

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ РЕЗЕРВОВ СЕРДЦА СТРЕССИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ-ГЛУФИМЕТА ПРИ БЛОКАДЕ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ

Перфилова В. Н.¹, Садикова Н. В.¹, Прокофьев И. И.¹, Иноземцев О. В.¹, Берестовицкая В. М.², Васильева О. С.², Тюренков И. Н.¹

¹Кафедра фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ

²Кафедра органической химии Российского государственного педагогического университета им А. И. Герцена

В условиях стресса возбуждение высших вегетативных центров, детерминирующих стрессорную реакцию, приводит к многократному увеличению концентрации катехоламинов, действующих на сердце и активации аденилатциклазы, что влечет за собой увеличение вхождения Ca^{2+} в кардиомиоциты, мобилизацию и уменьшение резерва гликогена, инициацию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), активацию фосфолипаз, липаз, повреждение лизосомальных мембран, высвобождение протеолитических ферментов. Все это приводит к нарушению целостности мембран клетки и органелл, разрушению ДНК, гибели клеток (Меерсон Ф.З., 1984; Пшенникова М.Г., 2000). Избыток Ca^{2+} вызывает контрактуру миофибрилл, некробиоз отдельных групп кардиомиоцитов и выраженные нарушения сокращения и расслабления сердца (Меерсон Ф.З., 1984; Пшенникова М.Г., 2000).

Для ограничения стрессорного повреждения сердца существуют стресс-лимитирующие системы, одной из которых является NO-ергическая система. Оксид азота (NO) синтезируется из аминокислоты L-аргинина при участии NO-синтаз: конститутивных (nNOS и eNOS) и индуцибельной (iNOS). nNOS и eNOS вырабатывают физиологические концентрации NO, который оказывает положительное инотропное действие, вызывает расширение коронарных сосудов, улучшает кровоснабжение миокарда, что способствует увеличению доставки энергетических субстратов (Davare M.A., 2001).

Индучибельная NO-синтаза активируется при различных патологических процессах, в том числе и при стрессе, способствует увеличению выработки оксида азота в миокарде в сотни раз. Высокий уровень оксида азота в сердце может оказывать как кардиопротекторное (Bolli R., 2001), так и кардиодепрессивное действие [Парахонский А.П., 2010; Gealekman O., 2002; Muller-Strahl G, 2000]. Есть данные, что блокада iNOS приводит к улучшению инотропной функции сердца (Ikeda, M. 2001; Li W.M., 2005).

Но имеются также сведения о цитопротекторных эффектах активации iNOS при сердечно-сосудистых нарушениях (Bolli R., 2001).

По мнению многих авторов, одним из основных путей регуляции продукции оксида азота является активация глутаматергических рецепторов, расположенных на NO-ергических нейронах (S.L. Baader 1996; C. Zhang, 1999; West et al., 2002). В связи с этим представляется перспективным поиск и разработка новых веществ для ограничения стрессорного повреждения миокарда, влияющих на NO-ергическую систему, среди производных глутаминовой кислоты.

Цель: изучение влияния нового производного глутаминовой кислоты-глүфимета на инотропную функцию сердца стрессированных животных при блокаде индуцибельной NO-синтазы.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 50 беспородных крысах-самках массой 250–280 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария, согласно правилам GLP при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.396 и 51000.4-96). Экспериментальное исследование было одобрено региональным независимым этическим комитетом ГУ Волгоградского медицинского научного центра (протокол № 12-2011). Стресс моделировался подвешиванием крыс за дорсальную шейную кожную складку на 24 часа [Ковалев Г.В, 1983]. Для оценки функционального состояния сердца использовались нагрузочные тесты: проба на адренореактивность (введение адреналина 0,1 мл/100 г массы животного в/в в разведении 10^{-7} г/л) и максимальная изометрическая нагрузка (окклюзия восходящей части дуги аорты на 30 сек) [Тюренков И.Н., 2012; Спасов А.А., 2012]. Было сформировано 4 группы: 1 – интактные животные (n=14); 2- контрольная – стрессированные животные, которым вводили физ. р-р (0,1 мл/на 100 г массы) (n=18); 3- стрессированные животные, получавшие селективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы (iNOS)

аминогуанидин в дозе 50 мг/кг (n=6); 4 – стрессированные животные, получавшие глуфимет в дозе 29 мг/кг и аминогуанидин в дозе 50 мг/кг (n=6); 5 – стрессированные животные, получавшие препарат сравнения фенибут в дозе 25 мг/кг и аминогуанидин в дозе 50 мг/кг (n=6). Препараты вводили внутривенно за 10 мин до и через 10 мин после стрессирования. В ранее проведенных исследованиях было показано кардиопротекторное действие глуфимета и фенибута в названных дозах при стрессорном нарушении сократимости миокарда (Перфилова В.Н., 2014).

