

## **ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ИНЕРТНЫМ ГАЗОМ ГЕЛИЕМ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ L-NAME-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЕФИЦИТА ОКСИДА АЗОТА**

**М.В. ПОКРОВСКИЙ<sup>1</sup>**  
**О.А. СТАРОСЕЛЬЦЕВА<sup>2</sup>**  
**М.В. КОРОКИН<sup>1</sup>**  
**О.С. ГУДЫРЕВ<sup>1</sup>**  
**Т.Г. ПОКРОВСКАЯ<sup>1</sup>**  
**В.И. КОЧКАРОВ<sup>1</sup>**  
**Л.В. КОТЕЛЬНИКОВА<sup>2</sup>**  
**Т.А. ДЕНИСЮК<sup>2</sup>**  
**И.Н. ЕРШОВ<sup>1</sup>**

<sup>1)</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет

<sup>2)</sup> Курский государственный медицинский университет

e-mail: star.ks@inbox.ru

В результате исследования было показано, что прекондиционирование инертным газом гелием в объеме 150 мл оказывает более выраженное эндотелиопротективное действие на модели L-NAME-индуцированного дефицита NO в сравнении с гипоксическим прекондиционированием. Это выражалось в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов и снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции. Сочетанное применение инертного газа гелия с кислородом в объеме 150 мл и 50 мл соответственно позволило обнаружить наиболее выраженный эндотелиопротективный эффект. Это проявилось в наибольшем снижении КЭД и достижении целевых значений артериального давления.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, гипоксическое прекондиционирование, прекондиционирование гелием.

В прошлое десятилетие наблюдался всплеск интереса к клиническому использованию инертных газов. Благородные газы всегда были загадкой. Обнаруженные поздно в истории химии и в небольших количествах в нашей атмосфере, они – некоторые из большинства неактивных известных элементов. Однако, несмотря на чрезвычайную инертность, благородные газы (гелий, неон, аргон, криптон, ксенон и радон) нашли разнообразное и все более расширяющееся применение в медицине [16]. В настоящее время рассматривается возможность использования инертных газов в кардиологии с особым вниманием к клиническому использованию гелия в силу его доступности и сравнительной дешевизны. Обсуждаются вопросы раскрытия механизмов его фармакологического действия и выдвигаются на первый план цели его использования как эндотелиопротективного и кардиопротективного средства.

ИБС ранее всегда рассматривалась как болезнь, затрагивающая кардиомиоциты. Однако теперь известно, что последствия ее распространяются на сосудистую стенку и особенно на эндотелиальные клетки.

В последнее время ученые сосредоточились на понятии эндогенной защиты от ишемии, то есть прекондиционирования, и продемонстрировали, что эндотелиальная дисфункция могла быть полностью изменена ранней или отсроченной фазой прекондиционирования. Идентификация этих механизмов может привести к развитию новых эндотелиопротективных агентов в патофизиологических ситуациях, связанных с эндотелиальной дисфункцией [5]. Одним из таких агентов может служить инертный газ гелий.

Преко́ндиционирование инертным газом гелием можно рассматривать как вариант гипоксического преко́ндиционирования. Последнее нашло свое широкое применение в трансплантации стволовых клеток органов и тканей, как нейропротективный и кардиопротективный агент [8].

Длительная клеточная гипоксия приводит к нарушению гемодинамики и энергетическому отказу, а в конечном счете – некрозу клеток. Однако менее тяжелая гипоксия, увеличивая сопротивление острому ишемизированному напряжению, оказывает цитопротективное действие [3, 6].

Недавние исследования показывают, что механизмы такого цитопротективного действия связаны с семьей индуцибельных гипоксией факторов (HIF), а также их



взаимодействия с индуцибельной азотной окисью (iNOS) [4, 10, 13]. В осуществлении механизмов гипоксического прекондиционирования также важное значение уделяется роли сосудистого фактора эндотелиального роста (VEGF), главным образом, выраженного в нейронах, эндотелиальных клетках и астроглии [9, 15]. А основным пусковым моментом считается открытие АТФ-зависимых калиевых каналов [12].

