

# РОЛЬ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПУТИ L-АРГИНИН/NO ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ДЕФИЦИТА ОКСИДА АЗОТА

*Кафедра «Фармакология», НИИ ЭМ  
Курского государственного медицинского университета*

У лабораторных животных при моделировании эндотелиальной дисфункции введением ингибитора NO-синтазы L-NAME выявлена активизация эндотелиопротективных эффектов эналаприла, лозартана, амлодипина, индапамида и небиволола при сочетанном их введении с L-аргинином. Это положение подтверждается обобщающим расчётным показателем — коэффициентом эндотелиальной дисфункции (КЭД), рассчитанным по результатам проб на эндотелийзависимую и эндотелийнезависимую вазодилатацию.

Сосудистый эндотелий — ключевое и решающее звено в регуляции сосудистой функции и гомеостаза. Оксид азота (NO) является самым важным паракринным веществом, освобождающимся из эндотелия, регулирующим тонус сосудов. В дополнение к регулированию сосудистого тонуса и артериального давления сосудистый эндотелий обладает антитромботическими свойствами, модулирует взаимодействие между стенкой кровеносных сосудов и циркулирующих лейкоцитов и тромбоцитов [2, 3, 4, 15]. Факторы риска атеросклероза, также как и уже имеющийся атеросклероз, связаны с эндотелиальной дисфункцией (ЭД) и уменьшением биодоступности NO [5, 7, 16, 26]. NO образуется путём превращения аминокислоты L-аргинина в L-цитруллин конститутивным ферментом — эндотелиальной NO-синтазой (e-NOS). Таким образом, L-аргинин является единственным субстратом для продукции NO. Следует отметить всё возрастающий интерес к возможности реализации моделирования ЭДС с использованием L-аргинина в профилактике развития атеросклероза [8, 28]. Необходимы дополнительные исследования для уточнения роли и места L-аргинина в дополнительной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. В доступной литературе мы не нашли данных о влиянии L-аргинина и его комбинаций с основными антигипертензивными препаратами на функциональные особенности регуляции сосудистого тонуса при моделировании дефицита оксида азота, что и явилось целью наших исследований.

## Методы исследования

Опыты проводились на белых крысах-самцах линии Wistar массой 250—300 г. N-нитро-L-аргинин-метилэфир (L-NAME) вводился внутривенно в дозе 25 мг/кг/сут. (n=10) в течение 7 дней. На 8-й день от начала эксперимента под наркозом (этиминал-натрия 50 мг/кг) вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей, болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в правую бедренную вену. Показатели кардиогемодинамики — систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД), частоту сердечных сокращений (ЧСС) — измеряли непрерывно посредством

датчика P231D «Gould» (США) и компьютерной программы «Bioshell». Проводились вазодилататорные сосудистые пробы: внутривенное введение ацетилхолина (АХ; 40 мкг/кг) (15) и нитропруссид натрия (НП; 30 мкг/кг). Исследуемые группы животных (в каждой n=10): 1 — интактные; 2 — с введением L-NAME; 3, 4, 5, 6, 7, 8 — L-аргинин (200 мг/кг), эналаприл (0,5 мг/кг), лозартан (6 мг/кг), амлодипин (0,5 мг/кг), индапамид (2 мг/кг); небиволол (0,5 мг/кг) на фоне введения L-NAME; 9, 10, 11, 12, 13 — совместно с вышеуказанными препаратами L-аргинин (200 мг/кг) на фоне введения L-NAME. Традиционные антигипертензивные препараты вводились внутривенно в начальных терапевтических дозах, L-аргинин вводился внутривенно в дозе, используемой по литературным данным в кардиологии.

В качестве биохимических маркеров эндотелиальной дисфункции определяли стабильные метаболиты NO (Метельская В. А., Гуманова Н. Г., 2005), и уровень экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота (e-NOS) определяли в клеточном лизате по модифицированному методу R. J. Hendrickson.

