

ВЛИЯНИЕ ДИСТАНТНОГО И ПРЯМОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА ДИНАМИКУ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СТАБИЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ИШЕМИИ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА

Н.И. ЖЕРНАКОВА¹
С.А. АЛЕХИН²
М.В. ПОКРОВСКИЙ¹
Л.В. ИВАНОВА²
И.М. КОЛЕСНИК²
Д.И. КОЛМЫКОВ²
М.В. КОРОКИН¹
Д.В. ЛОПАТИН²
Л.В. КОТЕЛЬНИКОВА²

¹⁾ Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

²⁾ Курский государственный
медицинский университет

e-mail: mpokrovsky@yandex.ru

Длительная ишемия тонкого кишечника ведет к повышению уровня стабильных метаболитов оксида азота в 2,2 раза с последующим их падением во время реперфузии в 2,3 раза. Ишемическое прекондиционирование уменьшает количество стабильных метаболитов оксида азота после эпизода длительной ишемии и увеличивает из уровень после 30-минутной реперфузии.

Ключевые слова: ишемическое прекондиционирование, стабильные метаболиты оксида азота.

Ишемическое и реперфузионное поражение играет одну из важнейших ролей в патогенезе многих заболеваний [1, 2, 3, 5, 12]. Тонкий кишечник не является исключением, и снижение кровотока даже на незначительное время проявляется выраженными морфофункциональными изменениями [11, 20]. Также было установлено, что возобновление кровотока в сосудах кишечника ведет к усилению повреждения [15].

Открытие ишемического прекондиционирования стало новым этапом в понимании реализации протекторного влияния различных факторов и послужило отправной точкой в поиске фармакологического агента, реализующего свое действие по механизмам ишемического прекондиционирования [10, 16, 17, 18].

Однако механизмы протекторного влияния во многом остаются нераскрытыми, в связи с чем целью нашего исследования стало изучение влияния дистантного и прямого прекондиционирования на динамику сывороточного уровня стабильных метаболитов оксида азота как одного из месенджеров прекондиционирования.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на самках белых крыс линии Wistar одного возраста массой 250-280 г. Для исследования взяты крысы без внешних признаков заболевания, прошедшие карантинный режим и содержавшиеся в стандартных условиях вивария Курского государственного медицинского университета.

Животные были распределены по группам следующим образом:

- исходные показатели (10 животных);
- контрольная группа (20 животных) группа в которой моделировалась глубокая 30-минутная ишемия тонкого кишечника с последующей 30-минутной реперфузией;
- группа прямого ишемического прекондиционирования (20 животных) – в данной группе проводилось исследование влияния прямого ишемического прекондиционирования на течение 30-минутной ишемии тонкого кишечника и последующей 30-минутной реперфузией;
- группа прямого ишемического прекондиционирования на фоне введения глибенкламида (20 животных) – в данной группе проводилось исследование влияния прямого ишемического прекондиционирования на течение 30-минутной ишемии тонкого кишечника и последующей 30-минутной реперфузией на фоне введения глибенкламида в дозировке 5 мг/кг;

- группа дистантного ишемического preconditionирования (20 животных) – в данной группе проводилось исследование влияния дистантного ишемического preconditionирования на течение 30-минутной ишемии тонкого кишечника с последующей 30-минутной реперфузией;

- группа дистантного ишемического preconditionирования фоне введения глибенкламида (20 животных) – в данной группе проводилось исследование влияния дистантного ишемического preconditionирования на течение 30-минутной ишемии тонкого кишечника с последующей 30-минутной реперфузией на фоне введения глибенкламида в дозировке 5 мг/кг.

Детально последовательность проведения работы в различных группах хорошо видна на таймлайне (рис. 1).

