

УДК 612.172.1:(615.217.24+615.224):616-092.9

# ИССЛЕДОВАНИЕ СОСУДОРАСШИРЯЮЩИХ И БЕТА-АДРЕНОБЛОКИРУЮЩИХ СВОЙСТВ D- И L-НЕБИВОЛОЛА НА ИЗОЛИРОВАННОМ СЕРДЦЕ И ИЗОЛИРОВАННОЙ АОРТЕ МОРСКОЙ СВИНКИ

В. И. Козловский<sup>1</sup> (к. м. н.), С. Хлопицкий<sup>2</sup> (проф., д. м. н.),  
Р. Е. Грыглевский<sup>2</sup> (проф., д. м. н.)

<sup>1</sup> Гродненский государственный медицинский университет;

<sup>2</sup> Ягеллонский университет (г. Краков, Польша).

Предполагается, что L-изомер  $\beta$ -адренергического антагониста небиволола вызывает периферический сосудорасширяющий эффект, связанный с высвобождением оксида азота из эндотелия, в то же время только D-небиволол имеет свойства  $\beta$ -адренергического антагониста. Целью настоящего исследования было оценить сосудорасширяющее действие обоих изомеров небиволола на моделях изолированного сердца и изолированной аорты, а также изучить свойства  $\beta$ -адренергических антагонистов у D- и L-небиволола. Установлено, что как L-, так и D-небиволол на обеих экспериментальных моделях вызывали сосудорасширяющий эффект, существенно ослабленный в присутствии неселективного ингибитора синтазы оксида азота L-NAME ( $10^{-4}$  M). В то же время только D-небиволол ингибировал увеличение сократимости изолированного сердца морской свинки, вызванное изопренилином. Таким образом, как D-, так и L-небиволол обладают сосудорасширяющими свойствами, связанными с высвобождением эндотелиального оксида азота, в то же время только D-небиволол имеет свойства  $\beta$ -адренергического антагониста.

Ключевые слова: D-небиволол, L-небиволол, сосудорасширяющий эффект, коронарное кровообращение, оксид азота,  $\beta$ -адренергические антагонисты.

It is supposed that L-isomer of  $\beta$ -adrenergic antagonist nebitolol induces NO-dependent peripheral vasodilator effect, whereas only D-nebitolol has the properties of  $\beta$ -adrenergic antagonist. The aim of our investigation was to assess vasodilating effect of both isomers of nebitolol in the isolated guinea pig heart and isolated guinea pig aorta as well as to study  $\beta$ -adrenergic antagonist properties of both D- and L-nebitolol. We have found that both D- and L-nebitolol in both experimental models induced vasodilating effect, which was significantly reduced by non-selective nitric oxide synthase inhibitor L-NAME ( $10^{-4}$  M). On the other hand, only D-nebitolol inhibited isoprenaline-induced increase of contractility in the isolated guinea pig heart. Thus both D- and L-nebitolol possess endothelial NO-dependent properties, whereas only D-nebitolol is  $\beta$ -adrenergic antagonist.

Keywords: D-nebitolol, L-nebitolol, vasodilator effect, coronary circulation, nitric oxide,  $\beta$ -adrenergic antagonists.

## Введение

$\beta$ -Адренергические антагонисты очень широко применяются в медицинской практике, прежде всего для лечения различных заболеваний сердечно-сосудистой системы: гипертонической болезни, ишемической болезни сердца, аритмий сердца. В последнее время представители этой фармакологической группы начали использоваться для лечения хронической застойной сердечной недостаточности. Особое место среди  $\beta$ -адренергических антагонистов занимает небиволол. Этот препарат, наряду со свойствами селективного антагониста  $\beta_1$ -адренорецепторов, обладает периферическим сосудорасширяющим действием, опосредованным выделением эндотелиального оксида азота [1, 2, 8]. Благоприятное влияние небиволола на функцию эндотелия в сравнении с другим селективным  $\beta_1$ -адренергическим антагонистом атенололом подтверждено в клинических испытаниях [12].

