УДК 616.12-008:577.15]-092.9

Изучение влияния иммобилизированных субтилизинов на коронарный кровоток в эксперименте на изолированном сердце крысы

Байкалов Г.И.[1, 2], Князев Р.А.[2], Ершов К.И.[2], Бахарева К.И.[1], Солдатова М.С.[1], Мадонов П.Г.[1, 2]

[1]*НИИ клинической и экспериментальной лимфологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск)*

[2]*ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России*

Study of the immobilized subtilisins influence on coronary blood flow of an isolated rat heart

Baikalov G.I.[1, 2], Knyazev R.A.[2], Ershov K.I.[2], Bakhareva K.I.[1], Soldatova M.S.[1], Madonov P.G.[1, 2]

[1]*Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk)*

[2]*Novosibirsk State Medical University*

АННОТАЦИЯ

Введение. В клинической медицине отмечен феномен: у многих пациентов с ангинозными приступами при проведении коронарографии не выявляется значительных обструктивных процессов в коронарных артериях. Имеют место нарушения коронарной микроциркуляции из-за дисфункции эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Это обстоятельство инициирует поиск новых лекарственных препаратов для фармакологической коррекции вазомоторного статуса коронарных сосудов с целью устранения ишемии миокарда.

Цель. Изучить параметры коронарного потока при перфузии изолированного сердца иммобилизированными субтилизинами (ИС) в разных дозировках.

Материалы и методы. Влияние ИС на коронарный кровоток изучали на модели изолированного сердца крысы по Лангендорфу. Эксперименты проведены на 50 крысах-самцах линии Вистар. Животные были разделены на 5 групп: контрольную (сердца, перфузируемые только раствором Кребса — Хензеляйта) и 4 опытных (1-я — перфузия ИС в концентрации 170 Ед./л; 2-я — перфузия ИС в концентрации 340 Ед./л; 3-я — перфузия ИС в концентрации 500 Ед./л; 4-я — перфузия ИС в концентрации 1000 Ед./л).

Результаты. При перфузии ИС в концентрациях 170 и 340 Ед./л наблюдалось нарастание коронарного потока. При перфузии ИС в концентрации 340 Ед./л был достоверно выражен вазодилатирующий эффект. При перфузии в концентрации 500 и 1000 Ед./л отмечалось уменьшение коронарного потока, что, вероятнее всего, вызвано вазоконстрикцией.

Заключение. При перфузии сердца раствором ИС наблюдается феномен вазомоторной активности коронарных сосудов. Обусловленный ИС вазомоторный эффект имеет дозозависимое и разнонаправленное действие и реализуется, вероятнее всего, посредством аллостерического воздействия на естественный механизм регуляции тонуса коронарных сосудов.

Ключевые слова: иммобилизированный субтилизин, коронарный кровоток, изолированное сердце.

ABSTRACT

Introduction. In clinical medicine, some phenomenon has been noted: in many patients with anginal attacks during coronary angiography, significant obstructive processes in the coronary arteries are not detected. There is impaired coronary microcirculation due to dysfunction of endothelial and smooth muscle cells. This circumstance initiates the

Поступила 08.04.2021
Принята 28.05.2021

Автор, ответственный за переписку
Байкалов Герман Игоревич: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: gbaikalov@yandex.ru

Received 08.04.2021
Accepted 28.05.2021

Corresponding author
Baikalov German Igorevich: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: gbaikalov@yandex.ru

search for new drugs for pharmacological correction of the vasomotor status of coronary vessels in order to eliminate myocardial ischemia.

Aim. To study the parameters of the coronary blood flow during the perfusion of an isolated heart with immobilized subtilisins (IS) in different dosages.

Materials and methods. The effect of IS on coronary blood flow was studied using the Langendorff-perfused rat heart. The experiments were carried out on 50 male Wistar rats. Animals were divided into 5 groups: control (hearts perfused only with Krebs-Henseleit solution) and 4 experimental (1st — perfusion with IS at a concentration of 170 U/l; 2nd — perfusion with IS at a concentration of 340 U/l; 3rd — perfusion with IS at a concentration of 500 U/l; 4th — perfusion with IS at a concentration of 1000 U/l).

Results. An increase in coronary blood flow was observed during perfusion with IS at concentrations of 170 and 340 U/l. With perfusion of IS at a concentration of 340 U/l, the vasodilating effect was significantly expressed. With perfusion at a concentration of 500 and 1000 U/l, a decrease in coronary flow was noted, which is most likely caused by vasoconstriction.

Conclusion. When the heart is perfused with IS solution, the phenomenon of vasomotor activity of the coronary vessels is observed. The vasomotor effect caused by IS has a dose-dependent and multidirectional effect and is realized, most likely, through an allosteric effect on the natural mechanism of regulation of the coronary vessels tone.

Keywords: immobilized subtilisins, coronary blood flow, isolated heart.

ВВЕДЕНИЕ

В клинической медицине отмечен следующий феномен: у многих пациентов с ангинозными приступами при проведении коронарографии не выявляются значительные обструктивные процессы в коронарных артериях. Имеют место нарушения коронарной микроциркуляции из-за дисфункции эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Это обстоятельство инициирует поиск новых лекарственных препаратов для фармакологической коррекции вазомоторного статуса коронарных сосудов с целью ликвидации ишемии миокарда [1].

Коронарная микроциркуляция и коронарный кровоток обеспечивают адекватный метаболизм миокарда. Вазоактивные производные эндотелия, различные метаболические факторы и нейрогормоны передают сосудорасширяющие и вазоконстрикторные сигналы, которые должны быть сбалансированы для поддержания надлежащего тонуса коронарных сосудов, обеспечивающего полноценную коронарную микроциркуляцию [2].

