

Поиск селективных блокаторов цинк-зависимых металлопротеиназ 2-го и 9-го типа в ряду бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот

Крыжановский С.А., Мокров Г.В., Григоркевич О.С., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Лихошерстов А.М., Гудашева Т.А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Цель настоящего исследования – поиск в ряду бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот биологически активных соединений, обладающих свойствами блокаторов, цинк-зависимых металлопротеиназ 2-го и 9-го типа, которые, как известно, играют ключевую роль в патогенезе раннего постинфарктного ремоделирования миокарда. При изучении влияния вновь синтезированных соединений на уровень экспрессии металлопротеиназы-9 в крови крыс с острым инфарктом миокарда было отобрано соединение-лидер – 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин), – которое эффективно блокирует повышения уровня этого фермента в крови. При помощи эхокардиографии показано, что отобранное соединение-лидер по своей способности препятствовать развитию ремоделирования миокарда в острейшую фазу экспериментального инфаркта миокарда, как минимум, не уступает эталонному ингибитору металлопротеиназ – доксициклину.

Ключевые слова: металлопротеиназы 2-го и 9-го типа, постинфарктное ремоделирование миокарда, производные бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот

Search selective blockers of the zinc-dependent metalloproteinases 2nd and 9th type among the benzoylamino (phenylsulfonyl) amino-substituted cyclic aminoacids derivatives

Kryzhanovskii S.A., Mokrov G.V., Grigorkevich O.S., Tsorin I.B., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Likhosherstov A.M., Gudasheva T.A.
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The purpose of this study – search among the benzoylamino (phenylsulfonyl) amino-substituted cyclic aminoacids derivatives biologically active compounds exhibiting properties of the zinc-dependent metalloproteinases 2nd and 9th type blockers which is known to play a key role in the pathogenesis of the myocardium early post-infarction remodeling. In studying the effect of newly synthesized compounds on metalloproteinase-9 levels in blood of rats with acute myocardial infarction were selected compound leader: 1-({4-[(4-chlorobenzoyl)amino]phenyl}sulfonyl-L-proline), which effectively blocked the increase of this enzyme level. Using echocardiography it was demonstrated that the selected compound-leader prevents the myocardial remodeling development in the acute phase of experimental myocardial infarction, at least not inferior to the reference inhibitor of metalloproteinases – doxycycline.

Keywords: metalloproteinases 2nd- and 9th-type, post-infarction myocardial remodeling, derivatives of the benzoylamino (phenylsulfonyl) amino-substituted cyclic aminoacids

Автор, ответственный за переписку:

Крыжановский Сергей Александрович – д.м.н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (495)601-21-85; e-mail: SAK-538@yandex.ru

Введение

Известно, что в условиях острого трансмурального инфаркта миокарда в результате гибели большого количества сократительных кардиомиоцитов в ишемизированном миокарде происходит существенная структурная перестройка, приводящая к значительным изменениям размеров, геометрии и функции левого желудочка сердца. Этот патологический процесс хорошо изучен как в эксперименте [9, 13, 20], так в клинике [6, 10, 19] и носит название «раннее постинфарктное ремоделирование сердца». Полагают, что одну из ключевых ролей в этом процессе играют матриксные металлопротеиназы (ММП) — энзимы, вовлекающие межклеточный матрикс миокарда в процесс структур-

но-функционального ремоделирования посредством деградации цепей коллагена [7, 18]. В этом плане наибольший интерес представляют цинк-зависимые матриксные металлопротеиназы 2-го и 9-го типов (желатиназы) — ММП-2 и ММП-9, поскольку известно, что, с одной стороны, они имеют тропность к коллагену I и III типа, составляющему основу межклеточного матрикса миокарда, а с другой стороны, показано, что находящийся в очаге ишемии коллаген подвергается конформационным изменениям, в результате чего его трёхмерная спираль начинает «раскручиваться», и он переходит в одномерную фрагментированную цепочку, представляющую собой желатин, который и является акцептором действия ММП-2 и ММП-9 [1, 17]. Не менее важно и то, что эти ММП, помимо