При статистической обработке данных рассчитывали среднее значение, величину стандартного отклонения. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования

Блокада NO-синтазы вызывала артериальную гипертензию (САД —  $190,3 \pm 6,7$ , ДАД —  $145,0 \pm 3,9$ , СрАД —  $160,1 \pm 4,6$  мм рт. ст.). Введение на фоне L-NAME антигипертензивных препаратов в указанных дозах не приводило к достижению целевых показателей АД, в группах с дополнительным введением L-аргинина отмечалось потенцирование гипотензивного действия фоновых препаратов, достоверно значимое снижение параметров АД до нормального уровня отмечалось в группах комбинации L-аргинина с эналаприлом и амлодипином. Для дальнейшей объективизации оценки коррекции эндотелиальной дисфункции, возникающей при моделировании дефицита оксида азота введением L-NAME, нами использован специальный коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД), предложенный в нашей лаборатории [6]. Данный коэффициент рассчитывался по формуле:  $КЭД = SAД_{НП} / SAД_{АХ}$ , где SAД НП — площадь треугольника над кривой восстановления АД, причём точками меньшего катета являются точка максимального падения АД и точка выхода уровня АД на плато при проведении функциональной пробы с введением НП, SAД АХ — площадь треугольника над кривой восстановления АД при проведении пробы с АХ, причём за меньший из катетов принимают разность между точкой окончания брадикардического кардиального компонента и точкой восстановления АД. Мы рассчитывали КЭД у каждого животного каждой группы и после

моделирования блокады NO-синтазы получили КЭД, равный  $5,4 \pm 0,6$ , в то время как в группе интактных животных КЭД составлял  $1,1 \pm 0,1$ , т. е. получили разницу КЭД в 5 раз.

Моделирование L-NAME–индуцированного дефицита азота характеризовалось также резким снижением стабильных метаболитов оксида азота в сыворотке животных. Данный показатель у интактных животных составил  $114,1 \pm 4,2$  мкмоль, тогда как у животных с патологией —  $61,2 \pm 2,7$  мкмоль ( $p < 0,05$ ), т. е. получили разницу в 2 раза. Показатель экспрессии эндотелиальной NO-синтазы, выраженный в % от контроля, у интактных животных составил  $72,9 \pm 3,8$ , а в группе L-NAME —  $21,4 \pm 4,7$ , т. е. разница составляет 3,5 раза.

Таким образом, коэффициент эндотелиальной дисфункции представляется наиболее репрезентативным и доступным способом оценки эндотелиопротективных свойств биологически активных веществ, поэтому в дальнейших исследованиях мы использовали именно этот показатель.

Как видно из данных таблицы, L-аргинин дополняет эндотелиопротективные эффекты представителей основных групп антигипертензивных препаратов, приближая КЭД к группе интактных животных, что свидетельствует о восстановлении баланса эндотелийзависимой и эндотелийнезависимой вазодилатации в условиях снижения активности ферментативного пути образования оксида азота.

## Обсуждение

Для согласованной работы eNOS требуется много совместно действующих факторов, таких как никотинамиддифосфат (NADPH), динуклеотидаденинрибофлавин (FAD), кальций, кальмодулин и тетрагидробиоптерин. NO диффундирует в сосудистые гладкомышечные клетки и стимулирует гуанилатциклазу, что приводит к увеличению продукции cGMP и вазодилатации [1, 17].

При снижении доступности L-аргинина eNOS начинает избыточно продуцировать реактивные формы кислорода (оксидативный стресс), что приводит к нарушениям защитных функций антиоксидантных механизмов клетки, и становится сильным патогенным фактором развития эндотелиальной дисфункции. Этот феномен получил название «разобщение» (uncoupling) eNOS и был убедительно продемонстрирован в опытах с очищенным ферментом [17]. Недостаток L-аргинина может вызываться диетическими факторами, повышением активности аргиназы (фермента, разрушающего L-аргинин) [11, 22], окисленными липопротеидами низкой плотности [24], увеличением присутствия эндогенного ингибитора eNOS — асимметричного диметиларгинина (ADMA) и NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) [9, 30]. Как следствие, происходит нарушение метаболизма и мембранного транспорта L-аргинина, что в результате приводит к существенным сдвигам в редокс-окислительных компонентах eNOS, при этом биосинтез NO резко снижается [26].

### Влияние эналаприла, лозартана, амлодипина, индапамида и небиволола в комбинации с L-аргином на функциональные показатели на фоне моделирования дефицита оксида азота введением N-нитро-L-аргинин-метилового эфира (L-NAME) в дозе 25 мг/кг внутривнутрибрюшинно ( $M \pm m$ , $n=10$ )