Регуляция коронарного кровотока — довольно сложный процесс, опосредованный множеством механизмов, которые включают внесосудистые сжимающие силы (тканевое давление), давление коронарной перфузии, миогенные, местные метаболические, эндотелиальные, а также нервные и гормональные воздействия. Существует взаимосвязь между диаметром сосуда и величиной миогенного ответа. В связи с этим считается, что миогенный ответ играет важную роль в поддержании базального сосудистого тонуса в сосудистой сети сопротивления. Таким образом,

INTRODUCTION

In clinical medicine, the following phenomenon has been noted: in many patients with anginal attacks during coronary angiography, significant obstructive processes in the coronary arteries are not detected. There are impaired coronary microcirculation due to dysfunction of endothelial and smooth muscle cells. This circumstance initiates the search for new drugs for pharmacological correction of the vasomotor status of coronary vessels in order to eliminate myocardial ischemia [1].

Coronary microcirculation and coronary blood flow ensure adequate myocardial metabolism. Vasoactive endothelial derivatives, various metabolic factors and neurohormones transmit vasodilating and vasoconstrictive signals, which must be balanced to maintain the proper tone of the coronary vessels, ensuring full coronary microcirculation [2].

The regulation of coronary blood flow is a rather complex process mediated by many mechanisms, which include extravascular compressive forces (tissue pressure), coronary perfusion pressure, myogenic, local metabolic, endothelial, as well as neural and hormonal influences. There is a relationship between the diameter of the vessel and the magnitude of the myogenic response. In this regard, the myogenic response is believed to play an important role in maintaining of basal vascular tone in the resistance vasculature. Thus, it is in the presence of this “background” vasomotor tone that nonmyogenic factors bi-directionally affect the regulation of coronary blood flow, which is necessary to balance the delivery of oxygen by the myocardium and oxidative metabolism the latter [3].

Experimental studies of coronary circulation focus on various mechanisms — myogenic, local meta-

именно при наличии этого «фонового» вазомоторного тонуса немиогенные факторы двунаправленно влияют на регуляцию коронарного кровотока, что необходимо для уравновешивания доставки кислорода миокардом и окислительного метаболизма миокарда [3].

Экспериментальные исследования коронарного кровообращения сосредоточены на различных механизмах — миогенных, местных метаболических, эндотелиальных, нервных и гормональных. Установлено, что каждый из этих механизмов может иметь глубокое влияние на перфузию миокарда. По мнению некоторых исследователей до сих пор не ясны общие взаимосвязанные механизмы, ответственные за регуляцию коронарного кровотока [4]. Наряду с этим есть доказательства, что эти механизмы действуют параллельно и даже избыточно [5]. В настоящее время хорошо изучен феномен эндотелий-зависимой дисфункции как основная причина неокклюзионных ишемических состояний.

Эндотелий-зависимая дисфункция является следствием дисбаланса между факторами релаксации эндотелия, такими как оксид азота (NO), и констрикторами эндотелия, такими как эндотелин. Независимая от эндотелия дисфункция основана на тонусе миоцитов [6]. Вазодилататоры локального происхождения играют доминирующую роль в регуляции микрососудистого сопротивления [7].

Сущность фармакологической регуляции эндотелиальной дисфункции коронарных сосудов заключается в устранении вазоконстрикции как прямыми, так и опосредованными механизмами. В этой связи представляется интересным не только поиск новых лекарственных средств, но и установление коронарорасширяющих эффектов у известных, зарегистрированных препаратов.

В России зарегистрирован и используется в клинической практике лекарственный препарат Тромбовазим, обладающий прямым тромболитическим действием. Показания к применению в кардиологии — острый инфаркт миокарда с подъемом зубца ST, во флебологии — хронические заболевания вен [8]. Активное действующее вещество лекарственного препарата Тромбовазим — иммобилизированный субтилизин (ИС). Субтилизин является протеолитическим ферментом, обладающим прямым фибринолитическим действием [9]. Для снижения аллергогенных свойств и увеличения энтеральной биодоступности субтилизина проводится электронно-лучевая иммобилизация фермента на полимерном носителе полиэтиленгликоле [10]. В инbolic, endothelial, nervous and hormonal. It has been established that each of these mechanisms can have a profound effect on myocardial perfusion. According to some researchers, the general interrelated mechanisms responsible for the regulation of coronary blood flow are still not clear [4]. Along with this, there is evidence that these mechanisms operate in parallel and even redundantly [5]. Currently, the phenomenon of endothelium-dependent dysfunction is well studied as the main cause of non-occlusive ischemic conditions.

Endothelium-dependent dysfunction results from an imbalance between endothelial relaxation factors such as nitric oxide (NO) and endothelial constrictors such as endothelin. Endothelium-independent dysfunction is based on the myocyte tone [6]. Vasodilators of local origin play a dominant role in the regulation of microvascular resistance [7].

The essence of the pharmacological regulation of endothelial dysfunction of coronary vessels is the elimination of vasoconstriction by both direct and indirect mechanisms. In this regard, it seems interesting not only to search for new drugs, but also to establish vasodilatory effects for well-known, registered drugs.

In Russia, the drug, Trombovazim, which has a direct thrombolytic effect, is registered and is used in clinical practice. Indications for use in cardiology are acute myocardial infarction with ST elevation, in phlebology — chronic venous diseases [8]. The active ingredient of trombovazim is immobilized subtilisin (IS). Subtilisin is a proteolytic enzyme with a direct fibrinolytic effect [9]. To reduce the allergenic properties and increase the enteral bioavailability of subtilisin, electron-beam immobilization of the enzyme is carried out on a polyethylene glycol polymer carrier [10]. In the drug labeling, there is no indication of its effect on coronary blood flow. Since thrombovazim is positioned as a drug for the treatment of cardiovascular diseases, it seems relevant to evaluate the effect of immobilized subtilisin on coronary circulation in experiments on an isolated rat heart using the Langendorff method [11–13]. The choice of this experimental model is due to the possibility of a direct assessment of the vasomotor action of immobilized subtilisin in the absence of humoral and nervous regulation of the coronary circulation in an isolated heart.

