

ФИЗИОЛОГИЯ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ СИСТЕМ

ДЕЙСТВИЕ ДОНОРА НИТРОКСИДА НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ
СВОЙСТВА СЕРДЦА EX VIVO И IN VIVO

© В. Л. Лакомкин, А. А. Абрамов, Е. В. Лукошкова,
В. В. Ермишкин, В. И. Капелько

Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ,
Москва, Россия
E-mail: v.lakomkin@yandex.ru;

Доноры нитроксида расслабляют сосуды большого и малого круга, но их влияние на сократительные свойства миокарда не ясно. В работе сопоставлено действие стабильного донора нитроксида — динитрозильных комплексов железа с лигандом глутатионом (препарат «оксаком») на сократительную функцию сердца *in vivo* при наличии гипотензивного эффекта и *ex vivo* на изолированном сердце крыс. Болюсное введение оксакома (10 мг/кг) быстро снижало артериальное давление, повышало индексы сократимости и снижало константу скорости расслабления миокарда. Эти изменения постепенно нормализовались в течение 20 мин. На изолированном сердце оксаком (0.01—2.7 мкМ) увеличивал скорость коронарной перфузии на 13—21 % при стабильном давлении, но не влиял на показатели сократимости и расслабимости миокарда. Наличие кардиотропного эффекта в опытах *in vivo* вероятно, обусловлено более высокой первоначальной дозой препарата.

Ключевые слова: оксид азота, гипотензивный эффект, сократимость сердца, интактное и изолированное сердце.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 103. № 1. С. 000—000. 2017

V. L. Lakomkin, A. A. Abramov, E. V. Lukoshkova, V. V. Ermishkin, V. I. Kapelko. THE INFLUENCE OF THE NITRIC OXIDE DONOR ON CARDIAC CONTRACTILE PROPERTIES EX VIVO AND IN VIVO. Russian Cardiology Research and Production Complex, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia, e-mail: v.lakomkin@yandex.ru.

Nitric oxide donors induce relaxation of blood vessels in the systemic and pulmonary circuits, but their effect on the contractile properties of the myocardium is still unclear. In this study, the effects of stable nitric oxide donor, dinitrosyl iron complexes with ligand glutathione («oxacom»), on the contractile function of the heart were evaluated *in vivo* in the presence of hypotensive effect and *ex vivo* in the isolated rat heart. A bolus injection of oxacom (10 mg/kg) quickly reduced blood pressure, increased contractility indices and reduced myocardial relaxation rate constant. These changes gradually normalized within 20 min. In the isolated heart, oxacom (0.01—2.7 μM) increased coronary perfusion flow rate by 13—21 % under the conditions of constant perfusion pressure, but did not affect myocardial contractility and relaxability. The presence of cardiotropic effect in experiments *in vivo* was probably due to a higher initial dose of oxacom.

Key words: nitric oxide, hypotensive effect, cardiac contractility, intact and isolated heart.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 103. N 1. P. 000—000. 2017

Гипертонические кризы являются нередким осложнением самой распространенной болезни системы кровообращения — гипертонии. Доноры нитрооксида являются общепризнанными вазодилататорами. Из них в последние годы особое внимание было уделено изучению действия динитрозильных комплексов железа, которые в отличие от других доноров нитрооксида, оказывают длительное гипотензивное действие [9] и потенциально могут быть использованы при гипертонических кризах или для лечения стойкой гипертонии. В связи с этим в Российском кардиологическом научно-производственном комплексе была создана лекарственная форма динитрозильных комплексов железа с лигандом глутатионом, получившая коммерческое название «оксаком». Испытания действия оксакома на здоровых добровольцах и при гипертонических кризах у больных [1, 6] показали его высокую эффективность — артериальное давление быстро снижалось на 15—20 % и медленно восстанавливалось до исходного уровня за 8—10 ч.

