



УДК 615.22-088.331

## **ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ 3-(2,2,2-ТРИМЕТИЛГИДРАЗИНИИ) ПРОПИОНАТОМ, НОВЫЕ ПУТИ РЕАЛИЗАЦИИ ЕГО ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ**

**Л.М. ДАНИЛЕНКО  
М.В. ПОКРОВСКИЙ  
О.О. НОВИКОВ  
К.А. БЕЛЯЕВ  
К.В. ХАВАНСКИЙ**

*Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет*

*e-mail: Danilenkolyudmila@mail.ru*

В настоящей работе рассмотрена роль АТФ-зависимых калиевых каналов, эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы в реализации цитопротекторного эффекта 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата. Показано, что предварительная блокада АТФ-зависимых калиевых каналов гlibенкламидом, неселективная блокада эндотелиальной NO-синтазы с помощью L-NAME и селективная блокада индуцибельной NO-синтазы с помощью амингуанидина полностью нивелировали протективное действие 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата при коронароокклюзивном инфаркте миокарда. Выявлено, что защитное действие 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата осуществляется за счет активации системы синтеза оксида азота и через АТФ-зависимые калиевые каналы, что доказывает реализацию эффектов 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата по механизму, схожему с механизмом дистантного ишемического preconditionирования.

Ключевые слова: 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат, АТФ-зависимые калиевые каналы, дистантное preconditionирование.

На сегодняшний день ишемическая болезнь сердца (ИБС) является главной причиной инвалидизации и смертности населения всех развитых стран, что заставляет искать новые возможности прогнозирования, оценки риска, диагностики, профилактики и лечения. В связи с этим, в течение последних 20 лет активно разрабатываются и изучаются методы защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения. Эти методы дают возможность ограничить зону некроза, сохранить функции миокарда, предотвратить развитие сердечной недостаточности и улучшить клинические результаты у пациентов с ишемической болезнью сердца и другими заболеваниями, опосредованными эндотелиальной дисфункцией. Одним из методов такой защиты является ишемическое preconditionирование (ИП) – феномен, при котором кратковременные сублетальные эпизоды ишемии коронарной артерии активируют механизмы защиты миокарда от последующего глобального повреждения и способствуют значительному снижению частоты осложнений, возникающих в период ишемии/реперфузии. В случае острой ишемии этот механизм может предотвратить развитие инфаркта миокарда, а если последний все же происходит, ИП обеспечивает его меньший размер, уменьшает вероятность появления аритмии, предохраняет от значительных нарушений функций миокарда левого желудочка, а также уменьшает повреждения миокарда, связанные с реперфузией.

При этом особое внимание уделяется дистантному ишемическому preconditionированию (ДИП), при котором ишемия отдаленного от миокарда органа или ткани, в частности верхней или нижней конечности, может проявлять эффекты, подобные ИП. Преимуществом ДИП является малая инвазивность и доступность, однако его использование имеет ряд ограничений, среди которых пожилой возраст, возможность развития тахифилаксии и др. Поэтому с точки зрения безопасности, универсальности и удобства применения использование фармакологических агентов preconditionирования, которые способны активировать каскад реакций, приводящих к реализации феномена preconditionирования, выглядит предпочтительнее.

Однако перечень препаратов с доказанной способностью выступать в качестве агента preconditionирования ограничен, в связи с этим расширение этого списка является немаловажной задачей. 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат относится к классу миокардиальных цитопротекторов, является парциальным ингибитором окисления жирных кислот и классическим антигипоксантом. Данные свойства 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата известны достаточно давно и являются общепризнанными. Наша же задача



заклучалась в изучении иных механизмов, обеспечивающих противоишемический эффект 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата.

Анализируя стадию реализации защитных эффектов ишемического preconditionирования, многие исследователи обращают внимание на значительную роль АТФ-зависимых  $K^+$ -каналов ( $K^+$ АТФ-каналы). Реализацию их защитного потенциала связывают с гиперполяризацией мембраны вследствие их открытия, активацией системы оксида азота, антиапоптатическими механизмами. Каналы этого типа располагаются на плазматической мембране нервных клеток, на внутренней мембране митохондрий, широко представлены в эндотелии и гладкомышечных клетках мозговых сосудов. Все их изоформы способны принимать участие в реализации защитного эффекта preconditionирования. Однако в настоящее время большинство исследований направлено на изучение роли митохондриального пула  $K^+$ АТФ-каналов.

