

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ ХИМАЗЫ ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

К. мед. н. С.А. ЛАЗАРЕВА, профессор В.И. ВОЛКОВ

Институт терапии им. А.Т. Малой АМН Украины, Харьков

Представлены новые литературные сведения о протеолизе, в частности сериновой протеиназе — химазе человека, играющей важную роль в сердечной функции. Приведенные данные могут быть использованы в разработке стратегий лечения сердечной недостаточности при ишемической болезни сердца.

Одним из патогенетических направлений лечения больных с постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью (СН) является использование ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ). Препараты этой группы блокируют активность основных нейрогуморальных систем, симпатико-адреналовой и особенно ренин-ангиотензин-альдостероновой (РААС), участвующих в патогенезе острого инфаркта миокарда и постинфарктного ремоделирования миокарда и вызываемой им СН.

После перенесенного инфаркта миокарда активация локальной ренин-ангиотензиновой системы в миокарде является важным фактором его систолической и диастолической дисфункции. Этому предшествует повышение активности тканевой РААС в миокарде больных, перенесших инфаркт миокарда [1]. Морфологически это подтверждается повышением плотности химазных антител в тучных клетках в зоне некроза, которая коррелирует с АП-образующей активностью не только при остром инфаркте миокарда, но и при постинфарктном кардиосклерозе. Клинико-экспериментальные параллельные исследования выявили, что клинические признаки СН коррелируют с прогрессирующим повышением АП-образования в миокарде [2], при этом кардиомиоциты теряют способность реагировать на стимуляцию ангиотензином II (АП).

Предпосылкой для изучения химазы во взаимосвязи с ингибиторами АПФ явились следующие факты: ангиотензинообразующие ферменты химаза и АПФ являются нетрипсиноподобными протеазами, они — ферменты серингистидинового ряда (т.е. в их активном центре содержатся серин и гистидин, которые и осуществляют катализ). Они обладают абсолютной специфичностью по отношению к разрываемой ими связи фенилаланина и/или тирозина. Но если два фермента катализируют одну и ту же связь в одном и том же субстрате, то возникает вопрос: чем определяется очередность их действия? Оба фермента — АПФ и химаза — работают слаженно в молодом и здоровом организме. При этом наблюдается оптимальная активность АПФ и минимальная — химазы. Но как только это равновесие нарушается (стресс, возраст, атеросклероз и т.д.), появляются признаки патологии: превалирующую роль начинает играть альтернативный путь образования АП, активность химазы повышается и именно она играет важную роль в развитии сердечно-сосудистой патологии. Вполне возможно,

что ренин-ангиотензиновая система и кинины плазмы — это те рычаги, с помощью которых простагландины осуществляют чрезвычайно сложную и тонкую регуляцию артериального давления.

Каковы взаимоотношения между иАПФ и химазой? По-видимому, реципрокные. Известно, что активный центр ферментов представляет собой гидрофобную полость, состоящую из двух участков, один из которых каталитический, а второй выполняет функцию «узнавания и сближения» с субстратом. Показана прямая зависимость: чем больше гидрофобность вещества, тем лучше происходит взаимодействие его с ферментами. В соответствии с этим обладающий высокой липофильностью ингибитор легче проходит через эффекты «узнавания и сближения», подменяя субстрат, полностью или частично занимая место в активном центре АПФ. При применении ингибиторов активность АПФ значительно снижается, в результате чего должна повыситься концентрация ангиотензина I (АI), который является субстратом для химазы, активность которой вначале может возрасти. В результате снижения образования АП снижается активация ангиотензиновых рецепторов сосудов и коры надпочечников, а также уменьшается стимулирующее влияние на симпатическую секрецию и иннервацию, что влечет за собой уменьшение высвобождения альдостерона и содержания ионов натрия, которые являются неспецифическими активаторами АПФ и, возможно, химазы. Ингибитор АПФ замедляет инактивацию брадикинина, вызывающего сосудорасширяющий эффект (путем образования NO, простагландина E1 и др.). Результатом всех этих эффектов, вместе взятых, является тот факт, что активность химазы может нормализоваться, что в конечном итоге ведет к снижению действия данного фермента.

Одним из важных вопросов о роли АП в патофизиологии СН является следующий: вносят ли вклад в локальное образование АП в сердце другие ферменты в дополнение к АПФ?

Как предполагают, АП-образующий фермент в сердечной мышце — химаза, химотрипсинподобная сериновая протеаза, которая синтезируется и депонируется в тучных клетках сердечной мышцы и не подвергается непосредственному воздействию ингибиторов АПФ, может играть потенциальную роль в развитии СН [3].

