

## ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА И РЕСВЕРАТРОЛА ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ИШЕМИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ МИОКАРДА

Даниленко Л.М.

*ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия (30500, г. Белгород, ул. Победы, 85), e-mail: Danilenko\_L@bsu.edu.ru*

В настоящей работе проведена экспериментальная оценка эффективности применения рекомбинантного эритропоэтина и ресвератрола при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда. Было выявлено, что введение рекомбинантного эритропоэтина и ресвератрола достоверно, относительно контрольной группы животных, уменьшало распространенность зоны некроза миокарда левого желудочка при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда до  $13,2 \pm 0,3$  % и  $15,2 \pm 0,8$  соответственно. Тогда как в контрольной группе животных данный показатель составил  $27,3 \pm 1,2$  %. Предварительная блокада АТФ-зависимых калиевых каналов глибенкламидом, неселективная блокада NO-синтазы с помощью L-NAME и селективная блокада индуцибельной NO-синтазы с помощью амингуанидина нивелировала эффекты рекомбинантного эритропоэтина и ресвератрола протекторное действие дистантного preconditionирования. Защитное действие рекомбинантного эритропоэтина и ресвератрола осуществляется за счет активации системы синтеза оксида азота и через АТФ-зависимые калиевые каналы, что доказывает реализацию их эффектов по механизму, схожему с механизмом реализации эффектов дистантного ишемического preconditionирования.

Ключевые слова: рекомбинантный эритропоэтин, ресвератрол, дистантное ишемическое preconditionирование.

## USE OF RECOMBINANT ERITROPOIETIN AND RESVERATROL FOR PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF MYOCARDIAL ISHEMIC INJURIES

Danilenko L.M.

*FSAEI HVE «Belgorod National Research University», Belgorod, Russia (30500, Belgorod, Pobeda street 85), e-mail: DanilenkoL@bsu.edu.ru*

In this paper we present experimental evaluation of the use of recombinant erythropoietin and resveratrol while simulating myocardial infarction. It was perceived that inserting of recombinant erythropoietin and resveratrol considerably lowered the expansion of necrotic myocardial zone in the left ventricle of heart up to  $13,2 \pm 0,3$  % and  $15,2 \pm 0,8$  relatively (in comparison with a control group of animals). While this figure was  $27,3 \pm 1,2$  % in a control group. Preparatory blockade of ATP-sensitive potassium channels with glibenclamide, nonselective blockade of NO-synthase with L-NAME and selective blockade of inducible NO-synthase with aminoguanidine neutralized the effects of recombinant erythropoietin and resveratrol, thus showing the protective effect of recombinant erythropoietin. The protective effect of recombinant erythropoietin and resveratrol is due to the activation of nitric oxide synthesis and by the ATP-sensitive potassium channels, which proves the realization of their effects by mechanisms which is similar to the mechanism of the effects of distant ischemic preconditioning.

Keywords: recombinant erythropoietin, resveratrol, distant ischemic preconditioning.

**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 preconditionирования [3], и физических факторов, активирующих определенные звенья внутриклеточных сигнальных систем, ответственных за

увеличение устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии [2]. В фармакологическом аспекте одним из наиболее перспективных гуморальных агентов, принимающих участие в реализации феномена прекондиционирования, является эритропоэтин. В свою очередь ресвератрол, природный фитоэстроген, наряду с антиоксидантной, гиполипидемической, антиагрегантной, эндотелиопротекторной активностью обладает также и кардиопротекцией [9]. Одним из обсуждаемых механизмов кардиопротекции ресвератрола является прекондиционирование. Периоды полувыведения у эритропоэтина и ресвератрола 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 [1]. 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. Известно, что три важных фактора (рецептор аденозина А1, комплексные киназы, в том числе протеинкиназа С (PKC), митоген активируемая протеинкиназа (МАРК) и тирозинкиназы) и каналы калия, чувствительные к митохондрическому АТФ (КАТФ), играют наиболее важную роль в опосредованной прекондиционированием кардиозащите. Другие эффекторы, скорее всего способствующие кардиопротекции посредством аденозина или прекондиционирования (которое вовлечено в процесс замедленного (второго) этапа кардиозащиты) включают в себя МАРК, белки теплового шока, а также iNOS и eNOS.