Активация митохондриальных калиевых каналов рассматривается как ведущий механизм кардиопротективного действия прекондиционирования гелием [7, 11].

**Целью** настоящего исследования явилось изучение эндотелиопротективных эффектов прекондиционирования инертным газом гелием в сравнении с гипоксическим прекондиционированием и прекондиционированием смесью гелия с кислородом на модели L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота.

**Материалы и методы.** Опыты проводили на самцах белых крыс линии Вистар массой  $250 \pm 50$  г. Для моделирования эндотелиальной дисфункции внутрибрюшинно вводился блокатор NO-синтазы N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) в дозе 25 мг/кг/сут в течение 7 дней.

На 8-й день от начала эксперимента под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД). Болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в бедренную вену. Показатели гемодинамики – систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) – измеряют непрерывно посредством датчика и компьютерной программы «Віорас». Помимо измерения АД проводили ряд функциональных тестов с последующей оценкой изменения параметров гемодинамики (САД, ДАД, ЧСС) в ответ на внутривенное введение раствора ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного (ЭЗВД) [3, 5], а также изменения параметров гемодинамики в ответ на внутривенное введение раствора нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного (ЭНВД) [1,3].

Степень эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных, а также степень ее коррекции исследуемыми препаратами оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД), представляющему собой отношение площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение НП (ЭНВД) к площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение АХ (ЭЗВД) [1, 2].

Экспериментальные животные были разделены на группы (n=10): I– интактные; II– с введением L-NAME; III– с вдыханием гелия в объеме 150 см<sup>3</sup> непосредственно перед введением L-NAME однократно в сутки в течение 7 дней; IV– с пребыванием крысы в стеклянном закрытом сосуде в течение 5 минут непосредственно перед введением L-NAME однократно в сутки в течение 7 дней; V– с вдыханием смеси гелия в объеме 150 см<sup>3</sup> с кислородом в объеме 50 см<sup>3</sup> непосредственно перед введением L-NAME однократно в сутки в течение 7 дней.

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Microsoft Excel. «Описательная статистика» применялась для нахождения среднего значения (M) и ошибки среднего (m). «Двухвыборочный t-тест с различными дисперсиями» использовался для сравнения показателей в различных группах животных и определения достоверности различий между ними. Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Влияние прекондиционирования инертным газом гелием в сравнении с гипоксическим прекондиционированием и прекондиционированием смесью гелия с кислородом на исходные показатели артериального давления у наркотизированных крыс с моделированием L-NAME-индуцированной патологии представлены в таблице. Значение показателей САД и ДАД в группе интактных животных приняты целевыми значениями артериального давления. Обнаружено, что применение прекондиционирования смесью гелия с кислородом (150 см<sup>3</sup> и 50 см<sup>3</sup> соответственно) предотвращает развитие выраженной гипертензии, и значения САД и ДАД достоверно не отличались от соответствующих значений интактных животных. Прекондиционирование гелием в объеме 150 см<sup>3</sup> не оказывало статистически значимого влияния на значения САД и ДАД (табл. 1).

Результаты функциональных проб на эндотелийзависимое (ацетилхолин 40 мкг/кг в/в) и эндотелийнезависимое (нитропруссид 30 мг/кг в/в) расслабление сосудов у животных с L-NAME индуцированной патологией на фоне проведения прекондиционирования инертным газом гелием в сравнении с гипоксическим прекондиционированием и прекондиционированием смесью гелия с кислородом позволили установить, что при сочетанном применении гелия с кислородом коэффициент эндотелиальной дисфункции снижался максимально среди остальных экспериментальных групп и значение КЭД в данной группе составило  $2,5 \pm 0,18$ . КЭД в группе интактных животных составил  $1,1 \pm 0,1$ , в группе животных, получавших L-NAME –  $5,4 \pm 0,6$  (табл.).

