



ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 615.22-088.331.1

ТРИГГЕРНЫЙ МЕХАНИЗМ ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА И РЕЗВЕРАТРОЛА

Л.М. ДАНИЛЕНКО
М.В. ПОКРОВСКИЙ
О.О. НОВИКОВ
Л.В. КОРОКИНА
Д.В. ГОНЧАРОВА
А.В. ИНДЕРОВА
Е.Н. СВЕТЛИЧНАЯ

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: DanilenkoIyudmila@mail.ru

В настоящей работе проведено экспериментальное исследование влияния рекомбинантного эритропоэтина и резвератрола на площадь некротизированного миокарда левого желудочка при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда. Было выявлено, что рекомбинантный эритропоэтин и резвератрол являются триггерами ишемического прекондиционирования и могут вызывать фармакологическое прекондиционирование, а реализация их механизмов защиты от ишемии осуществляется за счет активации АТФ-зависимых калиевых каналов и биосинтеза оксида азота.

Ключевые слова: прекондиционирование, эритропоэтин, резвератрол.

Введение. Согласно современным представлениям, эндогенный кардиопротективный ответ, проявляющийся в росте устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии, может быть индуцирован с помощью некоторых неишемических стимулов, не требующих инвазивного вмешательства. Данное направление находится в стадии интенсивной разработки и может включать использование некоторых фармакологических препаратов, имитирующих эффекты прекондиционирования [6], и физических факторов, активирующих определенные звенья внутриклеточных сигнальных систем, ответственных за увеличение устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии [5]. В фармакологическом аспекте одним из наиболее перспективных гуморальных агентов, принимающих участие в реализации феномена прекондиционирования, является эритропоэтин, а резвератрол – природный фитоэстроген. Периоды полувыведения у эритропоэтина и резвератрола значительно выше, чем у других, в том числе и гуморальных агентов прекондиционирования (аденозин, брадикинин, опиоиды), следовательно, «временное терапевтическое окно» должно быть существенно шире.

Эритропоэтин (ЕРО) – индуцибельный гипоксией гормон, который является существенным для нормального эритропоэза в костном мозге. Введение рекомбинантного эритропоэтина – эффективный и безопасный терапевтический подход к лечению анемии, связанной с хронической почечной недостаточностью [4]. Однако рецепторы ЕРО также широко распространены в сердечно-сосудистой системе, включая эндотелиальные, гладкомышечные и другие типы клеток. Одним из плеотропных эффектов ЭПО и его аналогов рекомбинантного эритропоэтина (РЭПО) является уменьшение апоптоза. Причем даже однократное введение ЭПО при инфаркте миокарда или другом ишемическом событии (операция на сердце, острый коронарный синдром) обеспе-

чивает как немедленную, так и пролонгированную кардиопротекцию за счет сохранения жизнеспособного миокарда в период ишемии/реперфузии [7].

Многочисленные экспериментальные исследования показали, что резвератрол наряду с антиоксидантной, гиполипидемической, антиагрегантной, эндотелиопротекторной активностью обладает также и кардиопротекцией [9, 10, 11]. Одним из обсуждаемых механизмов кардиопротекции резвератрола является прекодиционирование.

Детальное изучение механизмов, лежащих в основе сердечного прекодиционирования, выявило несколько регуляторных путей ее реализации. Известно, что три важных фактора (рецептор аденозина A₁, комплексные киназы, в том числе протеинкиназа C (PKC), митоген активируемая протеинкиназа (МАРК) и тирозинкиназы) и каналы калия, чувствительные к митохондрическому АТФ (K_{АТФ}), играют наиболее важную роль в опосредованной прекодиционированием кардиозащите. Другие эффекторы, скорее всего способствующие кардиопротекции посредством аденозина или прекодиционирования (которое вовлечено в процесс замедленного (второго) этапа кардиозащиты) включают в себя МАРК, белки теплового шока, а также iNOS и eNOS.

Интригующим с точки зрения практического использования и малоизученным является феномен дистантного прекодиционирования, суть которого состоит в том, что кратковременные эпизоды ишемии одного органа (почки, брыжейки, нижней конечности) повышают устойчивость других органов к тяжелым ишемическим повреждениям (3).

