

**Л. М. ДАНИЛЕНКО, М. В. ПОКРОВСКИЙ, И. А. ТАТАРЕНКОВА,
В. В. ЕЛАГИН О. И. БРАТЧИКОВ**

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ С РЕСВЕРАТРОЛОМ ПРИ ИШЕМИЧЕСКИХ/РЕПЕРФУЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ МИОКАРДА: РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА

*Кафедра фармакологии ФГАОУ ВПО «БелГУ», медицинский институт,
факультет лечебного дела и педиатрии,
Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85; тел. (4722) 30-13-73;
кафедра фармакологии, кафедра урологии ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России,
Россия, 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3; тел. (4712) 58-77-66. E-mail: Danilenko_L@bsu.edu.ru*

В статье изложены результаты исследований влияния дистантного прекондиционирования путем создания кратковременной ишемии конечностей и фармакологического прекондиционирования ресвератролом на размер зоны некроза миокарда и уровень тропонина I в сыворотке крови после ишемии-реперфузии. Установлено сопоставимое протективное действие как дистантного, так и фармакологического прекондиционирования. Обсуждаются возможные механизмы защитного действия фармакологического прекондиционирования при ишемии/реперфузии. Прекондиционирование сердца ресвератролом обеспечивает кардиопротекцию, о чем свидетельствует снижение размера площади некротизированного миокарда. Кардиопротекция ресвератрола была полностью отменена как N-нитро-L-аргинин метиловым эфиром (L-NAME), так и аминокванидином (AG), что показывает, что ресвератрол обеспечивает кардиопротекцию по типу ишемического прекондиционирования, через синтазы оксида азота (NOS).

Ключевые слова: сердце, ишемия/реперфузия, прекондиционирование, ресвератрол.

L. M. DANILENKO, M. V. POKROVSKY, I. A. TATARENKOVA, V. V. ELAGIN, O. I. BRATCHKOV

PHARMACOLOGICAL PRECONDITIONING OF RESVERATROL
IN ISCHEMIC / REHERFUSION INJURY: THE ROLE OF NITRIC OXIDE

*Department of pharmacology FGAOU VPO «BSU», institute of medicine,
department of pediatrics and medical business,
Russia, 308015, Belgorod, str. Victory, 85; tel. (4722) 30-13-73;
department of pharmacology, department of urology medical university
of KSMU Russian ministry of health,
Russia, 305041, Kursk, str. Marx, 3; tel. (4712) 58-77-66. E-mail: Danilenko_L@bsu.edu.ru*

The article presents the results of studies of the effect of distant preconditioning by creating short-term limb ischemia and pharmacologic preconditioning of resveratrol on the size of myocardial necrosis and the level of troponin I in serum after ischemia-reperfusion. Established a comparable protective effect as distant and pharmacological preconditioning. Possible mechanisms of the protective effect of pharmacological preconditioning during ischemia/reperfusion. Preconditioning of the heart by resveratrol provides cardioprotection, as evidenced by the reduction in the size of the area of myocardial necrosis. Cardioprotection resveratrol was completely abolished as N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), and aminoguanidine (AG), which show that resveratrol provides cardioprotection type of ischemic preconditioning by nitric oxide synthase (NOS).

Key words: hearts, ischemia/reperfusion, preconditioning, resveratrol.

Введение

В настоящее время в современной кардиофармакологии продолжается поиск новых эффективных методов защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения, в том числе средств, позволяющих сохранить структуру и функции кардиомиоцитов в условиях ишемии.

Помимо фармакологических кардиопротекторных средств, альтернативных стратегий особое внимание привлечено к феномену ишемического прекондиционирования (ИП) миокарда. Ишемическое прекондиционирование, опосредованное одним или более короткими периодами ишемии и реперфузии, считается наиболее мощным

кардиопротекторным подходом последних лет [9]. В отличие от фармакологических вмешательств, которые защищают ишемический миокард путем нейтрализации токсичных компонентов, preconditionирование оказывает кардиопротекцию через регуляцию эндогенных защитных механизмов, которые включают в себя несколько кардиопротективных ферментов и белков [25, 36]. Реализация кардиопротекции ишемического preconditionирования опосредуется через два окна: раннее, или классическое, preconditionирование продолжительностью до 3–4 ч и позднее ишемическое preconditionирование продолжительностью от 1 до 3–4 дней [8]. Попытки увеличить «временное терапевтическое окно» preconditionирования имеют ограниченный успех. Существует явная необходимость в разработке фармакологических подходов, способных обеспечить увеличение «временного терапевтического окна» кардиопротекции.

