

КАРДИОПРОТЕКТОРНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДИСТАНТНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У КРЫС С ГИПЕРХОЛЕСТЕРОЛЕМИЕЙ

Чепелев С. Н., Висмонт Ф. И.

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Реферат. Настоящее исследование посвящено выявлению воспроизводимости кардиопротекторного эффекта дистантного ишемического посткондиционирования миокарда у крыс с гиперхолестеролемией. Установлено, что дистантное ишемическое посткондиционирование не эффективно в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с гиперхолестеролемией. Дистантное ишемическое посткондиционирование эффективно

в плане снижения продолжительности нарушений сердечного ритма во время острой ишемии-реперфузии миокарда у крыс с гиперхолестеролемией. Наличие гиперхолестеролемии может служить критерием для исключения дистантного ишемического посткондиционирования в качестве способа уменьшения ишемических и реперфузионных повреждений миокарда у пациентов с острым инфарктом миокарда.

Введение. В настоящее время ишемическая болезнь сердца (ИБС) является важнейшей причиной смертности в развитых странах мира и Республике Беларусь в частности [1]. В связи с этим, поиск новых эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического повреждения миокарда остается актуальной задачей современной медицины [2].

В последние годы объектом повышенного интереса ведущих мировых исследователей в области кардиологии являются кардиопротекторные (противоишемический и антиаритмический) эффекты дистантного ишемического пре- (ДИПК) и посткондиционирования (ДИПостК), которые воспроизводятся ишемией конечностей, осуществляемой до и после острой ишемии миокарда [3, 4]. В клинической практике необходимость защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения чаще всего возникает у пациентов с различными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, к числу которых относится и гиперхолестеролемиа (ГХЕ).

В современной литературе имеются данные, касающиеся воспроизводимости кардиопротекторных эффектов локального ишемического пре- и посткондиционирования у экспериментальных животных с ГХЕ, которые весьма противоречивы: одни исследования указывают на отсутствие противоишемических эффектов [1, 4], а другие исследования, напротив, указывают на присутствие у экспериментальных животных с ГХЕ выраженного инфарктлимитирующего эффекта указанных феноменов [3]. Причины такого расхождения результатов исследований до сих пор не выяснены. В то же время, изучение кардиопротекторной эффективности ДИПостК в условиях наличия ГХЕ до сих пор не было предметом специального исследования.

Цель работы — выявление воспроизводимости противоишемического и антиаритмического эффектов дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с гиперхолестеролемией.

Материалы и методы. Исследование эффективности ДИПостК выполнено на 58 наркотизированных нелинейных белых крысах-самцах. Масса крыс составляла 200–250 г, а их возраст — 4 ± 1 мес. Животные содержались в стандартных условиях вивария УО БГМУ со свободным доступом к пище и воде. ГХЕ вызывали интрагастральным введением животным с помощью металлического атравматического зонда длиной 8 см, с оливой диаметром 2 мм, 10 % раствора холестерина (Sigma, США),

приготовленного на оливковом масле, в дозе 10 мл/кг 1 раз в сутки в течение 10 дней ($n = 37$). В качестве контроля использовали 21 крысу с аналогичными характеристиками, которым в течение 10 дней интрагастрально вводилось оливковое масло в дозе 10 мл/кг (крысы без ГХЕ). Для подтверждения наличия ГХЕ у крыс выполнялось биохимическое исследование сыворотки крови с помощью биохимического анализатора Olympus (крысы с ГХЕ, $n = 8$, крысы без ГХЕ, $n = 8$). С этой целью из левой общей яремной вены осуществляли забор крови в объеме 1 мл. При проведении биохимического исследования в сыворотке крови крыс определяли ферментативным методом содержание общего холестерина (ОХ) и триглицеридов (ТГ) с использованием наборов реагентов научно-технического производственного кооператива «Анализ X» (Беларусь).

Острую коронарную недостаточность у крыс воспроизводили по методике, описанной С. Clark et al. [5]. Моделирование острой коронарной недостаточности у крыс с ГХЕ/без ГХЕ выполнялось через 24 часа после последнего введения животным холестерина/оливкового масла. Для наркотизации животных применяли тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг внутривентриально с последующей внутривенной инфузией поддерживающей дозы 10 мг/кг/ч с помощью инъекционного насоса В. Braun (Германия). Крыс переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом через трахеостому при помощи аппарата ИВЛ фирмы Harvard (Великобритания). Температура тела измерялась в прямой кишке с помощью электротермометра и поддерживалась электрогрелкой на уровне 37,0 °С. Грудную клетку вскрывали в четвертом межреберном промежутке слева. Интубированным животным после 15-минутной стабилизации гемодинамики выполняли 30-минутную окклюзию передней нисходящей коронарной артерии путем механического ее пережатия при помощи фишки. Реперфузия миокарда достигалась простым удалением фишки. Длительность реперфузии составляла 120 мин. Животные опытной группы (ДИПостК, $n = 7$) дополнительно подвергались воздействию 15-минутной окклюзии обеих бедренных артерий через 10 мин после 30-минутной острой ишемии миокарда.

