

## **ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ НЕСЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА АРГИНАЗЫ L-НОРВАЛИНА И ИНГИБИТОРА ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ-5 ТАДАЛАФИЛА**

**Э.Н. ДУДИНА<sup>1</sup>**  
**Т.Г. ПОКРОВСКАЯ<sup>2</sup>**  
**Е.А. КОНОВАЛОВА<sup>1</sup>**  
**М.В. КОРОКИН<sup>2</sup>**  
**М.В. СЫТНИК<sup>2</sup>**  
**С.А. ЛОСЕНКО<sup>1</sup>**  
**Т.В. ОСТАШКО<sup>2</sup>**  
**С.В. ХОДОВ<sup>1</sup>**  
**И.М. КОЛЕСНИК<sup>1</sup>**

<sup>1)</sup> *Курский государственный  
медицинский университет*

<sup>2)</sup> *Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет*

*e-mail: dudina.ele@yandex.ru*

В результате исследования было показано, что сочетанное применение неселективного ингибитора аргиназы L-норвалина и ингибитора фосфодиэстеразы-5 тадалафила оказывает выраженное эндотелиопротективное действие на модели L-NAME-индуцированного дефицита NO, что выражалось в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов и снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, L-норвалин, ингибитор фосфодиэстеразы-5 тадалафил.

Коррекция эндотелиальной дисфункции при сердечно-сосудистой патологии сегодня является одним из наиболее перспективных направлений, определяющих вероятность развития сосудистых осложнений и способствующих улучшению прогноза в целом [4]. В патогенезе и клинике артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, атеросклероза, сахарного диабета и их осложнений одним из важных аспектов считается нарушение структуры и функции эндотелия [6].

Здоровый эндотелий обладает целым рядом разнообразных функций, однако в современной научной литературе под эндотелиальной дисфункцией понимают нарушение баланса между выделяемыми эндотелиальными клетками вазодилаторами и вазоконстрикторами с преобладанием последних [3].

Ведущую роль в развитии эндотелиальной дисфункции играет снижение синтеза и биодоступности оксида азота NO, который обладает не только вазодилатирующим действием, но также является дезагрегантом, угнетает пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов и препятствует выделению тканевых факторов, повышающих вероятность тромбообразования, что позволяет рассматривать его в качестве основного антиатерогенного медиатора [1]. Оксид азота также является и основным медиатором эрекции, в процессе развития которой его действие приводит к расслаблению гладкомышечных клеток кавернозных тел, что обеспечивает резкое усиление притока к ним артериальной крови.

Развитие эндотелиальной дисфункции нарушает этот процесс, препятствуя достижению достаточного уровня артериального кровотока в кавернозных телах, что приводит к развитию артериогенной эректильной дисфункции [2]. Эндотелиальная дисфункция в настоящее время рассматривается в качестве ранней, потенциально обратимой стадии атеросклеротического процесса. Таким образом, на уровне полового члена эндотелиальная дисфункция приводит к развитию эректильной дисфункции, а в коронарных сосудах – к развитию ишемической болезни сердца. Это определяет значение эректильной дисфункции в качестве раннего проявления системного сосудистого поражения.

Тадалафил является наиболее перспективным и наименее изученным селективным конкурентным ингибитором фосфодиэстеразы-5 (ФДЭ-5), который, препятствуя разрушению цГМФ, усиливает сосудорасширяющий эффект оксида азота, тем самым может улучшать состояние эндотелиальной функции сосудов.



Оксид азота образуется из аминокислоты L-аргинина. Метаболизм L-аргинина в клетках протекает по двум путям [7]. L-аргинин посредством аргиназы гидролизуется в орнитин и мочевину. Другой путь превращения L-аргинина – в оксид азота и цитрулин – катализируется NO-синтазой. Ферменты аргиназа и NO-синтаза конкурируют между собой за общий субстрат L-аргинин [9].

Установлено, что аргиназа – фермент цикла мочевины, обладающий высокой активностью, в тысячи раз превышающей таковую у NO-синтазы [8].