В последнее время многочисленные экспериментальные исследования посвящены изучению кардиопротекторных свойств ресвератрола (3, 5, 4'-тригидрокси-транс-стильбен), который является природным фенольным соединением, содержащимся в кожуре винограда и вине [10, 30].

Известна его гипополипидемическая, антиоксидантная, эстрогенная, антиагрегационная активность, есть результаты по кардиопротективной активности в опытах *in vitro*.

Имеются результаты по эффективности ресвератрола для защиты почек, сердца и мозга от ишемического/реперфузионного повреждения [1, 10, 16, 30]. В клетках почек ресвератрол оказывает свое защитное действие через активацию синтеза оксида азота (NO) [16].

Поскольку ресвератрол может защитить различные ткани от ишемических повреждений, мы предположили, что он может функционировать в качестве фармакологического агента preconditionирования через NO. Периоды полувыведения ресвератрола значительно выше, чем других, в том числе гуморальных агентов preconditionирования (аденозин, брадикинин, опиоиды), следовательно, «временное терапевтическое окно» должно быть существенно шире.

Чтобы проверить данную гипотезу, мы поставили цель изучить механизм кардиопротекции ресвератрола по типу ишемического preconditionирования.

Материалы и методы

Изучение выживаемости ишемизированного миокарда было проведено на 66 лабораторных кроликах массой 2–2,5 кг. Влияние ресвератрола на размер зоны некроза изучали на модели коронароокклюзионного инфаркта миокарда. Инфаркт миокарда воспроизводился на наркотизирован-

ных животных (хлоралгидрат 300 мг/кг), находящихся на управляемом дыхании, путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на уровне нижнего края ушка левого предсердия (60 мин) с последующей реперфузией (90 мин). Поперечные срезы миокарда производили через каждые 0,8 см, начиная с уровня 0,8 см ниже места наложенной лигатуры. Срезы миокарда помещали в емкость, содержащую фосфатный буфер (pH 7,4) и 1 мг/мл трифенилтетразолия хлорид для образования красного формазана [2, 3, 4, 5]. Подсчет площадей интактного и некротизированного миокарда левого желудочка производили на каждом из четырех срезов с помощью пиксельного анализа в программе «Adobe Photoshop 9.0». Уровень Troponin I (TnI) определяли на иммунофлуоресцентном приборе «Triage MeterPro» («Biosite», США).

Ишемическое preconditionирование осуществляли путем 5-минутного прекращения кровотока в лигированной коронарной артерии за 30 мин до тотальной ишемии миокарда. Дистантное ишемическое preconditionирование осуществляли путем наложения жгута на верхнюю треть бедра на 10 мин с последующей 20-минутной реперфузией и воспроизведением модели инфаркта на 60 минут.

Фармакологическое preconditionирование осуществляли с помощью внутривенного введения в маргинальную вену уха кролика ресвератрола (Sigma) в дозе 2 мг/кг.

С целью подтверждения гипотезы о реализации эффектов preconditionирования через активацию системы синтеза оксида азота и КАТФ-каналы животным вводили L-NAME в дозе 25 мг/кг (блокатор индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной (eNOS) NO-синтазы), глибенкламид (блокатор КАТФ-каналы) в дозе 0,4 мг/кг, аминогуанидин (блокатор индуцибельной (iNOS) NO-синтазы) в дозе 100 мг/кг [6, 7].

Результаты исследования и их обсуждение

Наложение лигатуры на нисходящую ветвь левой коронарной артерии в контрольной группе приводило к развитию некроза миокарда левого желудочка, размер которого составил $27,3 \pm 1,2\%$. Применение ДИП, фармакологического preconditionирования путем внутрибрюшинного введения ресвератрола привело к достоверному уменьшению площади некротизированного миокарда и составило $9,4 \pm 0,5\%$, $15,2 \pm 0,8\%$ соответственно. Блокада eNOS и iNOS на фоне моделирования ишемии/реперфузии, применения ресвератрола, ДИП привела к нивелированию противоишемических эффектов. Величина зоны некроза в группе животных, получавших L-NAME и ресвератрол, составила $24,1 \pm 1,3\%$, получавших L-NAME и ДИП – $25,3 \pm 0,8\%$, аминогуанидин и ресвератрол –

