



УДК 615.22-008.331.1

## ПРИМЕНЕНИЕ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА И L-АРГИНИНА ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

**М.В. КОРОКИН**  
**М.В. ПОКРОВСКИЙ**  
**В.И. КОЧКАРОВ**  
**О.С. ГУДЫРЕВ**  
**Л.В. КОРОКИНА**  
**Т.Г. ПОКРОВСКАЯ**

*Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет*

*e-mail: mkorokin@mail.ru*

Проведено изучение возможности коррекции L-NAME-индуцированной ADMA-ассоциированной эндотелиальной дисфункции с помощью внутрибрюшинного введения тетрагидробиоптерина в дозе 10 мг/кг, L-аргинина 30 мг/кг, 200 мг/кг и их комбинации. Показано, что L-аргинин 30 и 200 мг/кг и тетрагидробиоптерин 10 мг/кг, по отдельности оказывая эндотелиопротективное действие при ADMA ассоциированной патологии, при сочетанном применении проявляют аддитивный эффект, выражающийся в нормализации функциональных показателей и биохимических маркеров, значения которых не отличаются от показателей у интактных животных.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, тетрагидробиоптерин, L-аргинин, ADMA.

Появление в последние годы понятий «эндогенного ингибирования» эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и «разобщение eNOS» привело к интенсификации исследований, направленных на предотвращение указанных процессов, как ключевых звеньев в коррекции эндотелиальной дисфункции.

Метилированные аналоги L-аргинина – асимметричный диметиларгинин (ADMA) и монометиларгинин (L-NMMA) – являются эндогенными ингибиторами эндотелиальной NO синтазы (eNOS). В последние годы обнаружено, что концентрация ADMA увеличивается при артериальной гипертензии, гестозе, диабете, гипергомоцистеинемии, эндотоксиновом шоке и повышенные концентрации ADMA являются одними из ключевых факторов риска сердечно-сосудистого континуума [9, 10, 13]. «Разобщение eNOS» представляет собой переключение ферментной активности eNOS на выработку супероксида, а не окиси азота. При этом, на ключевую роль в регуляции функции eNOS выдвигается кофактор птерина тетрагидробиоптерин (BH4) [10, 11, 12, 13, 14]. Для обеспечения оптимальной активности eNOS предложены две стратегии – экзогенное введение L-аргинина для преодоления ингибирования e-NOS и тетрагидробиоптерина (BH4) для преодоления разобщения e-NOS.

В ранее проводимых нами исследованиях было показано, что L-аргинин как монотерапия, так и в сочетании с антигипертензивными средствами на ADMA-подобной модели L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции эффективно увеличивал активность эндотелиальной NO-синтазы и продукцию оксида азота и предотвращал развитие эндотелиальной дисфункции у крыс-самцов [1, 3, 5, 6, 7].

В связи с выше изложенным, целью настоящего исследования явилось изучение эндотелиопротективных эффектов тетрагидробиоптерина, L-аргинина и их комбинации на ADMA-подобной, L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота (NO). Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ № МК-905.2012.4.

**Материалы и методы.** Опыты проводились на белых крысах-самцах линии Wistar массой 200-250 г. Блокатор NO-синтазы N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) вводился внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг/сут, один раз в сутки в течение 7 дней.

Животные были разделены на группы (n=10): 1 – интактные; 2 – с введением L-NAME; 3 – с введением на фоне L-NAME L-аргинина (EUROBIOPHARM GmgH, Hamburg) (30 мг/кг внутрибрюшинно) однократно в сутки в течение 7 дней; 4 – с введением на фоне L-NAME L-аргинина (EUROBIOPHARM GmgH, Hamburg) (200 мг/кг внутрибрюшинно) однократно в сутки в течение 7 дней; 5 – с введением на фоне L-NAME тетрагидробиоптерина (Sigma-Aldrich) (10 мг/кг, внутрибрюшинно) однократно в сутки в течение 7 дней; 6 – с введением на фоне L-NAME L-аргинина 30 мг/кг и тетрагидробиоптерина 10 мг/кг (внутрибрюшинно) однократно в сутки в течение 7 дней; 7 – с введением на фоне L-NAME L-аргинина 200 мг/кг и тетрагидробиоптерина 10 мг/кг (внутрибрюшинно) однократно в сутки в течение 7 дней.

На 8 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 аппаратно-программного комплекса «Віорас». Помимо измерения АД проводили ряд функциональных проб, проводимых в представленной последовательности: 1. Проба на эндотелийзависимое



расслабление сосудов (внутривенное введение раствора ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100г). 2. Проба на эндотелийнезависимое расслабление сосудов (внутривенное введение раствора нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100г) [1, 4, 5, 6].

Степень эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных, а также степень ее коррекции исследуемыми препаратами оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД), представляющему собой отношение площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение НП (ЭНВД) к площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение АХ (ЭЗВД) [1, 3, 4].