Таблица

**Влияние прекондиционирования инертным газом гелием в сравнении с гипоксическим прекондиционированием и прекондиционированием смесью гелия с кислородом на коэффициент эндотелиальной дисфункции при моделировании L-NAME индуцированного дефицита оксида азота ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Группы животных	Функциональная проба	САД, мм рт. ст.	ДАД, мм рт. ст.	Площадь сосудистой реакции, усл. ед.	КЭД
Интактные	Исходные	$137,7 \pm 3,7$	$101,9 \pm 4,3$		$1,1 \pm 0,1$
	АХ	$84,3 \pm 4,5$	$38,7 \pm 2,8$	$1268,0 \pm 74,8$	
	НП	$83,0 \pm 3,7$	$42,1 \pm 4,4$	$1375,3 \pm 93,7$	
L-NAME (25 мг/кг)	Исходные	$190,3 \pm 6,7^*$	$145,0 \pm 3,9^*$		$5,4 \pm 0,6^*$
	АХ	$110,6 \pm 5,2^*$	$82,8 \pm 6,6^*$	$695,3 \pm 87,6^*$	
	НП	$88,7 \pm 4,7$	$50,8 \pm 4,2$	$3322,7 \pm 116,7^*$	
L-NAME (25 мг/кг) + гипоксическое прекондиционирование	Исходные	$170,5 \pm 8,0$	$135,7 \pm 5,9$		$3,51 \pm 0,29$
	АХ	$105,7 \pm 3,8$	$62,4 \pm 4,9$	$1424,8 \pm 159,5$	
	НП	$113,3 \pm 4,7$	$57,2 \pm 5,8$	$4170,4 \pm 652,5$	
L-NAME (25 мг/кг) + прекондиционирование гелием 150 см <sup>3</sup>	Исходные	$147,6 \pm 3,9$	$115,0 \pm 3,3$		$3,1 \pm 0,4$
	АХ	$96,7 \pm 1,9$	$54,1 \pm 1,4$	$533,3 \pm 36,4$	
	НП	$106,4 \pm 3,5$	$48,9 \pm 2,0$	$1829,3 \pm 148,4$	
L-NAME (25 мг/кг) + прекондиционирование смесью гелия с кислородом (150 и 50 мл соответственно)	Исходные	$134,7 \pm 4,0$	$100,1 \pm 4,9$		$2,57 \pm 0,21$
	АХ	$88,3 \pm 4,8$	$43,8 \pm 4,0$	$734,8 \pm 51,6$	
	НП	$86,6 \pm 2,4$	$48,8 \pm 2,3$	$1835,6 \pm 131,7$	

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с интактными, \*\* –  $p < 0,05$  в сравнении с L-NAME, САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, КЭД – коэффициент эндотелиальной дисфункции.

**Обсуждение результатов.** В настоящее время не существует препаратов для специфической коррекции эндотелиальной дисфункции, поэтому большую ценность представляют данные о свойствах различных кардиологических феноменов, в качестве дополнения к существующим методам лечения сердечно-сосудистых заболеваний и создания на их основе нового класса препаратов – эндотелиотропных аддитивов.

Гипоксическое прекондиционирование оказывает цитопротективное действие и может рассматриваться как нейропротективный и кардиопротективный агент. Механизмы подобного действия связаны с семьей индуцибельных гипоксией факторов (HIF) и их целевых генов сосудистых факторов эндотелиального роста (VEGF), а также их взаимодействием с индуцибельной азотной окисью (iNOS). Основным пусковым моментом при этом считается открытие АТФ-зависимых калиевых каналов.

Прекондиционирование инертным газом гелием может рассматриваться как вариант гипоксического прекондиционирования. Активация митохондриальных калиевых каналов выступает здесь как ведущий механизм кардиопротективного действия прекондиционирования гелием.