Влияние ресвератрола (2 мг/кг) в/в и дистантного ишемического прекондиционирования на размер зоны некроза и уровень тропонина I при острой коронароокклюзии (60 мин) с последующей реперфузией (90 мин) у наркотизированных кроликов (M± m; в % от массы левого желудочка; n=6)

Группа	% некроза	Уровень тропонина I, нг/мл
Контроль (инфаркт миокарда)	27,3±1,2	16,26±1,9
КО/реперфузия + дистантное прекондиционирование	9,4±0,5*	4,9±1,3*
КО/реперфузия + ресвератрол (2 мг/кг)	15,2±0,8*	5,24±1,1*
КО/реперфузия + дистантное прекондиционирование + ресвератрол (2 мг/кг)	9,4±0,5*	4,9±1,3*
КО/реперфузия + L-NAME + дистантное прекондиционирование	23,5±1,2	14,15±1,2
КО/реперфузия + L-NAME + ресвератрол (2 мг/кг)	24,1±1,3	17,11±1,2
КО/реперфузия + амингуанидин (100 мг/кг) + дистантное прекондиционирование	22,8±2,0	14,11±1,2
КО/реперфузия + амингуанидин (100 мг/кг) + ресвератрол (2 мг/кг)	26,6±1,9	15,45±1,2
КО/реперфузия + глибенкламид (0,4 мг/кг) + дистантное прекондиционирование	24,2±1,5	16,34±1,8
КО/реперфузия + глибенкламид (0,4 мг/кг) + ресвератрол (2 мг/кг)	28,5±1,3	16,95±1,8

Примечание: КО/реперфузия – коронароокклюзия нисходящей ветви левой коронарной артерии на уровне ушка (60 мин) с последующей реперфузией (90 мин); ИП – ишемическое прекондиционирование (5 мин); ДИП – дистантное ишемическое прекондиционирование (10 мин) верхней трети бедра;
*p < 0,05 – в сравнении с контролем; # p < 0,05 – в сравнении с серией без фармакологического анализатора.

26,6±1,9%, амингуанидин и ДИП – 22,8±2,0%. При блокаде АТФ-зависимых калиевых каналов величина зоны некроза в группе животных, получавших глибенкламид и ресвератрол, – 28,5±1,3%, глибенкламид и ДИП – 24,2±1,5%. Уровень тропонина, как и предполагалось, изменяется с размером площади некроза миокарда левого желудочка (таблица).

Исходя из результатов экспериментов, дистантное ишемическое прекондиционирование, фармакологическое прекондиционирование и ресвератрол обладают в равной степени выраженным кардиопротекторным действием.

Кратковременная ишемия миокарда инициирует каскад определенных биохимических процессов в кардиомиоцитах. Эти процессы направлены на защиту миокарда от повреждений, связанных с его ишемизацией. Благодаря этому короткому, но эффективному «курсу закаливания» миокард становится подготовленным к последующей ишемии, в связи с чем он гораздо более успешно защищается от агрессивных факторов, обусловленных ухудшением питания и оксигенации сердца. Этот физиологический феномен, названный ишемическим прекондиционированием, был открыт не так давно, но уже привлек к себе внимание множества ученых. В случае острой ишемии этот механизм может предотвратить развитие инфаркта

миокарда, а если последний все же происходит, ишемическое прекондиционирование обеспечивает меньшие размеры инфаркта, уменьшает вероятность появления аритмии, предохраняет от значительных нарушений функций миокарда левого желудочка, а также уменьшает повреждения миокарда, связанные с реперфузией [10]. К механизмам реализации кардиопротективного действия ресвератрола [6] можно отнести: антиоксидантный, противовоспалительный, повышающий активность ферментов NOS, стимулирующих ангиогенез. Но один из самых обсуждаемых механизмов – это эффект, опосредованный через прекондиционирование. Каким образом ишемия может сыграть прекондиционирующее, то есть «подготавливающее», действие? Во время кратковременного ишемического эпизода кардиомиоциты начинают выделять аденозин и брадикинин, что, в свою очередь, вызывает активацию универсального внутриклеточного мессенджера — протеинкиназы С. Под ее действием АТФ-зависимые калиевые каналы гладкомышечных клеток сосудов и кардиомиоцитов, закрытые в норме, открываются. За счет этого происходит защитное укорочение сердечных потенциалов действия. Такой эффект имеет энергосберегающее значение, и при возникновении в ближайшее время повторной ишемии миокарда отмечаются снижение его

метаболической активности, уменьшение скорости распада АТФ, замедление гликогенолиза и снижение скорости нарастания внутриклеточного ацидоза. Благодаря всему этому миокард лучше переносит ишемию, в том числе более длительную и выраженную.