В связи с этим **целью нашего исследования явилось** изучение роли  $K^+$ АТФ-каналов в реализации цитопротекторного эффекта фармакологического preconditionирования 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионатом и дистантного preconditionирования.

**Материалы и методы.** Изучение выживаемости ишемизированного миокарда было проведено на 66 лабораторных кроликах массой 2-2,5 кг. Влияние 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата на размер зоны некроза при инфаркте миокарда проводили на модели коронароокклюзионного инфаркта миокарда. 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.

Фармакологическое preconditionирование осуществляли с помощью внутривенного введения в маргинальную вену уха кролика 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата (Милдронат®, производства «GRINDEX», Латвия) в дозе 40 мг/кг. Дистантное ишемическое preconditionирование осуществляли путем наложения жгута на верхнюю треть бедра на 10 минут, с последующей 20-минутной реперфузией и воспроизведением модели инфаркта на 30 минут. Контролем правильности наложения жгута служило отсутствие пульса на артериях голени.

Через 30 минут после коронарной окклюзии осуществляли снятие лигатуры и реперфузию миокарда в течение 90 мин. После чего проводили забор крови из правого желудочка в одноразовую вакуумную пробирку с антикоагулянтом, для определения специфического маркера сердечной мышцы Troponin I (TnI). Troponin I является специфическим белком и обнаружен только в миокарде, чем отличается от скелетных изоформ. Уровень тропонина определяли на иммунофлуоресцентном приборе Triage MeterPro (Biosite, США). Оценку площади некротизированного миокарда осуществляли после окончания 90 мин. реперфузии. Поперечные срезы миокарда производили через каждые 0,8 см, начиная с уровня 0,8 см ниже места наложенной лигатуры. Срезы миокарда помещают в емкость, содержащую фосфатный буфер (рН 7,4) и 1 мг/мл трифенилтетразолия хлорид для образования красного формазана. Подсчет площадей интактного и некротизированного миокарда левого желудочка производят на каждом из четырех срезов с помощью пиксельного анализа в программе Adobe Photoshop 9.0.

С целью подтверждения гипотезы о реализации эффектов preconditionирования через активацию системы синтеза оксида азота и АТФ-зависимые калиевые каналы животным вводили L-NAME в дозе 25 мг/кг, глибенкламид в дозе 0,4 мг/кг, амингуанидин в дозе 100 мг/кг.

**Результаты и их обсуждение.** Наложение лигатуры на нисходящую ветвь левой коронарной артерии у кролика в контрольной группе животных приводило к развитию некроза миокарда, размер которого составил  $27,3 \pm 1,2\%$  от всего миокарда. Применение местного preconditionирования путем пережатия левой коронарной артерии за 30 минут до моделирования инфаркта миокарда способствовало достоверному уменьшению площади некротизированного миокарда до  $11,8 \pm 0,8\%$  (см. табл.).

Применение дистантного preconditionирования путем пережатия бедренной артерии, фармакологического preconditionирования путем внутривенного введения Милдронат® в дозе 40 мг/кг и их сочетания за 30 мин. до моделирования коронароокклюзионного инфаркта миокарда привело к достоверному уменьшению площади некротизированного миокарда и составило  $9,05 \pm 0,6$ ,  $20,2 \pm 1,0$  и  $11,69 \pm 0,58$  соответственно.

Наибольшая протективная активность обнаружена при сочетанном использовании дистантного preconditionирования и Милдроната, показатель площади некротизированного миокарда в данной группе животных составил  $11,69 \pm 0,58$  (см. табл.).



Таблица

**Размер зоны инфаркта миокарда и уровня тропонина I в экспериментальных группах при изучении влияния эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы и АТФ-зависимых калиевых каналов на эффекты 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата и дистантного прекондиционирования при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда**

| №<br>n/n | Группа                    | % некроза  | Уровень тропонина I |
|----------|---------------------------|------------|---------------------|
| 1        | Контроль                  | 27,3±1,2   | 16,26 ±1,2          |
| 2        | ДП                        | 9,05±0,6*  | 4,63±0,8*           |
| 3        | Локальное ИП              | 11,8±0,8*  | 5,4±1,4*            |
| 4        | Милдронат                 | 20,2±1,0*  | 12,2±1,1*           |
| 5        | Милдронат+ ДП             | 11,69±0,5* | 6,36 ±2,9*          |
| 6        | L-NAME+ДП                 | 25,3±0,8   | 15,86±0,9           |
| 7        | L-NAME+ Милдронат         | 23,6±1,3   | 16,3 ±1,7           |
| 8        | Глибенкламид+ДП           | 24,2±1,5   | 15,34±1,3           |
| 9        | Глибенкламид + Милдронат  | 32,6±1,8   | 17,69 ±0,9          |
| 10       | Аминогуанидин + ДП        | 22,8±2,0   | 14,58 ±1,8          |
| 11       | Аминогуанидин + Милдронат | 26,3±1,3   | 17,30 ±1,2          |

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с контролем.