Для исследования изменений показателей кардиодинамики всем группам животных проводили следующую оперативную подготовку: после перевода на искусственную вентиляцию легких осуществляли торакотомию, затем перикардотомию. Через верхушку сердца в левый желудочек вводили катетер, соединенный с датчиком давления (Элема, Швеция). С помощью компьютерного гемодинамического анализатора на базе программы BEAT регистрировали скорость сокращения (+dP/dt max) (мм.рт.ст/сек), скорость расслабления (-dP/dt max) (мм.рт.ст/сек) миокарда, левожелудочковое давление (ЛЖД) (мм.рт.ст.). Максимальная интенсивность функционирования структур (МИФС) определялись расчетным способом ((ЛЖД ср.х ЧССср)/масса левого желудочка +1/3 межжелудочковой перегородки). Оценку степени снижения сократимости стрессированного миокарда проводили через 30 мин после прекращения иммобилизации.

Статистическую обработку результатов проводили в пакете программ «Statistica 6.0» с предварительной проверкой выборок на нормальность распределения с применением критерия Шапиро-Уилка. Достоверность различий оценивали по критерию Крускала-Уоллиса, Сигела-Кастеллана.

Результаты и обсуждение. У контрольной группы стрессированных животных при проведении пробы на адренореактивность прирост скорости сокращения и расслабления миокарда, а также ЛЖД и ЧСС по сравнению с исходными данными был существенно меньше, чем у животных интактной группы (Таб. 1). В условиях блокады индуцибельной NO-синтазы прирост +dP/dt max, -dP/dt max и ЛЖД и ЧСС в ответ на нагрузку адреналином статистически значимо не отличался от такового в контрольной группе стрессированных животных. У крыс, получавших глуфимет и аминогуанидин прирост исследуемых показателей относительно исходных данных был статистически значимо выше, чем у стрессированных животных, получавших только аминогуанидин (Таб. 1). Значительно меньший прирост показателей наблюдался у стрессированных

крыс, получавших фенибут на фоне блокады iNOS по сравнению с таковым стрессированных животных, которым вводили только аминогуанидин (Таб. 1).

У животных контрольной группы, подвергшихся 24-х часовому иммобилизационно-болевному стрессированию, прирост скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД, ЧСС и МИФС при пережатии восходящей части дуги аорты был существенно и статистически значимо ниже по сравнению с исходными значениями, чем у животных интактной группы (Таб.1). В условиях ингибирования индуцибельной NO-синтазы при проведении изометрической нагрузки у стрессированных животных отмечалась тенденция к увеличению прироста ЛЖД и МИФС на 5-ой и 30- секунде наблюдения по сравнению с контрольной группой стрессированных животных. У крыс, получавших глуфимет и аминогуанидин, отмечался более существенный прирост ЛЖД и МИФС на 5-й и 30-ой секундах окклюзии восходящей части дуги аорты, чем у стрессированных животных, которым вводили только аминогуанидин. В группе стрессированных животных, которым вводили фенибут на фоне блокады iNOS, прирост практически всех исследуемых показателей относительно исходных данных был ниже, чем у стрессированных крыс, получавших только аминогуанидин, хотя отличия не были статистически достоверны (Таб.1).

Таким образом, у крыс, подвергшихся 24-часовому иммобилизационно-болевному стрессированию, наблюдается снижение инотропной функции сердца, о чем свидетельствует более слабый по отношению к исходным данным прирост показателей сократимости миокарда, ЛЖД и МИФС при проведении функциональных тестов, чем у интактных животных. Очевидно, это обусловлено существенным повышением в сердце стрессированных животных уровня катехоламинов и развитием их кардиотоксического эффекта, вызванного повреждением мембранного аппарата кардиомиоцитов свободными радикалами, инактивацией ферментов тканевого дыхания, разобщением дыхания и окислительного фосфорилирования. Следствием воздействия избыточной концентрации катехоламинов на миокард при стрессе может быть и уменьшение величины коронарного кровотока в результате укорочения диастолы, повышения напряжения миокарда и давления в связи с этим коронарных сосудов, нарушение микроциркуляции. Все эти события приводят к снижению сократимости миокарда (Меерсон Ф.З., 1984; Пшенникова М.Г., 2000).