В связи с этим **целью** нашего исследования явилось изучение одного из механизмов реализации противоишемических эффектов рекомбинантного эритропоэтина и резвератрола через активацию систем синтеза оксида и АТФ-зависимые калиевые каналы по механизму ишемического прекодиционирования.

Материалы и методы. Изучение влияния рекомбинантного эритропоэтина (50 МЕ/кг) и резвератрола (2 мг/кг) на размер зоны некроза при инфаркте миокарда проводили на модели коронароокклюзионного инфаркта миокарда у кроликов. При этом инфаркт миокарда воспроизводился на наркотизированных животных (хлоралгидрат 300 мг/кг), находящихся на управляемом дыхании, путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на уровне нижнего края ушка левого предсердия, с последующей регистрацией ЭКГ во II стандартном отведении в течение 20 минут. Эритропоэтин и резвератрол вводили животным за 30 минут до перевязки коронарной артерии в маргинальную вену уха кролика. Через 30 минут после коронарной окклюзии осуществляли снятие лигатуры и проведение реперфузии миокарда в течение 90 мин. После этого осуществляли забор крови из правого желудочка сердца в одноразовую вакуумную пробирку с антикоагулянтом для определения специфического маркера повреждения кардиомиоцитов Troponin I (TnI). Уровень TnI определяли на иммунофлуоресцентном приборе Triage MeterPro (Biosite, США) с использованием тест-системы Cardiac Panel. Срезы миокарда помещали в емкости, содержащие фосфатный буфер (рН 7,4) и 1 мг/мл трифенилтетразолия бромид. Соотношение масс участков ткани и буфера составляло 1:9. Бюксы помещали в термостат, инкубировали при 37°C для образования красного формазана. Подсчет площадей интактного и некротизированного миокарда левого желудочка производили на каждом из четырех произведенных срезов с помощью попиксельного анализа в программе Adobe Photoshop 9.0. Данные по размерам площади инфаркта представляли в виде отношения некротизированного миокарда к интактному (в процентах). Дистантное ишемическое прекодиционирование осуществляли путем наложения жгута на верхнюю треть бедра на 10 минут, с последующей 20-минутной реперфузией. Контролем правильности наложения жгута служило отсутствие пульса на артериях голени. С целью подтверждения гипотезы о реализации эффектов резвератрола и рекомбинантного эритропоэтина по типу ишемического прекодиционирования кроликам за полчаса до введения исследуемых препаратов вводили L-NAME в дозе 25 мг/кг/сут (блокатор эндотелиальной eNOS синтазы), амингуанидин в дозе 100 мг/кг (блокатор индуцибельной iNOS синтазы), глибенкламид в дозе 0,4 мг/кг (блокатор АТФ-зависимых калиевых каналов).



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 в/в введения эритропоэтина и внутрибрюшинного резвератрола привело к достоверному уменьшению площади некротизированного миокарда и составило $9,4 \pm 0,5\%$, $13,2 \pm 0,3\%$, $15,2 \pm 0,8\%$ соответственно.

Блокада eNOS и iNOS на фоне моделирования инфаркта миокарда, применения эритропоэтина и резвератрола, ДИП привела к нивелированию противоишемических эффектов. Величина зоны некроза в группе животных, получавших L-NAME и эритропоэтин, составила $23,5 \pm 1,2\%$, у резвератрола $24,1 \pm 1,3\%$, получавших L-NAME и ДИП – $25,3 \pm 0,8\%$, аминогуанидин и эритропоэтин – $28,6 \pm 2,9\%$, аминогуанидин и резвератрол – $26,6 \pm 1,9\%$, аминогуанидин и ДИП – $22,8 \pm 2,0\%$. При блокаде АТФ-зависимых калиевых каналов величина зоны некроза в группе животных, получавших глибенкламид и эритропоэтин, – $21,2 \pm 1,1\%$, резвератрол – $28,5 \pm 1,3\%$, глибенкломид и ДИП – $24,2 \pm 1,5\%$. Уровень тропонина, как и предполагалось, изменяется с размером площади некроза миокарда левого желудочка (табл. 1)

Таблица 1

Влияние блокады NO-синтазы и АТФ-зависимых калиевых каналов на эффекты рекомбинантного эритропоэтина, резвератрола, дистантного preconditionирования и уровень тропонина при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда ($M \pm m$, $n=6$)