AIM OF THE RESEARCH

To study the parameters of the coronary blood flow during the perfusion of an isolated heart with immobilized subtilisins in different dosages.

струкции по медицинскому применению лекарственного препарата нет указаний о его воздействии на коронарный кровоток. Поскольку Тромбовазим позиционируется как средство для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, представляется актуальным оценить влияние иммобилизированного субтилизина на коронарное кровообращение в экспериментах на изолированном сердце лабораторной крысы по методу Лангендорфа [11–13]. Выбор этой экспериментальной модели обусловлен возможностью прямой оценки вазомоторного действия иммобилизированного субтилизина в условиях отсутствия у изолированного сердца гуморальной и нервной регуляции коронарного кровообращения.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить параметры коронарного потока при перфузии изолированного сердца иммобилизированными субтилизинами в разных дозировках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования. Эксперимент проведен на 50 крысах-самцах линии Вистар массой 280–320 г. Животные находились в условиях вивария на обычном пищевом рационе и свободном доступе к воде и пище, условия содержания и манипуляции с животными соответствовали стандартам, регламентирующим работу с лабораторными животными [14]. Животные были разделены на 5 групп: контрольную (сердца, перфузируемые только раствором Кребса — Хензеляйта) и 4 опытных (1-я — перфузия ИС в концентрации 170 Ед./л; 2-я — перфузия ИС в концентрации 340 Ед./л; 3-я — перфузия ИС в концентрации 500 Ед./л; 4-я — перфузия ИС в концентрации 1000 Ед./л).

Исследуемый препарат — иммобилизированный субтилизин. Использовалась фармацевтическая субстанция лекарственного препарата Тромбовазим (АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», Новосибирск), представляющая собой лиофилизат для последующего растворения. Для экспериментов лиофилизат растворяли в буфере Кребса — Хензеляйта. Концентрация ИС в перфузионном растворе моделировала диапазон доз от однократной терапевтической для энтерального приема с постепенным увеличением до однократной терапевтической при внутривенном введении.

Метод Лангендорфа. Данная экспериментальная модель позволяет детально изучать физиологические и биохимические процессы в сердце, а также внешние воздействия на него в условиях отсутствия системных нейрогенных и гуморальных

MATERIALS AND METHODS

Study design. The experiment was carried out on 50 male Wistar rats weighing 280–320 g. The animals were kept in a vivarium on a normal diet and free access to water and food, the conditions of keeping and manipulating the animals corresponded to the standards for work with laboratory animals [14]. Animals were divided into 5 groups: control (hearts perfused only with Krebs-Henseleit solution) and 4 experimental (1st — perfusion with IS at a concentration of 170 U/l; 2nd — perfusion with IS at a concentration of 340 U/l; 3rd — perfusion with IS at a concentration of 500 U/l; 4th — perfusion with IS at a concentration of 1000 U/l).

The investigated drug is immobilized subtilisin. We used the pharmaceutical substance of the drug, Trombovazim (Siberian Center for Pharmacology and Biotechnology, Novosibirsk), which is a lyophilisate for solution. For experiments, the lyophilisate was diluted in Krebs-Henseleit buffer. The IS concentration in the perfusion solution modeled the dose range from a single therapeutic dose for enteral administration with a gradual increase to a single therapeutic dose for intravenous administration.

Langendorff method. This experimental model makes it possible to study in detail the physiological and biochemical processes in the heart, as well as external influences on it in the absence of systemic neurogenic and humoral factors. The principle of the Langendorff heart is that the perfusion solution enters the aorta through a cannula. The aortic valve is closed by the pressure in the aorta, and the perfusion solution flows only into the coronary arteries. Having passed the microvasculature of the heart, the solution is collected through the heart vein system into the coronary sinus and then enters the right atrium. There are two ways for the outflow of the perfusion solution: through the orifice of the venae cavae and through the tricuspid valve into the right ventricle and then through the pulmonary artery trunk. It follows that the solution does not enter the left chambers of the heart, so you can use sensors or catheters to record the pressure in the left ventricle and heart rate. In Fig. 1 you can see a diagram of the setup for operation on a rat heart isolated according to Langendorff.

According to the technique, for 1 h before the experiment, the animals were injected intraperitoneally with heparin (500 U per one). After decapitation, the skin cover was removed from the chest, the heart was quickly removed and placed in a container with

факторов. Принцип работы сердца по Лангендорфу заключается в том, что перфузионный раствор поступает в аорту через канюлю. Аортальный клапан закрывается за счет давления в аорте, и перфузионный раствор поступает только в коронарные артерии. Пройдя микроциркуляторное русло сердца, раствор собирается по системе вен сердца в коронарный синус и далее поступает в правое предсердие. Существуют два пути оттока перфузионного раствора: через устья полых вен и через трехстворчатый клапан в правый желудочек и далее через ствол легочной артерии. Отсюда следует, что раствор не попадает в левые камеры сердца, поэтому можно использовать датчики или катетеры для регистрации давления в левом желудочке и частоты сердечных сокращений. На рис. 1 представлена схема установки для работы на изолированном по Лангендорфу сердца крысы.