Неселективная блокада NO-синтазы с помощью внутривенного введения L-NAME в дозе 25 мг/кг и селективная блокада индуцибельной NO-синтазы (iNOS) с помощью внутривенного введения аминагуанидина в дозе 100 мг/кг на фоне моделирования инфаркта миокарда, применение милдроната и дистантного ишемического прекондиционирования привело к блокированию эффектов ишемического и фармакологического прекондиционирования. Величина зоны некроза получавших L-NAME и Милдронат на фоне моделирования инфаркта миокарда составила 23,6±1,3% в группе животных, получавших L-NAME и дистантное прекондиционирование 25,3±0,8%, аминагуанидин и Милдронат® 26,3±1,3%, аминагуанидин и дистантное прекондиционирование 22,8±2%. Блокада АТФ-зависимых калиевых каналов с помощью внутрибрюшинного введения глибенкломида в дозе 0,4 мг/кг на фоне моделирования инфаркта миокарда, применение Милдроната® и дистантного ишемического прекондиционирования привело к блокированию эффектов ишемического и фармакологического прекондиционирования. Величина зоны некроза в группе животных, получавших глибенкламид и дистантное прекондиционирование, составила 24,2±1,5%, получавших глибенкломид и Милдронат® на фоне моделирования инфаркта миокарда – 32,6±1,8%. Как отмечалось ранее, Тропонин I (TnI) представляет собой маркер, обладающий высокой специфичностью и чувствительностью при повреждении миокарда, что подтверждено различными экспериментальными исследованиями. На это указывают и полученные нами данные в эксперименте при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда (см. табл.).

Вышеизложенное подтверждает наше предположение о том, что 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионат является триггером ишемического прекондиционирования и может вызывать фармакологическое прекондиционирование, а реализация естественных механизмов защиты от ишемии осуществляется за счет активации АТФ-зависимых калиевых каналов и биосинтеза оксида азота

АТФ-зависимые калиевые каналы являются эффекторным механизмом в реализации противоишемического эффекта действия как дистантного ишемического прекондиционирования, так и 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата.

Во время кратковременного (нефатального) 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 отмечаются 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.

Из этого следует, что 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионат можно рекомендовать в качестве препарата фармакологического прекондиционирования.



Важным аспектом профилактики развития хронической сердечной недостаточности является кардиопротекция, которая включает в себя предотвращение ишемическо-реперфузионного повреждения миокарда. Известно, что ишемическое preconditionирование оказывает выраженный кардиопротекторный эффект в отношении персистирующей фибрилляции желудочков, вызванной постишемической реперфузией. На основе этого подхода уже созданы новые протоколы противоишемической защиты в ходе кардиохирургических вмешательств с целью профилактики возникновения синдрома малого выброса. Доказаны клиническая безопасность и кардиопротективная эффективность процедуры ишемического preconditionирования перед первым введением кардиopleгического раствора в условиях экстракорпорального кровообращения. При этом агенты фармакологического preconditionирования также способны полноценно активировать каскад реакций аналогично ИП.

Проведенные эксперименты показали, что внутривенная инфузия 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата в дозе 40 мг/кг перед началом ишемии достоверно уменьшает размер инфаркта и уровень Тропонина I. Полученный инфаркт-лимитирующий эффект несколько менее выражен, чем при использовании ЛП и ДИП, но на порядок лучше, чем в группе контроля, что доказывает наличие у препарата противоишемических свойств.

