

© Даниленко Л.М., Покровский М.В., 2015  
УДК 615.22-088.331.1

## КАРДИОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ РЕСВЕРАТРОЛА ПРИ ИШЕМИЧЕСКИХ И РЕПЕРFUЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ МИОКАРДА

*Л.М. Даниленко, М.В. Покровский*

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный  
исследовательский университет», г. Белгород

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 амингуанидином (AG), что показывает, что ресвератрол обеспечивает кардиопротекцию по типу ишемического прекондиционирования, через синтазы оксида азота (NOS).

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

В настоящее время в современной кардиофармакологии продолжается поиск новых эффективных методов защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения. Помимо фармакологических кардио-протекторных средств, важное внимание привлечено к феномену ишемического прекондиционирования (ИП) миокарда [1, 9, 12]. Реализация кардиопротекции ишемического прекондиционирования опосредуется через два окна: во-первых, раннее или классическое прекондиционирование продолжительностью до 3-4 ч и позднее ишемическое прекондиционирование продолжительностью от 1 до 3-4 дней [8].

В последнее время многочисленные экспериментальные исследования посвящены изучению кардиопротекторных свойств ресвератрола (3, 5, 4'-тригидрокси-транс-стильбен), который, является природным фенольным соединением со-

держащимся в вине и кожуре винограда [10]. Известны его гиполипидемическая, антиоксидантная, эстрогенная, антиагрегационная активности, есть результаты по изучению кардиопротективной активности в опытах *in vitro*. Показана эффективность ресвератрола для защиты почек, сердца и мозга от ишемического-реперфузионного повреждения [9]. В клетках почек, ресвератрол оказывает свое защитное действие через активацию синтеза оксида азота (NO) [11].

Проверка гипотезы о кардиопротективной активности ресвератрола, реализуемой через механизмы прекондиционирования явилась целью настоящей работы.

### Материалы и методы

Изучение выживаемости ишемизированного миокарда было проведено на 66-и лабораторных кроликах массой 2-2,5 кг. Инфаркт миокарда воспроизводился на наркотизированных животных (хлорал-

гидрат 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 (рН 7,4) и 1 мг/мл трифенилтетразолия хлорида для образования красного формазана [2, 3, 4, 5]. Подсчет площадей интактного и некротизированного миокарда левого желудочка производили на каждом из четырех срезов с помощью попиксельного анализа в программе Adobe Photoshop 9.0. Уровень Тропонин I (TnI) определяли на иммунофлуоресцентном приборе Triage Meter Pro (Biosite, США).

Ишемическое preconditionирование осуществляли путем 5 минутного прекращения кровотока в лигированной коронарной артерии за 30 минут до тотальной ишемии миокарда. Дистантное ишемическое preconditionирование (ДИП) осуществляли путем наложения жгута на верхнюю треть бедра на 10 минут, 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 в дозе 2 мг/кг. Анализаторы: L-NAME в дозе 25 мг/кг (блокатор индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной (eNOS) NO-синтазы), глибенкламид (блокатор  $K_{ATP}$ -каналов) в дозе 0,4 мг/кг, амингуанидин (блокатор индуцибельной (iNOS) в дозе 100 мг/кг [6, 7].

#### Результаты 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 –  $25,3 \pm 0,8\%$ , амингуанидин и ресвератрол –  $26,6 \pm 1,9\%$ , амингуанидин и ДИП –  $22,8 \pm 2,0\%$ . При блокаде АТФ-зависимых калиевых каналов величина зоны некроза в группе животных, получавших глибенкламид и 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).

Исходя из результатов экспериментов, дистантное ишемическое preconditionирование, фармакологическое preconditionирование ресвератролом 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,

Таблица 1

**Влияние ресвератрола (2 мг/кг) в/в и дистантного ишемического preconditionирования на размер зоны некроза и уровень Тропонина I при острой коронароокклюзии (60 мин) с последующей реперфузией (90 мин.) у наркотизированных кроликов ( $M \pm t$ ; в % от массы левого желудочка;  $n=6$ )**

