

УДК 616-005.4:612.089.6

ВЛИЯНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ СИЛДЕНАФИЛОМ И ВАРДЕНАФИЛОМ НА СОСТОЯНИЕ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА В ИШЕМИЗИРОВАННОЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ

© Колесник И.М.¹, Лазаренко В.А.¹, Покровский М.В.²

¹ Кафедра хирургических болезней ФПО

Курского государственного медицинского университета, Курск;

² кафедра фармакологии

Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

E-mail: kolesnik_inga@mail.ru

Исследовано влияние фармакологического preconditionирования силденафилом и варденафилом на состояние микроциркуляторного русла в ишемизированной скелетной мышце в сравнении с эффектом дистантного ишемического preconditionирования. Определена роль индуцибельной NO-синтазы в реализации полученных эффектов. Ишемию моделировали на мышцах голени крыс. Состояние микроциркуляторного русла оценивали с помощью лазерной доплеровской флоуметрии и гистологического исследования. Выявлено, что силденафил и варденафил улучшают микроциркуляцию в ишемизированной мышце голени крыс за счет стимуляции неоангиогенеза. Полученные результаты позволяют проводить дальнейшие экспериментальные исследования возможности применения силденафила и варденафила для фармакологического preconditionирования.

Ключевые слова: preconditionирование, силденафил, варденафил, ишемия, неоангиогенез, индуцибельная NO-синтаза.

THE INFLUENCE OF PHARMACOLOGICAL PRECONDITIONING WITH SILDENAFIL AND VARDENAFIL ON CONDITION OF MICROVASCULATURE IN THE ISCHEMIC SKELETAL MUSCLE

Kolesnik I.M.¹, Lasarenko V.A.¹, Pokrovskiy M.V.²

¹ Department of Surgical Diseases of FPE of Kursk State Medical University, Kursk;

² Department of Pharmacology of Belgorod State National Research University, Belgorod

The influence of pharmacological preconditioning with sildenafil and vardenafil on condition of microvasculature in the ischemic skeletal muscle has been studied compared with the effect of distant ischemic preconditioning. The role of inducible NO-synthase has been defined in the implementation of the obtained effects. Ischemia was modeled on the leg muscles of rats. The state of microvasculature was assessed using laser doppler flowmetry and histological examination. It was found that sildenafil and vardenafil improve microcirculation in the ischemic leg muscles of rats by neovasculogenesis stimulation. The obtained results allow the possibility of further experimental studies of sildenafil and vardenafil for pharmacological preconditioning.

Keywords: preconditioning, sildenafil, vardenafil, ischemia, neoangiogenesis, inducible NO-synthase.

Эффективность применения preconditionирования для защиты органов и тканей от ишемических повреждений не вызывает сомнений. Труды многих ученых направлены на изучение механизма реализации этого процесса и возможность активации его фармакологическими препаратами. Фармакологическое preconditionирование является наиболее перспективным с клинической точки зрения. Метод лишен потенциальной опасности ишемических эпизодов [1, 9]. Кроме того, фармакологические препараты можно точно дозировать, что позволяет управлять продолжительностью периода толерантности к ишемии [1, 3]. Применение средств, имитирующих ишемическое preconditionирование, кажется многообещающим. Арсенал их широк. Однако данный вопрос остается открытым и не теряет своей актуальности. Ингибиторы фосфодиэстеразы – 5 силденафил и варденафил широко известны как пре-

параты, эффективно влияющие на эректильную дисфункцию. Исследования последних лет выявили, что препараты данной группы обладают стимулирующим влиянием на метаболический путь оксида азота, оказывая выраженный эндотелиопротективный эффект, способны активировать протеинкиназу G и АТФ-зависимые калиевые каналы [4, 5]. Все это предполагает изучать возможность применения их для фармакологического preconditionирования.

