

## ПУТИ РЕАЛИЗАЦИИ ДИСТАНТНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НИКОРАНДИЛОМ ПРИ L-NAME-ИНДУЦИРОВАННОМ ДЕФИЦИТЕ ОКСИДА АЗОТА

Даниленко Л.М.

*ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия (308015, г. Белгород, ул. Победы, 85), e-mail: Danilenko\_L@bsu.edu.ru*

В ходе проведенного исследования установлено, что индуцибельная NO-синтаза и АТФ-зависимые калиевые каналы ( $K_{ATP}$ ) играют важную роль в формировании эндотелиопротекторного эффекта как дистантного ишемического прекондиционирования, так и фармакологического. Селективный блокатор индуцибельной NO-синтазы, аминогуанидин в дозе 100 мг/кг, полностью устранял эндотелиопротекторный эффект дистантного ишемического прекондиционирования, в группе с применением никорандила полной отмены эффекта прекондиционирования не произошло. Глибенкламид в дозе 4 мг/кг, блокатор  $K_{ATP}$ , нивелировал эндотелиопротекторные эффекты как дистантного ишемического прекондиционирования, так и фармакологического прекондиционирования никорандилом. Что выразилось в повышении коэффициента эндотелиальной дисфункции до значений, близких к группе с введением L-NAME. Представленные результаты исследований указывают на наличие у никорандила и дистантного ишемического прекондиционирования эффекта прекондиционирования посредством активации  $K_{ATP}$ -каналов. Эти данные подтверждают концепцию, что эндотелиопротекторное действие ишемического и фармакологического прекондиционирования можно моделировать через  $K_{ATP}$ , предполагая, что активация этих каналов может быть эффективным средством улучшения состояния эндотелия и профилактики сердечно-сосудистых осложнений.

Ключевые слова: никорандил, эндотелий,  $K_{ATP}$ , дистантное ишемическое прекондиционирование.

## TOWARDS THE IMPLEMENTATION OF DISTANT ISCHEMIC PRECONDITIONING AND PHARMACOLOGICAL PRECONDITIONING BY NIKORANDIL IN L-NAME INDUCED DEFICIENCY OF NITRIC OXIDE

Danilenko L.M.

*FSAEI HVE «Belgorod National Research University», Belgorod, Russia (308015, Belgorod, Pobeda street 85)*

In the course of the study founded that the inducible NO-synthase and ATP-dependent potassium channels ( $K_{ATP}$ ) play an important role in the formation of a distant endothelioprotective effect of ischemic and pharmacological preconditioning. Selective blocker of inducible NO-synthase, aminoguanidine at a dose of 100 mg / kg, completely eliminated endothelioprotective distant effect of ischemic preconditioning in the group with the complete abolition of the use of nicorandil preconditioning effect has not happened. Glibenclamide at a dose of 4 mg / kg,  $K_{ATP}$  blocker, leveled endothelioprotective as distant effects of ischemic preconditioning as pharmacological preconditioning by nicorandil. It resulted in the increase of the coefficient of endothelial dysfunction to values close to the group with the introduction of L-NAME. The investigated results indicate the presence of nicorandil and distant ischemic preconditioning effect of preconditioning via activation  $K_{ATP}$  channels. These data support the concept that endothelioprotective effects of ischemic and pharmacological preconditioning can be modeled through  $K_{ATP}$ , suggesting that activation of these channels may be an effective means of improving the state of the endothelium and prevention of cardiovascular complications.

Keywords: nicorandil, endothelium,  $K_{ATP}$ , distant ischemic preconditioning.

### Введение

Исследования последних десятилетий в области ишемических кардиальных катастроф подчеркивают важную роль эндотелия сосудов. Безусловно, что наряду с протекцией миокарда важное клиническое значение имеет защита клеток эндотелия, так как ишемия и последующая реперфузия приводят к эндотелиальной дисфункции [9] и определяют степень повреждения миокарда [10]. Особенно эта проблема актуальна для

пожилых пациентов, поскольку с увеличением возраста наблюдается прогрессирующее нарушение функции эндотелия и повышение риска развития сердечно-сосудистых осложнений [7; 8]. Данные ряда исследовательских работ подтверждают тот факт, что состояние, характеризующееся нарушенной функцией эндотелия, обратимо [4]. В связи с этим поиск путей эндотелиопротекции продолжается. В ряде работ отмечается, что ишемическое прекондиционирование (ИП) способствует уменьшению дисфункции эндотелиальных клеток коронарных артерий [6]. Ишемическое прекондиционирование может рассматриваться как неспецифический ответ на различные виды сублетального стресса. С практической точки зрения предпочтение видится в использовании медикаментозных, фармакологических агентов прекондиционирования, так как это дает возможность контролировать их дозы, пролонгировать эффект, снижать развитие толерантности.