Биохимическими маркерами эндотелиальной дисфункции служили показатели концентрации стабильных метаболитов оксида азота (Total NOx) и экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) [2].

Достоверность изменений абсолютных параметров определяли разностным методом вариационной статистики с нахождением средних значений сдвигов (M), средней арифметической ( $\pm m$ ) и вероятности возможной ошибки (p) по таблицам Стьюдента. Различия оценивали как достоверные при  $p < 0,05$ . Статистические расчёты проводились с использованием программы Microsoft Excel 7.0.

**Результаты.** Блокада NO-синтетазы, вызванная семидневным введением L-NAME, приводила к артериальной гипертензии (САД – 190,3±6,7, ДАД – 145,0±3,9) и увеличению КЭД до 5,4±0,6, в то время как в группе интактных животных КЭД составлял 1,1±0,1. Параллельно обнаружена динамика биохимических маркеров эндотелиальной дисфункции. Так, показатель экспрессии eNOS под влиянием L-NAME снижался более чем в 3 раза, а NO-total почти на 50% (табл. 1). Это свидетельствовало о развитии признаков системной эндотелиальной дисфункции.

L-аргинин 30 и 200 мг/кг оказывал дозозависимое протективное действие на модели L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции, что выражалось в уменьшении значений артериального давления, нормализации КЭД, предотвращении снижения экспрессии eNOS и снижения значений NO-total (табл. 1). В то же время, значения АД даже в большей дозе не достигали целевого уровня, а экспрессия eNOS была в 2 раза ниже чем у интактных животных.

Тетрагидробиоптерин 10 мг/кг, также проявлял эндотелипротективное действие на модели L-NAME-индуцированной патологии, достоверно снижая КЭД и увеличивая экспрессию eNOS, однако значения не достигали показателей у интактных животных и в целом соответствовали таковым при применении малой дозы L-аргинина (30 мг/кг). Отличия обнаружены в уровне экспрессии eNOS, который в экспериментах с тетрагидробиоптеринном оказался почти в 2 раза выше (41,7±4,0%), чем с L-аргином в дозе 30 мг/кг (25,7±3,9%) (таблица 1).

Сочетанное использование L-аргинина с тетрагидробиоптеринном показало наибольшее протекторное действие при L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции. При этом, обнаружено отчетливое дозозависимое действие и при комбинированном применении L-аргинина 200 мг/кг с тетрагидробиоптеринном 10 мг/кг значения АД, КЭД, экспрессии eNOS и NO-total достоверно не отличались от таковых показателей у интактных животных (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние L-аргинина и тетрагидробиоптерина на функциональные и биохимические показатели крыс при моделировании эндотелиальной дисфункции введением L-NAME в дозе 25 мг/кг внутрибрюшинно (M±m, n=10).**

Группы животных	САД, мм рт.ст.	ДАД, мм рт.ст.	КЭД, усл. ед.	eNOS, в % от контроля	NO <sub>x</sub> total, мкмоль
Интактные	137,7±3,7	101,9±4,3	1,1±0,1	72,9±3,8	114,1±10,5
L-NAME	190,3±6,7*	145,0±3,9*	5,4±0,6*	21,4±4,7*	61,2±8,5*
L-NAME + L-аргинин 30 мг/кг	188,5±14,8*	137,3±9,9*	2,7±0,2**	25,7±3,9*	78,2±6,8*
L-NAME + L-аргинин 200 мг/кг	173,3±8,3*	137,3±9,4*	2,5±0,05**	36,5±4,7**	115,1±9,7**
L-NAME + Тетрагидробиоптерин 10 мг/кг	170,3±6,7*	128,8±5,2**	2,8±0,4**	41,7±4,0**	63,7±7,9*
L-NAME + Тетрагидробиоптерин 10 мг/кг + L-аргинин 30 мг/кг	155,9±3,8**	116,9±4,3**	1,9±0,3**	54,6±5,0**	81,9±8,1**
L-NAME + Тетрагидробиоптерин 10 мг/кг + L-аргинин 200 мг/кг	149,1±4,1**	112,4±5,1**	1,6±0,3**	61,9±6,5**	115,1±10,4**

Примечание: САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление; КЭД – коэффициент эндотелиальной дисфункции; eNOS – экспрессия эндотелиальной NO-синтазы; NO<sub>x</sub> total – концентрация нитрит-ионов в сыворотке крови; \* -  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных; \*\* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой L-NAME.



Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что, L-аргинин в дозах 30 и 200 мг/кг и тетрагидробиоптерин 10 мг/кг, в качестве монотерапии оказывая эндотелиопротективное действие при L-NAME-индуцированной патологии, при сочетанном применении показывают положительное фармакодинамическое взаимодействие, выражающееся в максимальной нормализации функциональных показателей и биохимических маркеров.