Минутный объем оставался постоянным, несмотря на уменьшение притока к сердцу из-за системной гипотензии [6], что позволяет предполагать компенсаторное усиление сократимости миокарда и/или облегчение выброса при сниженном сопротивлении. Однако действие препарата на миокард оставалось неизученным. Ранее было установлено, что доноры нитрооксида оказывают неоднозначное инотропное действие на миокард — отмечено как повышение, так и снижение сократимости [1, 12] в зависимости от условий опыта. В связи с этим первой задачей данной работы было исследование действия оксакома на сократимость и расслабимость миокарда в условиях *in vivo*, когда периферическое сопротивление заметно снижено. Второй задачей работы было изучение действия оксакома на сократительные свойства изолированного сердца, когда длина мышечных волокон была стабилизирована.

МЕТОДИКА

Опыты выполняли на наркотизированных кетамин (100 мг/кг) самцах крыс линии Вистар массой 400—450 г. У животных катетеризировали яремную вену для введения оксакома (10—40 мг/кг массы), в бедренную и сонную артерию, через которую катетер проводили в левый желудочек (ЛЖ). Среднее артериальное давление (АД) измеряли в бедренной артерии с помощью электроманометра Gould Statham P23 Db (США), давление в ЛЖ — при помощи тензометрического усилителя Hugo Sachs Elektronik (Германия). ЭКГ регистрировали во II стандартном отведении с помощью игольчатых электродов. Все сигналы подавали на «Biograph-4» (Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения). Рассчитывали традиционные показатели сократимости — максимальную скорость развития давления в ЛЖ сердца ($+dP/dt_{\max}$) и нормированный индекс сократимости ($+dP/dt_{\max}/P$, где P — давление в момент достижения максимума $+dP/dt$). Для характеристики процесса расслабления определяли экспоненциальную константу скорости расслабления ЛЖ в изоволюмической фазе диастолы [8] по методу, предложенному в работе [15]. Все сигналы оцифровывали с частотой 1 кГц с помощью аналого-цифрового преобразователя NI-USB-6210 («National Instruments», США) и записывали на жесткий диск компьютера. Для записи и обработки физиологических сигналов были разработаны собственные программы (автор — Е. В. Лукошкова). Величины всех параметров рассчитывали на основе анализа записей первичных сигналов, подвергнутых предварительной процедуре пульс-синхронного усреднения, которая обеспечивает автоматический расчет «усредненных форм» сигналов по 40 кардиоциклам каждые 5 с [2, 3].

Для работы на изолированных сердцах крыс применена стандартная методика ретроградной перфузии в установке Hugo Saks под постоянным давлением, равным 70 мм рт. ст., стандартным раствором Кребса—Хензеля с добавлением

11 мМ глюкозы. Раствор предварительно насыщали карбогеном (95 % O₂ и 5 % CO₂). В левый желудочек сердца вводили латексный баллончик, заполненный таким количеством жидкости, чтобы диастолическое давление в нем составляло 10—15 мм рт. ст., при котором достигается оптимальное растяжение камеры желудочка. Для регистрации давления в баллончике и скорости коронарной перфузии использовали датчики и усилители фирмы Harvard Instruments (США), аналого-цифровой преобразователь (USB-6215, National Instruments, США, используемая частота оцифровки 1000 Гц) и персональный компьютер. В качестве индекса расслабления использовали отношение между максимальной скоростью снижения давления в левом желудочке и максимальным развиваемым давлением, т. е. величину $(-dP/dt \max/P)$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты in vivo. Болюсное введение оксакома (10 мг/кг) оказывало немедленный эффект на гемодинамику — уже на первой минуте АД заметно снижалось, а частота сердечных сокращений (ЧСС), напротив, возрастала (рис. 1). Систолическое и диастолическое давление в ЛЖ имели тенденцию к снижению, но $+dP/dt_{\max}$, как и нормированный индекс сократимости $+dP/dt_{\max}/P$, заметно возрастали. Константа скорости изоволюмического расслабления отчетливо снижалась (т. е. расслабление происходило медленнее). Введение повышенных доз оксакома — 20 и 40 мг/кг — оказало принципиально такое же действие, лишь увеличилась степень изменения параметров. Так, при введении дозы 40 мг/кг АД снизилось на 40 %, индекс сократимости возрастал в 1.5 раза, а константа расслабления снизилась в 2 раза.