Ингибиторы аргиназы – это вещества природного происхождения, механизм действия которых заключается в блокировании фермента аргиназы, а, следовательно, в нарушении превращения L-аргинина в орнитин и мочевину [10]. Вследствие этого, большее количество L-аргинина расщепляется под действием NO-синтазы с образованием оксида азота. Тем самым, ингибиторы аргиназы предотвращают развитие дефицита оксида азота, как одного из важнейших этиологических факторов эндотелиальной дисфункции. Ингибиторы аргиназы могут быть селективными и неселективными. Некоторые из ингибиторов аргиназы уже исследованы *in vitro* [12]. L-норвалин – наименее изученный из неселективных ингибиторов аргиназы.

В клинической практике врач всегда имеет дело с сочетанной патологией. Нозологические формы тесно переплетены друг с другом, имеют общие патогенетические звенья, и проблема эффективной коррекции органических нарушений требует новых методов и средств [5]. Анализ результатов действия ингибиторов ФДЭ-5 и ингибиторов аргиназы на сердечно-сосудистую систему может позволить определить качественно новые показания для применения этих препаратов.

Если учесть, что многие из традиционных гипотензивных препаратов (диуретики, аденоблокаторы) сами снижают потенцию, исследование эндотелиопротективных свойств блокатора фосфодиэстеразы-5 тадалафила и его сочетания с ингибитором аргиназы L-норвалином представляется актуальным.

**Цель исследования:** изучение эндотелиотропных эффектов сочетанного использования ингибитора фосфодиэстеразы-5 тадалафила и ингибитора аргиназы L-норвалина.

**Материалы и методы.** Опыты проводили на самцах белых крыс линии Вистар массой  $250 \pm 50$  г. Для моделирования эндотелиальной дисфункции внутрибрюшинно вводился блокатор NO-синтазы N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) в дозе 25 мг/кг/сут в течение 7 дней.

На 8-й день от начала эксперимента под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД). Болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в бедренную вену. Показатели гемодинамики – систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) – измеряли непрерывно посредством датчика и компьютерной программы “Віорас”. Помимо измерения АД проводили ряд функциональных тестов с последующей оценкой изменения параметров гемодинамики (САД, ДАД, ЧСС) в ответ на внутривенное введение раствора ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного (ЭЗВД) [3, 5], а также изменения параметров гемодинамики в ответ на внутривенное введение раствора нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного (ЭНВД) [3, 1].

Степень эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных, а также степень ее коррекции оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД), представляющему собой отношение площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение НП-эндотелий независимой вазодилатации (ЭНВД) к площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение АХ-эндотелий зависимой вазодилатации (ЭЗВД) [3, 5].

Биохимическими маркерами эндотелиальной дисфункции служили TotalNO (NOx) и концентрация С-реактивного белка (СРБ). Нами использована модификация метода определения стабильных метаболитов NO. Принцип метода заключается в одновременном восстановлении нитратов в нитриты в присутствии хлористого ванадия и реакции диазотирования с последующим развитием окраски.

Уровень С-реактивного белка определяли иммунотурбидиметрическим методом измерения при длине волны 340 нм, с использованием нелинейной калибровки при



помощи реагентов «Human» (Германия) на автоматическом биохимическом анализаторе «Виталаб Флексор».

Экспериментальные животные были разделены на группы (n=10): I– интактные; II– с введением L-NAME; III– на фоне L-NAME введение L-норвалина в дозе 10 мг/кг в виде водного раствора внутривенно через зонд однократно в сутки в течение 7 дней; IV– с введением на фоне L-NAME тадалафила в виде водного раствора в дозе 0,09 мг/кг ежедневно один раз в сутки внутривенно через зонд; V– с введением на фоне L-NAME комбинации L-норвалина и тадалафила в дозе 10 мг/кг и 0,09мг/кг соответственно внутривенно, один раз в сутки в течение 7 дней через 30 минут после введения L-NAME.

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе MicrosoftExcel версии 10.0 при помощи средств пакета анализа. «Описательная статистика» применялась для нахождения среднего значения (M) показателей и ошибки среднего (m) в каждой группе животных; данные в тексте и таблицах представлены в виде M±m. «Двухвыборочный t-тест с различными дисперсиями» использовался для сравнения соответствующих показателей в различных группах животных и определения достоверности различий между ними путем вычисления вероятности возможной ошибки (p). Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего p<0,05.

**Результаты.** Влияние L-норвалина и тадалафила, а также их сочетанного применения в дозах 10 мг/кг и 0,09 мг/кг соответственно на исходные показатели артериального давления у наркотизированных крыс с моделированием L-NAME-индуцированной патологии представлены в табл.