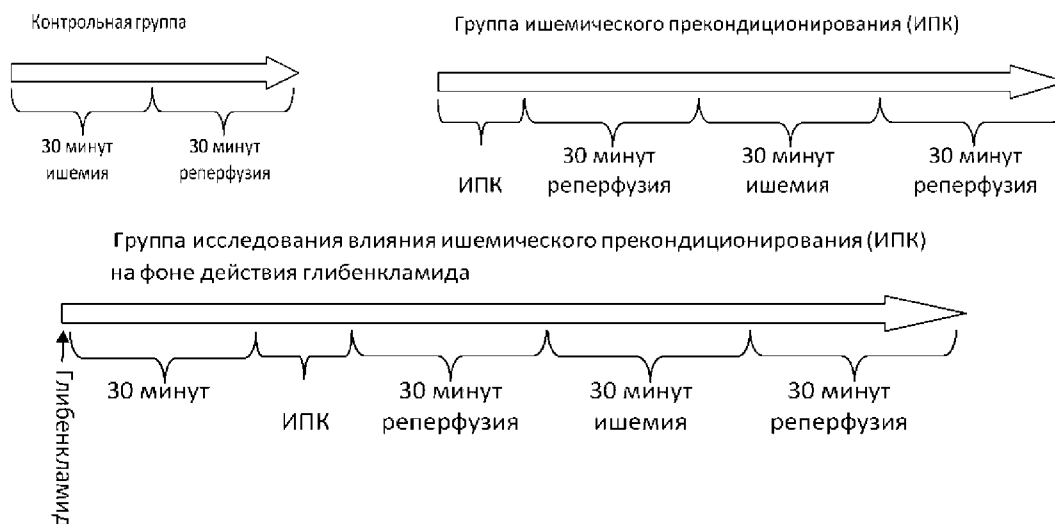


Рис. 1. Таймлайн эксперимента

Уровень стабильных метаболитов оксида азота определяли при помощи реактива Грисса после восстановления нитратов в нитриты и выражали в мкмоль/л.

Уровень микроциркуляции определяли при помощи оборудования BioracsystemsMP100 с модулем лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDF100C и инвазивным игольчатым датчиком TSD144 с записью и обработкой в программе AcqKnowledge 3.9.0.

Статистический анализ полученных данных осуществляли при помощи программы MicrosoftExcel версии 2007, рассчитывая среднее значение (M) показателей, ошибку среднего (m) и критерия достоверности (p), статистически достоверными считали различия при значениях $p \leq 0,05$.

Все манипуляции производили под общим обезболиванием путем внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в дозировке 300 мг/кг.

Глубокую ишемию тканей тонкого кишечника воспроизводили путем пережатия верхней мезентериальной артерии на 30 минут, контролируя эффективность при помощи ЛДФ. Эффективным считали такое пережатие, при котором отмечалось снижение микроциркуляции до недетектируемых величин.

Прямое ишемическое preconditionирование осуществляли путем пережатия верхней мезентериальной артерии. Время пережатия рассчитывали исходя из уровня перфузии ткани, в среднем время прекращения кровотока составило 10 мин.

Дистантное ишемическое preconditionирование осуществляли путем наложения жгута на верхнюю треть бедра на 10 минут с последующей 30-минутной реперфузией до воспроизведения эпизода глубокой ишемии [4].

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования было установлено, что исходные показатели стабильных метаболитов оксида азота находились на уровне $0,728 \pm 0,046$ мкмоль/дл.

При длительной ишемии в течение 30 минут уровень стабильных метаболитов оксида азота повышается до $1,607 \pm 0,126$ мкмоль/дл, а при последующей реперфузии падает до $0,692 \pm 0,103$ мкмоль/дл.

При действии прямого ишемического preconditionирования (ИПК) уровень стабильных метаболитов оксида азота повышается до $1,536 \pm 0,119$ мкмоль/дл после 30-минутного эпизода ишемии, после 30-минутной реперфузии снижается до $1,091 \pm 0,106$ мкмоль/дл, что составляет 95,58% (рис. 2) и 156,21% (рис. 3) от показателей в контрольной группе.

