

ISSN 2225-6016

# ВЕСТНИК

*Смоленской государственной  
медицинской академии*

*Том 18, №3*

2019



УДК 618.3-008.6-08-039.71

## ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ АРГИНАЗЫ II ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРЕЭКЛАМПСИИ

© Северинова О.В., Локтева Т.И., Гуреев В.В.

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, Белгород, ул. Победы, 85

### Резюме

**Цель.** Изучить протективную активность селективных ингибиторов аргиназы II KUD-974, KUD-975, KUD-259 на функциональные показатели у крыс с ADMA-подобной преэклампсией.

**Методика.** Исследование проведено на 140 самках крыс линии Wistar, массой 250-300 гр. ADMA-подобный агент (L-NAME) внутривнутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг/сут вводили экспериментальным животным с 14 до 20 сут. беременности. Селективные ингибиторы аргиназы II KUD-974, KUD-975, KUD-259 в дозировке 1 мг/кг/сут вводили интражелудочно с 14 по 20 сут. беременности. На 21 сут. беременности были проведены функциональные и лабораторные исследования.

**Результаты.** При проведении оценки результатов, полученных в ходе данного экспериментального исследования, было установлено, что снижение активности аргиназы приводит к повышению выработки оксида азота, что благоприятно воздействует на нормализацию сосудистой функции.

**Заключение.** Ингибиторы аргиназы II в настоящее время являются перспективной группой препаратов для лечения гипертензивных состояний у беременных.

**Ключевые слова:** преэклампсия, ингибиторы аргиназы, эндотелиальная дисфункция

## PROTECTIVE PROPERTIES OF ARGINASE II SELECTIVE INHIBITORS IN EXPERIMENTAL PREECLAMPSIA

Severinova O.V., Lokteva T.I., Gureev V.V.

Belgorod State National Research University, 85, Pobedy St., 308015, Belgorod, Russia

### Abstract

**Objective.** To study the protective effect of arginase II selective inhibitors KUD-974, KUD-975, KUD-259 on functional parameters in rats with ADMA-like preeclampsia.

**Methods.** The study was conducted in 140 female Wistar rats weighing 250-300 g. ADMA-like agent (L-NAME) was introduced intraperitoneally at a dose of 25 mg/kg/day from 14 to 20 days of gestation. Arginase II selective inhibitors KUD-974, KUD-975, KUD-259 at a dosage of 1 mg/kg/day was introduced intragastrically through a probe 1 time per day from 14 to 20 days of gestation. On the 21st day of gestation, functional tests and laboratory tests were performed.

**Results.** The analysis of the obtained in this experimental study results showed that a decrease in the activity of arginase leads to an increase in the production of nitric oxide, which has a beneficial effect on vascular function.

**Conclusion.** Arginase II inhibitors are currently a promising group of drugs for the treatment of hypertensive conditions in pregnant women.

**Keywords:** preeclampsia, arginase inhibitors, endothelial dysfunction

## Введение

На протяжении последнего десятилетия преэклампсия, которая является частным случаем гипертензивных расстройств во время беременности, служит объектом повышенного внимания, так как данное осложнение становится причиной каждого 3-го случая акушерской заболеваемости и ежегодно уносит до 50 000 жизней молодых женщин по всему миру, являясь наиболее частой причиной в структуре материнской смертности [1, 2]. Показатели перинатальной смертности и частота преждевременных родов (10-12%) у беременных с гипертензивными расстройствами в значительной степени превалируют над соответствующими значениями у женщин с физиологически протекающей беременностью. Частота случаев развития преэклампсии во время беременности составляет от 2 до 8% [4, 5]. Не смотря на столь пристальное внимание во всем мире

к данной проблеме, на сегодняшний день количество случаев развития данного осложнения не имеет тенденции к снижению [3]. В последние годы возрастает количество исследований, указывающих на то, что основную роль в развитии преэклампсии играет нарушение функционального состояния эндотелия сосудов, что влечет за собой развитие генерализованного спазма, повышение цифр артериального давления и, как следствие ишемические нарушения в органах [6]. Эндотелий является мощным эндокринным органом, участвующим в регуляции тонуса сосудов и поддержании их нормального строения, контроле реологических свойств крови и процессов местного воспаления. В норме антикоагулянтная и антитромботическая активность эндотелия преобладают над прокоагулянтными свойствами, однако в условиях повреждения данный баланс смещается в сторону прокоагуляции [8].