Таблица

**Изменение показателей гемодинамики и функциональных проб при применении комбинации тадалафила (0,09 мг/кг) с L-норвалином (10 мг/кг) на фоне моделирования L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции (M±m, n=10)**

Группы животных	Функциональная проба	САД мм рт. ст.	ДАД мм рт. ст.	ЧСС уд/мин.	S (усл. ед.)	КЭД
Интактные	Исходные	137,7±3,7	101,9±4,3	453,8±11,6		1,1±0,1
	АХ	84,3±4,5	38,7±2,8	448,3±11,0	1268,0±74,8	
	НП	83,0±3,7	42,1±4,4	464,1±11,5	1375,3±93,7	
L-NAME (25 мг/кг)	Исходные	190,3±6,7*	145,0±3,9*	417,2±11,7		5,4 ±0,6*
	АХ	110,6±5,2*	82,8±6,6*	399,8±15,6*	695,3±87,6*	
	НП	88,7±4,7	50,8±4,2	401,7±11,8	3322,7±116,7*	
L-NAME (25 мг/кг)+ L-норвалин (10 мг/кг)	Исходные	180±4,7*	144,6±5,1*	371,4±11**		2,1 ±0,2**
	АХ	106,7±4,9*	56,1±1,8**	344,2±15**	1360,6±126,9**	
	НП	129,3±5,1**	64,6±2,5*	358,3 ± 12**	2827,2±429,1**	
L-NAME (25 мг/кг)+ тадалафил (0,09 мг/кг)	Исходные	189,9 ± 8,5*	153,3 ± 6,4*	421,4±26,0		2,9 ±0,1**
	АХ	103,2±4,6*	69,6±6,3*	402,1±28,4	1073,5±43,1**	
	НП	105,6±6,6**	58,0±1,6	429,4±42,2	3059,1±384,3*	
L-NAME (25 мг/кг)+ L-норвалин (10 мг/кг)+ тадалафил (0,09 мг/кг)	Исходные	174,4±10,9**	111,2±0,7**	449,1±34,8		1,8 ±0,1**
	АХ	72,6±4,5**	51,5±3,2**	444,2±39,4**	1205,7±121,4**	
	НП	93,9±3,6	55,2±3,6	467,5±35,5**	2128,1±197,4**	

Примечание: \* –p<0,05 в сравнении с интактными, \*\* – p<0,05 в сравнении с L-NAME.

Значения показателей САД и ДАД в группе интактных животных приняты целевыми значениями артериального давления. Обнаружено, что сочетанное применение тадалафила и L-норвалина, в отличие от монотерапии этими препаратами, обладало гипотензивным эффектом, который достоверно отличался от показателей животных, получавших L-NAME. В то же время целевой уровень АД не достигнут, но значительно приближается к группе интактных животных.

Результаты функциональных проб на эндотелийзависимое (ацетилхолин 40 мкг/кг в/в) и эндотелийнезависимое (нитропруссид 30 мг/кг в/в) расслабление сосудов у животных с L-NAME-индуцированной патологией на фоне введения



L-норвалина (10 мг/кг) и тадалафила (0,09 мг/кг), а также их сочетанного применения позволили установить их значительный эндотелиопротективный эффект, при этом КЭД снижался до  $1,8 \pm 0,1$  усл. ед., что достоверно отличалось от монотерапии тадалафилом ( $2,9 \pm 0,1$  усл.ед.). Обращает на себя внимание, что это несколько лучше, чем при монотерапии L-норвалином ( $2,1 \pm 0,2$  усл.ед.).

В сочетании с описанными сведениями о благоприятном влиянии комбинированного использования препарата ингибитора фосфодиэстеразы-5 тадалафила и ингибитора аргиназы L-норвалина на исходные цифры артериального давления полученные данные свидетельствуют об эффективности сочетанного использования тадалафила с L-норвалином для коррекции L-NAME-индуцированной патологии, что позволяло умеренно снизить значения артериального давления при эффективном снижении КЭД.

Введение блокатора эндотелиальной NO-синтазы L-NAME вызывает нарушение синтеза оксида азота, а исследуемая комбинация препаратов восстанавливает необходимый для нормального функционирования эндотелия уровень NO.