NO-система, с одной стороны, является стресс-лимитирующей, с другой – повышение concentra-

ции оксида азота в результате увеличения активности iNOS при стрессе может вызвать дополнительный кардиотоксический эффект, обусловленный повреждающим действием пероксинитрита, который образуется при взаимодействии оксида азота с супероксидом и участвует в реализации окислительного стресса (S.K Goswami, 2015).

У животных, которым вводили селективный ингибитор iNOS, при проведении функциональных тестов прирост показателей сократимости миокарда ЛЖД и МИФС статистически значимо не отличался от такового стрессированных животных контрольной группы. Однако отмечалась тенденция к увеличению прироста ЛЖД и МИФС в условиях максимальной изометрической нагрузки. Это, очевидно, связано с ограничением повреждающего действия пероксинитрита на кардиомиоциты.

Кроме того, конститутивные NOS, вероятно, обеспечивают синтез базального уровня оксида азота, который оказывает стресс-лимитирующее действие (Zora Navarová, 2011). У стрессированных животных, получавших глуфимет в условиях блокады индуцибельной NO-синтазы, наблюдался более высокий прирост +dP/dt max, -dP/dt max и ЛЖД и МИФС при проведении пробы на адренореактив-

ность и окклюзии восходящей части дуги аорты. В химическую структуру данного соединения входят фрагменты гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот, фенибута и глицина, что дает основание предполагать наличие у него мультифакторного кардиопротекторного действия. Это может быть активация ГАМК-ергической стресс-лимитирующей системы, стимуляция через NMDA-рецепторы либо аллостерически конститутивных NOS, синтезирующих оксид азота, который в ЦНС оказывает ингибирующее влияние на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему, подавляя ее функциональную активность и, тем самым, ограничивает стресс-реакцию [Мацко 2004; Plotnikoff N.2006], а в кардиомиоцитах улучшает инотропную функцию [Парахонский 2010]. По кардиопротекторной активности глуфимет превосходит препарат сравнения фенибут.

Выводы:

1. Новое производное глутаминовой кислоты- глуфимет- способствует сохранению функциональных резервов стрессированного миокарда при блокаде iNOS, о чем свидетельствуют более высокие показатели скоростей сокращения и расслабления миокарда, ЛЖД и МИФС в условиях проведения нагрузочных проб.

ТАБЛИЦА 1

Влияние глуфимета и фенибута на скорость сокращения (+dP/dt max) и расслабления миокарда (-dP/dt max), ЛЖД, ЧСС и МИФС у стрессированных животных в условиях блокады индуцибельной NO-синтазы при проведении нагрузочных проб (M± σ)

Группы животных	Проба на адренореактивность, прирост показателей в %							
	+dP/dt max		-dP/dt max		ЛЖД		ЧСС	
Интактная группа (n=14)	60,4±7,7		62,6±9,6		58,9±8,1		50,9±6,9	
Стресс+физ. р-р (контрольная) (n=18)	30,5±2,4 [^]		29,8±3,5 [^]		30,4±3,7 [^]		25,6±3,9 [^]	
Стресс+аминогуанидин (n=6)	31,7±4,0		36,8±7,7		53,2±7,3		16,9±3,1	
Стресс+аминогуанидин+РГ ПУ-238 (n=6)	49,5±3,3**		58,4±6,8**		65,8±6,0**		32,4±2,7	
Стресс+аминогуанидин+фенибут (n=6)	40,3±9,6		27,9±5,8		62,3±13,5		18,7±6,6	
Группы животных	Максимальная изометрическая нагрузка, прирост показателей в %							
	+dP/dt max		-dP/dt max		ЛЖД		МИФС	
	5 с	30 с	5 с	30 с	5 с	30 с	5 с	30 с
Интактная группа	59,7±5,9	45,6±5,9	54,5±5,8	40,1±5,4	95,5±12,2	80,5±12,7	168,7±22,1	133,0±21,7
Стресс+физ. р-р (контрольная)	42,5±4,0 [^]	21,3±3,4 [^]	42,4±5,2 [^]	17,7±4,6 [^]	60,6±4,5 [^]	37,8±5,2 [^]	98,4±7,9 [^]	45,4±4,5 [^]
Стресс+аминогуанидин	49,7±6,2	23,7±7,6	34,1±4,0	14,2±3,6	104,0±22,8	62,2±20,3	140,6±29,7	68,9±27,7
Стресс+аминогуанидин+РГ ПУ-238	49,3±6,6	27,8±7,6	54,4±18,6	21,3±9,0	116,6±27,0	82,0±28,1	176,8±36,6	97,9±40,8
Стресс+аминогуанидин+фенибут	39,5±13,6	22,0±10,2	46,6±4,4	28,3±4,3**	84,1±18,8	62,2±16,7	120,2±27,6	77,3±25,3