на четыре группы: 1-я — ложнооперированные ($n=6$); 2-я — контроль = острый инфаркт миокарда ($n=12$); 3-я — доксициклин + острый инфаркт миокарда ($n=9$); 4-я — соединение-лидер (Ia) + острый инфаркт миокарда ($n=6$). Экспериментальный инфаркт миокарда воспроизводили по методу Селье. После торако- и перикардотомии под переднюю ветвь левой коронарной артерии на 0,5–1 мм ниже её выхода из-под ушка сердца проводили лигатуру. У ложнооперированных животных лигатура оставалась под коронарной артерией на протяжении всего эксперимента, а у животных 2-й, 3-й и 4-й групп производили одномоментную перевязку коронарной артерии. Величину ремоделирования миокарда в 1-й и 2-й группах и влияние на неё изучаемых соединений оценивали при помощи эхокардиографии, как было описано ранее [2]. Животным 3-й группы внутривенно через зонд вводили доксициклин (40 мг/кг/сут в 0,5 мл физиологического раствора) в течение 3 дней, предшествующих эксперименту. Животным 4-й группы по аналогичной схеме и в том же объёме растворителя вводили соединение-лидер (30 мг/кг/сут). Животные 1-й и 2-й групп по аналогичной схеме получали

0,5 мл физиологического раствора. Статистическую обработку данных производили следующим образом: нормальность распределения выборок определяли с помощью критерия Шапиро Уилка. Так как выборки имели нормальное распределение, для определения статистической значимости изменений использовали однофакторный дисперсионный анализ и дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену Кейлсу. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Данные в таблице представлены в виде средних арифметических и их стандартных ошибок, а в тексте и фигурах — только в виде средних арифметических.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов изучения влияния бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот на уровень ММП-9 в крови в условиях ишемии миокарда свидетельствует о том, что только соединение Ia значимо ($p=0,022$) по сравнению с контролем понижает этот показатель (рис. 2) и по своей активности, как минимум, не уступает эталонному

