

УДК 616-005.4:615.017

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РЕСВЕРАТРОЛА ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ В ХИРУРГИИ

© 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

Исследована возможность применения ресвератрола для фармакологического preconditionирования в хирургии. Эксперимент проведен на крысах линии Wistar. Определено влияние препарата на выживаемость изолированного кожного лоскута на питающей ножке и состояние микроциркуляторного русла в ишемизированной скелетной мышце в сравнении с эффектом дистантного ишемического preconditionирования. Ишемию моделировали на мышцах голени крыс. Состояние микроциркуляторного русла оценивали с помощью лазерной доплеровской флоуметрии и гистологического исследования. Выявлено, что ресвератрол увеличивает выживаемость изолированного кожного лоскута на питающей ножке и стимулирует неоангиогенез в ишемизированной мышце голени крысы. Полученные результаты позволяют проводить дальнейшие экспериментальные исследования возможности применения ресвератрола для фармакологического preconditionирования в хирургии.

Ключевые слова: preconditionирование, ресвератрол, ишемия, неоангиогенез, лазерная доплеровская флоуметрия.

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF POTENTIAL USE OF RESVERATROL FOR PHARMACOLOGICAL PRECONDITIONING IN SURGERY

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 possibility of using Resveratrol for pharmacological preconditioning in surgery is studied. The experiment was carried out on Wistar rats. The influence of Resveratrol on the survival of isolated skin pedicle flap and the microvasculature condition in the ischemic skeletal muscle was determined in comparison with the effect of distant ischemic preconditioning. Ischemia was modeled on leg muscles of rats. The microvasculature condition was assessed by laser Doppler flowmetry and histological examination. It was revealed that Resveratrol improves the survival of isolated skin pedicle flap and stimulates angiogenesis in the ischemic leg muscles of rats. The obtained results allow the possibility of further experimental studies of Resveratrol for pharmacological preconditioning in surgery.

Keywords: preconditioning, Resveratrol, ischemia, neoangiogenesis, laser Doppler flowmetry.

Изучение заложенных в живых организмах процессов самосохранения и самовосстановления, а также изыскание средств их стимуляции – актуальнейшая задача современной медицины. Ишемическое preconditionирование – феномен при котором воздействие подпороговым ишемическим импульсом приводит к активации защитных и восстановительных механизмов, способствующих повышению устойчивости органов и тканей, к последующему альтерирующему ишемическому эпизоду и запуску восстановительных механизмов. Феномен носит не локальный, а организменный характер, включая нейрогенный и гуморальный компонент. На подпороговый ишемический импульс развивается геномный репрограмминг клеток [1, 8]. Известны работы, посвященные изучению эффектов preconditionирования на сердце и головной мозг [6, 8], однако эффекты preconditionирования – цитопротекция и неоангиогенез, лежащие в основе восстановительных

процессов, важны в хирургии. Внедрение в практику фармакологических средств, способствующих активации и продлению этого естественного защитного механизма позволит значительно улучшить результаты лечения [12]. Известен ряд препаратов, способных инициировать процесс без ишемического эпизода [1, 2, 3, 4, 5], однако этот вопрос продолжает быть открытым.

Впервые о целебных свойствах продуктов из винограда упоминается четыре с половиной тысячи лет назад в лечебной книге индусов «Аюрведа», в которой описывается «даракчасав (darakchasava)» (подвергшийся брожению сок красного винограда) как средство, стимулирующее деятельность сердца [11]. В 1940 году ресвератрол (3, 5, 4¹-тригидрокси-транс-стильбен) был впервые идентифицирован в качестве лечебного компонента плодов винограда и был экстрагирован из высушенных корней горца гребенчатого *Polygonum cuspidatum*, широко известного в

Японии как Ко-jo-кон [9, 14]. Исследования последних лет доказали способность вещества инициировать синтез оксида азота посредством индукции экспрессии эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной NO-синтазы (iNOS) [7, 13]. Выявлено, что экспрессия iNOS повышается в течение 24 часов после введения малых доз ресвератрола, тогда как для повышения экспрессии eNOS требуется длительное применение вещества в больших дозах [7]. Все это позволяет предположить возможность применения ресвератрола для фармакологического preconditionирования.

Цель настоящего исследования – установить влияние ресвератрола на выживаемость изолированного кожного лоскута на питающей ножке и состояние микроциркуляторного русла в ишемизированной скелетной мышце в сравнении с эффектом дистантного ишемического preconditionирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент выполнен на 260 крысах линии Wistar массой 220-250 г. Каждая группа формировалась не менее чем из десяти крыс.

Модели ишемии всем животным воспроизводили на вторые сутки эксперимента, поскольку известно, что именно повышенная активность iNOS, регистрируемая через 24-72 часа после инициации процесса, является ответственной за реализацию эффектов «второго окна» preconditionирования [3, 6, 8]. Наркотизацию животных осуществляли внутрибрюшинным введением водного раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг веса [4, 5]. Крыс фиксировали в положении на спине.