**Обсуждение результатов.** Пути фармакологического воздействия, направленные на поддержание доступности ВН4 в сосудах, могут включать в себя меры по повышению степени биосинтеза ВН4 или снижению окислительной деградации. Несмотря на появление в последнее время сведений о понимании сути молекулярных взаимодействий между ВН4 и eNOS, регулирующих эндотелиальную функцию, целостные представления об этих процессах еще в полной мере не сформированы. Так или иначе, природа потенциального рецептора биоптерина или его транспортёра до настоящего момента остаётся неизвестной [12]. Более полное понимание сущности процесса транспортировки биоптерина в клетках предоставит возможность создания новых терапевтических подходов для лечения эндотелиальной дисфункции при сердечно-сосудистых заболеваниях. Дополнительный вопрос касается роли пути рециркуляции ВН4 в поддержании концентраций ВН4 в эндотелии сосудов. Данный путь может представлять собой новую, важную терапевтическую цель [12, 13].

Недавние разработки фармацевтических технологий по созданию стабильных лекарственных форм ВН4 помогут перевести данные исследования в область клинических испытаний.

Полученные результаты указывают на то, что сочетанное использование тетрагидробиоптерина и L-аргинина оказывается эффективным для регуляции баланса синтеза окиси азота в условиях моделирования АДМА-ассоциированной эндотелиальной дисфункции. Последнее позволяет предположить эффективность еще двух фармакологических подходов: использование больших доз фоллатов и ангибиторов аргиназ, что требует экспериментального обоснования.

#### Литературы

1. Возможности моделирования гипергомоцистеин-индуцированной эндотелиальной дисфункции у крыс / Корокин М. В., Полонская К. В., Покровский М. В. и соавт. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2009. – № 5. – С. 43 – 48.
2. Метельская В. А. Клиническая и лабораторная диагностика. – № 9, 86 с. (2004).
3. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME- индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / Покровский М. В., Кочкаров В. И., Покровская Т.Г., и соавт. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2006, – № 10, – С. 72 – 77.
4. Покровский М. В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. Патент. 2301015 Российская Федерация, МПК7 А61В 5/02. – № 2005113243/14, заявл. 10.1.2006; опубл. 20.06.07, Бюл. № 17. – 7 с.
5. Принципы фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции Покровский М. В., Аргюшкова Е. Б., Покровская Т. Г. и соавт. / Кубанский научный медицинский вестник // – 2007, – №1-2, – С. 146 – 150.
6. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота / Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. и соавт. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008, – № 71 (2), – С. 29 – 31.
8. Фармакологическая коррекция L-аргинином «ADMA-ENOS-ассоциированных мишеней» при экспериментальной преэклампсии / Покровский М. В., Покровская Т. Г., Гуреев В. В. и соавт. // Кубанский научный медицинский вестник. -2010 – №1, – с. 85-92.
9. L-Arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship / Bode-Böger S.M., Böger R.H., Galland A. et al. // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1998, – Vol. 46. – p. 489-497.
10. Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease / Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W. et al. // J. Am. Coll. Cardiol. – 1998, – Vol.32, – p. 1336-1344.
11. Tetrahydrobiopterin: A novel anti-hypertensive therapy / Porkert M, Sher S, Reddy U, et al. // J. Human Hyperten. – 2008, – Vol.22, – p. 401 – 407.
12. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase / Pou S., Keaton L., Surichamorn W. // J. Biol. Chem., – 1999, – Vol. 274, – p. 9573-9580.
13. Tetrahydrobiopterin uptake in supplemental administration: elevation of tissue tetrahydrobiopterin in mice following uptake of the exogenously oxidized product 7,8-dihydrobiopterin and subsequent reduction by an anti-folate-sensitive process / Sawabe K., Wakasugi K. O. Hasegawa H. // J. Pharmacol. Sci., – 2004, – Vol. 96, – p. 124-133.



## **INVESTIGATION OF ENDOTHELIAL AND CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF ENALAPRIL, LOSARTAN AND AMLODIPINE IN MODELING HYPERHOCYSTEIN INDUCED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION**

**M.V. KOROKIN**  
**M.V. POKROVSKIY**  
**V.I. KOCHKAROV**  
**O.S. GUDYREV**  
**L.V. KOROKINA**  
**T.G. POKROVSKAYA**

*Belgorod National  
Reserch University*

*e-mail: mkorokin@mail.ru*

Studying of possibility of correction L-NAME-induced ADMA-like endothelial dysfunction with the use of tetrahydrobiopterin in a 10mg/kg dose, L-arginin in a dose of 30mg/kg, 200 mg/kg and their combination is spent. It is shown, that L-arginin 30 and 200 mg/kg and tetrahydrobiopterin 10 mg/kg, separately rendering endothelio-protective action at ADMA like pathology, at their combined application show the additive effect expressed in normalisation of functional indicators and biochemical markers which values do not differ from indicators at intact animals.

Keywords: endothelial dysfunction, tatrahydrobiopterin, L-arginin, ADMA.