Никорандил - уникальный фармакологический препарат, обладающий свойствами открывать аденозинтрифосфатзависимые калиевые ( $K_{ATP}$ ) каналы и активировать систему синтеза оксида азота (NO).

В механизм ишемического прекондиционирования вовлечено несколько ключевых медиаторов, включая аденозин, сублетальные активные формы кислорода (ROS) и NO. Никорандил открывает митохондриальные  $K_{ATP}$ -каналы не только прямым воздействием, но и опосредованно, через активацию пути NO – ц ГМФ-зависимой протеинкиназы .

В связи с этим **целью** нашего исследования является изучение механизмов реализации эндотелиопротекторных эффектов дистантного ишемического прекондиционирования и фармакологического прекондиционирования никорандилом при L-NAME-индуцированном дефиците оксида азота.

### **Материалы и методы**

Моделирование L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции проводили на белых крысах-самцах линии Wistar массой 250-300 г. Все исследования проводили в одно и то же время суток во второй половине дня. N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) вводили ежедневно один раз в сутки внутривентрально в дозе 25 мг/кг в течение 7 дней.

Развитие эндотелиальной дисфункции (ЭД) оценивали путем проведения пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВД) в ответ на болюсное внутривенное введение раствора ацетилхолина в дозе 40 мкг/кг и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД) в ответ на болюсное введение раствора нитропруссид натрия в дозе 30 мкг/кг. Для объективной оценки развития нарушения функции эндотелия рассчитывали коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД). Для этого определяли площади прямоугольных треугольников над кривыми восстановления микроциркуляции после проведения реакций ЭЗВД и ЭНВД. КЭД рассчитывался как отношение площади треугольника над кривой

восстановления микроциркуляции в ответ на введение нитропруссиды к площади треугольника над кривой восстановления микроциркуляции в ответ на введение ацетилхолина [5].

Биохимическими маркерами эндотелиальной дисфункции служили Total NO (NOx). Нами использована модификация метода определения стабильных метаболитов NO. Принцип метода заключается в одновременном восстановлении нитратов в нитриты в присутствии хлористого ванадия и реакции диазотирования с последующим развитием окраски.

Для морфологического подтверждения развития моделируемых патологических процессов кусочки органов фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине и заливали в парафин по общепринятым методикам (Меркулов Г.А., 1969). В почках обращали внимание на состояние капилляров клубочков, толщину стенок артерий и артериол и их эндотелия. В сердце изучали общее состояние эндокарда и перикарда, кардиомиоцитов и стромы, оценивали состояние сосудов миокарда и их эндотелия.

Дистантное ишемическое прекондиционирование создавали по ранее апробированной и обоснованной методике наложением эластичного жгута на верхнюю треть контрлатерального (правого) бедра на 10 минут с последующей 20-минутной реперфузией непосредственно перед моделированием патологии. Контролем эффективности пережатия служило исчезновение пульсации на артериях стопы и появление цианоза ее кожи в первые секунды после наложения жгута.

Никорандил вводили в дозе 2 мг/кг в виде раствора внутривенно через зонд 2 раза в сутки в течение 7 дней непосредственно перед введением L-NAME.

Для изучения участия АТФ-зависимых калиевых каналов и индуцибельной NO-синтазы в реализации эндотелиопротекторных эффектов различных форм прекондиционирования использовали глибенкламид в дозе 0,4 мг/кг, который вводили внутривенно 1 раз в сутки в течение 7 дней на фоне введения L-NAME и амингуанидин в дозе 100 мг/кг.

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 исследования и их обсуждение**

Проведенные нами исследования показали, что и дистантное, и фармакологическое

прекондиционирование никорандилом оказывают выраженное эндотелиопротекторное действие, выражающееся в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов и снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции. Так, КЭД в группах животных с применением фармакологического preconditionирования никорандилом составил  $1,9 \pm 0,18$  усл. ед., дистантного ишемического preconditionирования –  $2,5 \pm 0,3$  усл. ед. по сравнению с группой контроля L-NAME-патологии –  $5,4 \pm 0,6$  усл. ед.

NO-продуцирующая функция эндотелия исследована нами на основании определения в сыворотке крови концентрации конечных стабильных метаболитов оксида азота (NOx). Концентрация NOx на фоне дистантного и фармакологического preconditionирования увеличивалась, приближаясь к уровню интактных животных ( $7,3 \pm 0,73$  мкмоль/л), и составила  $4,8 \pm 0,25$  мкмоль/л,  $6,2 \pm 0,3$  мкмоль/л при проведении preconditionирования ДИП и никорандилом соответственно.