Группы животных	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.	КЭД, отн. ед.
Интактные	$137,7 \pm 3,7$	$101,9 \pm 4,3$	$1,1 \pm 0,1$
L-NAME	$190,3 \pm 6,7^*$	$145,0 \pm 3,9^*$	$5,4 \pm 0,6^*$
L-NAME+L-аргинин	$173,3 \pm 8,3^{**}$	$137,3 \pm 9,4^{**}$	$2,5 \pm 0,05^{**}$
L-NAME +эналаприл	$183,9 \pm 11,4$	$138,9 \pm 7,0$	$3,3 \pm 0,1^{**}$
L-NAME+эналаприл+L-аргинин	$142,7 \pm 14,6^{***}$	$116,0 \pm 12,2^{***}$	$2,6 \pm 0,1^{***}$
L-NAME+лозартан	$192,2 \pm 10,5$	$138,2 \pm 2,4$	$2,3 \pm 0,3^{**}$
L-NAME+лозартан+L-аргинин	$165,0 \pm 6,2^{***}$	$131,1 \pm 4,3^{**}$	$1,7 \pm 0,1^{***}$
L-NAME+амлодипин	$186,3 \pm 15,2$	$131,1 \pm 7,0$	$2,1 \pm 0,3^{**}$
L-NAME+амлодипин+L-аргинин	$144,8 \pm 7,6^{***}$	$111,8 \pm 7,6^{***}$	$1,5 \pm 0,1^{***}$
L-NAME+индапамид	$191,4 \pm 10,0$	$140,4 \pm 2,4$	$3,3 \pm 0,4^{**}$
L-NAME+индапамид+L-аргинин	$183,9 \pm 6,8$	$137,7 \pm 6,6$	$2,3 \pm 0,2^{***}$
L-NAME +небиволол	$170,1 \pm 7,3^{***}$	$125,9 \pm 4,7^{**}$	$1,7 \pm 0,1^{**}$
L-NAME +небиволол +L-аргинин	$147,1 \pm 5,9^{***}$	$116,7 \pm 6,3^{**}$	$1,5 \pm 0,1^{**}$

**Примечание:** 1) КЭД — коэффициент эндотелиальной дисфункции; —  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных; \*\* —  $p < 0,05$  в сравнении с группой L-NAME, x —  $p < 0,05$  в сравнении с монотерапией.

В ранее проводимых экспериментальных исследованиях изучался потенциальный вазопротекторный эффект L-аргинина. Исследования, проводимые на изолированных сосудах, взятых у кроликов с гиперхолестеринемией, продемонстрировали улучшение эндотелийзависимой вазорелаксации (ЭЗВР) как при однократном внутривенном, так и при длительном пероральном введении L-аргинина [14]. В серии экспериментов *in vivo* показано также улучшение ЭЗВР сосудов задней конечности кроликов с гиперхолестеринемией на введение ацетилхолина на фоне внутривенного введения L-аргинина (10 мг·кг<sup>-1</sup>·минута<sup>-1</sup>) [12, 14], при этом D-аргинин не проявлял подобных эффектов. Используя подобную методику оценки кровотока, получили данные об уменьшении проявлений эндотелиальной дисфункции на фоне одновременного назначения диеты с высоким содержанием холестерина и L-аргинина у животных после 7 недель кормления. В дополнение к этому получены данные об уменьшении площади поражения атеросклеротическими бляшками грудной аорты, а также снижении гиперплазии миоинтимы сосудов при баллон-индуцированном повреждении в данных условиях моделирования атеросклероза на фоне введения L-аргинина [12]. Возможным объяснением данного эффекта L-аргинина является повышение локального NO-синтеза в месте повреждения сосуда, вследствие чего происходят снижение адгезирующей активности моноцитов, увеличение апоптоза гладкомышечных клеток и макрофагов. Эти данные были подтверждены в недавнем клиническом исследовании, показавшем снижение системного повышения периферической активации лимфоцитов, маркеров оксидативного стресса и уровня антител к окисленным липопротеидам низкой плотности на фоне введения L-аргинина у больных с чрескожной транслюминальной коронароангиопластикой [18, 29]. Таким образом, добавление L-аргинина может способствовать предотвращению рестеноза в стенке.

Постоянный приём L-аргинина предотвращал развитие эндотелиальной дисфункции, связанной с вдыханием табачного дыма у кроликов с нормо- и гиперхолестеринемией [12, 25, 27], у крыс при моделировании аллоксанового диабета, ишемической кардиомиопатии [20], артериальной гипертензии [10, 13, 19, 21].