В ходе экспериментов непрерывно регистрировались ЭКГ во II стандартном отведении и системное артериальное давление (АД), полученные при этом данные обрабатывались с помощью компьютерной программы Spike 4.

Зону риска определяли с помощью внутривенного введения в левую общую яремную вену 0,5 мл 5%-ного раствора синьки Эванса в конце реперфузии при кратковременной повторной окклюзии коронарной артерии. Таким образом, зона риска определялась как не окрашенная в синий цвет. Затем сердце извлекали и отделяли правый желудочек.

После замораживания в морозильной камере при температуре -20 °С в течение 30 мин левый желудочек разрезали на 6 поперечных срезов.

Срезы взвешивали при помощи торсионных весов, затем сканировали при помощи сканера с обеих сторон. После этого для идентификации зоны некроза срезы помещали в 1%-ный раствор трифенилтетразолия хлорида на 15 мин при температуре 37 °С. Жизнеспособный миокард (клетки, сохранившие дегидрогеназную активность) окрашивался в кирпично-красный цвет, некротизированная ткань была белесой. После 24-часовой инкубации срезов в 10%-ном растворе формалина срезы сканировали повторно для определения соотношения площадей зоны риска и зоны некроза. Размеры зон риска и некроза определяли при помощи компьютерной планиметрии с использованием программы Adobe Photoshop 6.0. Полученные в исследовании результаты заносились в электронную таблицу Excel 7.0 и обрабатывались с помощью стандартного пакета статистических программ Statistica 8. Статистическая значимость различий размеров зон риска и некроза оценивалась при помощи ANOVA и теста множественных сравнений Данна. Данные представлены в формате среднее \pm стандартная ошибка среднего. Значения $p < 0,05$ рассматривались как достоверные.

Результаты и обсуждение. Выживаемость крыс с ГХЕ после острой коронарной окклюзии составила 56,8 % (16 крыс из 37 погибли во время острой ишемии миокарда). Выживаемость в контрольной группе составила 63,6 %, в группе ДИПостК — 58,3 %.

У крыс с ГХЕ ($n = 8$) содержание ОХ в сыворотке крови составило $5,74 \pm 0,44$ ммоль/л ($p < 0,01$), ТГ — $1,21 \pm 0,17$ ммоль/л ($p < 0,01$). У крыс без ГХЕ ($n = 8$) содержание ОХ составило $1,61 \pm 0,14$ ммоль/л, ТГ — $0,50 \pm 0,05$ ммоль/л. Таким образом, результаты биохимического исследования сыворотки крови свидетельствовали о наличии ГХЕ у крыс, которым в течение 10 дней интрагастрально вводили 10 % раствор холестерина.

Изменения показателей гемодинамики на протяжении эксперимента (после вскрытия грудной клетки, в начале 30-минутной ишемии миокарда, в начале реперфузии и далее каждые 30 минут в течение реперфузии) у крыс с ГХЕ ($n = 7$) и крыс без ГХЕ ($n = 7$) представлены в таблице.

В группах крыс с ГХЕ в течение первых минут после окклюзии ПНКА отмечалось кратковременное (3–5 мин) статистически не значимое снижение АДср. примерно на 10–15 мм рт. ст. В дальнейшем в период реперфузии миокарда показатель АДср. во всех группах крыс с ГХЕ оставался относительно стабильным по сравнению с его исходным значением ($p < 0,05$). Статистически значимых отличий между анализируемыми группами крыс с ГХЕ по показателю ЧСС на протяжении всего эксперимента выявлено не было ($p > 0,05$). Длительность нарушений ритма сердца во время 30-минутной ишемии миокарда у крыс с ГХЕ и крыс без ГХЕ представлена на рис. 1.

**Показатели гемодинамики (АДср., мм рт. ст. и ЧСС, уд/мин)
в контрольной группе и группе крыс, в которой воспроизводилось ДИПостК
(крысы с ГХЕ и крысы без ГХЕ)**