Известно, что небиволол представляет собой рацемат, состоящий из D- и L-изомеров. Предполагается, что D-небиволол обладает свойствами антагониста  $\beta_1$ -адренорецепторов, в то время как L-небиволол обладает сосудорасширяющим действием [13]. С другой стороны, в литературе практически нет данных о прямом влиянии изомеров небиволола на сосуды, которые могут быть получены только в экспериментах на изолированных органах. В частности, особый интерес вызывает влияние на коронарное кровообращение.

Основной целью нашего исследования было изучить сосудорасширяющие свойства D- и L-стереоизомеров небиволола на изолированном сердце и изолированной аорте морской свинки с оценкой роли оксида азота в механизме этого действия. Кроме того, мы исследовали наличие у D- и L-небиволола свойств антагонистов  $\beta_1$ -адренорецепторов по ингибированию эффекта изопренилина на изолированном сердце.

## Материалы и методы

**Модель изолированного сердца морской свинки (метод Лангендорфа).** Морские свинки обоих полов, массой тела 300 – 400 г, наркотизировались пентобарбиталом (30 – 40 мг кг<sup>-1</sup> массы тела). После вскрытия грудной клетки сердца изолировались, промывались в холодном физиологическом растворе, затем коронарное русло изолированного сердца перфузировалось ретроградно через аорту под постоянным перфузионным давлением 60 мм рт. ст. с использованием аппарата Лангендорфа (Hugo Sachs Electronics) раствором Кребса – Ханзелайта следующего состава (mM): NaCl 118, CaCl<sub>2</sub> 2,52, MgSO<sub>4</sub> 1,64, NaHCO<sub>3</sub> 24,88, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, глюкоза 5,55, натрия пируват 2,0. Перфузионный раствор оксигенировался смесью 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Сердца стимулировались с частотой 273 импульса в минуту двумя платиновыми электродами, введёнными в правое предсердие. Объём жидкости, протекавший в единицу времени, соответствовал величине коронарного потока. Коронарный поток измерялся с помощью ультразвукового датчика (Hugo Sachs Electronics). Давление в левом желудочке измерялось с помощью резинового шарика, наполненного жидкостью, введённого в левый желудочек и соединённого с датчиком давления (Hugo Sachs Electronics). С помощью аналогового дифференцирующего усилителя (Hugo Sachs Electronics) рассчитывалась максимальная скорость изменения давления в левом желудочке ( $dP/dt_{\max}$ ), по которой оценивалась сократимость миокарда. Величины коронарного потока и  $dP/dt_{\max}$  записывались в течение всего эксперимента, а затем анализировались с помощью специальной программы (PSCF – IGEL, Польша). Детали метода описаны ранее [7].

Для изучения влияния D- и L-небиволола на коронарный поток изолированного сердца морской свинки соединения вводились путём внутрикоронарной инфузии до получения концентраций в диапазоне 10<sup>-6</sup> – 3 · 10<sup>-5</sup> М. Для оценки роли оксида азота в механизме сосудорасширяющего действия соединения вводились повторно в присутствии ингибитора синтазы оксида азота (NO-синтазы) метилового эфира L-N<sup>G</sup>-нитроаргинина (L-NAME, 10<sup>-4</sup> М). В контрольных опытах (без использования фармакологических антагонистов) эффекты D- и L-небиволола были повторяемы и не изменялись существенно в течение эксперимента. В качестве препарата сравнения использовался селективный β<sub>1</sub>-адренергический антагонист атенолол.

Для исследования в-адреноблокирующих свойств D- и L-небиволола, а также препарата сравнения атенолола, оценивалось влияние их на увеличение  $dP/dt$ , вызванное изопренилином (10<sup>-9</sup> М, болюс). Эффект изопренилина регистрировал-

ся дважды в течение эксперимента: до введения исследуемых соединений и в присутствии их (10<sup>-6</sup> М).