Экспериментальное моделирование дефицита оксида с помощью введения ингибитора синтеза NO N-нитро-L-аргинин-метилового эфира (L-NAME) в течение 7 дней обнаруживает увеличение маркеров воспалительных (адгезия и инфильтрация моноцитов) и пролиферативных (появление пролиферирующих и ядерных антиген-позитивных) клеток. Одновременно с этим повышается содержание в тканях ангиотензин-конвертирующего фермента и рецепторов к ангиотензину I типа, приводящих к повышению активности ангиотензина II. Кроме того, происходит повышение активности гена, ответственного за экспрессию хемокинов, таких как протеин-1 хемотаксиса моноцитов — MCP-1, цитокинов (трансформирующий фактор роста (TGF), тканевый фактор [14]. Возникающий оксидантный стресс активирует большое количество оксидантчувствительных факторов транскрипции (таких как нуклеарный фактор каппа-B, NF-κB), которые повышают экспрессию адгезивных молекул эндотелия (ICAM-1, VCAM-1), способствующих развитию воспалительных и других процессов (протекающих, в частности, при атеросклерозе). То есть данная модель позволяет воспроизвести начальные патофизиологические изменения, происходящие

при наличии факторов риска или ранних признаках развития атеросклероза. Известно, что введение L-аргинина, восстанавливая NO-синтез при одновременном введении с L-NAME, препятствует развитию данных изменений.

Настоящее исследование выявило сопоставимые антигипертензивные и эндотелиотропнонаправленные эффекты при монотерапии представителями базовых антигипертензивных препаратов и L-аргинина. Возможно, это связано с использованием малых доз исследуемых препаратов, соответствующих стартовой терапии, принятой в фармакотерапии артериальной гипертензии в клинических условиях. По проявлению наибольшего эндотелиотропного воздействия из данной группы можно выделить препараты из группы бетаблокаторов — небиволол и блокаторов AT I рецепторов — лозартан, что объясняется известными свойствами обоих препаратов активизировать эндотелиальную продукцию оксида азота [7]. L-аргинин в дозе 200 мг/кг дополняет эндотелиопротективные эффекты представителей основных групп антигипертензивных препаратов, приближая КЭД к группе интактных животных, наиболее выраженнее это проявилось в группе с эналаприлом и индапамидом. Положительные результаты дополняющей фармакотерапии патофизиологических состояний дефицита оксида азота с использованием субстрата NO-L-аргинина объясняются большим сродством L-аргинина к NO-синтазе, чем L-NAME, вследствие проявления неспецифических антиоксидантных свойств прекурсора NO, предотвращающих разобщение NOS-синтазы. В то же время нельзя исключать возможность активации других ферментных путей образования NO из L-аргинина (цитохром 450 и др.).

## Выводы

Коэффициент эндотелиальной дисфункции, рассчитанный по результатам проб на эндотелийзависимую и эндотелийнезависимую вазодилатацию, является наиболее информативным показателем, отражающим степень нарушения вазодилатации в условиях снижения синтеза оксида азота.

L-аргинин (200 мг/кг) при длительном, в течение 7 суток, введении L-NAME предотвращает развитие эндотелиальной дисфункции при экспериментальной модели дефицита азота, выражающегося в снижении показателя коэффициента эндотелиальной дисфункции.

L-аргинин потенцирует эндотелиопротективные эффекты эналаприла, лозартана, амлодипина, индапамида и небиволола при данной экспериментальной модели эндотелиальной дисфункции. Такое сочетание гипотензивных препаратов с L-аргинином является патогенетически оправданным, так как компенсируется основная причина развития данного патофизиологического состояния — снижение активности сосудистого эндотелия в образовании оксида азота, что позволяет рекомендовать более широкое изучение данного подхода коррекции сердечно-сосудистых заболеваний в клинических условиях.

*Поступила 17.04.2008*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Марков Х. М. Оксидантный стресс и дисфункция эндотелия // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2005. № 4. С. 5—9.