Концентрация нитрит-ионов (NOx) под влиянием комбинированного применения тадалафила с L-норвалином увеличивалась статистически достоверно до  $4,8 \pm 0,2$  мкМоль/л и приближалась к показателю интактных животных –  $7,2 \pm 0,6$  мкМоль/л. Обращает на себя внимание, что L-аргинин сам значительно увеличивал концентрацию нитрит-ионов NOx до  $4,7 \pm 0,3$  мкМоль/л, монотерапия тадалафилом также оказалась эффективной, и значения составили  $4,3 \pm 0,2$  мкМоль/л. Последнее позволяет предполагать, что оба препарата оказывают влияние на предотвращение падения концентрации нитрит-ионов NOx в плазме лабораторных животных в условиях L-NAME-индуцированного дефицита NO.

В дополнение к позитивным эффектам препаратов, направленных на увеличение уровня оксида азота, нами доказана и противовоспалительная составляющая их эндотелиопротективного действия. Уровень СРВ – важнейшего регулятора иммунных и воспалительных процессов в интактной группе составлял  $0,4 \pm 0,1$  мг/дл. Моделирование семидневной блокады NO-синтазы привело в активации каскада воспалительной реакции и уровень СРВ вырос до  $2,4 \pm 0,2$  мг/дл. Терапия комбинацией обоих препаратов эффективно проявила противовоспалительный эффект, и концентрация СРВ снизилась до  $0,9 \pm 0,1$  мг/дл.

**Обсуждение результатов.** Изучение роли эндотелия в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний привело к пониманию концепции о нем как о мишени для профилактики и лечения данных патологий. Нарушение функции эндотелия, как ключевой момент в патогенезе этих заболеваний, привлекает к себе внимание ученых всего мира в течение многих лет. Причиной тому – повсеместное распространение такого рода патологий и отсутствие эффективных средств борьбы с ними.

Основной задачей нашего исследования являлось изучение возможности коррекции моделируемой дисфункции эндотелия в эксперименте комбинацией ингибитора аргиназы L-норвалином с ингибитором ФДЭ-5 тадалафилом.

Изученные нами препараты в виде монотерапии не достигали заданных значений артериального давления и, следовательно, не полностью предотвращали гипертрофию сосудистой стенки, и значит, не могут рассматриваться для лечения в виде монотерапии на модели развития L-NAME-индуцированной гипертензии.

Тот факт, что фармакологическое ингибирование активности аргиназы исправляет дефект в продукции NO в тканях при сахарном диабете и эректильной дисфункции [11], побудил нас исследовать комбинированное воздействие на системные сердечно-сосудистые эффекты препаратов, влияющих на эректильную дисфункцию сосудистого генеза.

При комбинированном использовании исследуемых исходные цифры артериального давления при моделировании L-NAME-индуцированной артериальной гипертензии были значительно ниже, чем в группах с монотерапией тадалафилом и L-норвалина, и это дает возможность предположить, что в основе эндотелиопротективной эффективности предложенной комбинации лежит влияние на два разных патогенетических звена. С одной стороны, тадалафил, являясь

ингибитором фосфодиэстеразы-5, приводит к восстановлению функционирования адренергической системы в целом, одновременно способствует активации NO синтетазы, увеличивая синтез цГМФ и активность РКГ-1 (цГМФ-зависимой протеинкиназы); а с другой – L-норвалин ингибирует фермент, разрушающий субстрат для образования оксида азота, компенсирует нарушения выработки NO в эндотелии.

Таким образом, монотерапия L-аргинином и тадалафилом по проявленным эндотелиопротективным свойствам уступала сочетанному использованию этих препаратов. Более ярко выраженные эффекты сочетанного применения исследуемых веществ связаны с кумулятивными возможностями данной комбинации. L-норвалин увеличивает доступность эндогенных запасов L-аргинина для NO-синтазы, а также повышает активность данного фермента. А введение ингибитора ФДЭ-5 регулирует сигнальные пути, ведущие к активации eNOS и активируют путь NO-цГМФ.

Исследуемая комбинация препаратов, кроме того, модифицирует воспалительные процессы, положительно влияя на сосудистый гомеостаз, что также объясняет механизм их эндотелиопротективного действия.

Таким образом, более рациональным можно считать комбинированное применение ингибитора ФДЭ-5 и ингибитора аргиназы для достижения эндотелиопротективных эффектов.