Одним из факторов развития эндотелиальной дисфункции является дефицит оксида азота (NO), являющегося основным вазодилатирующим фактором, вырабатываемым эндотелием. При физиологическом течении беременности одним из адаптационных механизмов сердечно-сосудистой системы женщины заключается в увеличении эндогенной продукции NO и повышении чувствительности к нему гладкомышечных сосудистых клеток. Синтез NO осуществляется под действием фермента эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) из аминокислоты L-аргинин. Ингибиторы аргиназы – это вещества природного происхождения, механизм действия которых заключается в блокировании фермента аргиназы, а, следовательно, в нарушении превращения L-аргинина в орнитин и мочевины [6, 8]. Вследствие этого большее количество L-аргинина расщепляется под действием NO-синтазы с образованием оксида азота [7, 8]. Снижение активности аргиназы приводит к повышению выработки оксида азота, что благоприятно воздействует на нормализацию сосудистой функции. Таким образом, использование ингибиторов аргиназы для увеличения синтеза NO является одним из методических подходов предотвращения развития дисфункции эндотелия [6-8].

Цель исследования – изучить протективную активность селективных ингибиторов аргиназы П KUD-974, KUD-975, KUD-259 на функциональные показатели у крыс с ADMA-подобной преэклампсией.

## Методика

Исследование проведено на 140 самках крыс линии Wistar, массой 250-300 г. на базе лаборатории доклинических исследований Центра доклинических и клинических исследований НИУ «БелГУ». Исследование была выполнено в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и «Правилами лабораторной практики», утвержденными приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 №708н, с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [Directive 2010/63/EU]. Все эксперименты были одобрены Этическим комитетом ФГАОУ ВПО «Белгородского государственного национального исследовательского университета» (НИУ «БелГУ») Министерства образования и науки. Вивисекцию проводили в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS N123». Для содержания экспериментальных животных использовались клетки – индивидуально вентилируемые «Tecniplast» для мелких лабораторных животных. Подстил – стерилизованные УФ-облучением, опилки. Корм – гранулированный для мелких лабораторных животных – грызунов. Вода очищенная, стерилизованная УФ-облучением. Условия окружающей среды – обеспечивался системой индивидуально вентилируемых клеток. Акклиматизация и отбор животных для исследования – карантин не менее 10 сут. Распределение было выполнено по группам в соответствии с массой тела. На момент проведения исследований животные были здоровыми, без изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования. В течение 18 ч. до проведения экспериментов животные находились в условиях полной пищевой депривации со свободным доступом к воде.

С целью формирования групп беременных животных, находящихся в условиях отдельного содержания, к самкам (3 животных) подсаживали самцов (2 животных) на сут. Затем животных рассаживали и через 10-14 сут. в условиях медикаментозного сна путем пальпации передней брюшной стенки устанавливали факт наличия беременности. Затем беременные крысы были рандомизированы на 4 группы: 1 группа – интактные (животные с физиологически протекающей беременностью), 2 группа – контрольная (моделирование ADMA-подобной преэклампсии у исследуемых животных производили путем введения неселективного блокатора NOS N-нитро-L-аргинин-метилового эфира (L-NAME) (25 мг/кг/сут) внутривентриально с 14-х по 20-е сут. беременности), 3 группа – L-NAME + метилдопа, который вводили в дозе 0,043 г/кг 2 раза в сут. per os с 14-х по 20-е сут. беременности, 4 группа – L-NAME + L- норвалин 10 мг/кг/сут per os с 14-

х по 20-е сут. беременности; 5 группа – L-NAME + селективный ингибитор аргиназы II, KUD 259 в дозе 1 мг/кг/сут per os с 14-х по 20-е сут. беременности; 6 группа – L-NAME + селективный ингибитор аргиназы II, KUD 974 в дозе 1 мг/кг/сут per os с 14-х по 20-е сут. беременности; 7 группа – L-NAME + селективный ингибитор аргиназы II, KUD 975 в дозе 1 мг/кг/сут per os с 14-х по 20-е сут. беременности;

На 21 сут. гестации экспериментальное животное наркотизировали путем внутривенной инъекции хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг массы тела, после чего проводились функциональные тесты. Регистрацию гемодинамических показателей и проводили исследование функции эндотелия осуществляли посредством датчика и аппаратного комплекса для инвазивного измерения показателей гемодинамики Вiorac (USA) и компьютерной программы AcqKnowledge 3.8.1. Для оценки функционального состояния эндотелия использовали расчетный показатель – коэффициента эндотелиальной дисфункции (КЭД), который является соотношением эндотелийзависимой вазорелаксации (ацетилхолин) и эндотелийнезависимой вазорелаксации (нитропруссид натрия). Уровень конечных метаболитов NO (суммарную концентрацию нитратов и нитритов,  $\text{NO}_x$ ) в плазме крови исследуемых животных проводили с помощью колориметрического метода путем оценки развития окраски в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящим в состав реактива.