В нашем исследовании проведено изучение влияния фармакологического preconditionирования ингибиторами фосфодиэстеразы – 5 на состояние микроциркуляторного русла в ишемизированной скелетной мышце крыс в сравнении с эффектом воздействия дистантного ишемического preconditionирования. Определена роль индуцибельной NO-синтазы в их механизме. В ка-

честве исследуемых препаратов рассматривались силденафил и варденафил.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 170 крысах линии Wistar массой 220-250 г. Каждая группа формировалась не менее чем из десяти животных.

Ишемию скелетной мышцы моделировали на правой голени крысы оперативным удалением бедренной, подколенной, передней и задней большеберцовых артерий. Данная модель приводит к развитию острой ишемии крайне тяжелой степени [3].

Состояние микроциркуляторного русла в мышцах голени оценивали по уровню микроциркуляции и результатам морфологического исследования. Уровень микроциркуляции в мышцах голени определяли при помощи оборудования производства компании Biopac systems: полиграфа MP100 с модулем лазерной доплеровской флоуметрии LDF100C и игольчатого датчика TSD 144. Регистрацию и обработку результатов лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) производили с помощью программы AcqKnowledge версии 4.2., Запись кривой уровня микроциркуляции осуществляли в пяти точках (середина длины мышцы, точки на 3-5 мм выше и ниже, латеральнее и медиальнее первой) в течение 30 секунд в каждой точке. Из полученных пяти значений выводили среднее, которое вносили в протокол и принимали за уровень микроциркуляции в мышцах голени у данного животного. Из 10 полученных значений рассчитывали среднее, которое принимали за уровень микроциркуляции в данной группе животных на данном сроке исследования. Значения микроциркуляции выражались в перфузионных единицах (ПЕ) [3].

Морфологическое исследование выполняли на материале стандартных участков мышц, взятых после выведения животных из эксперимента. Обработку материала производили по стандартной методике с фиксацией в формалине, заливкой в парафин, окраской гематоксилином и эозином. Общеморфологическое и морфометрическое исследования выполняли с применением системы для сканирования и архивирования изображений MiraxDesk.

Животных выводили из эксперимента на 21-е и 28-е сутки после операции. Согласно литературным данным, после моделирования ишемии мышц голени уровень микроциркуляции в них резко снижается, восстановление его начинается лишь после 10 суток, однако до 90 суток остается достоверно ниже значения, зарегистрированного в группе интактных животных [3]. Учитывая ре-

зультаты, полученные при анализе возможности компенсаторного восстановления регионарного кровообращения в применяемой нами модели, а также литературные данные, как наиболее информативные расценены 28-е сутки, 21-е рассматривались как промежуточные.

Дистантное ишемическое прекондиционирование (ДИП) проводили 10-минутным пережатием левой бедренной артерии, с последующей 30-минутной реперфузией непосредственно перед моделированием патологии, затем каждые 46 часов первые семь суток эксперимента [2, 3].

Силденафил вводили внутривенно в суточной дозе 0,22 мг/кг каждые 46 часов первые семь суток эксперимента.

Варденафил вводили внутривенно в суточной дозе 0,5 мг/кг по той же схеме.

Блокаду индуцибельной NO-синтазы (iNOS) – внутрибрюшинным введением аминогуанидина в дозе 100 мг/кг, за 30 минут до проведения дистантного или фармакологического прекондиционирования.

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Microsoft Excel версии 10.0 при помощи средств пакета анализа. «Описательная статистика» применялась для нахождения среднего значения (M) показателей и ошибки среднего (m). «Двухвыборочный t-тест с различными дисперсиями» использовался для сравнения соответствующих показателей в различных группах животных и определения достоверности различий между ними. Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего $p < 0,05$.

Экспериментальные животные были разделены на следующие группы:

1. Интактные (n=10).
2. Ложнооперированные (n=20).
3. С моделированием ишемии мышц голени – контрольная (n=20).
4. С моделированием ишемии мышц голени и проведением ДИП (n=20).
5. С моделированием ишемии мышц голени и введением силденафила (n=20).
6. С моделированием ишемии мышц голени и введением варденафила (n=20).
7. С моделированием ишемии мышц голени и проведением ДИП на фоне блокады индуцибельной NO-синтазы (n=20).
8. С моделированием ишемии мышц голени и введением силденафила на фоне блокады индуцибельной NO-синтазы (n=20).
9. С моделированием ишемии мышц голени и введением варденафила на фоне блокады индуцибельной NO-синтазы (n=20).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее значение уровня микроциркуляции в интактной мышце голени крыс составляет 526 ± 34 ПЕ. Результат не имеет значимых отличий от результатов, полученных другими авторами, применявшими данную модель.