Накопленные к настоящему времени сведения о механизме действия гелия и его вкладе в NO-эргическую систему подтвердились результатами наших исследований.



В исследованиях, проведенных нашей лабораторией ранее, показано выраженное эндотелиопротективное действие дистантного ишемического прекондиционирования и фармакологического прекондиционирования эритропоезином. Однако исследование эндотелиопротективных свойств прекондиционирования инертными газами, в частности гелием, на выбранной модели эндотелиальной дисфункции не проводилось [1,3].

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о защитном действии инертного газа гелия, выражающемся в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов и снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции. Возможно, данный факт обусловлен тем, что гелий способствует активации АТФ-зависимых калиевых каналов. Это является пусковым механизмом прекондиционирования.

Сочетанное применение гелия с кислородом позволило обнаружить наиболее выраженный эндотелиопротективный эффект, выразившийся в снижении КЭД до уровня интактных животных и достижении целевых значений артериального давления. Отмеченный эффект комбинации на функцию эндотелия в определенной степени связан с физическими характеристиками данных газов. Гелий – газ инертный и во взаимодействие с кислородом не вступает, однако кислород способствует лучшему проникновению гелия в клеточную стенку.

Таким образом, применение прекондиционирования инертными газами для коррекции эндотелиальной дисфункции представляет большой интерес как для науки, так и для практической медицины. Рассмотренные выше аспекты могут служить основой для разработки новых профилактических и терапевтических мероприятий, а также дать перспективу их использования в качестве дополнения к существующим методам лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

#### **Выводы:**

1. Длительное (в течение 7 дней) внутрибрюшинное введение L-NAME в дозе 25 мг/кг вызывает у самцов крыс линии Вистар нарушение функции эндотелия сосудов, выражающееся в повышении значений артериального давления и коэффициента эндотелиальной дисфункции.

2. Прекондиционирование инертным газом гелием в объеме 150 мл оказывает более выраженное эндотелиопротективное действие в сравнении с гипоксическим прекондиционированием, проявляющееся в снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции.

3. При сочетанном применении гелия с кислородом в объеме 150 и 50 мл, соответственно, обнаружен наиболее выраженный эндотелиопротективный эффект, выразившийся в достижении целевых значений артериального давления и снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции.

**Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ № МК-905.2012.4.**

#### **Литература**

1. Метаболическая и антиоксидантная терапия L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции / М.В. Покровский, Е.Б. Артюшкова, Т.Г. Покровская и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2008. – № 3-4. – С. 73-78.

2. Новый взгляд на коррекцию эндотелиальной дисфункции / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская и др. // Российский журнал иммунологии. – 2006. – Т. 9. – С. 60-61.

3. Принципы фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции / М.В. Покровский, Е.Б. Артюшкова, Т.Г. Покровская и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2007. – № 1-2. – С. 146-150.

4. Brief anoxia preconditioning and HIF prolyl-hydroxylase inhibition enhances neuronal resistance in organotypic hippocampal slices on model of ischemic damage / I. Lushnikova, M. Orlovsky, V. Dosenko et al. // Brain Res. – 2011. – Vol. 1386. – P. 175-183.

5. Coronary endothelial dysfunction after ischemia-reperfusion: mechanisms and possibilities for protection / K. Laude, C. Thuillez, V. Richard // Therapie. – 2001. – Vol. 56(5). – P. 589-593.