Динамика изменений константы скорости расслабления (КР) близко соответствует динамике изменений АД, в то время как динамика нормированного индекса сократимости (ИС) зеркально соответствует динамике АД (рис. 2). Это позволяет предположить, что изменения миокардиальных параметров являются производными от изменений АД. При этом степень относительных изменений ИС была больше, чем степень снижения КР (рис. 3).

Опыты ex vivo. Действие оксакома на функцию нормально оксигенируемого изолированного сердца крыс изучали в диапазоне концентраций 0.01—2.7 мкМ. В таблице представлены и абсолютные результаты до введения оксакома, и относительные — в процентах к исходным показателям. Наиболее отчетливо изменялась скорость коронарного потока, увеличение которой в условиях постоянного перфузионного давления свидетельствовало о снижении тонуса коронарных сосудов. Она достоверно возрастала, начиная с концентрации 0.03 мкМ (рис. 4), причем отчетливое действие динитрозольных комплексов железа при любой концентрации проявлялось уже на первой минуте, когда величина прироста уже почти достигала максимума при данной концентрации. Изменения функциональных параметров были относительно невелики. Частота сокращений не изменялась, но все показатели сократимости миокарда достоверно снижались на 6—11 % уже в диапазоне низких концентраций оксакома, особенно в первые минуты, но уже после 1-2 мин она восстанавливалась, причем тем быстрее, чем больше была использована концентрация. Изменения развиваемого давления близко соответствовали динамике сократимости. Индекс расслабления изменялся недостоверно, за исключением концентрации 0.03 мкМ, при которой его повышение сочеталось с достоверным снижением начального диастолического давления.