При действии дистантного preconditionирования (ДИПК) на уровень стабильных метаболитов оксида азота изменяется следующим образом: при длительной ишемии отмечается рост до $1,536 \pm 0,119$ мкмоль/дл, а при реперфузии падает до $0,866 \pm 0,125$ мкмоль/дл, что составляет 97,94% (рис. 2) и 125,14% (рис. 3) соответственно.

С целью изучения реализации действия прямого и дистантного ишемического preconditionирования мы использовали введение глибенкламида в дозировке 5 мг/кг за 30 минут до preconditionирования внутрибрюшинно (рис. 1).

При введении глибенкламида за 30 минут до прямого ишемического preconditionирования уровень стабильных метаболитов азота повышается до $1,640 \pm 0,247$ мкмоль/дл после длительной ишемии и снижается до уровня $0,712 \pm 0,167$ мкмоль/дл, что составляет 102,05% (рис. 2) и 102,89% (рис. 3), при отсутствии достоверных различий с контрольной группой $p > 0,05$.

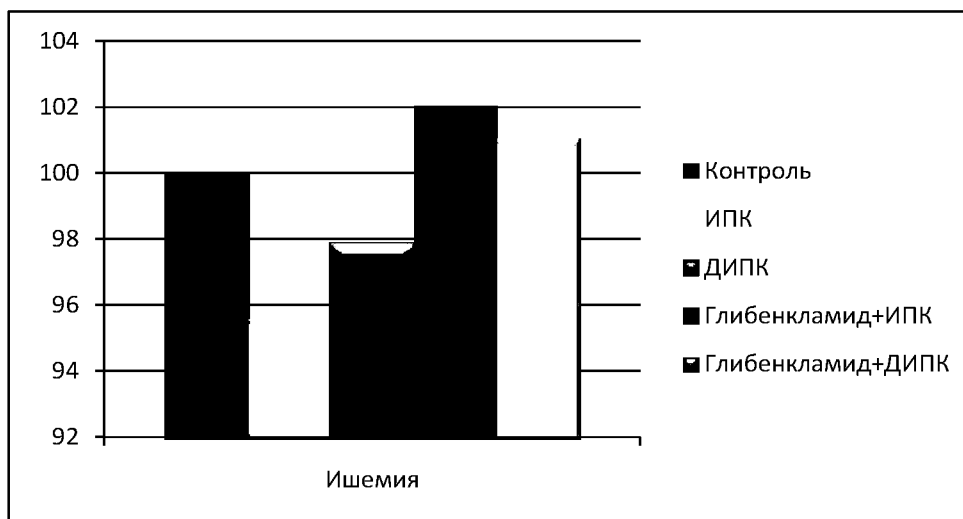


Рис. 2. Влияние preconditionирования и отмены его действия глибенкламидом на уровень стабильных метаболитов оксида азота плазмы крови при длительной ишемии тонкого кишечника