Рассмотренные выше аспекты этой проблемы могут служить основой для разработки новых профилактических и терапевтических мероприятий, а также дать перспективу их использования в качестве дополнения к существующим методам лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

#### **Выводы:**

Комбинация L-норвалина в дозе 10 мг/кг и тадалафила в дозе 0,09 мг/кг на фоне L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции обладает выраженным эндотелиопротективным действием, что выражается в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов, существенном снижении КЭД, а также в предотвращении снижения концентрации стабильных метаболитов оксида азота.

**Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ № МК-905.2012.4.**

#### **Литература**

1. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / под ред. Н.Н. Петрищева. – СПб., 2003. – 184 с.
2. Иремашвили, В.В. Значение исследования эндотелиальной функции у больных эректильной дисфункцией : дис. ... канд. мед. наук: 14.00.40 / В.В. Иремашвили. – М., 2006. – 188 с.
3. Марков, Х.М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия / Х.М. Марков // Кардиология. – 2005. – Т. 45, № 12. – С. 62-80.
4. Мартынов, А.И. Дисфункция эндотелия у больных гипертонической болезнью / А.И. Мартынов, Н.Г. Аветян, Е.В. Акатова // Кардиология. – 2005. – Т. 45, № 10. – С. 101-104.
5. Микроциркуляция в кардиологии / под ред. В.И. Маколкина. – М.: Визарт, 2004. – 136 с.
6. Намаканов, Б.А. Эндотелиальная дисфункция при артериальной гипертензии – фактор риска сердечно-сосудистых осложнений / Б.А. Намаканов, М.М. Расулов // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. – 2005. – № 6, ч. 2. – С. 98-101.
7. Appleton, J. Arginine: clinical potential of semi-essential amino acid / J. Appleton // Altern. Med. Rev. – 2002. – Vol. 7, № 6. – P. 512-522.
8. Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension / F.K. Johnson et al. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2005. – Vol. 288. – P.1057-1062.
9. Ash, D.E. Structure and function of arginases / D.E. Ash // J. Nutr. – 2004. – Vol. 134, № 10. – P. 2760-2764.
10. Inhibition of arginase activity enhances inflammation in mice with allergic airway disease, in association with increases in protein S-nitrosylation and tyrosine nitration / K. Ckless et al. // J. Immunol. – 2008. – Vol. 181, № 6. – P. 4255-4264.



11. Probing erectile dysfunction: S-(2-boronoethyl)-L-cysteine binds to arginase as a transition state analogue and enhances smooth muscle cell relaxation in human penile corpus cavernosum / N.N. Kim et al. // Biochemistry. – 2001. – Vol. 40. – P. 2678-2688.

12. The vascular effects of different arginase inhibitors in rat isolated aorta and mesenteric arteries / N.N. Huynh et al. // Br. J. Pharmacol. – 2009. – Vol. 156. – P. 84-93.

## **ENDOTHELIOPROTECTIVE EFFECT OF COMBINED USE OF NON-SELECTIVE INHIBITOR ARGINASE L-NORVALINE AND INHIBITOR PHOSPHODIESTERASE-5 TADALAFIL**

**E.N. DUDINA<sup>1</sup>**

**T.G. POKROVSKAYA<sup>2</sup>**

**E.A. KONOVALOVA<sup>1</sup>**

**M.V. KOROKIN<sup>2</sup>**

**M.V. SYTNIK<sup>2</sup>**

**S.A. LOSENIK<sup>1</sup>**

**T.V. OSTASHKO<sup>2</sup>**

**S.V. HODOV<sup>1</sup>**

**I.M. KOLESNIK<sup>1</sup>**

As a result of research it has been shown, that the combined application of non-selective inhibitor of arginase L-norvaline and inhibitor phosphodiesterase-5 tadalafil expressed endotheliotective action on model of L-NAME-induced deficiency NO that was expressed in prevalence endothelium dependent relaxations of vessels and decreasing of the coefficient of endothelial dysfunction.

Key words: endothelial dysfunction, L-norvaline, inhibitor phosphodiesterase-5 tadalafil.

<sup>1)</sup> *Kursk State Medical University*

<sup>2)</sup> *Belgorod National Research University*

*e-mail: dudina.ele@yandex.ru*