Согласно методике за 1 ч до опыта животным внутрибрюшинно вводили гепарин (500 ЕД на одну особь). После декапитации удаляли кожный покров с грудной клетки, быстро извлекали сердце и помещали его в емкость с охлажденным перфузионным раствором t = 0 °С. После прекращения сокращений выделяли аорту и вводили канюлю. Для исключения попадания пузырьков воздуха в коронарное русло сердце промывали через аортальную канюлю при помощи шприца, заполненного перфузионным раствором. Затем сердце подсоединяли к перфузионной системе. Перфузию проводили через коронарные сосуды при постоянном давлении 80 мм рт. ст. В каче-

a cooled perfusion solution at t = 0°C. After stopping of cardiac beat, the aorta was isolated and a cannula was inserted. To exclude the ingress of air bubbles into the coronary bed, the heart was washed through the aortic cannula using a syringe filled with a perfusion solution. The heart was then connected to a perfusion system. Perfusion was performed through the coronary vessels at a constant pressure of 80 mm Hg. Krebs-Henseleit solution (pH = 7.4, t = 37.5°C) was used as a perfusate. For adequate oxygenation of the heart, the perfusion solution was saturated with carbogen (95% O_2 and 5% CO_2).

In the experimental groups, after 20 min of perfusion against the background of stable work of the heart, the calculated dose of IS was introduced into container *2* (see Fig. 1). The moment of the introduction of IS was designated as the point 0 (zero) minute, at which the coronary blood flow was considered as baseline and was taken as 100%. Further, the perfusion with the test drug continued for 40 min. Changes in coronary blood flow were recorded at 5, 10, 20, 30 and 40 min. In the control group, from 0 to 40 min, perfusion was performed with Krebs-Henseleit solution.

The calculated indicator of coronary blood flow was the volumetric coronary flow rate, which reflects the time interval for the heart to pump the volume of perfusion fluid. On the measuring tube, 1 ml of volume was measured and when the perfusion pump was turned off, the stopwatch was used to determine how many seconds the heart was pumping the volume of perfusion fluid. In fact, coronary blood flow is

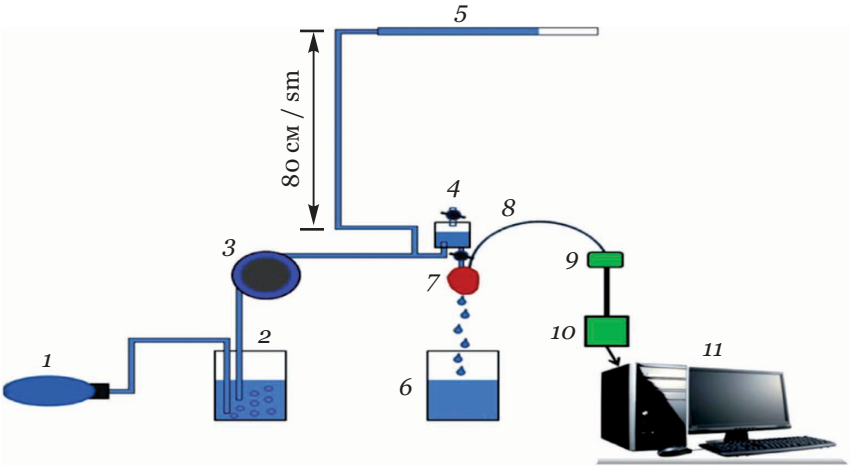

Рис. 1. Схема установки для работы на изолированном сердце по Лангендорфу: *1* — карбоген; *2* — емкость с перфузионным раствором; *3* — перистальтический насос; *4* — термостатируемая газоуловительная камера; *5* — мерная трубка; *6* — емкость для сбора оттекающего перфузата; *7* — сердце; *8* — катетер с латексным баллончиком; *9* — цифровой датчик давления; *10* — аналогово-цифровой преобразователь; *11* — персональный компьютер

Fig. 1. Installation diagram for working on an isolated heart according to Langendorff: *1* — carbogen; *2* — container with perfusion solution; *3* — peristaltic pump; *4* — thermostatically controlled gas trapping chamber; *5* — measuring tube; *6* — container for collecting the outflowing perfusate; *7* — heart; *8* — catheter with a latex balloon; *9* — digital pressure sensor; *10* — analog to digital converter; *11* — personal computer

стве перфузата использовался раствор Кребса — Хензеляйта (pH = 7.4, t = 37.5 °C). Для адекватной оксигенации сердца перфузионный раствор насыщался карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2).

В опытных группах по истечении 20 мин перфузии на фоне стабильной работы сердца в емкость 2 (см. рис. 1) вносилась расчетная доза ИС. Момент введения ИС обозначался как точка 0 (нулевая) минута, в которой коронарный поток считался исходным и принимался за 100 %. Далее перфузия исследуемым препаратом продолжалась в течение 40 мин. Изменения коронарного потока фиксировались на 5, 10, 20, 30 и 40-й минутах. В контрольной группе с 0-й по 40-ю минуту перфузия производилась раствором Кребса — Хензеляйта.

Расчетным показателем коронарного кровотока выступала объемная скорость коронарного потока, отражающая, за какой промежуток времени сердце прокачивает объем перфузионной жидкости. На мерной трубке отмеряли 1 мл объема и при отключении перфузионного насоса по секундомеру определяли, за сколько секунд сердце прокачивает объем перфузионной жидкости. Фактически коронарный кровоток представляет собой соотношение объем/время (мл/мин). Далее значения вносили в таблицу Excel, и программа пересчитывала значения коронарного потока в минуты (мл/мин). Поскольку абсолютные значения представляют собой индивидуальную величину у каждого животного (размер сердца, объем сосудистого русла), динамику коронарного потока оценивали в относительных единицах (%) и производили пересчет в минуты (мл/мин).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ StatPlus Pro 7.3.0. Проверку нормальности распределения данных в группах выполняли с помощью критерия Колмогорова — Смирнова. Статистическую значимость полученных результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для связанных выборок (до введения и после введения исследуемого компонента) при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе при перфузии раствором Кребса — Хензеляйта отмечали нарастание коронарного потока с 5-й по 20-ю минуту (от 2 до 10 %), а далее наблюдалось плавное снижение до 7 % от исходного.