Примечание: - [^] - изменения статистически значимы относительно интактной группы; - ** - изменения статистически значимы относительно группы стрессированных животных, получавших аминогуанидин; критерий Краскела - Уоллиса, Сигела-Кастеллана, p≤0,05.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davare M.A., Avdonin V., Hall D.D., Peden E.M., Burette A., Weinberg R.J., Horne M.C., Hoshi T., Hell J.W. A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel *cav1.2*. *Science*. 293: 98–101. 2001.
2. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33(11): 1897–1918. 2001.
3. Парахонский А.П. Кардиопротекторные эффекты индуцируемой NO-синтазы. Современные наукоемкие технологии. 9: 207-208. 2010.
4. Gealekman O., Abassi Z., Rubinstein I., Winaver J., Binah O. Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and beta-adrenergic hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure. *Circulation*. 105(2):236-243. 2002.
5. Muller-Strahl G, Kottenberg K., Zimmer H.G., Noack E., Kojda G. Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart. *J. of Physiology*. 522: 311–320. 2000.
6. Ikeda, M. Nelson C.S., Shinagawa H., et al. AMP regulates the calcium transients released from IP₃-sensitive stores by activation of rat κ-opioid receptors expressed in CHO cells. *Cell Calcium*. 29(1): 39–48. 2001.
7. Li W.M., Kong Y.H., Xue J.Y., Tian Y. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on hemodynamics and beta-adrenoreceptors mRNA in rats with heart failure after beta3-adrenergic receptors agonist injection. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 33(6):509-512. 2005.
8. West AR1, Galloway MP, Grace AA. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse*. 2002 Jun 15;44(4):227-45.
9. Пшеничкова М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии. Патол. физиология и эксперим. терапия. 2: 24-31. 2000а.
10. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М., 269 с. 1984.
11. Перфилова В.Н., Садикова Н.В., Берестовицкая В.М., Васильева О.С. Кардиопротекторные свойства нового производного глутаминовой кислоты при стрессорном воздействии. Экспериментальная и клиническая фармакология. –2014.–Т.77, №9.– с.13–17.
12. Chenyang zhang and margaret wong -r iley* Expression and regulation of NMDA receptor subunit R1 and neuronal nitric oxide synthase in cortical neuronal cultures: Correlation with cytochrome oxidase Department of Cell Biology, Neurobiology and Anatomy, Medical College of Wisconsin, WI 53226, USA *Journal of Neurocytology* 28, 525–539, 1999
13. The Journal of Neuroscience, February 15, 1996, 16(4):1440-1449 Glutamate Receptors Mediate Dynamic Regulation of Nitric Oxide Synthase Expression in Cerebellar Granule Cells
14. Stephan L. Baader and Karl Schilling Department of Anatomy and Cell Biology, University
15. Функциональные резервы сердца в условиях алиментарного дефицита магния. Спасов А.А., Харитонова М.В., Иежица И.Н., Желтова А.А., Тюренков И.Н., Гурова Н.А. *Кардиология*. 2012. Т. 52. № 10. С. 39-44.
16. Мацко М.А. Соотношение некоторых медиаторов стрессреализующих и стресслимитирующих систем в остром периоде ишемического инсульта. Пат. физиол. и эксп. терапия 2004; 4:14-16.
17. Plotnikoff N.P., Faith R.E., Murgo A.G. et al. Good R.A. Cytokines: Stress and Immunity. Boca Raton: CRC Press 2006; 2:405.
18. Парахонский А.П. Роль нейрональной NO-синтазы в патологии сердца. *Фунд. исслед.* 2010; 9:208-209.
19. S.K Goswami, S.K Maulik Oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of the practice of cardiovascular sciences*. 2015. Vol. 1 Issue 1. P. 15-18.
20. Zora Haviarová,1 Andrea Janegová,2 Pavel Janega,2,3 Štefan Durdík,4 Peter Kováč,5 Viera Štvrtinová,6 and Peter Mráz Expression of Constitutive Nitric Oxide Synthase Isoforms in Varicose Vein Wall; Preliminary Results. *International Journal of Vascular Medicine*. Volume 2011 (2011), Article ID 204723, 6 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2011/204723>