Данные морфологических исследований показали, что применение двух видов preconditionирования положительно повлияло на морфологические изменения почек и сердца крыс с экспериментальной артериальной гипертензией. Так, в группе с ДИП эта величина равнялась  $13,0 \pm 0,5$  мкм, и  $12,0 \pm 0,3$  мкм в группе с использованием никорандила. Отмечались нормализация структуры капилляров, предотвращение развития гипертрофических изменений диаметра кардиомиоцитов, отсутствовали деструктивные изменения эндотелия сосудов и признаки гипертрофии их стенок. В почках почти полностью исчезли признаки мембранозной гломерулопатии и капилляры клубочков выглядели в большинстве случаев так же, как и у интактных животных. Размер диаметра кардиомиоцитов группы контроля составил  $18,5 \pm 0,3$  мкм (рис. 1).



**А**

**Б**

**В**

**Рисунок 1.** А-Крыса с экспериментальной артериальной гипертензией: клубочки имеют «лапчатые» очертания; базальные мембраны капилляров утолщены («проволочные петли»). Почка крысы на фоне проведения ДИП (Б) preconditionирования никорандилом (В). 8-е сутки эксперимента: капилляры клубочка почки без патологических изменений; артериола коркового вещества без признаков гипертрофии, эндотелий не поражен. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото. х 400.

Таким образом, мы можем заключить, что и ДИП, и фармакологическое

прекондиционирование никорандилом в эксперименте оказывают эндотелиопротекторное действие на L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота.

Для изучения роли АТФ-зависимых калиевых каналов и индуцибельной NO-синтазы в эндотелиопротекторных эффектах разных видов preconditionирования нами были выполнены следующие эксперименты:

- 1) группа интактная;
- 2) группа контроля на фоне L-NAME-патологии;
- 3) L-NAME+ на фоне дистантного ишемического preconditionирования (ДИП);
- 4) L-NAME + на фоне введения никорандила (фармакологическое preconditionирование);
- 5) L-NAME+ на фоне введения глибенкламида;
- 6) L-NAME+ на фоне введения амингуанидина;
- 7) L-NAME+ на фоне проведения ДИП, после предварительного введения глибенкламида;
- 8) L-NAME+ на фоне введения никорандила, после предварительного введения глибенкламида;
- 9) L-NAME+ на фоне проведения ДИП, после предварительного введения амингуанидина;
- 10) L-NAME+ на фоне введения никорандила, после предварительного введения амингуанидина.

Таблица 1.

**Влияние дистантного ишемического preconditionирования и фармакологического preconditionирования никорандилом на коэффициент эндотелиальной дисфункции при моделировании L-NAME (25 мг/кг внутривенно, однократно в течение 7 дней) индуцированного дефицита оксида азота (M±m, n=10)**

| № n/n | Группа                             | КЭД<br>(усл.<br>ед.) | NOx<br>(мкмоль/л) | ДКМЦ<br>(мкм) |
|-------|------------------------------------|----------------------|-------------------|---------------|
| 1.    | Интактные                          | 1,1±0,1<br>*         | 7,7±0,2*          | 9,1±0,4*      |
| 2.    | Контроль                           | 5,4±0,5              | 2,3±0,4           | 18,5±0,1      |
| 3.    | L-NAME+ДИП                         | 2,5±0,3*             | 4,8±0,3*          | 13,0±0,6*     |
| 4.    | L-NAME +никорандил                 | 1,9±0,1*             | 6,2±0,6*          | 12,0±0,3*     |
| 5.    | L-NAME+амингуанидин                | 4,8±0,2              | 2,6±0,3           | 16,4±0,4      |
| 6.    | L-NAME+глибенкламид                | 5,3±0,5              | 2,2±0,2           | 18,1±0,3      |
| 7.    | L-NAME+амингуанидин<br>+ДИП        | 5,1±0,2              | 3,1±0,4           | 17,3±0,1      |
| 8.    | L-NAME+амингуанидин<br>никорандил  | 2,3±0,4*             | 6,0±0,3*          | 10,5±0,5*     |
| 9.    | L-NAME+глибенкламид +ДИП           | 4,4±0,3              | 3,5±0,5           | 17,0±0,4      |
| 10.   | L-NAME+глибенкламид<br>+никорандил | 4,3±0,5              | 3,0±0,2           | 17,1±0,2      |

**Примечание:** \* – p<0,05 в сравнении с L-NAME,

NOx - концентрация конечных стабильных метаболитов оксида азота, ДКМЦ – диаметр кардиомиоцитов, КЭД – коэффициент эндотелиальной дисфункции.

Введение амингуанидина животным контрольной группы не повлияло на КЭД и составило  $4,8 \pm 0,2$  усл. ед., что достоверно не отличается от группы контроля. Введение его перед применением дистантного ишемического прекондиционирования увеличивало КЭД (таблица 1) и нивелировало эндотелиопротекторный эффект дистантного ишемического прекондиционирования. В группе с применением амингуанидина с никорандилом полной отмены эффекта прекондиционирования не произошло, отмечено лишь небольшое его уменьшение. Что в цифрах составляет  $2,3 \pm 0,4$  усл. ед. Что подтверждается и результатами биохимических и морфологических исследований (таблица 1).