В опытной группе 1 (ИС в концентрации 170 Ед./л) не было выявлено достоверных отличий по сравнению с контрольной группой, но

the volume/time ratio (ml/min). Then the values were entered into an Excel spreadheet, and the program recalculated the values of the coronary blood flow in minutes (ml/min). Since the absolute values represent an individual value for each animal (heart size, volume of the vascular bed), the dynamics of the coronary flow was estimated in relative units (%) and recalculated in minutes (ml/min).

The results were statistically processed using the StatPlus Pro 7.3.0 statistical software package. The normal distribution of data in the groups was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. The statistical significance of the obtained results was assessed using the Student's t-test for related samples (before and after administration of the studied component) at a significance level of $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

In the control group, with perfusion with Krebs-Henseleit solution, an increase in coronary blood flow from 5 to 20 min (from 2 to 10%) was noted, and then a gradual decrease to 7% from baseline was observed.

In the 1st experimental group (IS at a concentration of 170 U/l), there were no significant differences compared with the control group, but there was an increase in coronary blood flow after 5 min by 3% ($p > 0.05$) and after 20 min by 12% ($p > 0.05$) (Fig. 2).

In the 2nd experimental group (IS at a concentration of 340 U/l), from the 5th to the 40th min of perfusion, the coronary blood flow significantly increased ($p < 0.05$), reaching its maximum at the 20th min of perfusion (increase of 23%) compared with the control group (Fig. 3).

In the 3rd experimental group (IS at a concentration of 500 U/l), there was a primary increase in coronary blood flow by the 5th min by 4% ($p > 0.05$), and then a significant decrease in the coronary blood flow from the 10th to 40th min of perfusion by 10% relatively to the control group (Fig. 4).

In the 4th experimental group (IS at a concentration of 1000 U/l), a gradual decrease in coronary blood flow from the 10th to the 40th min by 10–12% ($p < 0.05$) was observed relatively to the control group. The maximum decrease in coronary blood flow was noted at the 30th min of perfusion (Fig. 5).

By its physiological nature, the volume of the coronary circulation reflects the volume of the coronary bed, which directly depends on the tone of the coronary vessels. When the isolated heart was perfused with IS solution at a concentration of 170 and 340 U/l, an increase in coronary blood flow and, accordingly, a vasodilating effect of IS were noted. At a concentration of 340 U/l, this effect was clearly

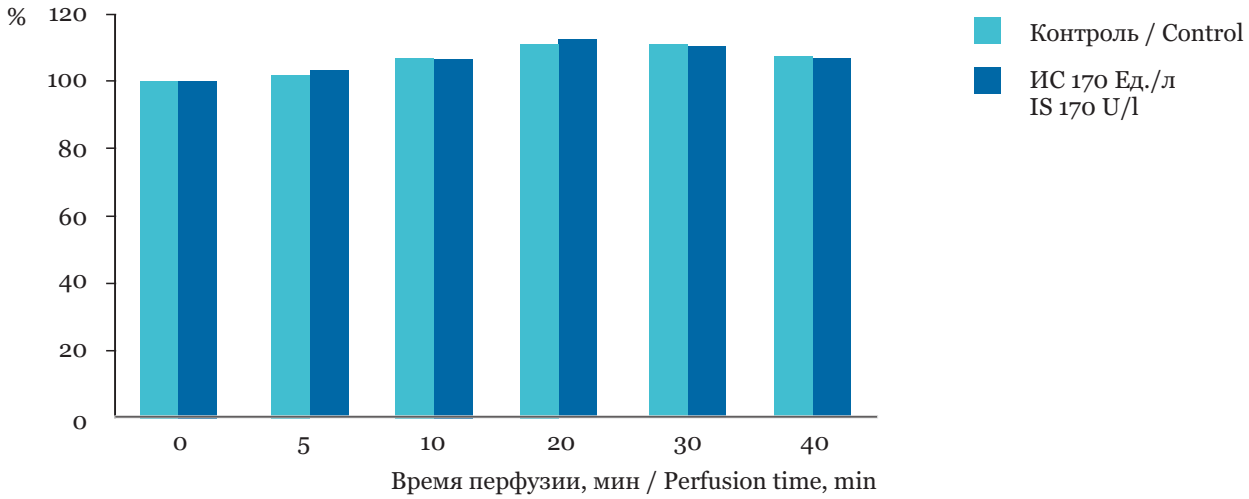

Рис. 2. Изменение коронарного потока при перфузии раствором ИС в концентрации 170 Ед./л по сравнению с контрольной группой
Fig. 2. Changes in coronary blood flow during perfusion with IS solution at a concentration of 170 U/l compared with the control group

было отмечено нарастание коронарного потока через 5 мин на 3 % ($p > 0.05$) и через 20 мин на 12 % ($p > 0.05$) (рис. 2).

В опытной группе 2 (ИС в концентрации 340 Ед./л) с 5-й по 40-ю минуту перфузии коронарный поток достоверно увеличивался ($p < 0.05$), достигая своего максимума на 20-й минуте перфузии (прирост на 23 %) по сравнению с группой контроля (рис. 3).