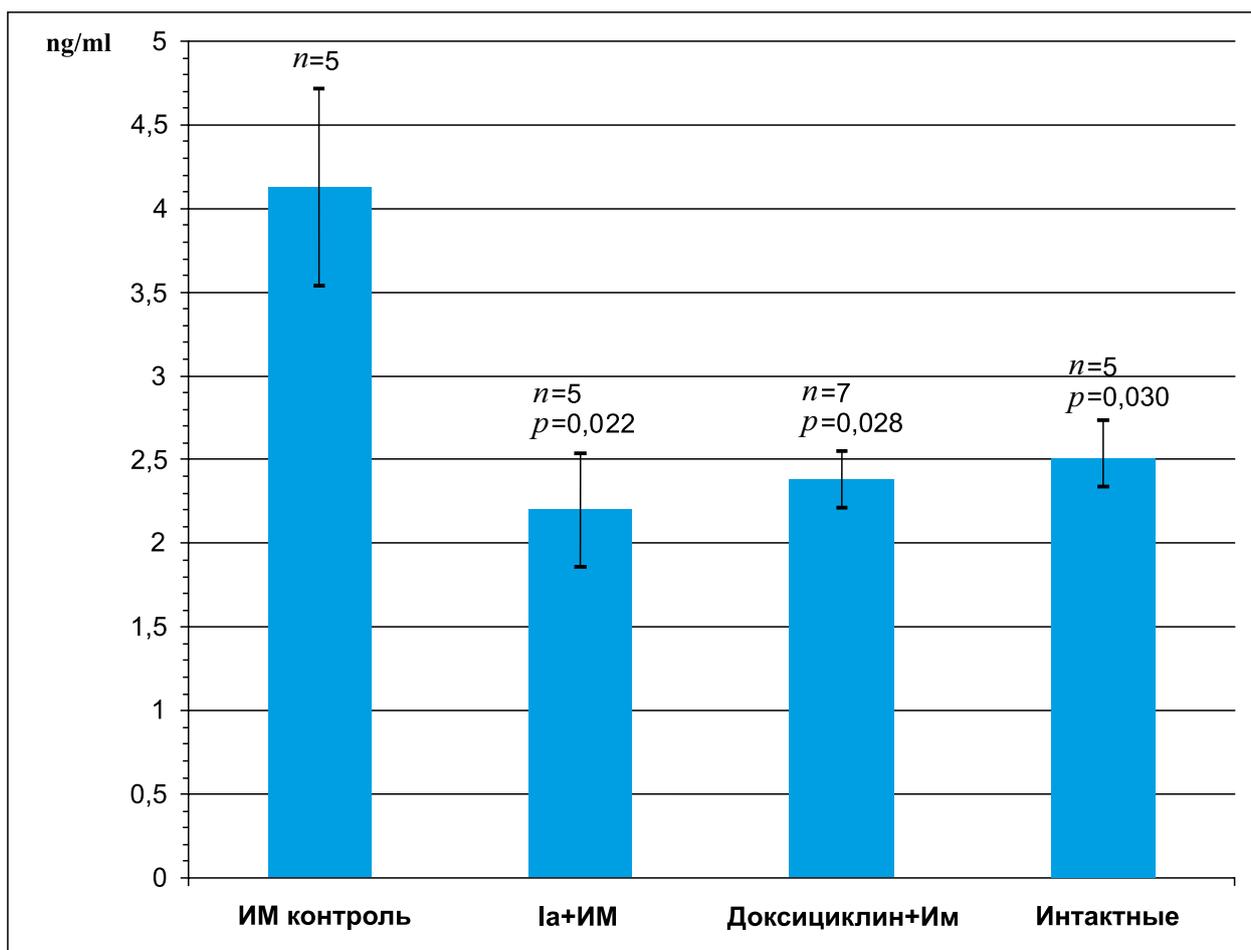


Рис. 2. Влияние соединения Ia на уровень ММП-9 в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда (ИМ).

Примечание: ИМ контроль — острый инфаркт миокарда; Ia+ИМ — соединение Ia+инфаркт миокарда; ДЦ+ИМ — эталонный препарат доксициклин+ инфаркт миокарда

Таблица 1

Влияние доксициклина и соединения Ia на показатели кардиогемодинамики крыс в условиях 60-минутной окклюзии коронарной артерии

Показатель	Группа животных	n	Исходный уровень	Время после окклюзии коронарной артерии, мин					
				3	10	20	30	45	60
КСР, мм	ОИМ	12	1,98±0,12	3,11±0,19 $p_2 < 0,0001$	3,83±0,15 $p_2 < 0,0001$	3,84±0,16 $p_2 < 0,0001$	3,61±0,16 $p_2 < 0,0001$	3,36±0,15 $p_2 < 0,0001$	3,24±0,15 $p_2 < 0,0001$
	ЛО	6	1,86±0,14 $p=0,534$	1,93±0,07 $p=0,001$ $p_2=0,876$	2,02±0,10 $p=0,0002$ $p_2=0,910$	2,01±0,08 $p=0,0002$ $p_2=0,864$	1,90±0,09 $p=0,0002$ $p_2=0,782$	1,81±0,09 $p=0,0002$ $p_2=0,959$	1,85±0,06 $p=0,0002$ $p_2=0,974$
	Доксициклин + ОИМ	9	1,77±0,10 $p=0,100$ $p_1=0,143$	2,65±0,16 $p=0,241$ $p_1=0,016$ $p_2 < 0,0001$	2,75±0,15 $p=0,007$ $p_1=0,0005$ $p_2 < 0,0001$	2,80±0,11 $p=0,004$ $p_1=0,0005$ $p_2 < 0,0001$	2,83±0,12 $p=0,019$ $p_1=0,0003$ $p_2 < 0,0001$	2,89±0,11 $p=0,038$ $p_1=0,0002$ $p_2 < 0,0001$	2,75±0,12 $p=0,034$ $p_1=0,001$ $p_2 < 0,0001$
	Ia + ОИМ	6	1,84±0,07 $p=0,128$ $p_1=0,243$	2,59±0,16 $p=0,845$ $p_1=0,001$ $p_2 < 0,0001$	2,80±0,19 $p=0,008$ $p_1=0,0004$ $p_2 < 0,0001$	2,87±0,21 $p=0,007$ $p_1=0,0004$ $p_2 < 0,0001$	2,82±0,09 $p=0,007$ $p_1=0,0007$ $p_2 < 0,0001$	2,80±0,05 $p=0,037$ $p_1=0,0002$ $p_2 < 0,0001$	2,69±0,08 $p=0,050$ $p_1=0,0008$ $p_2 < 0,0001$
ФВ, %	ОИМ	12	88,4±1,2	67,0±1,6 $p_2 < 0,0001$	57,4±1,7 $p_2 < 0,0001$	58,0±1,7 $p_2 < 0,0001$	63,4±1,6 $p_2 < 0,0001$	64,8±1,6 $p_2 < 0,0001$	67,9±1,3 $p_2 < 0,0001$
	ЛО	6	90,4±1,1 $p=0,253$	90,7±0,9 $p=0,0002$ $p_2=0,999$	90,2±1,1 $p=0,0002$ $p_2=0,997$	90,3±0,9 $p=0,0002$ $p_2=0,963$	91,5±0,8 $p=0,0002$ $p_2=0,999$	91,3±1,0 $p=0,0002$ $p_2=0,996$	90,4±1,2 $p=0,0002$ $p_2=0,983$
	Доксициклин + ОИМ	9	91,4±0,7 $p=0,297$ $p_1=0,807$	71,6±2,8 $p=0,378$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$	69,9±2,0 $p=0,0006$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$	69,5±0,8 $p=0,002$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$	68,0±1,7 $p=0,083$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$	69,4±1,8 $p=0,100$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$	72,6±1,5 $p=0,107$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$
	Ia+ОИМ	6	90,5±0,8 $p=0,456$ $p_1=0,965$ $p_2 < 0,0001$	68,7±2,3 $p=0,616$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$	67,2±1,5 $p=0,002$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$	68,9±2,1 $p=0,001$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$	70,8±1,5 $p=0,020$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$	70,9±2,2 $p=0,078$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$	72,3±1,4 $p=0,063$ $p_1=0,0001$ $p_2 < 0,0001$