Введение глибенкламида, блокатора АТФ-зависимых калиевых каналов полностью нивелировали эндотелиопротективные эффекты всех способов прекондиционирования: и ишемического, и фармакологического, что выразилось в повышении коэффициента эндотелиальной дисфункции (КЭД), при этом значения приближались к таковым в группе с L-NAME-патологией ( $5,4 \pm 0,6$  усл. ед.) и составили  $4,4 \pm 0,5$  усл. ед. и  $4,3 \pm 0,2$  усл. ед. при введении глибенкламида на фоне прекондиционирования ДИП и никорандила. Что подтверждается результатами биохимических и фармакологических исследований (таблица 1).

В настоящее время не существует фармакологической группы для специфической коррекции эндотелиальной дисфункции, поэтому данные о свойствах различных препаратов и кардиологических феноменов в качестве дополнения к существующим методам лечения сердечно-сосудистых заболеваний имеют огромное значение.

В исследованиях, проведенных в нашей лаборатории ранее, показано положительное влияние дистантного ишемического прекондиционирования и фармакологического прекондиционирования на степень выживаемости ишемизированных тканей и неоваскулогенез, воспалительный процесс и размер повреждения миокарда при инфаркте [1-3].

Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о защитном действии дистантного ишемического и фармакологического прекондиционирования никорандилом, выражающемся в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов и снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции. Пути реализации данных эффектов предполагаются различные. У никорандила он обусловлен в основном влиянием на АТФ-зависимые калиевые каналы. В связи с чем блокада  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламидом обнаружила нивелирование положительных эндотелиопротективных эффектов никорандила, выразившееся в повышении КЭД; а механизмы эндотелиопротективных

свойств дистантного ишемического прекондиционирования обусловлены дополнительным влиянием на метаболизм оксида азота.

### **Выводы**

1. Дистантное ишемическое прекондиционирование и фармакологическое прекондиционирование никорандилом могут рассматриваться как способы предупреждения повреждения эндотелия сосудов, что имеет важное значение для определения возможного спектра применения различных видов прекондиционирования в клинической практике.

2. Индуцибельная NO-синтаза играет важную роль в формировании эндотелиопротекторного эффекта дистантного ишемического прекондиционирования.

Механизм эндотелиопротекторного эффекта никорандила зависит главным образом от чувствительных АТФ-зависимых калиевых каналов.

### **Список литературы**

1. Бокерия Л.А., Чичерин И.Н. Природа и клиническое значение «новых ишемических синдромов». – М. : НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – 2007. – С. 302.
2. Aird W.C. Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 98, № 2. – P. 159-162.
3. Dirnagl U., Simon R.P., Hallenbeck J.M. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection // *Trends Neurosci.* – 2003. – Vol. 26, № 5. – P. 248-254.
4. Domenech R.J., Macho P. Cardiovascular aging // *Rev Med Chil.* – 2008. – Vol. 136, № 12. – P. 1582-1588.
5. Downey J.M., Davis A.M., Cohen M.V. Signaling pathways in ischemic preconditioning // *Heart. Fail. Rev.* – 2007. – Vol. 12, № 3-4. – P. 181-188.
6. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes / L. Hung, J. Chen, S.S. Huang et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2000. – Vol. 47, № 3. – P. 549-555.
7. Jager U., Nguyen-Duong H. Relaxant effect of trans-resveratrol on isolated porcine coronary arteries // *Arzneimittelforschung.* – 1999. – Vol. 49, № 3. – P. 207-211.
8. Ischemic preconditioning does not improve myocardial preservation during off-pump multivessel coronary operation / H.J. Penttila, M.V. Lepojarvi, P.K. Kaukoranta et al. // *Ann Thorac Surg.* – 2003. – Vol. 75, № 4. – P. 1246-1252.
9. Expression of hypoxia inducible factor 1 in the brain of rats during chronic hypoxia / J.C. Chavez, F. Agani, P. Pichiule et al. // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – Vol. 89, № 5. – P. 1937-1942.

10. Renal Anaemia Treatment with Recombinant Human Erythropoietin Increases Cardiac Output in Patients with Ischaemic Heart Disease / T. Linde, B. Wikstrom, L.G. Andersson et al. // Scand. J. Urol. Nephrol. – 1996. – Vol. 30, № 2. – P 115-120.

**Рецензенты:**

Маль Г.С., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой фармакологии КГМУ, г. Курск.

Будко Е.В., д.м.н., профессор КГМУ, г. Курск.