2. Баркаган З. С., Костюченко Г. И. Метаболически-воспалительная концепция атеротромбоза и новые подходы к терапии больных // Бюллетень СО РАМН. 2006. Т. 120. № 2. С. 132—138.
3. Ванин А. Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях // Вести РАМН. 2000. № 4. С. 3—5.
4. Котюжинская С. Г., Котюжинский А. И. Влияние оксида азота на фибринолитическую систему // Физиол. журн. 2000. № 2. С. 8—9.
5. Манухина Е. Б., Лямина Н. П., Долотовская П. В. и др. Роль оксида азота и свободных радикалов в патогенезе артериальной гипертензии // Кардиология. 2002. Т. 42. № 11. С. 73—84.
6. Покровский М. В., Кочкаров В. И., Покровская Т. Г. и др. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита азота в эксперименте // Кубанский научный медицинский вестник. Краснодар, 2006. № 10. С. 72—77.
7. Романовская Г. А., Акатова Е. В., Гороховская Г. Н. и др. Перспективы медикаментозного лечения эндотелиальной дисфункции // Фарматека. 2006. № 9. С. 50—56.
8. Степанов Ю. М., Кононов И. Н., Журбина А. И. и др. Аргинин в медицинской практике (Обзор литературы) // Сучасна гастроентерология. 2005. № 4. С. 121—127.
9. Boger R. H. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the «L-arginine paradox» and acts as a novel cardiovascular risk factor // J. Nutr. 2004. V. 134. № 10. С. 2842—2847.
10. Boger R. H. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor // Altern. Med. Rev. 2005. V. 10. № 1. P. 14—23.
11. Brandes R. P. Roads to Dysfunction. Arginase II. contributes to oxidized low-density lipoprotein-induced attenuation of endothelial NO production // Circulation Research. 2006. V. 99. P. 918—920.
12. Brandes R. P., Brandes S., Boger R. H. et al. L-arginine supplementation in hypercholesterolemic rabbits normalizes leukocyte adhesion to non-endothelial matrix // Life Sci. 2000. V. 66. P. 1519—1524.
13. Der Sarkissian E. L., Marchand D., Duguay D. Synergistic interaction between enalapril, L-arginine and tetrahydrobiopterin in smooth muscle cell apoptosis and aortic remodeling induction in SHR // Br. J. Pharmacol. 2004. V. 142 (5). P. 912—918.
14. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease // Circ. J. 2002. V. 66. P. 529—533.
15. Endemann D. H., Schiffrin E. L. Endothelial Dysfunction // J. Am. Soc. Nephrol. 2004. № 15. P. 1983—1992.
16. Feletou M., Vanhoutte P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006. V. 291. № 3. P. 985—1002.
17. Förstermann U., Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease From Marvel to Menace Circulation. 2006. V. 113. P. 1708—1714.
18. George J., Shmuel S. B., Roth A. et al. L-arginine attenuates lymphocyte activation and anti-oxidized LDL antibody levels in patients undergoing angioplasty // Atherosclerosis. 2004. V. 174. № 2. P. 323—327.
19. Gokce N. L-arginine and hypertension // J. Nutr. 2004. V. 134. № 10. P. 2807—2811.
20. Gornik H. L., Creager M. A. Arginine and endothelial and vascular health // J. Nutr. 2004. V. 134. № 10. P. 2880—2887.
21. Herman A. G., Moncada S. Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis // European Heart Journal. 2005. V. 26. № 19. P. 1945—1955.
22. Johnson F. K., Johnson R. A., Peyton K. J. et al. Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005. V. 288. P. 1057—1062.
23. Mac Mahon N. B., Cauman S. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood pressure lowering drugs results of prospectively designed overviews of randomized trials. BPLTCT // Lancet. 2004. V. 345. P. 1076—1078.
24. Mendes Ribeiro A. C., Brunini T. M., Ellory J. C. et al. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure // Cardiovasc. Res. 2001. V. 49 (4). P. 697—712.
25. Morris S. M. Arginine metabolism in vascular biology and disease // Vasc Med. 2005. V. 1. № 10. P. 83—87.
26. Rabelink T. J., Luscher T. F. Endothelial nitric oxide synthase host defense enzyme of the endothelium? // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2006. V. 26. P. 267—274.
27. Rasmusen C, Cynober L., Couderc R. Arginin and statins: relationship between the nitric oxide pathway and the atherosclerosis development // Ann. Boil. Clin. 2005. V. 63. №. 5. P. 443—455.
28. Siasos G., Tousoulis D., Antoniades C. et al. L-Arginine, the substrate for NO synthesis: an alternative treatment for premature atherosclerosis? // Int J Cardiol. 2007. V. 116. № 3. P. 300—308.
29. Suzuki T., Hayase M., Hibi K. et al. Effect of local delivery of L-arginine on in-stent restenosis in humans // Am. J. Cardiol. 2002. V. 89. P. 363—367.
30. Sydow K., Munzel T. ADMA and oxidative stress. Atheroscler Suppl. 2003, № 4. P. 41—51.

**T. G. POKROVSKAYA**

***ROLE FARMACOLOGY CORRECTION OF L-ARGININE/NO PATHWAY IN NITRIC OXIDE DEFICIENCY MODELLING***

*In laboratory animals in nitric oxide deficiency modelling introduction of NO-syntase inhibitor L-NAME activization endothelioprotective effects activization of enalapril, losartan, amlodipine, indapamide and nebivolol is revealed in their introduction in combination with L- arginine. This statement is proved by a generalizing parameter — the coefficient of endothelial dysfunction (CED), calculated due to results of tests on endotheliodependent and endothelioindependent vasodilatation.*