В экспериментах на изолированном сердце стереоизомеры небиволола растворялись в смеси диметилсульфоксида (ДМСО) и воды (1 : 1) или в чистом DMSO (при концентрации 3 · 10<sup>-5</sup> М). Инфузии чистого ДМСО и смеси ДМСО и воды вызывали незначительное увеличение коронарного потока (на 1,20 ± 0,18 мл/мин и 1,07 ± 0,16 мл/мин, соответственно).

**Модель изолированной аорты морской свинки (аортальные кольца).** Методика подробно описана в литературе [11]. После наркотизирования морских свинок пентобарбиталом (30 – 40 мг кг<sup>-1</sup> массы тела) и вскрытия грудной клетки аорта быстро удалялась, осторожно промывалась с помощью шприца холодным физиологическим раствором и помещалась в холодный раствор Кребса – Ханзелайта (см. выше). Адвентициальная ткань удалялась, аорта разрезалась на кольца длиной 2 – 3 мм. Аортальные кольца подвешивались в стеклянных камерах, содержащих 5 мл раствора Кребса – Ханзелайта, оксигенированного смесью 95 % O<sub>2</sub> и 5 % CO<sub>2</sub>, температура раствора поддерживалась на уровне 37°C. Кольца были соединены с датчиком изометрического растяжения. Растяжение колец увеличивалось до величины 2 г, после чего кольца оставались для стабилизации на 1 ч.

После периода стабилизации добивались максимального сокращения колец с помощью KCl (30 – 120 mM). После отмывания и стабилизации колец получали субмаксимальное (55 – 85 % от максимального) сокращение простагландином F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>, 10<sup>-6</sup> – 3 · 10<sup>-6</sup> М). После достижения стабильного плато сокращения оценивали состояние эндотелия с помощью АДФ (10<sup>-6</sup> М). Эксперимент проводили только в том случае, если АДФ вызывало расслабление сосудистых колец на величину не менее 50 % от величины сокращения, вызванного PGF<sub>2α</sub>. После отмывания и стабилизации колец вновь получали субмаксимальное сокращение аортальных колец PGF<sub>2α</sub>, и после достижения плато получали кумулятивную дозо-зависимую кривую расслабления, вызванного D- и L-небивололом (10<sup>-6</sup> – 3 · 10<sup>-4</sup> М). Для оценки роли оксида азота в механизме расслабления аортальных колец кривую расслабления получали в присутствии L-NAME (3 · 10<sup>-4</sup> М). В качестве препарата сравнения использовали атенолол.

В экспериментах на изолированной аорте стереоизомеры небиволола растворялись в чистом ДМСО. Соответствующие количества ДМСО не вызывали расслабления аортальных колец в наших экспериментах.

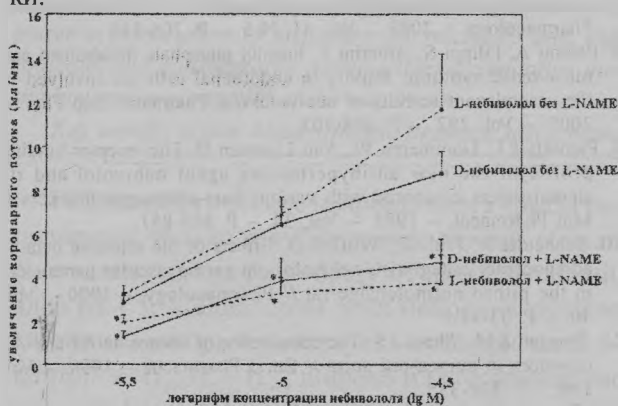
**Статистические методы.** Все показатели

были выражены как средняя величина ± стандартная ошибка. Статистическая значимость оценивалась с помощью спаренного Т-теста. Величина P меньше 0,05 считалась статистически значимой.