Образование АП в сердце изучено как *in vitro*, так и *in vivo*, но результаты этих экспериментов

противоречивы. Эксперименты *in vitro* с экстрактами, полученными из нормальных сердец, сердец больных [4, 5] или животных [6, 7], погибших от СН, показали, что 80–90% АП-образующей активности представлены химазой. В экспериментах *in vivo* с нормальными [8, 9] или поврежденными вследствие недостаточности собачьими сердцами [10, 11] получены противоположные результаты: более 70% АП-образующей активности принадлежит АПФ, так как подавляется ингибиторами АПФ. Кроме того, было показано [12], что в нормальных человеческих сердцах *in vivo* большая часть АП-образующей активности является производной от АПФ, поскольку она на 90% тормозится ингибиторами АПФ. Однако не были проведены исследования на интактных человеческих сердцах при СН.

Чтобы понять причину противоречивости этих данных, следует обратить внимание на условия проведения экспериментов *in vitro*. Химазная активность регулируется двумя факторами: теми, которые ведут к стимуляции и дегрануляции тучных клеток, и теми, которые тормозят химазную активность, т.е. природными химазными ингибиторами, присутствующими в интерстициальной жидкости. В норме химазы не секретируются и содержатся во внутриклеточных гранулах. Для ее выброса необходимы активация и дегрануляция тучных клеток. Тучные клетки стимулируются при хронических воспалительных состояниях. Иммунореактивность, характерная для химазы, обнаруживается во внеклеточном матриксе при СН, и при этом часть миокардиальных тучных клеток обнаруживается дегранулированной и освободившей химазу [13]. Кроме того, тучные клетки находят в увеличенном количестве в сердце при развитии СН [14, 15]. Во время подготовки экстрактов из ткани сердца в экспериментах *in vitro* тучные клетки разрушаются и внутриклеточная химазы легко достигает своего естественного субстрата — АІ. Это является пусковым моментом для тотальной дегрануляции — ситуации, которая *in vivo* бывает только при тяжелой аллергической тахифилаксии. Таким образом, при этих опытах *in vitro* вклад химазы в образование АП является следствием тяжелой гиперстимуляции. Вызванная химазой конверсия АП приводит к повышению его активности в интерстициальной жидкости. Она содержит и протеазный ингибитор высокой активности, которая теряется в процессе подготовки препарата.

Чтобы воссоздать реальные условия метаболизма АП в интерстиции миокарда была предпринята [16] инкубация экстрактов из человеческого сердца с АІ *in vitro* в присутствии интерстициальной жидкости. При этом химазы в человеческом сердце были сильно заторможены (более 95%). В соответствии с этой более физиологичной экспериментальной моделью большая часть АП-образующей активности представлена АПФ.

Все эти работы подтверждают, что локальное образование АП в сердце в большей степени регулируется АПФ, чем химазой.

Однако синтез специфических ингибиторов химазы и использование их в эксперименте и клинике при СН — важное достижение, позволившее наме-

тить роль тучных клеток и химазы в патогенезе и лечении СН [17]. Так, успешное применение химазного ингибитора SUNC 8257 позволило определить роль миокардиальной химазы в развитии СН, вызванной в эксперименте индуцированной тахикардией у собак. В этом эксперименте Т. Matsumoto [17] было показано, что у собак, подвергавшихся в течение трех недель рецидивирующей желудочковой тахикардии, развился значительный интерстициальный фиброз и, как следствие, СН. В отличие от этого у собак, леченных химазным ингибитором, в меньшей степени были выражены морфологические изменения и диастолическая дисфункция миокарда. Авторы предположили, что выраженный антифибротический эффект мог зависеть от уменьшения АП-образования. Однако лечение химазным ингибитором оказывало малый эффект на уровень сердечного АП (18%), в то время как объем фракции коллагена, характеризующий уровень фиброза, был значительно снижен (60%).

Таким образом, было показано, что индуцированный химазой тканевый фиброз не мог быть только следствием АП-образования. Эти данные согласуются с концепцией, что АПФ играет превалирующую роль в образовании АП, и подтверждают, что химазоингибиторный антифибротический эффект имеет место независимо от снижения уровня сердечного АП. Полученные положительные данные о специфичности химазного ингибитора сыграли определенную роль в понимании патофизиологии СН у человека.

