, S. Nodari, D'Aloia, A., et al., *Am. Heart J.*, **139**(3), 511 – 521 (2000).
16. M. Packer, *Am. J. Hypertens.*, **11**(1 Pt 2), 23S – 37S (1998).
17. G. Sponer, W. Bartsch, K. Strein, et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **9**(3), 317 – 327 (1987).
18. A. A. Timoshin, O. I. Pisarenko, V. L. Lakomkin, et al., *Exp. Clin. Card.*, **5**(2), 59 – 64 (2000).
19. A. F. Vanin, A. Huisman, E. E. van Faassen, *Meth. Enz.*, **359**, 27 – 42 (2003).

Поступила 08.10.10

## EFFECTS OF CARVEDILOL AND PROXODOLOL ON NITRIC OXIDE (NO) METABOLISM IN VARIOUS ORGANS UNDER CONDITIONS OF CONGESTIVE HEART FAILURE MODEL

D. A. Shashurin<sup>1</sup>, A. A. Timoshin<sup>2</sup>, O. S. Medvedev<sup>1</sup>, and A. F. Vanin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Fundamental Medicine, Moscow State University, Lomonosovskii pr. 31/5, Moscow, 119192, Russia

<sup>2</sup> State Cardiology Research and Production Association, Ministry of Public Health, ul. Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552, Russia

<sup>3</sup> Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 3, Moscow, 119991, Russia

There is certain evidence that high efficacy of  $\beta$ -adrenoblockers with  $\alpha$ -adrenoblocking effect (vasodilating  $\beta$ -blockers) in congestive heart failure (CHF) can be explained by their effect on nitric oxide (NO) metabolism. In this context, the possible effects of carvedilol and proxodolol on the NO level in different organs have been studied on CHF model. The heart failure was modeled in rats by ligation of the coronary artery. Operated animals were divided into experimental groups treated with carvedilol or proxodolol and the untreated (control) group. In addition, a group of sham-operated animals was formed. After 28 days of treatment, the NO level was measured in heart, liver, and kidneys using the EPR method with spin trap. It was found that, in carvedilol-treated group, the NO level in liver is significantly lower than in other groups, which can be explained by the inhibitory action of carvedilol on the NO metabolism in this organ. The NO levels in myocardium and kidney in the control group were higher than in the sham-operated group, which confirms previous findings that the NO levels increases in CHF. Both drugs significantly decreased the NO concentration in myocardium and kidney tissue compared to control animals.

**Key words:** Nitric oxide (NO), carvedilol, proxodolol,  $\beta$ -adrenoblockers