**Результаты и обсуждение**

Величина базального коронарного потока в изолированном сердце составляла 9,54±0,41 мл/мин, величина базального уровня dP/dt была 1069,3±132,7 мм рт. ст. сек<sup>-1</sup>.

В экспериментах на изолированном сердце D- и L-небиволол вызывали примерно одинаковое по амплитуде дозозависимое увеличение коронарного потока, начиная с концентрации 3 · 10<sup>-6</sup> М (рис. 1). Данный эффект обоих стереоизомеров значительно снижался в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME (10<sup>-4</sup> М). Так, в концентрации 3 · 10<sup>-5</sup> М увеличение коронарного потока, вызванное D- и L-небивололом, составляло соответственно 8,75±1,01 мл/мин и 11,68±2,50 мл/мин, в то же время в присутствии L-NAME эти величины составляли соответственно 4,66±1,08 мл/мин и 3,73±1,27 мл/мин. Атенолол не вызывал увеличения коронарного потока в изолированном сердце морской свинки.



**Рис. 1.** Влияние L-NAME (10<sup>-4</sup> М) на увеличение коронарного потока, вызванное D- и L-небивололом (3×10<sup>-6</sup> М - 3×10<sup>-5</sup> М). Результаты представлены как средняя величина ± стандартная ошибка (n = 4 - 7). Примечание: \* - статистически достоверное различие в сравнении с контролем (p < 0,05).

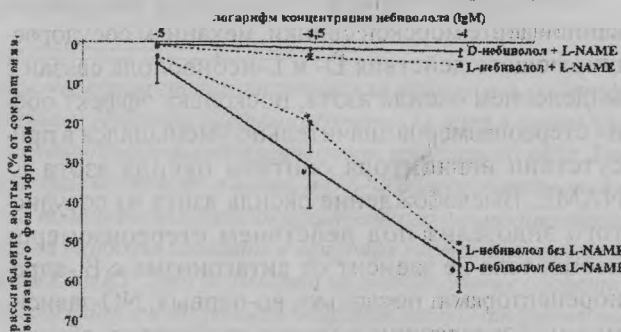
Изопреналин (10<sup>-9</sup> М, болюс) увеличивал dP/dt изолированного сердца морской свинки на 1081,9±173,1 мм рт. ст. Эффект изопреналина при повторном введении не изменялся существенно в контрольных экспериментах (данные не показаны). D-небиволол (10<sup>-6</sup> М), так же как и атенолол (10<sup>-6</sup> М), практически ингибировали повышение сократимости, вызванное изопреналином (на 92,4% и 87,3%, соответственно), в то же время L-небиволол (10<sup>-6</sup> М) не оказывал существенного влияния на эффект изопреналина (табл. 1).

В экспериментах на изолированной аорте морской свинки D- и L-небиволол вызывали дозозависимое расслабление аортальных колец, сокращённых PGF<sub>2α</sub> (рис. 2). Этот эффект резко умень-

**Таблица 1.** Влияние D-небиволола, L-небиволола и атенолола на увеличение dP/dt, вызванное введением изопреналина (10<sup>-9</sup> М, болюс).

Препарат	Прирост dP/dt, вызванный изопреналином (мм рт. ст. сек <sup>-1</sup> )	
	до введения антагониста	в присутствии антагониста
L-небиволол (10 <sup>-6</sup> М)	1123,80±296,33	704,00±151,00
D-небиволол (10 <sup>-6</sup> М)	838,75±105,07	59,50±9,44*
атенолол (10 <sup>-6</sup> М)	1117,50±258,31	168,50±70,91*

Примечание: \* - статистически достоверное различие в сравнении с эффектом до введения соответствующего антагониста (p < 0,05).