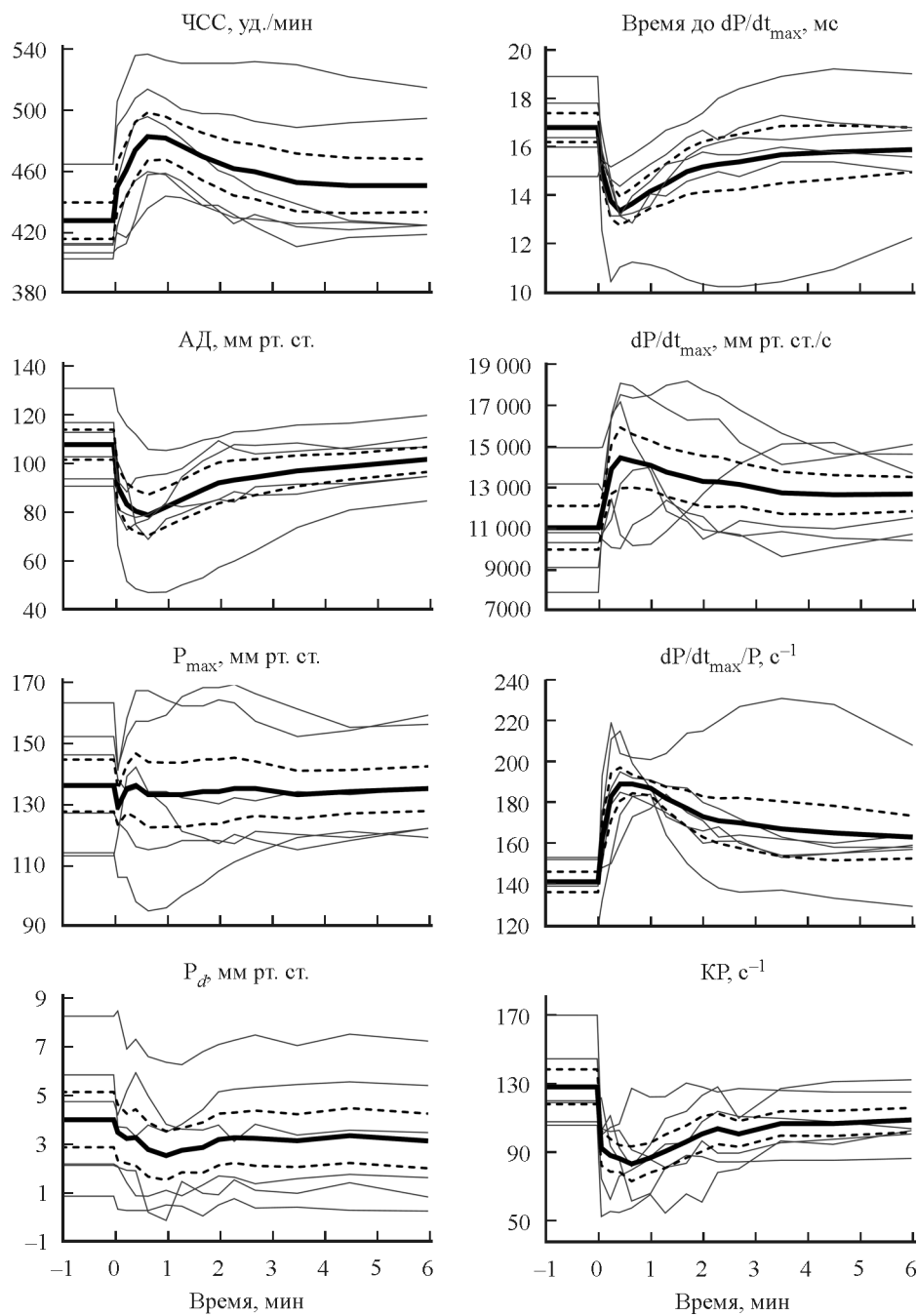


Рис. 1. Эффекты внутривенного оксакома (10 мг/кг, время 0) на ЧСС, АД, систолическое давление в ЛЖ (P_{max}), конечное диастолическое давление в ЛЖ (P_d), время до пика $+dP/dt$, максимальную скорость развития давления в ЛЖ (dP/dt_{max}), нормированный индекс сократимости ($dP/dt_{max}/P$) и константу расслабления (КР) сердец крыс контрольной группы.

Тонкими линиями показана динамика изменения показателей в каждом опыте, толстыми — средние величины, пунктирные линии отражают среднюю ошибку среднего (SEM).

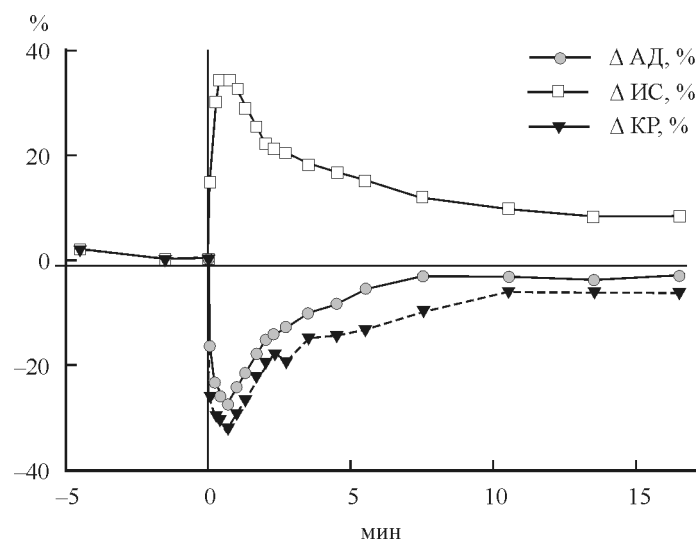


Рис. 2. Динамика относительных изменений АД, нормированного индекса сократимости (ИС) и константы расслабления (КР) после введения оксакома *in vivo*.

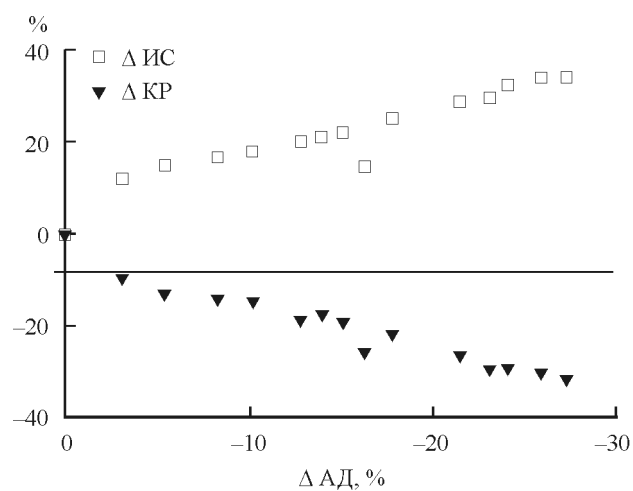


Рис. 3. Парное сопоставление степени изменений ИЧС и КР в сопоставлении с изменением АД.