6. Effects of normoxic and hypoxic exercise regimens on cardiac, muscular, and cerebral hemodynamics suppressed by severe hypoxia in humans / J.S. Wang, M.H. Wu, T.Y. Mao // *J. Appl. Physiol.* – 2010. – Vol. 109(1). – P. 219-229.
7. Helium-induced preconditioning in young and old rat heart: impact of mitochondrial Ca(2+) - sensitive potassium channel activation / A. Heinen, R. Huhn, K.M. Smeele // *Anesthesiology.* – 2008. – Vol. 109(5). – P. 830-836.
8. Hypoxic preconditioning enhances bone marrow mesenchymal stem cell migration via Kv2.1 channel and FAK activation / X. Hu, L. Wei, T.M. Taylor et al. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2011. – Vol. 301(2). – P. 362-372.
9. Hypoxic preconditioning provides neuroprotection and increases vascular endothelial growth factor A, preserves the phosphorylation of Akt-Ser-473 and diminishes the increase in caspase-3 activity in neonatal rat hypoxic-ischemic model / Y. Feng, P.G. Rhodes, A.J. Bhatt // *Brain Res.* – 2010. – Vol. 14. – P. 1325-1329.
10. Hypoxic preconditioning reinforces HIF-alpha-dependent HSP70 signaling to reduce ischemic renal failure-induced renal tubular apoptosis and autophagy / C.H. Yeh, S.P. Hsu, C.C. Yang et al. // *Life Sci.* – 2010. – Vol. 86(3-4). – P. 115-123.
11. Inhibition of glycogen synthase kinase or the apoptotic protein p53 lowers the threshold of helium cardioprotection in vivo: the role of mitochondrial permeability transition / P.S. Pagel, J.G. Krolikowski, P.F. Pratt Jr. et al. // *Anesth. Analg.* – 2008. – Vol. 107(3). – P. 769-775.
12. Novel functional role of heat shock protein 90 in ATP-sensitive K+ channel-mediated hypoxic preconditioning / J.D. Jiao, V. Garg, B. Yang, K. Hu // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 77(1). – P. 126-133.
13. Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat / E. Belaidi, P.C. Beguin, P. Levy et al. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 294(2). – P. 901-908.
14. Mao, X.R. Protein misfolding induces hypoxic preconditioning via a subset of the unfolded protein response machinery / X.R. Mao, C.M. Crowder // *Mol. Cell. Biol.* – 2010. – Vol. 30(21). – P. 5033-5042.
15. Role of vascular endothelial growth factor in protection of intrahepatic cholangiocytes mediated by hypoxic preconditioning after liver transplantation in rats / B. Zhou, P.J. Zhang, T. Tian et al. // *Transplant. Proc.* – 2010. – Vol. 42(7). – P. 2457-2462.
16. Harris, P.D. The uses of helium and xenon in current clinical practice / P.D. Harris, R. Barnes // *Anaesthesia.* – 2008. – Vol. 63(3). – P. 284-293.

## **ENDOTELIOPROTECTIVE EFFECTS OF HELIUM PRECONDITIONING AT MODELLING L-NAME-INDUCED DEFICIENCY OF NITROGEN OXIDE**

**M.V. POKROVSKIY<sup>1</sup>**  
**O.A. STAROSELTSEVA<sup>2</sup>**  
**M.V. KOROKIN<sup>1</sup>**  
**O.S. GUDYREV<sup>1</sup>**  
**T.G. POKROVSKAYA<sup>1</sup>**  
**V.I. KOCHKAROV<sup>1</sup>**  
**L.V. KOTELNIKOVA<sup>2</sup>**  
**T.A. DENISUK<sup>2</sup>**  
**I.N. ERSHOV<sup>1</sup>**

<sup>1)</sup> *Belgorod National Research University*

<sup>2)</sup> *Kursk State Medical University*

*e-mail: star.ks@inbox.ru*

As a result of research it has been shown, that helium preconditioning in volume 150 ml rendered endothelioprotective action on model of L-NAME-induced deficiency NO in comparison of hypoxic preconditioning. It was expressed in prevalence endothelium dependent relaxations of vessels and factor decrease endothelial dysfunction. Combined application of the helium and oxygen has allowed to find out the most expressed endothelioprotective effect. It was expressed in decrease CED to level of intact animals and achievement of target values of arterial pressure.

Key words: endothelial dysfunction, hypoxic preconditioning, helium preconditioning.