М. Hara et al. [18] показали, что тучные клетки играют ключевую роль в прогрессировании СН. Поскольку мышечная химазы не способна образовывать АП, то побочные эффекты, вызываемые тучными клетками, включая фиброз, должны рассматриваться независимо от образования АП химазой. Как утверждают [17], существуют альтернативные пути преобразования химазы, ее вовлечение в продукцию и активную трансформацию фактора роста (TGF-β1) [19, 20] и другие профибротические молекулы.

Кажется очевидным тот факт, что гемодинамический стресс вызывает инфильтрацию или пролиферацию тучных клеток в миокарде и у человека, и у экспериментальных животных [13].

Число химазосодержащих тучных клеток значительно (в 13 раз) повышается в миокарде во время действия водителя ритма, в то же время в группе больных, получавших ингибитор химазы, их число было в 2,9 раза меньше. Было показано, что число тучных клеток отражает влияние ингибитора химазы на их инфильтрацию. Путем блокирования этой инфильтрации химазный ингибитор косвенно уменьшает синтез и секрецию других производных тучных клеток профибротических молекул, таких как триптаза и основной фибропластический ростовой фактор [17].

Было показано [21], что торможение химазной активности препаратом NK 3201, другим потенциальным химазным ингибитором, угнетает дегрануляцию тучных клеток *in vivo*. Эти результаты свидетельствуют о том, что химазы также принимают участие в дегрануляции тучных клеток, и подтверждают, что указанный ингибитор стабилизирует тучные клетки.

Таким образом, данные литературы подтверждают, что большая часть побочных эффектов химазы не имеет отношения к АП-образованию, а относится к индуцированию химазой профибротических механизмов, таких как промотирование инфильтрации тучных клеток, а также освобождение TGF-бета 1. По-видимому, это далеко не все клеточные и молекулярные механизмы, с помощью которых химаза принимает участие в прогрессировании СН.

К ведущим патофизиологическим компонентам ремоделирования миокарда левого желудочка при СН относят гибель части кардиомиоцитов, реализующуюся как некроз и апоптоз; ремоделирование кардиомиоцитов; их «скольжение» друг относительно друга; фиброз миокарда [22–24]. В развитии некроза кардиомиоцитов важная роль отводится таким нейрорегуляторным механизмам, как чрезмерная бета-адренергическая стимуляция, а также избыточная продукция АП [25, 26]. Важным следствием некроза кардиомиоцитов являются индуцируемые гуморальными факторами изменения функции фибробластов с гиперпродукцией коллагеновых волокон и развитием фиброза [23, 27]. Развитию процессов апоптоза в миокарде при СН, вероятно, способствуют изменения экспрессии на кардиомиоцитах генов p53, Bcl-2 и Bax, а также увеличение уровней фактора некроза опухоли TNF-альфа и повышение активности протеолитических ферментов, в частности химазы [5, 23, 27]. По мнению F.G. Spinale [27], дальнейшее изучение проблемы апоптоза кардиомиоцитов может в перспективе послужить основой для формирования нового стратегического подхода к лечению СН.

Протеолиз относится к общим защитным реакциям организма и очень тесно связан с воспалением. Хроническое воспаление является одним из важнейших факторов развития атеросклероза и прогрессирования СН. Связь между этими процессами обеспечивается провоспалительными цитокинами. ИЛ-6 и ФНО-а оказывают отрицательное действие на сократимость миокарда и определяют его ремоделирование [28]. Прогностическая значимость цитокинов в развитии СН более значима, чем гемодинамическая. Отчетливая зависимость между ФНО-а и нарушениями гемодинамики является основой цитокиновой теории СН. Источником ФНО-а являются моноциты, которые мигрируют в миокард при развитии воспалительного процесса. Угнетающее действие его на миокард реализуется путем регуляции продукции NO в сосудистых гладкомышечных клетках, кардиомиоцитах, эндотелиоцитах. Существенную роль играют и тучные клетки (содержащие цитокины), количество которых существенно увеличивается как в зоне некроза, так и в интактных зонах, не только при остром инфаркте миокарда, но и при постинфарктном кардиосклерозе [29]. Продукты их дегрануляции стиму-

лируют пролиферацию фибробластов. Протеиназы, с одной стороны, ослабляют стенку левого желудочка в зоне некроза, разрушая матрикс, с другой — способствуют миграции клеток и продукции внеклеточного матрикса и его фиброзированию.