Группа	% некроза	Уровень тропонина I, нг/мл
Контроль (инфаркта миокарда)	$27,3 \pm 1,2$	$16,26 \pm 1,9$
ИМ + дистантное preconditionирование	$9,4 \pm 0,5^*$	$4,9 \pm 1,3^*$
ИМ + эритропоэтин (50 МЕ)	$13,2 \pm 0,3^*$	$5,0 \pm 1,9^*$
ИМ + резвератрол (2 мг/кг)	$15,2 \pm 0,8^*$	$5,24 \pm 1,1^*$
ИМ + L-NAME + дистантное preconditionирование	$23,5 \pm 1,2$	$14,15 \pm 1,2$
ИМ + L-NAME + эритропоэтин	$25,3 \pm 0,8$	$16,05 \pm 1,9$
ИМ + L-NAME + резвератрол	$24,1 \pm 1,3$	$17,11 \pm 1,2$
ИМ + глибенкламид + дистантное preconditionирование	$24,2 \pm 1,5$	$16,34 \pm 1,8$
ИМ + глибенкламид + эритропоэтин	$21,2 \pm 1,1$	$15,45 \pm 1,2$
ИМ + глибенкламид + резвератрол	$28,5 \pm 1,3$	$16,95 \pm 1,8$
ИМ + аминогуанидин + дистантное preconditionирование	$22,8 \pm 2,0$	$14,11 \pm 1,2$
ИМ + аминогуанидин + эритропоэтин	$28,6 \pm 2,9$	$17,55 \pm 1,7$
ИМ + аминогуанидин + резвератрол	$26,6 \pm 1,9$	$15,45 \pm 1,2$

Примечание: * – $p \leq 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

Исходя из результатов экспериментов, дистантное ишемическое preconditionирование, рекомбинантный эритропоэтин и резвератрол 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 preconditionированием», 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 preconditionирование обеспечивает меньшие

размеры инфаркта, уменьшает вероятность появления аритмии, предохраняет от значительных нарушений функций миокарда левого желудочка, а также уменьшает повреждения миокарда, связанные с реперфузией.

Одним из препаратов, который возможно использовать для проведения фармакологического preconditionирования, может явиться рекомбинантный эритропоэтин. Перспективы применения эритропоэтина в клинике объясняются его плеотропными эффектами.

Во многих исследованиях было показано протективное действие ЭПО на ишемию-реперфузию в различных органах и тканях, включая головной мозг [14], спинной мозг, почки [15], мышечную ткань сосудов [13], сердце [14]. В частности, доказан независимый кардиопротективный эффект ЭПО, снижение зоны инфаркта миокарда и улучшение функции сердца при ишемии-реперфузии вне зависимости от изменения гемоглобина, числа эритроцитов и напряжения кислорода в крови. В ряде исследований показано, что снижение апоптоза – один из возможных главных механизмов защитного эффекта ЭПО [12].

К механизмам реализации кардиопротективного действия резвератрола [8] можно отнести: антиоксидантный, противовоспалительный, повышающий активность ферментов NOS, стимулирующих ангиогенез. Но один из самым обсуждаемым механизмов – это эффект, опосредованный через preconditionирование.

Каким образом ишемия может сыграть preconditionирующее, 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 отмечается 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 рекомбинантного эритропоэтина и резвератрола. Оксид азота играет важную роль в реализации кардиопротекторных эффектов рекомбинантного эритропоэтина и резвератрола. И в том и другом случае синтез его 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 эритропоэтина и резвератрола активировать протеинкиназы [2] позволяет предположить их триггерную роль в процессе реализации эффектов фармакологического preconditionирования.

Вышеизложенное подтверждает наше предположение о том, что эритропоэтин и резвератрол являются триггерами ишемического preconditionирования и могут вызывать фармакологическое preconditionирование, а реализация естественных механизмов защиты от ишемии осуществляется за счет активации АТФ-зависимых калиевых каналов и биосинтеза оксида азота.

Исследование механизмов preconditionирования будет способствовать созданию фармакологических миметиков preconditionирования, индуцирующих воспроизводимый и стабильный кардиопротективный ответ и в то же время лишенных серьезных побочных эффектов.

Выводы.