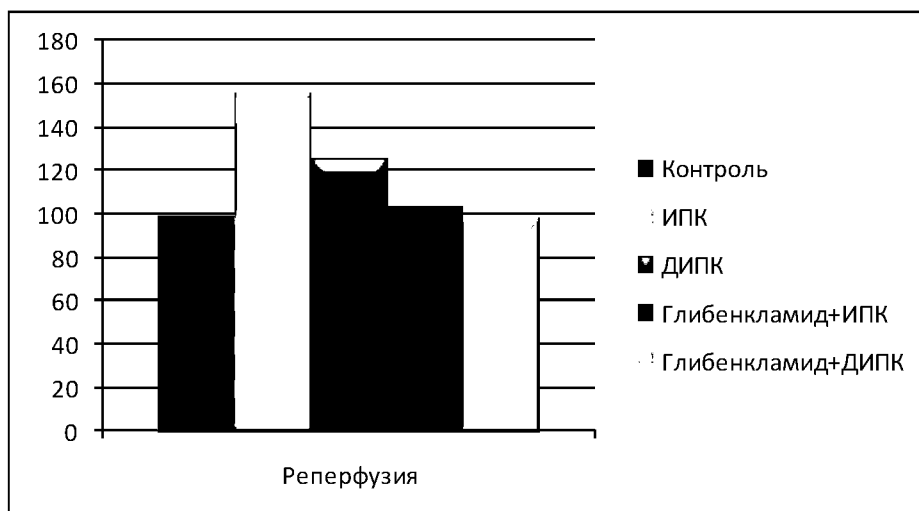


Рис. 3. Влияние preconditionирования и отмены его действия глибенкламидом на уровень стабильных метаболитов оксида азота плазмы крови после длительной ишемии и 30 минутной реперфузии тонкого кишечника



Введение глибенкламида 30 минут до дистантного ишемического прекодиционирования приводило к отмене эффекта воздействия последнего на динамику изменений уровня стабильных метаболитов оксида азота при ишемии и реперфузии тонкого кишечника. Так, после эпизода ишемии уровень стабильных метаболитов оксида азота составил $1,624 \pm 0,141$ мкмоль/дл, а после эпизода реперфузии снижался до $0,683 \pm 0,214$ мкмоль/дл, что составило 101,05% (рис. 2) и 98,69% (рис. 3), и так же как и в случае с отменой действия прямого прекодиционирования, достоверных отличий с контрольной группой не было выявлено ($p > 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о значительных колебаниях в уровне стабильных метаболитов оксида азота во время эпизода ишемии и реперфузии, что говорит об активации экстраорганных NO-синтаз, поскольку как магистральный кровоток так и кровоток в микроциркуляторном русле отсутствует (согласно данным ЛДФ). Это согласуется с данными Randy M. и соавт., говорящими о снижении уровня метаболитов оксида азота в перфузате ишемизированной зоны и восстановлении уровня при возобновлении кровотока [19]. Гипотеза участия оксида азота в механизмах, ответственных за развитие протекторного эффекта при ишемическом прекодиционировании, является на настоящее время наиболее дискуссионной среди исследователей феномена [6, 7, 9, 13, 14], хотя большинство авторов склоняются к мнению о том, что NO является триггером второго окна прекодиционирования [8].

Нами в ходе исследования были получены данные, убедительно свидетельствующие о вовлечении системы оксида азота в процессы, протекающие при прямом и дистантном прекодиционировании.

Выводы:

1. Длительная, 30-минутная ишемия тонкого кишечника ведет к повышению уровня стабильных метаболитов оксида азота в 2,2 раза с последующим их падением во время реперфузии в 2,3 раза;
2. Прямое ишемическое прекодиционирование уменьшает количество стабильных метаболитов оксида азота после эпизода 30-минутной ишемии тонкого кишечника на 4,5% и повышает их уровень после периода 30-минутной реперфузии на 56,2%;
3. Дистантное ишемическое прекодиционирование уменьшает количество стабильных метаболитов оксида азота после эпизода 30-минутной ишемии тонкого кишечника на 2,1% и повышает их уровень после периода 30-минутной реперфузии на 25,1%.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ № МК-905.2012.4.

Литература

1. Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения) / М.В. Биленко. – М. : Медицина, 1989. – 279 с.
2. Власов, Т.Д. Системные нарушения микроциркуляции как следствие органной постишемической реперфузии / Т.Д. Власов // Патологическая физиология микроциркуляции : сб. науч. работ / под ред. Н.Н. Петрищева. – СПб., 1998. – С. 90-106.
3. Капелька, В.И. Эволюция концепций и метаболическая основа ишемической дисфункции миокарда / В.И. Капелька // Кардиология. – 2005. – № 9. – С. 55-61.
4. Влияние дистантного прекодиционирования на выживаемость ишемизированных тканей / И.М. Колесник, М.В. Покровский, В.А. Лазаренко и др. // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 214-217.
5. Крыжановский, Г.Н. Некоторые общепатологические закономерности и базовые механизмы развития патологических процессов / Г.Н. Крыжановский // Арх. патологии. – 2001. – № 6. – С. 44-49.
6. Покровский, В.И. Оксид азота, его физиологические и патологические свойства / В.И. Покровский, Н.А. Виноградов // Терапевт. арх. – 2005. – №1. – С. 82-87.