В опытной группе 3 (ИС в концентрации 500 Ед./л) отмечали первичное увеличение коронарного потока к 5-й минуте на 4 % ($p > 0.05$), а затем достоверное снижение коронарного потока с 10-й по 40-ю минуту перфузии на 10 % относительно группы контроля (рис. 4).

pronounced (an increase of 23% at the 20th min) and statistically significant. With an increase in the concentration of IS to 500 and 1000 U/l, there was a decrease in the coronary circulation, which indicates an increase in the contractile activity of the coronary vessels. Thus, we have established the phenomenon of vasomotor activity in relation to coronary vessels under the action of IS. This effect is dose-dependent and multidirectional. In modern physiology and pharmacology, there is no information on the presence of specific IS receptors in coronary vessels. Most likely, the vasomotor effect caused by IS under conditions of perfusion of an isolated heart is realized through an allosteric influence on the endothelial mechanism of regulation of the coronary vessels

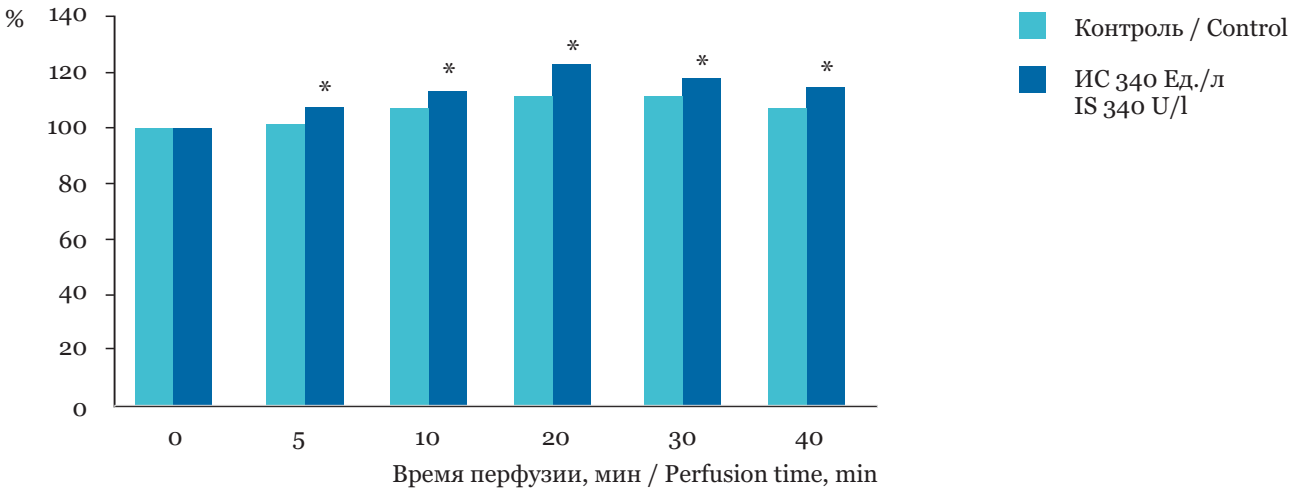

Рис. 3. Изменение коронарного потока при перфузии раствором ИС в концентрации 340 Ед./л по сравнению с контрольной группой (*$p < 0.05$)
Fig. 3. Changes in coronary blood flow during perfusion with IS solution at a concentration of 340 U/l compared with the control group (*$p < 0.05$)

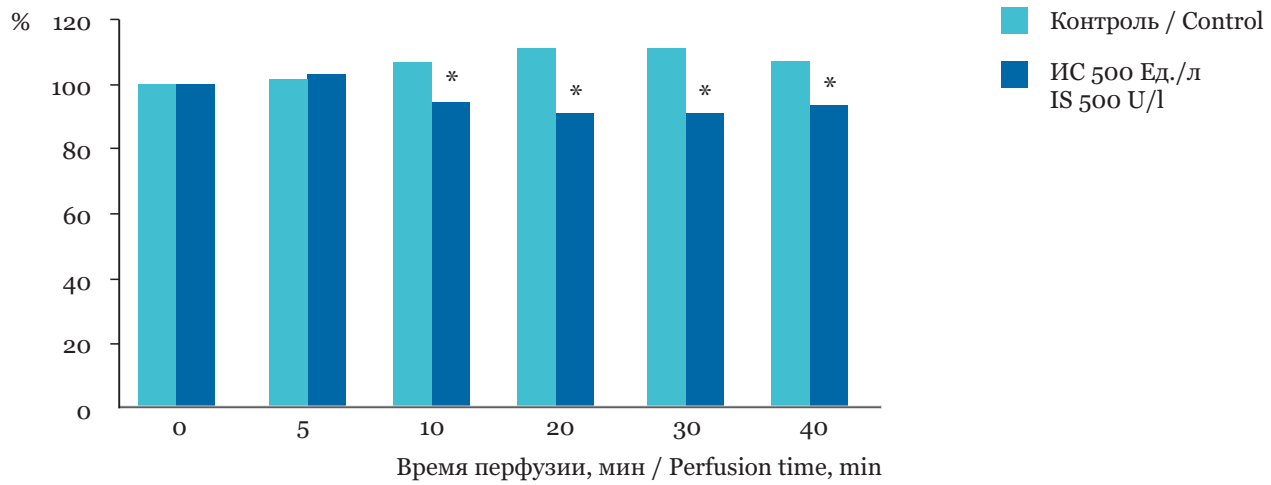

Рис. 4. Изменение коронарного потока при перфузии раствором ИС в концентрации 500 Ед./л по сравнению с контрольной группой (*$p < 0.05$)
Fig. 4. Changes in coronary blood flow upon perfusion with IS solution at a concentration of 500 U/l compared with the control group (*$p < 0.05$)

В опытной группе 4 (ИС в концентрации 1000 Ед./л) отмечали постепенное снижение коронарного потока с 10-й по 40-ю минуту на 10–12 % ($p < 0.05$) относительно группы контроля. Максимальное снижение коронарного потока было отмечено на 30-й минуте перфузии (рис. 5).

По своей физиологической сущности объем коронарного кровообращения отражает объем коронарного русла, который напрямую зависит от тонуса коронарных сосудов. При перфузии изолированного сердца раствором ИС в концентрации 170 и 340 Ед./л отмечали нарастание коронарного потока и, соответственно, вазодилатитone. The study of these mechanisms is planned in the next experiments.