В группе ложнооперированных животных среднее значение уровня микроциркуляции в мышцах правой голени составляет на 21-е сутки 527 ± 10 ПЕ, на 28-е сутки – 532 ± 33 ПЕ. На всех сроках результаты лазерной доплеровской флоуметрии не имеют достоверных отличий от показателей в группе интактных животных – 526 ± 34 ПЕ ($p=0,19$; $p=0,43$ соответственно). При гистологическом исследовании отличий от строения интактных мышц также не выявлено. При моделировании ишемии мышц голени уровень микроциркуляции на 21-е сутки 322 ± 7 ПЕ, на 28-е 361 ± 8 ПЕ, что достоверно ниже значения в интактной мышце ($p < 0,05$). На 21-е сутки ишемизированная мышца макроскопически выглядела набухшей, в ней имелись крупные участки серовато-коричневатого цвета. Данные участки гистологически представляли собой крупные очаги организуемого некроза с резорбцией некротических волокон и разрастанием грануляционной ткани. На 28-е сутки цвет мышцы нормализовывался, но она выглядела несколько гипотрофичной. При гистологическом исследовании участки резорбируемого некроза были значительно мельче, а в микроциркуляторном русле отмечались полнокровие и новообразование единичных капилляров. Вблизи участков некроза встречались пучки атрофированных мышечных волокон.

При оценке уровня микроциркуляции в опытных группах было выявлено, что проведение дистантного ишемического прекодиционирования, введение силденафила и варденафила способствуют эффективному и равнозначному повышению уровня регионарного кровотока в ишемизированной мышце голени крыс. Показатели ЛДФ в этих группах достоверно выше таковых в контрольной группе на соответствующем сроке - ДИП: 21-е сутки – 450 ± 8 ПЕ ($p < 0,05$), 28-е сутки – 702 ± 23 ПЕ ($p < 0,05$); силденафил: 21-е сутки – 435 ± 12 ПЕ ($p=0,00001$), 28-е сутки – 806 ± 42 ПЕ ($p < 0,05$); варденафил: 21-е сутки – 483 ± 20 ПЕ ($p=0,00065$), 28-е сутки – 824 ± 7 ПЕ ($p < 0,0001$). Уровень микроциркуляции во всех опытных группах на 21-е сутки приближается к показателям в группе интактных животных, а на 28-е сутки значительно выше. То есть можно говорить о том, что компенсаторное восстановление регионарного кровообращения в ишемизированных мышцах животных опытных групп произошло до

28-х суток эксперимента. В контрольной серии восстановление исходного значения наблюдается значительно позже (в срок до 3 месяцев).

В развитии ишемического прекодиционирования имеют значение две различные изоформы NO-синтаз: кальцийзависимая эндотелиальная (eNOS), участвующая в ранних фазах ИПК, и кальцийнезависимая индуцибельная (iNOS), генерирующая оксид азота поздней защиты. Авторы «гипотезы оксида азота» считают, что именно повышенная активность iNOS, регистрируемая через 24-72 ч после инициируемого ишемического эпизода, является ответственной за реализацию эффектов отсроченной фазы ИПК [1, 6, 7].