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 / R. Bolli // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2001. – Vol. 33. – P. 1897-1918.
8. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning / R. Bolli, B. Dawn, X.L. Tang et al. // *Basic. Res. Cardiol.* – 1998. – Vol. 93. – P. 325-338.
9. Bolli, R. Causative role of oxyradicals in myocardial stunning: a proven hypothesis / R. Bolli // *Basic. Res. Cardiol.* – 1998. – Vol. 93. – P. 156-162.
10. Remote organ ischemic preconditioning protect brain from ischemic damage following asphyxial cardiac arrest / K.R. Dave, I. Saul, R. Prado et al. // *Neurosci. Lett.* – 2006. – Vol. 404. – P.170-175.
11. Henninger, D.D. Enterocyte respiration rates in feline small intestine exposed to graded ischemia / D.D. Henninger, D.N. Granger, T.Y. Aw // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 1995. – Vol. 268. – P. 116-120.
12. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog / R.B. Jennings, H.M. Sommers, G.A. Smyth et al. // *Arch. Pathol.* – 1960. – Vol. 70. – P. 68-78.
13. Jugdutt, B.I. Nitric oxide and cardiovascular protection / B.I. Jugdutt // *Heart Fail. Rev.* – 2003. – Vol. 8, № 1. – P. 29-34.
14. Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species / A. Kunz, L. Park, T. Abe et al. // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 27. – P. 7083-7093.
15. Regional differences in gut blood flow and mucosal damage in response to ischemia and reperfusion / F.W. Leung, K.C. Su, E. Passaro et al. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 1992. – 263. – P. 301-305.
16. Brief renal artery occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits / T. McClanahan, B. Nao, K. Wolke et al. // *FASEB J.* – 1993. – Vol. 7. – P. AII8.
17. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium / C.E. Murry, R.B. Jennings, K.A. Reimer et al. // *Circulation.* – 1986. – Vol. 14. – P. 1124-1136.
18. Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion / K. Przienc, B. Bauer, M. Ovize et al. // *Circulation.* – 1993. – Vol. 87, № 3. – P. 893-899.
19. Effectsofinvivomyocardialischemiaand reperfusion on interstitial nitric oxide metabolites / M.S. Randy, M.S. Jahania, E.S. Jennifer et al. // *Ann. Thorac. Surg.* –2002. – Vol. 73. – P. 1261-1266.
20. Wells, C.L. Bacterial translocation / C.L. Wells, M.A. Maddaus, R.L. Simmons // *Splanchnic Ischemia and Multiple Organ Failure* // Edward Arnold, London, 1989. – P. 195-204.

EFFECT OF DISTANT AND DIRECT PRECONDITIONING ON THE DYNAMICS OF THE STABLE METABOLITES OF NITRIC OXIDE DURING ISCHEMIA OF THE SMALL INTESTINE

N.I. GERNAKOVA¹, S.A. ALEHIN²
M.V. POKROVSKIY¹, L.V. IVANOVA²
I.M. KOLESNIK², D.I. KOLMIKOV²
M.V. KOROKIN¹
D.V. LOPATIN²
L.V. KOTELNIKOVA²

¹⁾ *Belgorod National Research University*

²⁾ *Kursk State Medical University*

e-mail: mpokrovsky@yandex.ru

Prolonged ischemia of the small intestine leads to increased levels of stable metabolites of nitric oxide by 2.2 times and their subsequent decline during reperfusion by 2.3 times. Ischemic preconditioning reduces the number of stable metabolites of nitric oxide after an episode of prolonged ischemia and increase their level after 30 minutes of reperfusion.

Key words: ischemic preconditioning, stable metabolites of nitric oxide.