По оси абсцисс — степень снижения АД (%), по оси ординат — степень прироста ИС и снижения КР. Выпадающие из рядов точки соответствуют самому первому измерению — через 0.08 мин.

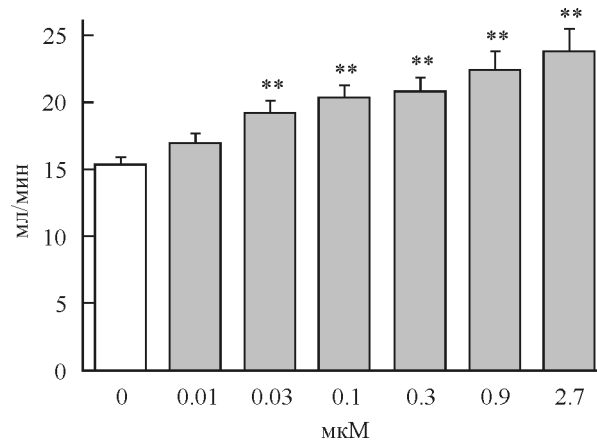


Рис. 4. Прирост скорости коронарного потока изолированного сердца под влиянием возрастающих концентраций оксакома (от 0.01 до 2.7 мкМ).

** $p < 0.01$ для парного критерия Стьюдента при сравнении с контролем.

Действие оксакома на функцию изолированного сердца крыс

Показатель	Абсолютные значения	Относительные изменения (%) при различных концентрациях оксакома, мкМ			
	Контроль (12)	0.01 (3)	0.03 (9)	0.1 (12)	0.9 (6)
Скорость коронарного потока, мл/мин	16.5 ± 1.2	113 ± 5.9	116 ± 2.8**	121 ± 2.5**	119 ± 4.1**
Частота сокращений, мин ⁻¹	266 ± 7	98 ± 0.7	99 ± 3.3	100 ± 3.8	101 ± 2.3
Развиваемое давление, мм рт. ст.	176 ± 6	89 ± 1.8*	95 ± 2.1*	97 ± 0.9**	95 ± 2.9
dP/dt max, мм рт. ст./с	4630 ± 269	93 ± 2.2*	97 ± 3.3	96 ± 1.1**	94 ± 2.8
Индекс расслабления, с ⁻¹	14.4 ± 0.6	113 ± 5.9	109 ± 3.8*	99 ± 3.2	96 ± 3.4
Мин. диастолическое давление, мм рт. ст.	6.0 ± 1.5	-0.2 ± 0.6	-1.2 ± 0.4**	0.0 ± 0.4	-0.3 ± 0.3

Примечание. Изменения показателей при действии оксакома выражены в процентах к исходным параметрам за исключением минимального диастолического давления, изменение которого показано в мм рт. ст. В скобках указано число опытов. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ — уровни значимости при сравнении с контролем для парного критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты *ex vivo* показали, что введение оксакома в широком диапазоне концентраций отчетливо повышает скорость коронарного потока, т. е. расслабляет коронарные сосуды, но слабо влияет на сократимость и расслабимость миокарда. Эти данные соответствуют устоявшемуся мнению, что доноры оксида азота не оказывают существенного влияния на сократительные свойства здорового сердца [11, 12]. Но результаты *in vivo* продемонстрировали значительный рост показателей сократимости и почти столь же значительное по степени снижение

константы скорости расслабления. Поскольку концентрации оксакома были сопоставимы (10 мг/кг или 0.4 мкмоль/кг массы *in vivo* и 0.1—0.9 мкМ *ex vivo*), эти изменения, скорее всего, связаны со снижением АД. С этим согласуются и данные рис. 3, показывающие первоначальное отставание изменений миокардиальных индексов от изменения АД.