Примечание: p – вероятность ошибки I рода по отношению к контролю с инфарктом миокарда; p_1 – по отношению к ложнооперированному контролю; p_2 – по отношению к исходному уровню.

препарату доксициклина. Выбор доксициклина в качестве эталонного препарата основан на том, что тетрациклины, в частности доксициклин, помимо собственно антибактериальной активности, обладают рядом плеiotропных эффектов, в том числе и способностью блокировать гиперпродукцию ММП-2 и ММП-9 в ишемизированном миокарде и тем самым препятствовать раннему постинфарктному ремоделированию миокарда [4, 8]. Не менее важно и то, что доксициклин является первым лекарственным средством, обладающим свойствами ингибитора ММП, которое было разрешено FDA к применению в клинике по этим показаниям [15].

В следующей серии экспериментов оценивали способность соединения-лидера (Ia) препятствовать ремоделированию миокарда в острейшую фазу экспериментального инфаркта миокарда. Показано, что одномоментная перевязка коронарной артерии в контрольной группе животных повлекла за собой выраженные изменения систолической функции левого желудочка. На третьей минуте после окклюзии коронарного сосуда конечно-систолический размер (КСР) левого желудочка увеличился с 1,98 до 3,11 мм;

фракция выброса (ФВ) уменьшилась с 88,40 до 67,00%. Фракция укорочения (ФУ) снизилась с 53,17 до 32,27%. Этот процесс динамически нарастает во времени и достигает своего максимума в период с 10-й по 20-ю минуту после перевязки. Так, например, к 20-й минуте КСР увеличился с 1,98 до 3,84 мм, а ФВ уменьшилась с 88,4 до 58,0%. В период с 30-й по 60-ю минуту от момента перевязки коронарной артерии отмечено постепенное относительное улучшение показателей, характеризующих систолическую функцию левого желудочка, однако все они статистически значимо отличались от исходного уровня (табл. 1).

В группе животных ($n=9$), получавших доксициклин (40 мг/кг, *per os*), одномоментная перевязка коронарной артерии также влекла за собой снижение систолической функции левого желудочка сердца, однако в первые 20 мин от момента начала ишемии интенсивность этого процесса была статистически значимо ниже (табл. 1, рис. 3, 4). Так, например, к 20-й минуте ишемии у контрольных животных КСР увеличивался с 1,98 до 3,84 мм, т. е. практически в 2 раза, тогда как у животных, получавших доксициклин, увеличение КСР составило менее 60% (соответственно,

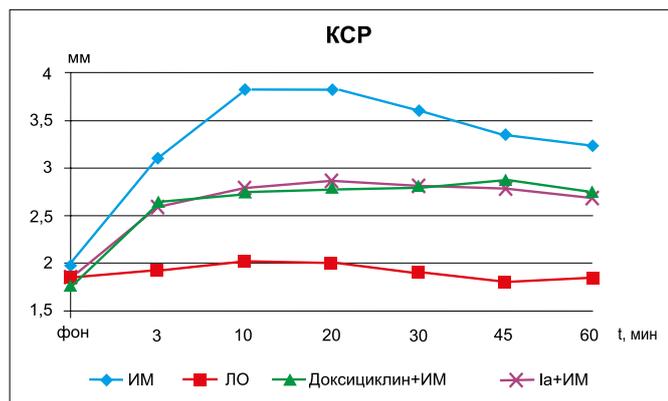


Рис. 3. Влияние соединения Ia на динамику изменения конечно-систолического размера (КСР) у крыс в острой фазе инфаркта миокарда.