**Материалы и методы.** Изучение влияния рекомбинантного эритропоэтина (50 МЕ/кг) и ресвератрола (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 ресвератрол 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 (pH 7,4) и 1 мг/мл трифенилтетразолия хлорид. 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 preconditionирование 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 ресвератрола и рекомбинантного эритропоэтина по типу ишемического preconditionирования кроликам за полчаса до введения исследуемых препаратов вводили L-NAME в дозе 25 мг/кг/сут (блокатор эндотелиальной e-NOS синтазы), аминогуанидин 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 ресвератрола 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 ресвератрола, ДИП привела к нивелированию противоишемических эффектов. Величина зоны некроза в группе животных, получавших L-NAME и эритропоэтин, составила  $23,5 \pm 1,2$  %, у ресвератрола  $24,1 \pm 1,3$  %, получавших L-NAME и ДИП –  $25,3 \pm 0,8$  %, аминогуанидин и эритропоэтин –  $28,6 \pm 2,9$  %, аминогуанидин и ресвератрол –  $26,6 \pm 1,9$  %, аминогуанидин и ДИП –  $22,8 \pm 2,0$  %. При блокаде АТФ-зависимых калиевых каналов величина зоны некроза в группе животных, получавших глибенкламид и эритропоэтин, –  $21,2 \pm 1,1$  %, ресвератрол –  $28,5 \pm 1,3$  %, глибенкламид и ДИП –  $24,2 \pm 1,5$  %. Уровень тропонина, как и предполагалось, изменяется с размером площади некроза миокарда левого желудочка (табл. 1).

**Влияние блокады NO-синтазы и АТФ-зависимых калиевых каналов на эффекты рекомбинантного эритропоэтина, ресвератрола, дистантного прекондиционирования и уровень тропонина I при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда (M±m, n=6)**

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

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

Исходя из результатов экспериментов, дистантное ишемическое прекондиционирование, рекомбинантный эритропоэтин 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. 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 [10], спинной мозг, почки [7], сердце [8]. 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 [8]. К механизмам реализации кардиопротективного действия ресвератрола [6] можно отнести: антиоксидантный, противовоспалительный, повышающий активность ферментов NOS, стимулирующих ангиогенез. Но один из самым обсуждаемых 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 ресвератрола. Оксид азота играет важную роль в реализации кардиопротекторных эффектов рекомбинантного эритропоэтина и ресвератрола. 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 ресвератрола активировать протеинкиназы [5] позволяет предположить их триггерную роль в процессе реализации эффектов фармакологического preconditionирования. Вышеизложенное подтверждает наше

предположение о том, что эритропоэтин и ресвератрол 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, фармакологических миметиков preconditionирования, индуцирующего воспроизводимый и стабильный кардиопротективный ответ и в то же время лишенных серьезных побочных эффектов.

### **Выводы**

1. Проведение дистантного ишемического preconditionирования, введение рекомбинантного эритропоэтина и 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, так и рекомбинантного эритропоэтина и ресвератрола на модели коронароокклюзионного инфаркта миокарда.
3. Блокада эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы нивелирует цитопротекторный эффект рекомбинантного эритропоэтина и ресвератрола на модели коронароокклюзионного инфаркта миокарда, что доказывает роль оксида азота в реализации эффектов preconditionирования.

### **Список литературы**

1. Дистантное и фармакологическое preconditionирование – новые возможности стимуляции неоваскулогенеза / И.М. Колесник, М.В. Покровский, О.С. Гудырев и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2010. – № 6. – С. 56-58.
2. Коркушко О.В., Лишневецкая В.Ю. Эндотелиальная дисфункция // Кровообіг та гемостаз. – 2003. – № 2. – С. 4-15.
3. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2006. – № 10. – С. 72-77.
4. Противовосполительные эффекты дистантного ишемического preconditionирования в сочетании с рекомбинантным эритропоэтином / Л.М. Даниленко, М.В. Покровский, О.О. Новиков и др. // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. – 2011. – № 4, вып. 13/2. – С. 49-53.

5. Триггерный механизм противоишемического действия эритропоэтина и резвератрола / Л.М. Даниленко, М.В. Покровский, О.О. Новиков и др. // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. – 2012. – № 10, вып. 18/2. – С. 138-142.
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. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection / O. Oldenburg, Q. Qin, T. Krieg et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – Vol. 286, № 1. – P. H468-H476.
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. Donnelly R., Millar-Craig M.W. Cardiac troponins: IT upgrade for the heart // Lancet. – 1998. – Vol. 351, № 9102. – P. 537-539.
10. Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore / S.Y. Lim, S.M. Davidson, D.J. Hausenloy et al. // Cardiovasc Res. – 2007. – Vol. 75, № 3. – P. 530-535.

**Рецензенты:**

Тохтарь В.К., д.б.н., профессор кафедры фармацевтической технологии медицинского института НИУ «БелГУ», г. Белгород.

Голивец Т.П., д.м.н., профессор кафедры терапии факультета последипломного медицинского образования медицинского института НИУ «БелГУ», г. Белгород.