Оценку состояния микроциркуляции в плаценте проводили с помощью оборудования компании Вioracsystems: полиграф MP100 с модулем лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDF100C и инвазивным игольчатым датчиком TSD144, который устанавливался непосредственно на проекцию плацентарного диска. Регистрация и обработка результатов ЛДФ производились с помощью программы AcqKnowledge версии 3.8.1, значения микроциркуляции выражались в перфузионных единицах (ПЕд.) Сбор суточной мочи проводился с помощью специальных метаболических клеток. Оценка уровня белка в суточной моче проводилась пирогалловым методом на спектрофотометре ПЭ-5400 В. Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на нормальность распределения. Тип распределения определялся критерием Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения были подсчитаны среднее значение (M) и стандартная ошибка среднего (m). Межгрупповые различия анализировались параметрическими (t-критерий Стьюдента) или непараметрическими (критерий Манна-Уитни) методами, в зависимости от типа распределения. Статистическую значимость различий между морфологическими изменениями после их ранжирования оценивали с помощью метода анализа непараметрических данных Манна-Уитни. Все расчеты выполнялись с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel 7.0.

## Результаты исследования и их обсуждение

При введении селективных ингибиторов аргиназы II животным с АДМА-подобной преэклампсией было выявлено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение уровня артериального давления по отношению к группе «нелеченых» животных (рис. 1).

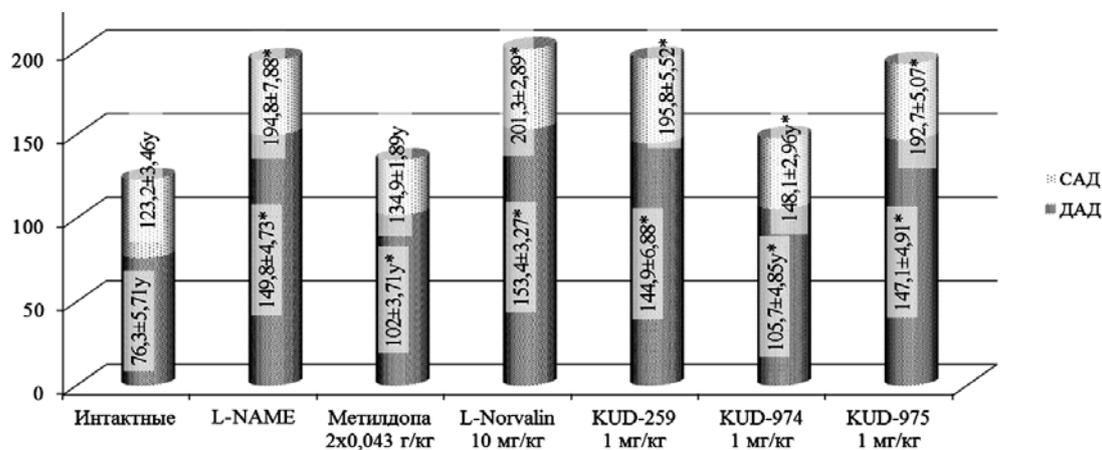


Рис. 1. Влияние селективных ингибиторов аргиназы II на уровень артериального давления при АДМА-подобной преэклампсии у крыс.  $p < 0,05$  – в сравнении с группой интактных животных; <sup>y</sup> –  $p < 0,05$  в сравнении с группой L-NAME; \*<sup>y</sup> –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных с группой L-NAME

При оценке результатов показателей функционального состояния эндотелия сосудов было выявлено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) улучшение показателей коэффициента эндотелиальной дисфункции животных с ADMA-подобной преэклампсией, которым вводились селективные ингибиторы аргиназы II по отношению к группе «нелеченых» животных (рис. 2).