Кожный лоскут на питающей ножке выкраивали на брюшке отступив от мечевидного отростка 1 см, по белой линии живота, предварительно наметив по трафарету размер: основание – 1 см, длина – 4 см. Затем его изолировали в полиэтиленовый пакет, края кожи ушивали узловым швом. Степень выживаемости лоскута оценивали на пятые сутки после моделирования (6-е сутки эксперимента) планиметрически, измеряя площадь выжившей ткани. В дальнейшем рассчитывали показатель выживаемости (отношение площади выжившей ткани к изначальной площади лоскута $\times 100\%$) [3, 5].

Ишемию скелетной мышцы моделировали на правой голени крысы оперативным удалением бедренной, подколенной, передней и задней большеберцовых артерий [2, 4]. 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 5 мм выше, ниже, латеральнее и медиальнее первой) в течение 30 секунд в каждой точке, измерения производили в перфузионных единицах (ПЕ). 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 [2, 4].

Морфологическое и иммуногистохимическое 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. [2] Учитывая это, а также результаты, полученные при анализе возможности компенсаторного восстановления регионарного кровообращения в применяемой нами модели, наиболее информативными расценены 28-е сутки, 21-е рассматривались как промежуточные.

Дистантное ишемическое preconditionирование (ДИП) проводили 10-минутным пережатием левой бедренной артерии, посредством наложения жгута на верхнюю треть бедра, каждые 48 часов с первых суток эксперимента, на модели ишемии мышц голени первые семь суток эксперимента [2, 3]. Такая схема обусловлена тем, что через 48 часов эффект preconditionирования ослабевает [1, 2, 8], и именно в первые 7 суток эффективна активация неоангиогенеза в ишемизированной мышце.

Ресвератрол вводили внутривенно в суточной дозе 2,0 мг/кг по той же схеме.

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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При моделировании кожного лоскута на питающей ножке выживает часть его длины, превосходящая ширину основания не более чем в 2 раза. Мы заведомо моделировали лоскут, длина которого в 4 раза превосходила ширину основания.

На пятые сутки в контрольной группе площадь выжившей ткани составила $1,59 \pm 0,03 \text{ см}^2$, показатель выживаемости – 40% от изначальной площади (4 см^2). Все изучаемые методы коррекции способствовали достоверному увеличению площади выжившей ткани по сравнению с контрольной группой. Проведение дистантного ишемического preconditionирования – до значения $2,60 \pm 0,03 \text{ см}^2$ ($p = 0,00001$); введение ресвератрола – до $2,86 \pm 0,03 \text{ см}^2$ ($p < 0,05$).

Таким образом, дистантное ишемическое preconditionирование способствует увеличению выживаемости изолированного кожного лоскута на питающей ножке. Ресвератрол в этой модели оказывает аналогичное действие.

Полученные результаты не опровергли наших предположений о способности ресвератрола инициировать процесс preconditionирования и привели к необходимости исследования других эффектов.

Preconditionирование индуцирует экспрессию генных программ, вовлеченных не только в цитопротекцию, но и в восстановительные механизмы [1, 8]. В связи с этим в дальнейшем исследовании нами изучено влияние ресвератрола на состояние микроциркуляторного русла в ишемизированной скелетной мышце.

Среднее значение уровня микроциркуляции в интактной мышце голени крыс составляет 526 ± 17 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 ± 11 ПЕ, на 28-е сутки – 532 ± 11 ПЕ. На всех сроках результаты лазерной доплеровской флоуметрии не имеют достоверных отличий от показателей в группе интактных животных – 526 ± 17 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 ± 9 ПЕ, что достоверно ниже значения в интактной мышце ($p < 0,05$). При морфологическом исследовании на 21-е и 28-е сутки после моделирования ишемии в мышцах голени выявлены признаки редукции сосудов микроциркуляторного русла, остаточные изменения в мышечных волокнах и строении мышц. Количество кровеносных капилляров в стромальных промежутках резко снижено. Основная масса мышц представлена компактно расположенными мышечными волокнами, в которых определялись очаговые дистрофические изменения в виде неравномерности поперечной исчерченности, стертости продольного миофибриллярного рисунка саркоплазмы, участков сегментации саркомеров. При иммуногистохимическом исследовании в микрососудах мышц голени снижена экспрессия маркера цитопротекции и потенциального роста эндотелия CD105 как на 21-е, так и на 28-е сутки.

При оценке уровня микроциркуляции в опытных группах было выявлено, что проведение дистантного ишемического preconditionирования, введение ресвератрола способствуют эффективному и равнозначному повышению уровня регионального кровотока в ишемизированной мышце голени крыс. Показатели ЛДФ в этих группах достоверно выше таковых в контрольной группе на соответствующем сроке - ДИП: 21-е сутки – 485 ± 14 ПЕ ($p < 0,05$), 28-е сутки – 771 ± 19 ПЕ ($p < 0,05$); ресвератрол 21-е сутки – 485 ± 11 ПЕ ($p = 0,00001$), 28-е сутки 701 ± 16 ПЕ ($p = 0,00001$). 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 регионального кровообращения в ишемизированных мышцах животных опытных групп произошло до 28-х суток эксперимента. Согласно литературным данным восстановление исходного значения микроциркуляции при применении данной модели наблюдается значительно позже (в срок до 3 месяцев) [2].