Примечание: ИМ – острый инфаркт миокарда (контроль); ЛО – ложнооперированные животные; ДЦ+ИМ – эталонный препарат доксициклин+инфаркт миокарда; Ia+ИМ – соединение Ia+инфаркт миокарда

с 1,77 до 2,80 мм) — различия статистически значимы ($p=0,004$) (табл. 1, рис. 3). К этому моменту у контрольных животных ФВ снизилась с 88,4 до 58,0%, т. е. на 34%, а у животных, получавших доксициклин — менее чем на 25% (соответственно, с 91,4 до 69,5%) — различия статистически значимы ($p=0,002$) (табл. 1, рис. 4). Начиная с 30-й минуты ишемии, показатели, характеризующие систолическую функцию левого желудочка сердца, в группе животных, получавших доксициклин, статистически значимо не отличались от таковых, зарегистрированных в это же время в контрольной группе.

В группе животных ($n=6$), получавших соединение Ia (30 мг/кг, *per os*), одномоментная перевязка коронарной артерии, так же как в контроле и в группе животных, получавших доксициклин, влекла за собой снижение систолической функции левого желудочка сердца, однако в первые 20 минут от момента начала ишемии интенсивность этого процесса была статистически значимо ниже, чем в контроле (табл. 1, рис. 2-3). Так, например, к 20-й минуте ишемии у контрольных животных КСР увеличивался с 1,98 до 3,84 мм, т. е. практически в 2 раза, тогда как у животных, получавших соединение Ia, увеличение КСР составило, так же как и в случае доксициклина, менее 60% (соответственно, с 1,84 до 2,87 мм),

Литература

1. Гасанов А.Г., Бершова Т.В. Роль изменений внеклеточного матрикса при возникновении сердечно-сосудистых заболеваний. Биомед. химия. 2009; 55: 2: 155–168.
2. Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б., Ионова Е.О., Столярчук В.Н., Сорочкина А.В., Вититнова М.Б., Мирошкина И.А. Доказательство валидности эхокардиографии в модельных экспериментах

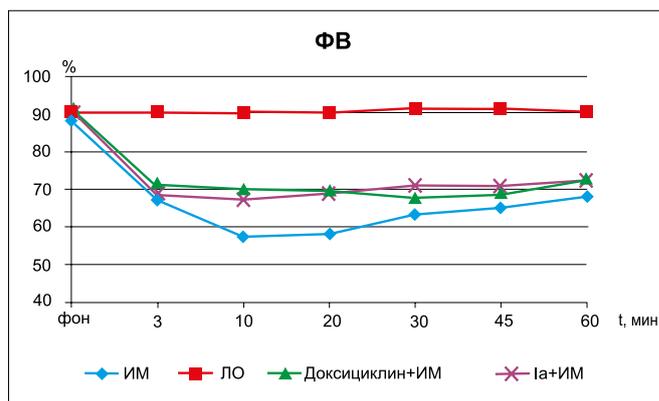


Рис. 4. Влияние соединения Ia на динамику изменения фракции выброса (ФВ) у крыс в острой фазе инфаркта миокарда.

Примечание: ИМ – острый инфаркт миокарда (контроль); ЛО – ложнооперированные животные; ДЦ+ИМ – эталонный препарат доксициклин+инфаркт миокарда; Ia+ИМ – соединение Ia+инфаркт миокарда

различия статистически значимы ($p=0,007$) (табл. 1, рис. 2). К этому моменту у контрольных животных ФВ снизилась с 88,4 до 58,0%, т. е. на 34%, а у животных, получавших соединение Ia — менее чем на 25% (соответственно, с 90,5 до 68,9%) — различия статистически значимы ($p=0,001$) (табл. 1, рис. 3). Если различия в показателях, отражающих систолическую функцию сердца в период максимального падения сократимости миокарда (10–20-я минуты ишемии) между контрольной группой и группой животных, получавших соединение Ia, статистически значимы, то различия в величине КСР и ФВ между группами, получавшими доксициклин и соединение Ia, практически отсутствуют: соответственно $p=0,840$ и $p=0,587$.