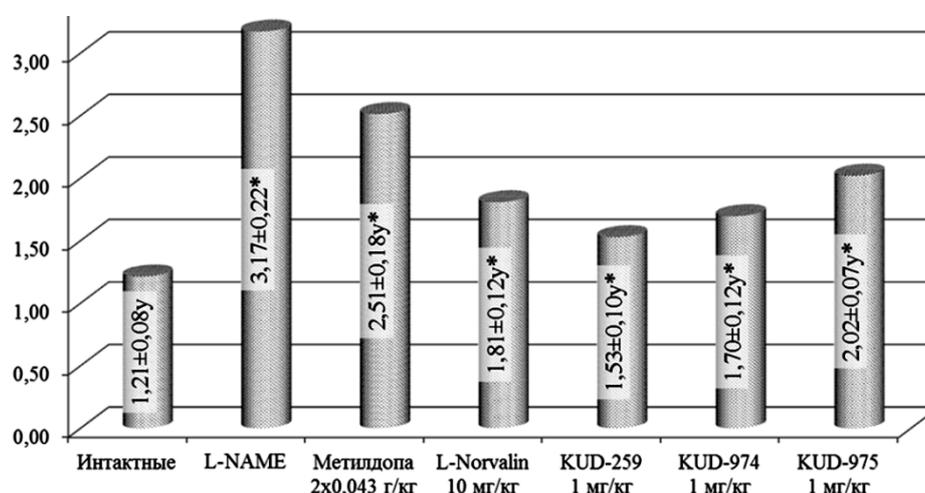


Рис. 2. Влияние селективных ингибиторов аргиназы II на коэффициент эндотелиальной дисфункции при ADMA-подобной преэклампсии у крыс. \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных; <sup>y</sup> –  $p < 0,05$  в сравнении с группой L-NAME; \*<sup>y</sup> –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных с группой L-NAME

При оценке уровня концентрации конечных метаболитов оксида азота в плазме у крыс с ADMA-подобной преэклампсией было выявлено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение показателей у групп животных с ADMA-подобной преэклампсией, которым вводились селективные ингибиторы аргиназы II по отношению к группе «нелеченых» животных (рис. 3).

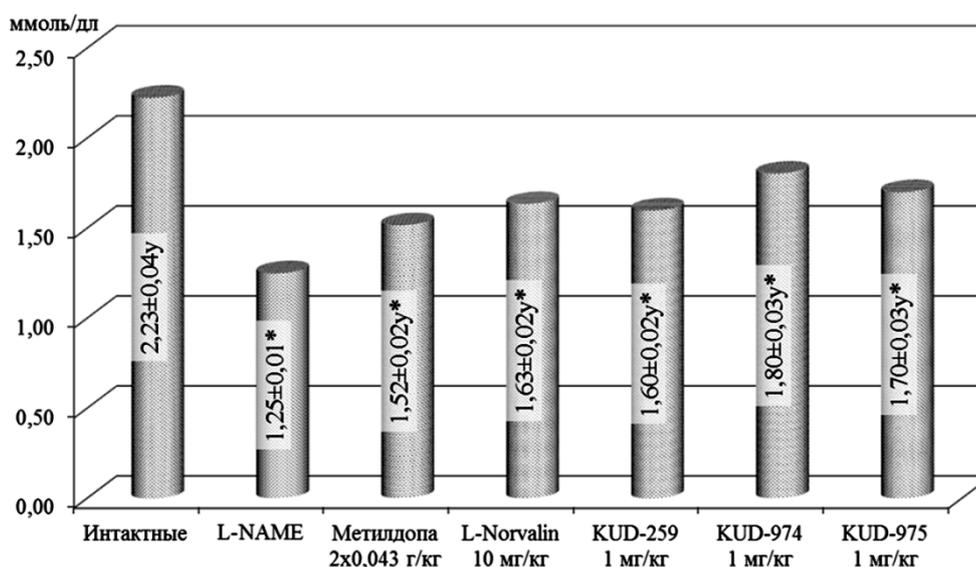


Рис. 3. Влияние селективных ингибиторов аргиназы II на концентрацию конечных метаболитов оксида азота в плазме у крыс с ADMA-подобной преэклампсией. \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных; <sup>y</sup> –  $p < 0,05$  в сравнении с группой L-NAME; \*<sup>y</sup> –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных с группой L-NAME

При оценке результатов показателей микроциркуляции в плаценте у экспериментальных животных было зарегистрировано статистически значимое ( $p < 0,05$ ) повышение данных показателей по отношению к группе «нелеченых» животных (рис. 4).