**Рис. 2.** Влияние L-NAME (3×10<sup>-4</sup> М) на релаксацию изолированных колец аорты морской свинки, вызванную D- и L-небивололом (10<sup>-5</sup> - 10<sup>-4</sup> М). Результаты представлены как средняя величина ± стандартная ошибка (для n = 3 - 5).

Примечание: \* - статистически достоверное различие между контролем и опытом (p < 0,05).

шался в присутствии L-NAME. Атенолол не вызывал расслабления колец аорты в наших экспериментах.

Таким образом, в соответствие с данными, полученными ранее на других моделях [4, 9, 10, 13], только D-небиволол обладает свойствами антагониста β<sub>1</sub>-адренорецепторов. С другой стороны, оба стереоизомера небиволола увеличивали коронарный поток в изолированном сердце морской свинки. В единственной из опубликованных ранее работ, посвящённой влиянию изомеров небиволола на коронарные сосуды [3] как L-, так и D-изомер расширяли изолированные коронарные сосуды собаки, однако, в отличие от наших данных, L-небиволол превосходил по эффекту D-небиволол. Причина данного противоречия не совсем ясна: возможно, это связано с особенностями экспериментальных моделей. Эксперименты в изолированном сердце более близки к реальным условиям, так как они сопровождаются перфузией коронарных сосудов, которая отсутствовала в опытах на изолированных коронарных сосудах, проведённых в вышеупомянутой работе.

На модели изолированных колец аорты морской свинки, так же, как и в изолированном сердце, оба стереоизомера небиволола вызвали примерно одинаковый по силе сосудорасширяющий эффект. Таким образом, можно заключить, что как для L-, так и для D-небиволола характерно прямое сосудорасширяющее действие, сила которого примерно одинакова у обоих стереоизомеров. На первый взгляд, это противоречит данным эксперимен-

тов *in vivo*, в которых только L-небиволол уменьшал общее периферическое сопротивление [13]. Мы предполагаем, что снижению общего периферического сопротивления на фоне действия D-небиволола препятствовала рефлекторная вазоконстрикция, развивающаяся в ответ на снижение сократимости в результате блокады  $\beta_1$ -адренорецепторов сердца.

Как в изолированном сердце, так и на изолированной аорте морской свинки, механизм сосудорасширяющего действия D- и L-небиволола связан с выделением оксида азота, поскольку эффект обоих стереоизомеров значительно уменьшался в присутствии ингибитора синтазы оксида азота L-NAME. Высвобождение оксида азота из сосудистого эндотелия под действием стереоизомеров небиволола не зависит от антагонизма с  $\beta_1$ -адренорецепторами, поскольку, во-первых, NO-зависимыми сосудорасширяющими свойствами обладают как имеющий свойства  $\beta_1$ -адренергического антагониста D-небиволол, так и лишённый их L-небиволол, а во-вторых, другой селективный  $\beta_1$ -адренергический антагонист атенолол не вызывал увеличения коронарного потока и расслабления аортальных колец в наших экспериментах.

Способность небиволола стимулировать высвобождение оксида азота в таком важном сосудистом русле, как коронарные сосуды, может иметь существенное значение для клинических эффектов препарата. Известно, что при ишемической болезни сердца наблюдается дисфункция эндотелия и снижение продукции эндотелиального оксида азота [5, 14], поэтому увеличение высвобождения оксида азота в эндотелии коронарных сосудов должно иметь положительное значение при этих состояниях. Установлено, что наличие выраженной эндотелиальной дисфункции существенно отягощает прогноз больных ишемической болезнью сердца [6]. В одном клиническом испытании небиволол показал способность уменьшать явления эндотелиальной дисфункции у больных гипертонической болезнью, причём другой селективный  $\beta_1$ -адренергический антагонист атенолол не обладал подобными свойствами [12]. В настоящее время пока отсутствуют данные клинических испытаний, касающихся долговременного влияния небиволола на течение и исход различных сердечно-сосудистых заболеваний, однако есть достаточные основания предполагать, что небиволол может иметь существенные преимущества перед другими в-адренергическими антагонистами.