Кроме того, химазе тучных клеток отводится роль фактора активации матричных металлопротеиназ [30]. Использование двойной иммуноцитохимии показало совместную локализацию в атеросклеротических коронарных артериях металлопротеиназ и тучных клеток, 78% которых были дегранулированы [31]. Дегрануляция тучных клеток и производимые ими нейтральные протеазы в атеросклеротических коронарных артериях вызывают значительное повышение активности металлопротеиназ. Активация матричных металлопротеиназ вызывает протеолитическую дегградацию трополина 1, что угнетает сократительную функцию сердца. Ингибитор химазы химостатин уменьшает повышение активности металлопротеиназ.

Влиянию ингибиторов химазы на сердечную функцию и выживание после инфаркта миокарда была посвящена экспериментальная работа [32], позволившая установить, что сердечная химаза играет важную роль в развитии постинфарктного ухудшения функции миокарда. Предварительное применение ингибитора химазы значительно тормозило ее активность и улучшало показатели сердечной функции. Применению химазного ингибитора в качестве антиремоделирующего средства после инфаркта миокарда была посвящена экспериментальная работа [33]. Химаза, ведущая к тканевому ремоделированию, как ожидают, может быть потенциальной фармацевтической целью. Ее функция *in vivo* все еще не изучена, поскольку не было создано пероральных ингибиторов химазы. Синтезированный недавно химический ингибитор химазы NK 3201 обладает свойствами противодействия неоинтимальной гиперплазии на экспериментальной модели у собак, крыс и хомяков. Пероральное назначение показало быстрое поглощение его всеми органами, за исключением мозга. При инфаркте миокарда, кожной анафилаксии и легочном фиброзе ингибитор химазы вызывал торможение активности химазы, тканевого АП-образования и воспалительной реакции. Эти факты подтверждают, что химаза играет важную роль в развитии воспаления и фиброза.

Вышеприведенные факты являются предпосылкой для продолжения изучения показателей системы протеолиза у больных ишемической болезнью сердца, в частности перенесших инфаркт миокарда и страдающих СН, с целью поиска патогенетической терапии, направленной на профилактику нарушений и коррекцию нарушенного гомеостаза. Утверждение, что химазные ингибиторы могут быть использованы для предотвращения сердечного ремоделирования и прогрессирования СН, нуждается в клиническом подтверждении.

Литература

1. *Ertl G., Hu K.* Anti-ischemic potential of drugs related to the renin-angiotensin system // *J. Cardiovasc. Pharmacol.*— 2001; 37, suppl. 1: S11–20.
2. *Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function* // *G.G. Serneri, M. Boddi, I. Cecioni et al.* // *Circ. Res.*— 2001; 88 (9): 961–968. Comment in: *Circ. Res.*— 2001; 88 (9): 861–863.
3. *Urata H., Healy B., Stewart R.W.* Angiotensin II-forming pathways in normal and failing hearts // *Ibid.*— 1990; 66: 883–890.