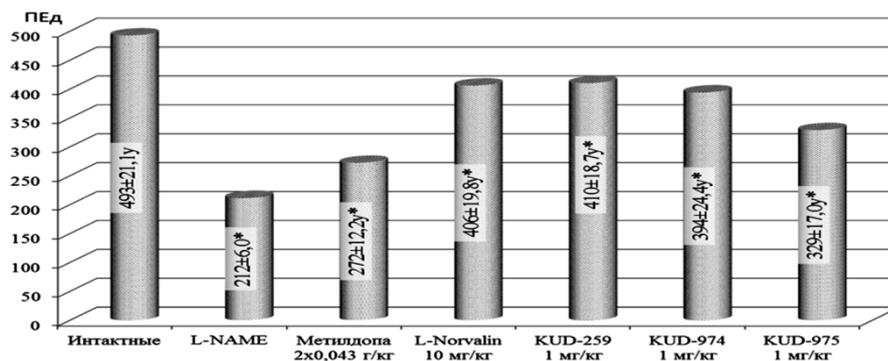


Рис. 4. Влияние селективных ингибиторов аргиназы II на показатели микроциркуляции в плаценте у крыс с ADMA-подобной преэклампсией. \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных; <sup>y</sup> –  $p < 0,05$  в сравнении с группой L-NAME; \*<sup>y</sup> –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных с группой L-NAME

При оценке уровня белка в моче было выявлено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение концентрации белка в моче животных с ADMA-подобной преэклампсией, которым вводились селективные ингибиторы аргиназы II по отношению к группе «нелеченых» животных (рис. 5).

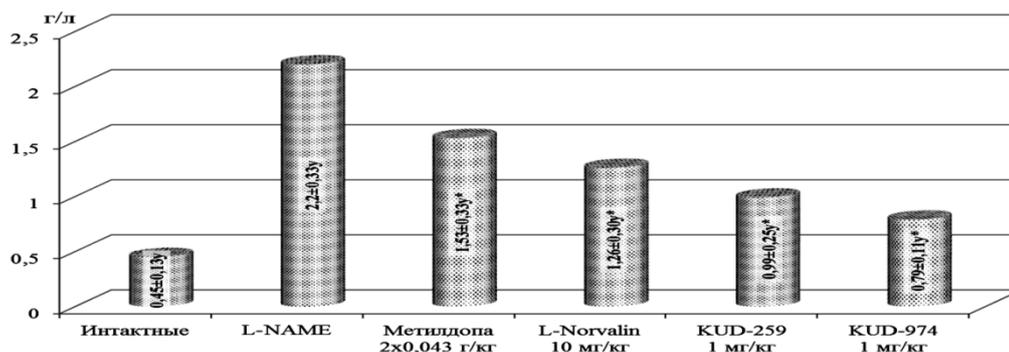


Рис. 5. Влияние селективных ингибиторов аргиназы II на протеинурию при ADMA-подобной преэклампсии. \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных; <sup>y</sup> –  $p < 0,05$  в сравнении с группой L-NAME; \*<sup>y</sup> –  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных и с группой L-NAME

В ходе экспериментального исследования была выявлена выраженная протективная активность селективных ингибиторов аргиназы II KUD-974, KUD-975, KUD-259 в отношении функциональных показателей у крыс с ADMA-подобной преэклампсией.

При проведении данного исследования эндотелиальная дисфункция была выбрана в качестве мишени для поиска новых лекарственных препаратов с целью профилактики и лечения преэклампсии, так как нарушение функционального состояния мелких артериальных сосудов приводит к нарушению регуляции артериального давления и микроциркуляции в тканях, что ведет к нарушению функции органов и систем, а в некоторых случаях и к полиорганной недостаточности [5].

При проведении оценки результатов, полученных в ходе данного экспериментального исследования, было установлено, что снижение активности аргиназы приводит к повышению выработки оксида азота, что благоприятно воздействует на нормализацию сосудистой функции [3, 6]. Таким образом, использование ингибиторов аргиназы для увеличения синтеза NO является одним из методических подходов предотвращения развития дисфункции эндотелия.