Как видно из нашего исследования, АТФ-зависимые калиевые каналы являются важным эффекторным звеном в реализации цитопротекторного действия как дистантного preconditionирования, так и ресвератрола. Оксид азота играет важную роль в реализации кардиопротекторных эффектов рекомбинантного ресвератрола. И в том, и в другом случае его синтез осуществляется за счет активации индуцибельной NO-синтазы, однако в механизме цитопротекции большое значение имеет эндотелиальная NO-синтаза, выполняющая, по всей вероятности, триггерную роль. Доказанная способность ресвератрола активировать протеинкиназы [2] позволяет предположить их триггерную роль в процессе реализации эффектов фармакологического preconditionирования. Вышеизложенное подтверждает наше предположение о том, что ресвератрол является триггером ишемического preconditionирования и может вызывать фармакологическое preconditionирование, а реализация естественных механизмов защиты от ишемии осуществляется за счет активации АТФ-зависимых калиевых каналов и биосинтеза оксида азота, фармакологических миметиков preconditionирования, индуцируемых воспроизводимый и стабильный кардиопротективный ответ и в то же время лишенных серьезных побочных эффектов.

Таким образом:

1. Проведение дистантного ишемического preconditionирования, введение ресвератрола достоверно относительно контрольной группы животных уменьшало распространенность зоны некроза миокарда левого желудочка.

2. АТФ-зависимые калиевые каналы являются эффекторным звеном в механизме цитопротекторного действия как дистантного ишемического preconditionирования, ресвератрола на модели коронароокклюзионного инфаркта миокарда.

3. Блокада эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы нивелирует цитопротекторный эф-

фект рекомбинантного ресвератрола на модели коронароокклюзионного инфаркта миокарда, доказывает роль оксида азота в реализации эффектов preconditionирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Даниленко Л. М., Покровский М. В., Новиков О. О. Противовоспалительные эффекты дистантного ишемического preconditionирования в сочетании с рекомбинантным эритропоэтином // Научные ведомости БелГУ. Сер. «Медицина. Фармация». – 2011. – № 4, вып. 13/2. – С. 49–53.
2. Даниленко Л. М., Покровский М. В., Новиков О. О. Триггерный механизм противоишемического действия эритропоэтина и ресвератрола // Научные ведомости БелГУ. Сер. «Медицина. Фармация». – 2012. – № 10, вып. 18/2. – С. 138–142.
3. Колесник И. М., Покровский М. В., Гудырев О. С. Дистантное и фармакологическое preconditionирование – новые возможности стимуляции неоваскулогенеза // Кубанский научный медицинский вестник. – 2010. – № 6. – С. 56–58.
4. Коркушко О. В., Лишневецкая В. Ю. Эндотелиальная дисфункция // Кровообіг та гемостаз. – 2003. – № 2. – С. 4–15.
5. Покровский М. В., Кочкаров В. И., Покровская Т. Г. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте // Кубанский научный медицинский вестник. – 2006. – № 10. – С. 72–77.
6. Agnes A., Parratt J. R. A common mechanism in the protective effects of preconditioning, cardiac pacing and physical exercise against ischemia and reperfusion-induced arrhythmias // Exp. clin. cardiol. – 2005. – Vol. 10. № 3. – P. 200–205.
7. Donnelly R., Millar-Craig M. W. Cardiac troponins: IT upgrade for the heart // Lancet. – 1998. – Vol. 351. № 9102. – P. 537–539.
8. Constans J., Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease // Clin. chim. acta. – 2006. – Vol. 368. № 1–2. – P. 33–47.
9. Lim S. Y., Davidson S. M., Hausenloy D. J. et al. Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore // Cardiovasc res. – 2007. – Vol. 75. № 3. – P. 530–535.
10. Oldenburg O., Qin Q., Krieg T. et al. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection // Am. j. physiol. heart circ. physiol. – 2004. – Vol. 286. № 1. – P. 468–476.

Поступила 05.10.2015