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



2. Предварительная блокада АТФ-зависимых калиевых, эндотелиальной eNOS, индуцибельной iNOS, полностью нивелировали протекторное действие дистантного ишемического preconditionирования, рекомбинантного эритропоэтина и резвератрола, что доказывает реализацию их противоишемических эффектов по механизму, схожему с механизмом реализации эффектов дистантного ишемического preconditionирования.

Литература

1. Бокерия, Л.А. Природа и клиническое значение «новых ишемических синдромов» / Л.А. Бокерия, И.Н. Чичерин. – М. : НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – 2007. – С. 302.
2. Aird, W.C. Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease / W.C. Aird // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 98, № 2. – P. 159-162.
3. Dave, K.R. Remote organ ischemic preconditioning protect brain from ischemic damage following asphyxial cardiac arrest / K.R. Dave, I. Saul, R. Prado // *Neurosci. Lett.* – 2006. – Vol. 404. – P. 170-175.
4. Dirnagl, U. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection / U. Dirnagl, R.P. Simon, J.M. Hallenbeck // *Trends Neurosci.* – 2003. – Vol. 26. – P. 248-254.
5. Domenech, R.J. *Rev Med Chil* / R.J. Domenech, P. Macho. – 2008 Dec; 136(12):1582-8. Epub 2009 Mar 23. Review. Spanish.
6. Downey, J.M. Signaling pathways in ischemic preconditioning / J.M. Downey, A.M. Davis, M.V. Cohen // *Heart. Fail. Rev.* – 2007. – Vol. 12. – P. 181-188.
7. Guglin, M.E. Cardiovascular effects of erythropoietin: anemia and beyond / M.E. Guglin, D. Koul // *Cardiol. Rev.* – 2006. – 14(4). – 200-204.
8. Hung, L. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes / L. Hung, J. Chen, S.S. Huang et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2000. – Vol. 47. – P. 549-555.
9. Jager, U. Relaxant effect of trans-resveratrol on isolated porcine coronary arteries / U. Jager, H. Nguyen-Duong // *Arzneimittelforschung.* – 1999. – Vol. 49 – P. 207-211.
10. Leikert, J.F. *Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Subsequent Nitric Oxide Release From Endothelial Cells* / J. F. Leikert, T. R. Rathel, P. Wohlfart // *Circulation.* – 2002 – Vol. 106, № 13. – P. 1614 – 1617.
11. Naderali, E.K. Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs / E.K. Naderali, P.J. Doyle, G. Williams // *Clin. Sci.* – 2000 – Vol. 98 – P. 537-543.
12. Penttil, H.J. Ischemic preconditioning does not improve myocardial preservation during off-pump multivessel coronary operation / H.J. Penttil, M.V. IC. Lepojarvi, IC. Paivi et al. // *Circulation.* – 2003. – Vol. 75. – P. 1246-1252.
13. Turley, J.E. Exhaled NO is reduced at an early stage of hypoxia-induced pulmonary hypertension in * newborn piglets / J.E. Turley, L.D. Nelin, M.R. Kaplowitz et al. // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2003. – Vol. 284, № 3. – P. 489-500.
14. Chavez, J.C. Expression of hypoxia inducible factor 1 in the brain of rats during chronic hypoxia / J.C. Chavez, F. Agani, P. Pichiule, J.C. LaManna // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – Vol. 89. – P. 1937-1942.
15. Wikstrom D, L.G. Andersson et al. // *J. Scand. Urol. Nephrol.* – 1996. – Vol. 30. – P. 115.

TRIGGER MECHANISM OF ANTIISCHEMIC ACTION OF ERITHROPOIETIN AND RESVERATROL

L.M. DANILENKO
M.V. POKROVSKIY
O.O. NOVIKOV
L.V. KOROKINA
D.B. GONCHAROVA
A.B. INDEROVA
E.N. SVETLICHNAYA

In this paper an experimental study of the effect of recombinant erythropoietin, and resveratrol, in the area of myocardial necrosis of the left ventricle in the simulation coronal occlusion myocardial infarction is presented. It was found that recombinant erythropoietin, and resveratrol are the triggers of ischemic preconditioning and can cause pharmacological preconditioning, and the implementation of mechanisms of protection against ischemia is due to activation of ATP-sensitive potassium channels and nitric oxide biosynthesis.

Belgorod National Research University

Key words: preconditioning, erythropoietin, resveratrol.

e-mail:
 Danilenkohudmila@mail.ru