Естественно предположить, что ведущей причиной повышения сократимости при внезапном снижении АД является барорефлекс. В пользу этого свидетельствуют компенсаторная активация частоты сокращений (рис. 1), которая могла быть обусловлена симпатической стимуляцией сердца. Однако блокада бета-адренорецепторов не повлияла на учащение сокращений при введении оксакома [4] и лишь немного углубила снижение АД. Кроме того, для действия катехоламинов характерно повышение и сократимости, и расслабимости миокарда. Однако результаты отчетливо показали быстрое снижение константы скорости расслабления, динамика которой близко совпадала с динамикой снижения АД. Эти данные позволяют предполагать наличие прямого действия нитрооксида на кардиомиоциты.

Естественными источниками нитрооксида в сердце являются NO-синтазы — эндотелиальная (NOS3), локализованная не только в эндотелиоцитах, но и на мембране кардиомиоцитов, а также нейрональная (NOS1), находящаяся в клетках. Известно, что нитроксид вырабатывается в каждом сердечном цикле, поскольку NOS3 и NOS1 являются кальций-зависимыми ферментами [13], и образование нитрооксида возрастает при усилении сокращений. Эти ферменты оказывают разное действие. Активация NOS3, нитрозируя тиоловые группы медленных кальциевых каналов, уменьшает вход Ca^{++} в кардиомиоциты и тем самым оказывает отрицательное инотропное действие [14]. Она особенно активируется при активации бета-рецепторов [10] и представляет таким образом физиологический механизм защиты от избыточного проникновения Ca^{++} в кардиомиоциты.

Нитроксид в клетках действует двояко. Специфическое действие состоит в активации растворимой гуанилатциклазы, в результате из ГТФ получается цГМФ, который активирует протеинкиназу G; эта протеинкиназа снижает активность SERCA2 [7] — «кальциевого насоса» мембран саркоплазматического ретикулула, в результате замедляется поглощение Ca^{++} . Неспецифическое действие нитрооксида состоит в нитрозировании тиоловых групп цистеинов, входящих в состав многих белков, что изменяет их функции. Именно этим объясняется множественность эффектов нитрооксида. В частности, нитрозирование тиоловых участков цистеина на молекуле рианодинового рецептора RyR2 [16] способствует выходу Ca^{++} из саркоплазматического ретикулула, что оказывает положительное инотропное действие. Также и донор нитрооксида — S-нитрозоглутатион дозозависимо активировал канал RyR2 и увеличивал выход Ca^{++} [17]. Таким образом, уменьшение входа внешнего Ca^{++} компенсируется усилением мобилизации внутреннего Ca^{++} .

При обсуждении результатов действия оксакома *ex vivo* и *in vivo* необходимо принять во внимание, что в условиях *ex vivo* действующая концентрация оксакома в коронарных сосудах точно соответствовала заданной. В условиях же *in vivo* болюсное введение оксакома оказывало первоначальное действие на сосуды легких и сердца. В недавно выполненной работе было показано, что введение оксакома повышало содержание нитрооксида в сердце значительно больше, чем в других органах [5]. Следовательно, можно думать, что концентрация нитрооксида в клетках была выше расчетной, она сильнее активировала протеинкиназу G [7] и замедляла расслабление миокарда, а также больше нитрозировала RyR2 и тем самым усиливала сократимость миокарда. Это действие постепенно ослабевало параллельно устранению гипотензивного эффекта.