Реализация противоишемического эффекта предположительно обусловлена, в частности, противовоспалительным эффектом феномена preconditionирования. Природа повреждения миокарда при ишемии и реперфузии после достаточно длительного периода нарушенного кровоснабжения имеет много общих черт с воспалительным процессом. На изолированном сердце крыс установлено, что реперфузируемый миокард характеризуется всеми признаками воспаления: высоким уровнем продукции свободных радикалов, усиленной инфильтрацией нейтрофилов, определяемой как гистологически, так и по миелопероксидазной активности. Реперфузионное повреждение миокарда также в определяющей степени связано с экспрессией на эндотелии молекул адгезии Е-селектина ICAM-1, последующей адгезией и трансэндотелиальной миграцией нейтрофилов. Этот процесс, определяемый высвобождением цитокинов типа фактор некроза опухолей (ФНО-α) и активацией ядерного фактора КР-κВ, протекает по классической двухэтапной схеме развития воспаления. На первом этапе происходит лабильный контакт нейтрофилов с эндотелиоцитами, который определяется взаимодействием Р-сегтина эндотелиоцитов с их лигандами (Р80b-1) на нейтрофилах и сопровождается экспрессией эндотелиоцитами молекул адгезии ICAM-1. На втором этапе осуществляется их прочная адгезия посредством связывания. В результате через 480 мин. в реперфузии ICAM-1-зависимая адгезия нейтрофилов возрастает в 3 раза по сравнению с контролем и в 2,5 раза по сравнению со значением после начала реперфузии. Устранение первичной адгезии лейкоцитов к эндотелию в первую фазу не оказывает существенного влияния на выраженность и динамику реперфузионного повреждения, тогда как предупреждение второго этапа адгезии сопровождается выраженным кардиопротекторным эффектом. При этом активированные клетки эндотелия продуцируют аденозин, который обладает противовоспалительным потенциалом, угнетает активацию нейтрофилов, их адгезию к эндотелию. Аденозин, в свою очередь, является активатором АТФ-зависимых калиевых каналов, через которые запускаются эффекты ИП. Общеизвестно, что ИП способно угнетать воспалительную реакцию, снижать концентрацию провоспалительных агентов ИЛ-6 и ИЛ-8 в плазме через 3 ч после вмешательства наряду с уменьшением тяжести поражения миокарда. Проведенное исследование позволяет констатировать факт, что 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионат является агентом фармакологического preconditionирования, эффекты которого реализуются через активацию АТФ-зависимых калиевых каналов по типу ишемического preconditionирования и, следовательно, дают возможность предположить, что именно этот механизм противоишемического действия 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата выглядит наиболее предпочтительным.

#### **Выводы.**

1. Введение 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата и проведенное дистантное preconditionирование достоверно, относительно контрольной группы животных, уменьшало площадь зоны некроза миокарда левого желудочка при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда.

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 полностью нивелировали протективное действие дистантного preconditionирования и 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата при коронароокклюзивном инфаркте миокарда. Защитное действие 3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионата и дистантного preconditionирования осуществляется за счет активации системы синтеза оксида азота и через АТФ-зависимые калиевые каналы, что доказывает реализацию



эффектов 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата 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. [P. Macho] // *Rev Med Chil.* – 2008. Dec. – Vol. 136(12). – P. 1582-1588.
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). – P. 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. Penttilä, H.J. Ischemic preconditioning does not improve myocardial preservation during off-pump multivessel coronary operation / H.J. Penttilä, M.V.I.C. Lepojärvi, I.C. 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. L489-500.
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. Wikström, D. [L.G. Andersson et al.] // *Scand. J. Urol. Nephrol.* – 1996. – Vol. 30. – P. 115.

## PHARMACOLOGICAL PRECONDITIONING OF 3 - (2,2,2-TRIMETILGIDRAZINIYA) PROPIONATE, NEW WAYS OF IMPLEMENTATION OF ITS ANTIISCHEMIC EFFECTS

**L.M. DANILENKO**  
**M.V. POKROVSKIY**  
**O.O. NOVIKOV**  
**K.A. BELYAEV**  
**A.V. HAVANSKY**

*Belgorod National Research University*

*e-mail: Danilenkoljudmila@mail.ru*

In this paper we consider the role of ATP - dependent potassium channels, endothelial and inducible NO-synthase in the implementation of the cytoprotective effect of 3 - (2,2,2-trimetilgidraziny) propionate. It is shown that pre-blockade of ATP-zavisymyh potassium channels glibenclamide, nonselective blockade of endothelial NO-synthase with L-NAME and the selective blockade of inducible NO-synthase with aminoguanidine completely neutralized the protective effect of 3 - (2,2,2-trimetilgidraziny) propionate koronarooklyuzivnom myocardial infarction. Revealed that the protective effect of 3 - (2,2,2-trimetilgidraziny) propionate is due to activation of nitric oxide synthesis and by ATP-sensitive potassium channels, which proves that the implementation of the effects of 3 - (2,2,2-trimetilgidraziny) propionate on the mechanism is similar to the distant ischemic preconditioning.

Keywords: 3 - (2,2,2 -trimetilgidraziny) propionate, ATP-sensitive potassium channels, distant preconditioning.