При макроскопической оценке мышцы ишемизированной голени крыс после проведения дистантного ишемического preconditionирования на 21-е и 28-е сутки ишемии не отличались по цвету и виду от интактных. При гистологическом

исследовании в срезах отсутствовали дистрофические изменения мышечных волокон и существенные признаки имевшихся ишемических повреждений. Капилляризация пучков мышечных волокон была равномерной, четко идентифицировалась по структуре стенок капилляров. Соотношение капилляр/мышечное волокно составило от 1,0 до 1,2. При иммуногистохимическом исследовании экспрессия CD105 равномерно в высокой степени определялась в эндотелии межмышечных капилляров во всех участках исследованных мышц голени. Экспрессия индуцибельной NO-синтазы (iNOS) соответствовала характеру распределения и интенсивности реакции, коррелировала с реакцией на CD105.

Гистологическое исследование ишемизированных мышц в группе с применением ресвератрола не выявило достоверных отличий в динамике морфологических изменений по сравнению с данной группой.

Следовательно, в модели ишемии мышц голени дистантное ишемическое прекондиционирование и ресвератрол оказывают равноценное стимулирующее влияние на неоангиогенез.

Таким образом, в данном экспериментальном исследовании нами показано, что ресвератрол в применяемой дозе оказывает эффект, аналогичный дистантному ишемическому прекондиционированию на модели изолированного кожного лоскута на питающей ножке и ишемии мышцы голени крысы, способствуя увеличению выживаемости лоскута и стимуляции неоангиогенеза в ишемизированной мышце.

Фармакологическое прекондиционирование ресвератролом наряду с дистантным ишемическим прекондиционированием может рассматриваться как доступный универсальный инструмент предупреждения ишемического повреждения мягких тканей в хирургии. Способность ресвератрола стимулировать неоангиогенез позволяет изучать возможность применения его как активатора репаративных процессов.

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., Лазаренко В.А., Покровский М.В. Влияние фармакологического прекондиционирования силденафилом и варденафилом на состояние микроциркуляторного русла в ишемизированной скелетной мышце // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2015. – № 1. – С. 83-87.
3. Колесник И.М., Покровский М.В., Лазаренко В.А. Фармакологическое прекондиционирование эритропозтином – новые возможности оптимизации выживаемости ишемизированных тканей // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2010. – № 3. – С. 32-36.
4. Способ стимуляции неоангиогенеза в ишемизированной скелетной мышце: патент 2547692 Российской Федерации, МПК G09B 23/28, A61K 31/335, A61P 9/10. / Колесник И.М., Покровский М.В., Лазаренко В.А. – № 2014105447/14, заявлено 13.02.2014; опубликовано 10.04.2015, Бюллетень № 10.
5. Способ увеличения выживаемости кожного лоскута в условиях редуцированного кровообращения дигидрохверцетином: патент 2547786 Российской Федерации МПК G09B 23/28, A61K 31/335, A61P 9/10. / Колесник И.М., Покровский М.В., Лазаренко В.А. – № 2014105449/14, заявлено 13.02.2014; опубликовано 10.04.2015, Бюллетень № 10.
6. Bolli R. Causative role of oxyradicals in myocardial stunning: a proven hypothesis // Basic. Res. Cardiol. – 1998. – Vol. 93. – P. 156-162.
7. Dipak K. D., Nilanjana M. Resveratrol in Cardioprotection: A Therapeutic Promise of Alternative Medicine // Molecular Interventions – 2006. – Vol. 6. – P. 36-47.
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. Frémont L. Biological effects of resveratrol // Life Sci – 2000 – Vol. 66 – P. 663-673.
10. Nagaoka T., Hein T.W., Yoshida A., Kuo L. Resveratrol, a Component of Red Wine, Elicits Dilatation of Isolated Porcine Retinal Arterioles: Role of Nitric Oxide and Potassium Channels // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2007. – Vol. 48. – P. 4232-4239.
11. Paul B., Masih I., Deopujari J., Charpentier C.J. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakhasava, an Ayurvedic medicine from India // Ethnopharmacol. – 1999. – Vol. 68. – P. 71-76.
12. Sommer C. Ischemic preconditioning: postischemic structural changes in the brain // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 2008. – Vol. 67. – P. 85-92.
13. Taubert D., Berkels R. Upregulation and activation of eNOS by Resveratrol // Circulation. – 2003. – Vol. 107. – P. 78-79.
14. Vastano, B.C., Chen Z., Zhu N. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of Polygonum cuspidatum // J. Agri. Food Chem. 2000. – Vol. 48. – P. 253-256.