Работа поддержана грантами РФФИ № 15-04-06571а и № 15-04-04355а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Гостеев А. Ю., Зорин А. В., Родненков О. В., Драгнев А. Г., Чазов Е. И. Гемодинамические эффекты синтетического аналога эндогенных донаторов оксида азота (II) — препарата динитрозильных комплексов железа у больных артериальной гипертензией с неосложненными гипертоническими кризами. Тер. архив. 86(9) : 49—55. 2014.
- [2] Ермишкин В. В., Лукошкова Е. В., Лакомкин В. Л., Абрамов А. А., Колесников В. А., Лакомкин С. В., Капелько В. И. Неинвазивная оценка сократимости миокарда крыс. Кардиологический вестник. 8(1) : 26—31. 2013.
- [3] Капелько В. И., Лакомкин В. Л., Лукошкова Е. В., Грамович В. В., Выборов О. Н., Абрамов А. А., Ундровинас Н. А., Ермишкин В. В., Лакомкин С. В., Веселова С. П., Жданов В. С., Ширинский. В. П. Комплексное исследование сердца крыс при поражении изопротеренолом. Кардиология. 54(3) : 46—56. 2014.
- [4] Лакомкин В. Л., Орлова Ц. Р., Абрамов А. А., Свиряева И. В., Шумаев К. Б., Рууге Э. К., Ванин А. Ф., Капелько В. И. Хронотропная регуляция сердца при действии активных форм кислорода. Кардиологический вестник. 6(1) : 53—59. 2011.
- [5] Тимошин А. А., Лакомкин В. Л., Рууге Э. К., Ванин А. Ф. Фармакокинетика и распределение динитрозильных комплексов железа в тканях органов крыс. Биофизика. 57 (2): 331—337. 2012.
- [6] Chazov E. I., Rodnenkov O. V., Zorin A. V., Lakomkin V. L., Gramovich V. V., Vybo-rov O. N., Dragnev A. G., Timoshin A. A., Buryachkovskaya L. I., Abramov A. A., Masenko V. P., Arzamastsev E. V., Kapelko V. I., Vanin A. F. Hypotensive effect of «oxacom» containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials in healthy volunteers. Nitric Oxide. 26 : 148—156. 2012.
- [7] Filice E. I., Angelone T., De Francesco E. M., Pellegrino D., Maggiolini M., Cerra M. C. Crucial role of phospholamban phosphorylation and S-nitrosylation in the negative lusitropism induced by 17 β -estradiol in the male rat heart. Cell Physiol. Biochem. 28(1) : 41—52. 2011.
- [8] Frederiksen J. W., Weiss J. L., Weisfeldt M. L. Time constant of isovolumic pressure fall: determinants in the working left ventricle. Am. J. Physiol. 235 : H701—H706. 1978.
- [9] Lakomkin V. L., Vanin A. F., Timoshin A. A., Kapelko V. I., Chazov E. I. Long-lasting hypotensive action of stable preparations of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in conscious normotensive and hypertensive rats. Nitric Oxide. 16(4) : 413—418. 2007.
- [10] Lima B., Forrester M. T., Hess D. T., Stamler J. S. S-Nitrosylation in Cardiovascular Signaling. Circ. Res. 106 : 633—646. 2010.
- [11] Massion P.B., Feron O., Dessy C., Balligand J. Nitric Oxide and Cardiac Function: Ten Years After, and Continuing. Circ. Res. 93 : 388—398. 2003.
- [12] Paulus W. J., Bronzwaer J. G. Myocardial contractile effects of nitric oxide. Heart Fail. Rev. 7(4) : 371—383. 2002.
- [13] Pinsky D. J., Patton S., Mesaros S., Brovkovich V., Kubaszewski E., Grunfeld S., Malinski T. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. Circ. Res. 81(3) : 372—379. 1997.
- [14] Poteser M., Romanin C., Schreibmayer W., Mayer B., Groschner K. S-nitrosation controls gating and conductance of the α 1 subunit of class C L-type Ca^{2+} channels. J. Biol. Chem. 276: 14797—14803. 2001.
- [15] Raff G. L., Glantz S. A. Volume loading slows left ventricular isovolumic relaxation rate: Evidence of load-dependent relaxation in the intact dog heart. Circ. Res. 48 : 813—824. 1981.
- [16] Salama G., Menshikova E. V., Abramson J. J. Molecular interaction between nitric oxide and ryanodine receptors of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. Antioxid. Redox Signal. 2(1) : 5—16. 2000.
- [17] Xu L., Eu J. P., Meissner G., Stamler J. S. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. Science. 279 : 234—237. 1998.

Поступила 5 X 2016