CONCLUSION

The data obtained during the experiment lead to the following conclusions:

1. The phenomenon of vasomotor activity of coronary vessels due to the action of IS was established.

2. The vasomotor effect of IS has a dose-dependent and multidirectional effect.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

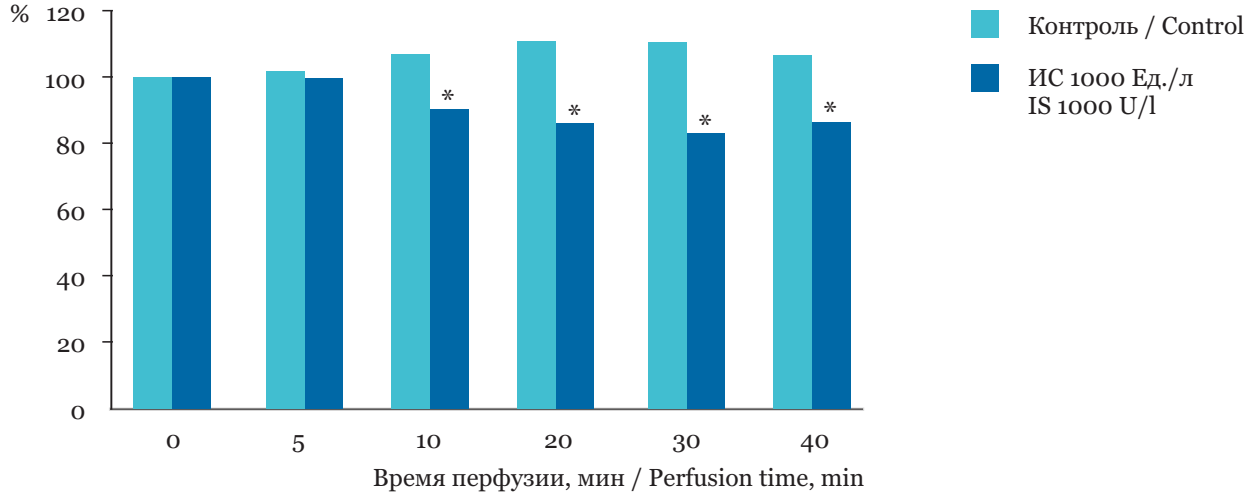

Рис. 5. Изменение коронарного потока при перфузии раствором ИС в концентрации 1000 Ед./л по сравнению с контрольной группой (*$p < 0.05$)
Fig. 5. Changes in coronary blood flow during perfusion with IS solution at a concentration of 1000 U/l compared with the control group (*$p < 0.05$)

рующий эффект ИС. При концентрации 340 Ед./л этот эффект был отчетливо выражен (прирост на 23 % на 20-й минуте) и статистически достоверен. При увеличении концентрации ИС до 500 и 1000 Ед./л происходило снижение коронарного кровообращения, что указывает на повышение сократительной активности коронарных сосудов. Таким образом, нами установлен феномен вазомоторной активности по отношению к коронарным сосудам при действии ИС. Этот эффект является дозозависимым и разнонаправленным. В современной физиологии и фармакологии нет сведений о наличии в коронарных сосудах специфических рецепторов к ИС. Вероятнее всего, вазомоторный эффект, вызываемый ИС в условиях перфузии изолированного сердца, реализуется посредством аллостерического воздействия на эндотелиальный механизм регуляции тонуса коронарных сосудов. Изучение этих механизмов планируется в следующих экспериментах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные, полученные в ходе проведенного эксперимента, позволяют сделать следующие выводы:

1. Установлен феномен вазомторной активности коронарных сосудов, обусловленный действием ИС.

2. Вазомоторный эффект ИС имеет дозозависимое и разнонаправленное действие.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vancheri F., Longo G., Vancheri S., Henein M. Coronary microvascular dysfunction // J. Clin. Med. 2020. Vol. 9 (9): 2880. doi: 10.3390/jcm9092880.
2. Cziráki A., Lenkey Z., Sulyok E., Szokodi I., Koller A. L-arginine-nitric oxide-asymmetric dimethylarginine pathway and the coronary circulation: translation of basic science results to clinical practice // Front. Pharmacol. 2020. Vol. 11: 569914. doi: 10.3389/fphar.2020.569914.
3. Goodwill A.G., Dick G.M., Kiel A.M., Tune J.D. Regulation of coronary blood flow // Compr. Physiol. 2017. Vol. 7 (2). P. 321–382. doi: 10.1002/cphy.c160016.
4. Tune J.D. Coronary circulation // Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease. 2014. Vol. 6 (3). P. 1–189. doi: 10.4199/C00111ED1V01Y201406ISP054.
5. Duncker D.J., Bache R.J. Regulation of coronary blood flow during exercise // Physiol. Rev. 2008. Vol. 88 (3). P. 1009–1086. doi: 10.1152/physrev.00045.2006.
6. Konst R.E., Guzik T.J., Kaski J.C., Maas A.H.E.M., Elias-Smale S.E. The pathogenic role of coronary microvascular dysfunction in the setting of other cardiac or systemic conditions // Cardiovasc. Res. 2020. Vol. 116 (4). P. 817–828. doi: 10.1093/cvr/cvaa009.
7. Deussen A., Ohanyan V., Jannasch A., Yin L., Chilian W. Mechanisms of metabolic coronary flow regulation // J. Mol. Cell. Cardiol. 2012. Vol. 52 (4). P. 794–801. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.10.001.
8. Мадонов П.Г., Киншт Д.Н., Ершов К.И., Шилова М.А., Соловьев О.Н. Опыт клинического применения нового лекарственного препарата Тромбовазим® в сосудистой хирургии // Ангиология и сосудистая хирургия. 2015. Т. 21, № 1. С. 99–104.
9. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Киншт Д.Н., Кихтенко Н.В. Таргетная фармакодинамика субтилизинов // Сиб. науч. мед. журн. 2016. Т. 36, № 4. С. 15–23.
10. Фармацевтическая композиция, обладающая тромболитическими, противовоспалительными и цитопротективными свойствами: Патент РФ № 2213557 / А.В. Артамонов, Е.И. Верещагин, О.В. Гришин, А.В. Троицкий. Опубликовано: 10.10.2003.