#### Выводы

1. Свойствами в-адренергического антагониста обладает только D-изомер небиволола.

2. Как D-, так и L-небиволол обладают прямым сосудорасширяющим действием на моделях изолированного сердца и изолированной аорты морской свинки.

3. Механизм сосудорасширяющего действия D- и L-небиволола связан со стимуляцией высвобождения эндотелиального оксида азота.

#### Литература

1. Altwegg L.A., d'Uscio L.V., Barandier C. Nebivolol induces NO-mediated relaxations of rat small mesenteric but not of large elastic arteries // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2000. – Vol. 36. – P. 316-320.
2. Cockcroft J.R., Chowieczyk P.J., Brett S.E. Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L- arginine/NO-dependent mechanism // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1995. – Vol. 274. – P. 1067-1071.
3. Gao Y. S., Nagao T., Bond R.A. Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 1991. – Vol. 17. - P. 964-969.
4. Janssens W.J. Pharmacology of nebivolol // *J Pharm Belg.* – 1992. – Vol. 47. – P. 323-327.
5. Hashimoto M., Kozaki K., Eto M. Association of coronary risk factors and endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery // *Hypertens Res.* – 2000. – Vol. 23. – P. 233-238.
6. Heitzer T., Schlinzig T., Krohn K. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease // *Circulation.* – 2001. – Vol. 104. - P. 2673-2678.
7. Kozlovski V.I., Chlopicki S., Gryglewski R.J. Effects of two beta-3 agonists, CGP 12177A and BRL 37344, on coronary flow and contractility in isolated guinea pig heart // *J. of Cardiovascular Pharmacology.* – 2003. - Vol. 41, N 5. – P. 706-713.
8. Parenti A., Filippi S., Amerini S. Inositol phosphate metabolism and nitric-oxide synthase activity in endothelial cells are involved in the vasorelaxant activity of nebivolol // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2000. – Vol. 292. – P. 698-703.
9. Pauwels P.J., Gommeren W., Van Lommen G. The receptor binding profile of the new antihypertensive agent nebivolol and its stereoisomers compared with various beta-adrenergic blockers // *Mol Pharmacol.* – 1988. – Vol. 34. – P. 843-851.
10. Schneider J., Fruh C., Wilffert B. Effects of the selective beta 1-adrenoceptor antagonist, nebivolol, on cardiovascular parameters in the pithed normotensive rat // *Pharmacology.* – 1990 - Vol. 40. – P. 33-41.
11. Stogall S.M., Shaw J.S. The coexistence of adenosine A1 and A2 receptors in guinea-pig aorta // *Eur J Pharmacol.* – 1990. – Vol. 190. - P. 329-335.
12. Tzemos N, Lim P.O, MacDonald T.M. Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study // *Circulation.* – 2001. – Vol. 104. – P. 511-514.
13. Van de Water A., Xhonneux R, Reneman R.S. Cardiovascular effects of dl-nebivolol and its enantiomers - a comparison with those of atenolol // *Eur J Pharmacol.* – 1988. – Vol. 156. - P. 95-103.
14. Zhang X., Zhao S.P., Li X.P. Endothelium-dependent and -independent functions are impaired in patients with coronary heart disease // *Atherosclerosis.* – 2000. – Vol. 149. – P. 19 – 24.

#### Resume

THE STUDY OF VASODILATOR AND  $\beta$ -ADRENERGIC ANTAGONIST PROPERTIES OF D- AND L-NEBIVOLOL IN THE ISOLATED GUINEA PIG HEART AND ISOLATED GUINEA PIG AORTA

V. I. Kozlovski, S. Chlopicki, R.-J. Gryglewski.

Both D- and L-nebivolol possess endothelial NO-dependent properties, whereas only D-nebivolol is  $\beta$ -adrenergic antagonist.