4. *Kokkonen J.O., Saarinen J., Kovanen P.T.* Regulation of local angiotensin II formation in the human heart in the presence of interstitial fluid: inhibition of chymase by protease inhibitors of the interstitial fluid and of angiotensin-converting enzyme by Ang-(1-9) formed by heart carboxypeptidase A-like activity // *Circulation.*— 1997; 95: 1455–1463.
5. *Tomaselli G.F., Marban E.* Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure // *Cardiovasc. Res.*— 1999; 42: 270–283.
6. *Balcells E., Meng Q.C., Johnson W.H. Jr.* Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations // *Am. J. Physiol.*— 1997; 273: H1769–H1774.
7. *Akusu M., Urata H., Kinoshita A.* Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs in vitro // *Hypertension.*— 1998; 32: 514–520.
8. *Balcells E., Meng Q.C., Hageman G.* Angiotensin II formation in dog heart is mediated by different pathways in vivo and in vitro // *Am. J. Physiol.*— 1996; 271: H417–H421.
9. *Wei C.C., Meng Q.C., Palmer R.* Evidence for angiotensin-converting enzyme and chymase-mediated angiotensin II formation in the interstitial fluid space of the dog heart in vivo // *Circulation.*— 1999; 99: 2583–2589.
10. *Dell'Italia L.J., Balcells E., Meng Q.C.* Volume-overload cardiac hypertrophy is unaffected by ACE inhibitor treatment in dogs // *Am. J. Physiol.*— 1997; 273: H961–H970.
11. *Su X., Wei C.C., Machida N.* Differential expression of angiotensin converting enzyme and chymase in dogs with chronic mitral regurgitation // *J. Mol. Cell. Cardiol.*— 1999; 31: 1033–1045.
12. *Zisman L.S., Abraham W.T., Meixell G.E.* Angiotensin II formatting in the intact human heart: predominance of the angiotensin-converting enzyme pathway // *J. Clin. Invest.*— 1995; 95: 1490–1498.
13. *Urata H., Boehm K.D., Philip A.* Cellular localization and regional distribution of an angiotensin- II forming chymase in the heart // *Ibid.*— 1993; 91: 1269–1281.
14. *Patella V., Marino I., Arbustini E.* Stem cell factor in mast cells and increased cell density in idiopathic ischemic cardiomyopathy // *Circulation.*— 1998; 97: 971–978.
15. *Frangogiannis N.G., Perrard J.L., Mendoza L.H.* Stem cell factor induction is associated with mast cells accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion // *Ibid.*— 98: 687–698.
16. Role for chymase in heart failure / J.O. Kokkonen, A. Ken, P.T. Linstedt, P.T. Kovanen // *Ibid.*— 2003; 107: 2522–2524.
17. *Matsumoto T., Wada A., Tsutamoto T.* Chymase inhibition prevents cardiac fibrosis and improves diastolic dysfunction in the progression of heart failure // *Ibid.*— 2555–2558.
18. *Hara M., Ono K., Hwang M.W.* Evidence for a role of mast cells in the evolution to congestive heart failure // *J. Exp. Med.*— 2002; 195: 375–381.
19. *Taipale J., Lohi J., Saarinen J.* Human mast cells and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured epithelial and endothelial cells // *J. Biol. Chem.*— 1995; 270: 4689–4696.
20. *Linstedt K.A., Wang Y., Shiota N.* Activation of paracrine TGF-beta 1 signaling upon stimulation and degranulation of rat serosal mast cells: a novel function for chymase // *FASEB J.*— 2001; 15: 1377–1388.
21. *Sukenaga Y., Kamoshita K., Takai S.* Development of the chymase inhibitor as an anti-tissue-remodeling drug: myocardial infarction and some other possibilities / *Jpn. J. Pharmacol.*— 2002; 90: 218–222.
22. *Cohn J.N.* Overview of the treatment of heart failure // *Am. J. Cardiol.*— 1997; 80: 21–61.
23. *Colucci W.S.* Molecular mechanisms of myocardial failure // *Ibid.*— 15L–25L.
24. *Gheorghiade M., Bonov R.O.* Chronic heart failure in the United States a manifestation of coronary artery disease // *Circulation.*— 1998; 97: 282–289.
25. *Lorell B.H., Carabello B.A.* Left ventricular hypertrophy. Pathogenesis, detection and prognosis // *Ibid.*— 2000; 102: 470–479.
26. *Massie B.M.* Heart failure: a time to take stock // *Curr. Opin. Card.*— 1997; 12: 209–217.
27. *Spinale F.G.* Novel approaches to retard ventricular remodeling in heart failure // *Eur. J. Heart Failure.*— 1999; 1: 17–23.
28. *Братуць В.В., Шумаков В.А., Талаева Т.В.* Атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром: патогенез, диагностика, клиника, лечение. — К.: Четверта хвиля, 2004.— 576 с.
29. *Ertl G., Hu K.* Anti-ischemic potential of drugs related to the renin-angiotensin system // *J. Cardiovasc. Pharmacol.*— 2001 Apr; 37, suppl. 1: 11–20.
30. *Urata H., Boehm K.D., Philip A.* Cellular localization and regional distribution of an angiotensin-II forming chymase in the heart // *J. Clin. Invest.*— 1993; 91: 1269–1281.
31. Role of chymase in vascular diseases and the efficacy of chymase inhibitor / D. Jin, S. Takai, M. Yamada et al. // *Nippon Yakurigaku Zasshi.*— 2003 Aug; 122(2): 111–120.
32. *Balcells E., Meng Q.C., Hageman G.* Angiotensin II formation in dog heart is mediated by different pathways in vivo and in vitro // *Am. J. Physiol.*— 1996; 271: H417–H421.
33. *Wei C.C., Meng Q.C., Palmer R.* Evidence for angiotensin-converting enzyme and chymase-mediated angiotensin II formation in the interstitial fluid space of the dog heart in vivo // *Circulation.*— 1999; 99: 2583–2589.

Поступила 25.08.2005

THERAPEUTIC ASPECTS OF CHYMASE ACTIVITY INVESTIGATION IN HEART FAILURE

S.A. Lazareva, V.I. Volkov

Summary

New literature data about proteolysis, in particular serine proteinase, i.e. human chymase, playing an important role in the heart function, are presented. The reported data can be applied to development of the treatment strategies in heart failure in patients with coronary artery disease.