REFERENCES

1. Vancheri F., Longo G., Vancheri S., Henein M. (2020). Coronary microvascular dysfunction. *J. Clin. Med., 9 (9)*: 2880. doi: 10.3390/jcm9092880.
2. Cziráki A., Lenkey Z., Sulyok E., Szokodi I., Koller A. (2020). L-arginine-nitric oxide-asymmetric dimethylarginine pathway and the coronary circulation: translation of basic science results to clinical practice. *Front. Pharmacol., 11*: 569914. doi: 10.3389/fphar.2020.569914.
3. Goodwill A.G., Dick G.M., Kiel A.M., Tune J.D. (2017). Regulation of coronary blood flow. *Compr. Physiol., 7 (2),* 321–382. doi: 10.1002/cphy.c160016.
4. Tune J.D. (2014). Coronary circulation. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease, 6 (3),* 1–189. doi: 10.4199/C00111ED1V01Y201406ISP054.
5. Duncker D.J., Bache R.J. (2008). Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol. Rev., 88 (3),* 1009–1086. doi: 10.1152/physrev.00045.2006.
6. Konst R.E., Guzik T.J., Kaski J.C., Maas A.H.E.M., Elias-Smale S.E. (2020). The pathogenic role of coronary microvascular dysfunction in the setting of other cardiac or systemic conditions. *Cardiovasc. Res., 116 (4),* 817–828. doi: 10.1093/cvr/cvaa009.
7. Deussen A., Ohanyan V., Jannasch A., Yin L., Chilian W. (2012). Mechanisms of metabolic coronary flow regulation. *J. Mol. Cell. Cardiol., 52 (4),* 794–801. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.10.001.
8. Madonov P.G., Kinsht D.N., Ershov K.I., Shilova M.A., Solov'ev O.N. (2015). Clinical experience of the new drug, Trombovazim® in vascular surgery. *Angiology and Vascular Surgery, 21 (1)*, 99–104. In Russ.
9. Madonov P.G., Mishenina S.V., Kinsht D.N., Kikhtenko N.V. (2016). Targeted pharmacodynamics of subtilisins. *The Siberian Scientific Medical Journal, 36 (4),* 15–23.
10. *Pharmaceutical composition with thrombolytic, anti-inflammatory and cytoprotective properties*: RF Patent No. 2213557 / A.V. Artamonov, E.I. Vereshchagin, O. V. Grishin, A.V. Troitsky. Published: 10.10.2003.
11. Minasyan S.M., Galagudza M.M., Sonin D.L. et al. (2009). Isolated rat heart perfusion technique. *Region-*

11. Минасян С.М., Галагудза М.М., Сонин Д.Л. и др. Методика перфузии изолированного сердца крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2009. Т. 8, № 4 (32). С. 54–59.
12. Bell R.M., Mocanu M.M., Yellon D.M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion // J. Mol. Cell. Cardiol. 2011. Vol. 50 (6). P. 940–950.
13. Watanabe M., Okada T. Langendorff perfusion method as an ex vivo model to evaluate heart function in rats // Methods Mol. Biol. 2018. Vol. 1816. P. 107–116. doi: 10.1007/978-1-4939-8597-5_8.
14. Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики: Приказ Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199н. URL: http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201608160001?index=0&rangeSize=1. Дата обращения: 08.06.2021.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Байкалов Герман Игоревич — аспирант кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск).

Князев Роман Александрович — канд. биол. наук, ассистент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ершов Константин Игоревич — канд. биол. наук, ассистент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Бахарева Ксения Игоревна — младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск).

Солдатова Марина Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск).

Мадонов Павел Геннадьевич — д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; руководитель отдела экспериментальной фармакологии НИИ клинической и экспериментальной лимфологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск).

Образец цитирования: Байкалов Г.И., Князев Р.А., Ершов К.И., Бахарева К.И., Солдатова М.С., Мадонов П.Г. Изучение влияния иммобилизированных субтилизинов на коронарный кровоток в эксперименте на изолированном сердце крысы // Journal of Siberian Medical Sciences. 2021. № 3. С. 56–65.

al Blood Circulation and Microcirculation, 8, 4 (32), 54–59. In Russ.
12. Bell R.M., Mocanu M.M., Yellon D.M. (2011). Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol., 50 (6),* 940–950.
13. Watanabe M., Okada T. (2018). Langendorff perfusion method as an ex vivo model to evaluate heart function in rats. *Methods Mol. Biol., 1816*, 107–116. doi: 10.1007/978-1-4939-8597-5_8.
14. On the approval of the Rules of Good Laboratory Practice: Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated 01.04.2016 No. 199н. Retrieved on June 8, 2021 from http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201608160001?index=0&rangeSize=1.

ABOUT THE AUTHORS

Baikalov German Igorevich — Post-graduate Student, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Junior Researcher, Laboratory for Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk).

Knyazev Roman Aleksandrovich — Cand. Sci. (Biol.), Assistant, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University.

Ershov Konstantin Igorevich — Cand. Sci. (Biol.), Assistant, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University.

Bakhareva Ksenia Igorevna — Junior Researcher, Laboratory for Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk).

Soldatova Marina Sergeevna — Junior Researcher, Laboratory for Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk).

Madonov Pavel Gennad'evich — Dr. Sci. (Med.), Assistant Professor, Head, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Head, Division of Experimental Pharmacology, Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk).

Citation example: Baikalov G.I., Knyazev R.A., Ershov K.I., Bakhareva K.I., Soldatova M.S., Madonov P.G. (2021). Study of the immobilized subtilisins influence on coronary blood flow of an isolated rat heart. *Journal of Siberian Medical Sciences, 3,* 56–65.