Введение амингуанидина привело к полной отмене полученного ранее эффекта дистантного ишемического прекодиционирования. Показатели ЛДФ в данных опытных группах на 28-е сутки не имеют достоверных отличий от показателя в контрольной группе на этом сроке: ДИП + амингуанидин - 341 ± 7 ПЕ ($p=0,14$). Однако блокада iNOS не отменила эффекта прекодиционирования силденафилом и варденафилом, а лишь уменьшила уровень микроциркуляции до значения не имеющего достоверных отличий от такового в интактной мышце голени крысы 538 ± 19 и 545 ± 26 ПЕ соответственно. Положительное влияние прекодиционирования силденафилом и варденафилом на состояние микроциркуляторного русла в ишемизированной скелетной мышце подтверждено данными гистологического исследования. В группах с фармакологическим прекодиционированием отсутствовали дистрофические изменения мышечных волокон и существенные признаки имевшихся ишемических повреждений. Капилляризация пучков мышечных волокон была равномерной, визуально соответствовала таковой у интактных животных. При иммуногистохимическом исследовании индуцибельной NO-синтазы и CD105 установлено повышение их экспрессии при проведении ДИП и введении силденафила и варденафила во всех участках исследованных мышц голени.

В данном экспериментальном исследовании нами показано, что силденафил и варденафил в применяемых дозах оказывают эффект аналогичный дистантному ишемическому прекодиционированию на модели ишемии мышц голени крысы, способствуя восстановлению микроциркуляции до 28 суток эксперимента, за счет стимуляции неоангиогенеза. Мы применяли силденафил в суточной дозе $0,22$ мг/кг каждые 46 часов первые семь суток эксперимента, варденафил – в суточной дозе $0,5$ мг/кг по той же схеме. Известно, что ежедневное прекодиционирование приводит к постепенной отмене эффекта. Учитывая то, что эффект прекодиционирования начинает ослабе-

вать через 46 часов [8], нами выбрана схема введения суточной дозы через соответствующий промежуток времени. Столь малые дозы препаратов влекут меньшую фармакологическую нагрузку. Кроме того, в ряде исследований доказано, что применение препарата в такой дозе лишает его побочных эффектов [4].

Блокада iNOS амингуанидином полностью нивелировала полученный эффект дистантного ишемического preconditionирования. В группе с применением силденафила и варденафила полной отмены эффекта preconditionирования не произошло, отмечено лишь небольшое его уменьшение.

Фармакологическое preconditionирование силденафилом и варденафилом наряду с дистантным ишемическим preconditionированием может рассматриваться как доступный универсальный инструмент профилактики и коррекции последствий локальной ишемии в хирургии. Причем препараты эффективны в минимальной дозе, не имеющей побочных эффектов, характерных для препарата в обычной дозе. Эффект preconditionирования силденафилом и варденафилом на модели ишемии мышц голени крысы сохраняется при блокаде индуцибельной NO-синтазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бокерия Л.А., Чичерин И.Н. Природа и клиническое значение «новых ишемических синдромов». – М. : НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2007. – 302 с.
2. Колесник И.М., Покровский М.В., Лазаренко В.А., Гудырев О.С. Влияние дистантного preconditionирования на выживаемость ишемизированных тканей // Вестн. эксперим. и клинич. хирургии. – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 214-217.
3. Колесник И.М. Дистантное и фармакологическое preconditionирование. Новые возможности применения в хирургии. – Saarbrücken : LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. – 123 с.
4. Покровская Т.Г., Чулюкова Т.Н., Покровский М.В. Эндотелиопротективные эффекты силденафила и тадалафила при экспериментальном моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота // Кубанский науч. мед. вест. – 2009. – № 4. – С. 136-139.
5. Покровская Т.Г., Чулюкова Т.Н., Покровский М.В., Филиппенко Н.Г. Эндотелиопротективные дозозависимые эффекты силденафила в комбинациях с L-аргинином при экспериментальном моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота // Биомедицина. – 2010. – Т. 1, № 5. – С. 118-120.
6. Bolli R. Causative role of oxyradicals in myocardial stunning: a proven hypothesis // Basic. Res. Cardiol. – 1998. – Vol. 93. – P. 156-162.
7. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2001. – Vol. 33. – P. 1897-1918.
8. Dirnagl U., Becker K., Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia from experimental strategies to clinical use // Lancet. – 2009. – Vol. 8, N 4. – P. 398-412.
9. Sommer C. Ischemic preconditioning: postischemic structural changes in the brain // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 2008. – Vol. 67. – P. 85-92.