Таким образом, в ряду бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот выявлено соединение — лидер: 1-(4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил)сульфонил-L-пролин, — которое по своей способности как препятствовать раннему постинфарктному ремоделированию миокарда, так и подавлять экспрессию ММП-9, как минимум, не уступает эталонному ингибитору металлопротеиназ доксициклину. Полученные данные составляют основу для дальнейшего фармакологического изучения соединения-лидера.

на мелких животных. Бюл. эксп. биол. и медицины. 2016; 161: 3: 416–420.

3. Ali M.A., Fan X., Schulz R. Cardiac sarcomeric proteins: novel intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in heart disease. Trends Cardiovasc. Med. 2011; 21: 4: 112–118.
4. Bench T.J., Jeremias A., Brown D.L. Matrix metalloproteinase inhibitor with tetracyclines for the treatment of coronary artery disease. Pharmacol. Res. 2011; 64: 561–566.

5. *Bencsik P., Pálóczi J., Kocsis G.F., Pipis J., Belec I., Varga Z.V., Csonka C., Görbe A., Csont T., Ferdinandy P.* Moderate inhibition of myocardial matrix metalloproteinase-2 by ilomastat is cardioprotective. *Pharmacol. Res.* 2014; 80: 36–42.
6. *Chang S.A., Chang H.J., Choi S.I., Chun E.J., Yoon Y.E., Kim H.K., Kim Y.J., Choi D.J., Sohn D.W., Helm R.H., Lardo A.C.* Usefulness of left ventricular dyssynchrony after acute myocardial infarction, assessed by a tagging magnetic resonance image derived metric, as a determinant of ventricular remodeling. *Am.J. Cardiol.* 2009; 104: 1: 19–23.
7. *Gallagher G.L., Jackson C.J., Hunyor S.N.* Myocardial extracellular matrix remodeling in ischemic heart failure. *Front. Biosci.* 2007; 12: 1410–1419.
8. *Griffin M.O., Fricovsky E., Ceballos G., Villarreal F.* Tetracyclines: a pleotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am.J. Physiol. Cell. Physiol.* 2010; 299: 539–548.
9. *Henderson K.K., Danzi S., Paul J.T., Leya G., Klein I., Samarel A.M.* Physiological replacement of T3 improves left ventricular function in an animal model of myocardial infarction-induced congestive heart failure. *Circ. Heart Fail.* 2009; 2: 3: 243–252.
10. *Hori M., Nishida K.* Oxidative stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 2009; 81: 3: 457–464.
11. *Hughes B.G., Fan X., Cho W.J., Schulz R.* MMP-2 is localized to the mitochondria-associated membrane of the heart. *Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2014; 306: 5: H764–H770.
12. *Hughes B.G., Schulz R.* Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury. *Basic Res Cardiol* 2014; 109(4):424.
13. *Jugdutt B.J.* The dog model of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Card. Fail.* 2002; 8: 6 Suppl: S472–S475.
14. *Kandasamy A.D., Chow A.K., Ali M.A., Schulz R.* Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc. Res.* 2010; 85: 3: 413–423.
15. *Lindsey M.L.* Matrix Metalloproteinase-9 Post Myocardial Infarction: Breakdowns and Breakthroughs. *Global J. Hum. Anat. Physiol. Res.* 2014; 1: 6–9.
16. *Moshal K.S., Rodriguez W.E., Sen U., Tyagi S.C.* Targeted deletion of MMP-9 attenuates myocardial contractile dysfunction in heart failure. // *Physiol. Res.* — 2008. — Vol. 57, № 3. — P. 379–384.
17. *Shamhart P.E., Meszaros J.G.* Non-fibrillar collagens: key mediators of post-infarction cardiac remodeling? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010; 48: 3: 530–537.
18. *Spinale F.G.* Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 1285–1342.
19. *Tiyyagura S.R., Pinney S.P.* Left ventricular remodeling after myocardial infarction: past, present, and future. *Mt. Sinai J. Med.* 2006; 73: 6: 840–851.
20. *Zhou S.X., Zhou Y., Lei J., Zhang Y.L.* Effects of oxidative stress on ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2008; 28: 11: 2030–2034.