Группа	% некроза	Уровень тропонина I, нг/мл
Контроль (инфаркта миокарда)	27,3±1,2	16,26±1,9
КО/реперфузия + дистантное preconditionирование	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 preconditionирование + ресвератрол (2 мг/ кг)	9,4±0,5*	4,9±1,3*
КО/реперфузия + L-NAME + дистантное preconditionирование	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 preconditionирование	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 preconditionирование	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 preconditionирование (5 мин); ДИП-дистантное ишемическое preconditionирование (10 мин) верхней трети бедра; \* $p < 0,05$  – в сравнении с контролем; #  $p < 0,05$  – в сравнении с серией без фармакологического анализатора

связанные с реперфузией. 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 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 ресвератрола. Оксид азота играет важную роль в реализации кардиопротекторных эффектов 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 ресвератрола активировать протеинкиназы [2] позволяет предположить их триггерную роль в про-

цессе 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, индуцирующих воспроизводимый и стабильный кардиопротективный ответ и в то же время лишенных серьезных побочных эффектов.

#### Выводы

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

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

3. Блокада эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы нивелирует цитопротекторный эффект рекомбинантного ресвератрола на модели коронароокклюзионного инфаркта миокарда, доказывает роль оксида азота в реализации эффектов preconditionирования.

#### Литература

1. Даниленко Л.М. Противовоспалительные эффекты дистантного ишемического preconditionирования в сочетании с рекомбинантным эритропоэтином / Л.М. Даниленко, М.В. Покровский, О.О. Новиков // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. – 2011. – № 4, вып. 13/2. – С. 49-53.
2. Даниленко Л.М. Триггерный механизм противоишемического действия эритропоэтина и ресвератрола / Л.М. Даниленко, М.В. Покровский, О.О. Новиков // Научные ведомости БелГУ.

- Сер. Медицина. Фармация. – 2012. – № 10, вып. 18/2. – С. 138-142.
3. Колесник И.М. Дистантное и фармакологическое preconditionирование – новые возможности стимуляции неоваскулогенеза / И.М. Колесник, М.В. Покровский, О.С. Гудырев // Кубанский научный медицинский вестник. – 2010. – № 6. – С. 56-58.
4. Коркушко О.В. Эндотелиальная дисфункция / О.В. Коркушко В.Ю. Лишневецкая // Кровообіг та гемостаз. – 2003. – № 2. – С. 4-15.
5. Покровский М.В. 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 // Кубанский научный медицинский вестник. – 2006. – № 10. – С. 72-77.
6. Agnes A. A common mechanism in the protective effects of preconditioning, cardiac pacing and physical exercise against ischemia and reperfusion-induced arrhythmias / A. Agnes, A. Parratt J.R. // Exp. Clin. Cardiol. – 2005. – Vol. 10, № 3. – P. 200-205.
7. Donnelly, R. Cardiac troponins: IT upgrade for the heart / R. Donnelly, M.W. Millar-Craig // Lancet. – 1998. – Vol. 351, № 9102. – P. 537-539.
8. Dipak, K.D. Resveratrol in Cardioprotection: A Therapeutic Promise of Alternative Medicine / K.D. Dipak., M. Nilanjana // Molecular Interventions. – 2006. – Vol. 6. – P. 36-47.
9. Ignatowicz E.W. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases / E.W. Ignatowicz, Baer-Dubowska // Pol. J. Pharmacol. – 2001. – Vol. 53. – P. 557-569.
8. Constans J. Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease / J. Constans, C. Conri // Clin. Chim. Acta. – 2006. – Vol. 368, № 1-2. – P. 33-47.
10. Kuriyama H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascu-

- lar tissues / H. Kuriyama, K. Kitamura, H. Nabata // Pharmacol. Rev. – 1995. – Vol. 47. – P. 387-573.
11. Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore / S.Y. Lim [et al.] // Cardiovasc Res. – 2007. – Vol. 75, № 3. – P. 530-535.
12. Sato M. Myocardial protection by protykin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin / M. Sato, G. Maulik, D.K. Bagchi // Free Radic. Res. – 2000. – Vol. 32. – P. 135-144.

#### CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF RESVERATROL IN ISCHEMIC AND REPERFUSION MYOCARDIAL INJURY

*L.M. Danilenko, M.V. Pokrovsky*

**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).**

*Keywords: hearts, ischemia/reperfusion, preconditioning, resveratrol.*

Даниленко Л.М. – к.ф.н., доц. кафедры фармакологии Белгородского государственного национально исследовательского университета.

E-mail: Danilenko\_L@bsu.edu.ru

Покровский М.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии Белгородского государственного национально исследовательского университета.

E-mail: mpokrovsky@yandex.ru