## Заключение

Методы лечения, используемые современными врачами акушерами в повседневной практике, направленные на купирование доминирующих синдромов с недостаточным учетом

патогенетических составляющих. Современные знания о патогенезе преэклампсии и накопленный экспериментальный опыт, обосновывают обозримые перспективы для создания лекарственных препаратов для лечения и профилактики преэклампсии и раскрывают новые возможности для проведения дальнейших научно-исследовательских работ. Поэтому на сегодняшний день является актуальным поиск новых фармакологических агентов, способных купировать данное осложнение беременности, влияющих на развитие, течение, коррекцию преэклампсии является важной задачей современной фармакологии. Таким образом можно предположить, что ингибиторы аргиназы в настоящее время являются перспективной группой препаратов для лечения гипертензивных состояний у беременных. При этом особый интерес представляют ингибиторы аргиназы II, учитывая их селективность.

## Литература (references)

1. Адамян Л. В., Артымук Н. В., Башмакова Н. В., Белокрыничкая Т. Е. и др. Артериальная гипертензия во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия и эклампсия: Клинический протокол. – Москва, 2016. – 41 с. [Adamyan L.V., Artyumuk N.V., Bashmakova N.V., Belokrinnitskaya T.E. I dr. *Arterial'naja gipertenzija vo vremja beremennosti, v rodah i poslerodovom periode. Prejeklampsija i jeklampsija: Klinicheskij protokol.* Hypertension during pregnancy, in labor and the postpartum period. Preeclampsia and eclampsia: Clinical Protocol. – Moscow, 2016. – 41 p. (in Russian)]
2. Гребенник Т.К., Рябинкина И.Н., Павлович С.В. и др. Статистика преэклампсии и эклампсии. Мать и дитя: материалы VIII Регионального научного форума. – Сочи, 2015. – С. 163-164. [Grebennik T.K., Ryabinkina I.N., Pavlovich S.V. i dr. *Statistika prejeklampsii i jeklampsii. Mat' i ditja: materialy VIII Regional'nogo nauchnogo foruma.* Statistics of preeclampsia and eclampsia. Mother and child: proceedings of the VIII Regional scientific forum. – Sochi, 2015. – P. 163-164. (in Russian)]
3. Дзугкоев С.Г., Дзугкоева Ф.С., Маргиева О.И., Можаяева И.В. Коррекция эндотелиальной дисфункции при никелевой интоксикации ингибиторами ENOS и аргиназы в эксперименте // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – №4. – С. 22. [Dzugkoev S.G., Dzugkoyeva F.S., Margieva O.I., Mozhaeva I.V. *Korrekcija jendotelial'noj disfunkcii pri nikelеvoј intoksikacii ingibitorami ENOS i arginazy v jeksperimente.* Correction of endothelial dysfunction in nickel intoxication by inhibitors of expression of ENOS and arginase in experiment Modern Problems of Science and Education. – 2018. – N4. – P. 22. (in Russian)]
4. Рекомендации ВОЗ по профилактике и лечению преэклампсии и эклампсии. Всемирная организация здравоохранения. [Rekomendacii VOZ po profilaktike i lecheniju prejeklampsii i jeklampsii. WHO recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia World Health Organization. – 2014. – P. 40. (in Russian)]
5. Сухих Г.Т., Мурашко Л.Е. Преэклампсия: руководство. – Москва: GEOTAR-медиа. – 2010. – 576 с. [Suhih G.T., Murashko L.E., *Prejeklampsija: rukovodstvo.* Preeclampsia. – Moscow: GEOTAR-media. – 2010. – 576 p. (in Russian)]
6. Gureev V. V. New approaches of morfofunktional pharmacological correction of violations of cardiovascular system in experimental preeclampsia // Research Results in Pharmacology. – 2016. – V.2, N3. – P. 11-27.
7. Minh Cong Nguyen, Jong Taek Park, Yeong Gwan Jeon, Byeong Hwa Jeon, Kwang Lae Hoe, Young Myeong Kim, Hyun Kyo Lim, Sungwoo Ryoo Yonsei. Arginase inhibition restores peroxynitrite-induced endothelial dysfunction via L-Arginine-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation // Medical Journal. – 2016. – V.57, N6. – P. 1329-1338.
8. Stupakova E.G., Lazareva G.A., Gureev V.V. et al. L-NAME-induced Preeclampsia: correction of functional disorders of the hemostasis system with Resveratrol and Nicorandil // Research Results in Pharmacology. – 2019. – V.5, N2. – P. 1-12.

## Информация об авторах

Северина Ольга Владимировна – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». E-mail: frendic@mail.ru

Локтева Татьяна Ивановна – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». E-mail: 1161778@bsu.edu.ru

Гуреев Владимир Владимирович – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». E-mail: gureev@bsu.edu.ru