Группа		Контроль		ДИПостК	
Крысы с ГХЕ/без ГХЕ		Крысы с ГХЕ	Крысы без ГХЕ	Крысы с ГХЕ	Крысы без ГХЕ
До начала ОИМ	АДср.	76 ± 5	86 ± 5	73 ± 3	73 ± 3
	ЧСС	424 ± 16	417 ± 9	456 ± 11	410 ± 16
Начало ОИМ	АДср.	73 ± 3	77 ± 8	64 ± 3	74 ± 4
	ЧСС	425 ± 12	439 ± 6	433 ± 19	429 ± 14
Начало реперфузии	АДср.	78 ± 5	74 ± 2	67 ± 2 ¹	74 ± 4
	ЧСС	446 ± 25	413 ± 16	44 ± 8	410 ± 23
30' реперфузии	АДср.	83 ± 7	74 ± 4	72 ± 4	75 ± 4
	ЧСС	466 ± 20	411 ± 12	446 ± 19	404 ± 22
60' реперфузии	АДср.	77 ± 8	73 ± 4	73 ± 5	78 ± 4
	ЧСС	433 ± 13	413 ± 15	467 ± 24	410 ± 22
90' реперфузии	АДср.	71 ± 6	78 ± 3	69 ± 6	77 ± 4
	ЧСС	432 ± 13	433 ± 14	462 ± 25	396 ± 19
120' реперфузии	АДср.	70 ± 5	82 ± 5	67 ± 6	85 ± 3
	ЧСС	434 ± 10	436 ± 20	435 ± 19	426 ± 16

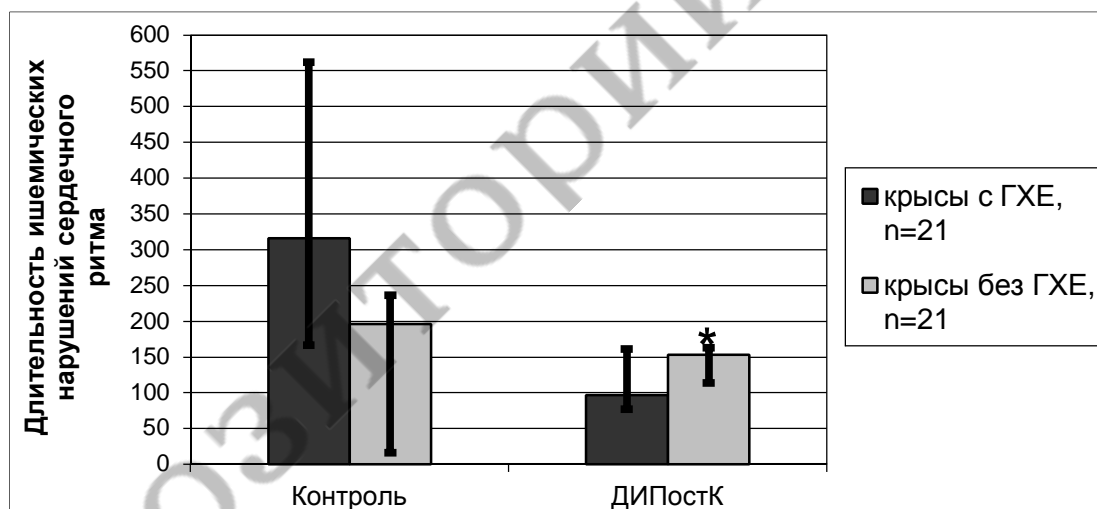


Рис. 1. Длительность нарушений сердечного ритма (в сек.) во время 30-минутной ишемии миокарда в контрольной группе и группе крыс, в которой воспроизводилось ДИПостК (крысы с ГХЕ и крысы без ГХЕ)

* — статистически значимые отличия длительности ишемических нарушений сердечного ритма у крыс с ГХЕ в группе ДИПостК, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)

У крыс с ГХЕ во время 30-минутной ишемии миокарда наблюдались нарушения сердечного ритма продолжительностью в контрольной группе с ГХЕ — 315 (157; 563) сек., в группе крыс с ГХЕ после ДИПостК — 96 (76; 156) сек. ($p < 0,05$). У крыс без ГХЕ длительность аритмии во время

острой ишемии миокарда в группе контроль составила 198 (14; 239) сек., в группе с ДИПостК — 153 (109; 166). При этом у 5 из 7 крыс отмечалась ФЖ, а у 6 из 7 — ПЖТ. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма имели место у 6 крыс контрольной группы. В группе крыс с ГХЕ, в которой воспроизводилось ДИПостК, во время острой ишемии миокарда отмечались нарушения ритма сердца продолжительностью от 19 до 188 сек. Лишь у 1 из 7 крыс данной группы была выявлена ФЖ, а ПЖТ наблюдалась у 5 крыс указанной группы. Реперфузионные нарушения сердечного ритма были выявлены у 3 животных группы ДИПостК.

Таким образом, несмотря на то, что ДИПостК не оказывает влияние на нарушения сердечного ритма во время острой ишемии миокарда, в группе ДИПостК с ГХЕ имеет место статистически значимое снижение продолжительности ишемических нарушений сердечного ритма по сравнению с группой контроль ГХЕ.

Несмотря на наличие тенденции к снижению размеров зоны риска в миокарде левого желудочка во всех группах крыс с ГХЕ по сравнению с крысами без ГХЕ, статистически значимых различий между анализируемыми группами крыс с ГХЕ и крыс без ГХЕ по данному показателю не выявлено ($p > 0,05$). Таким образом, размеры зоны риска во всех группах крыс были сопоставимы (рис. 2).

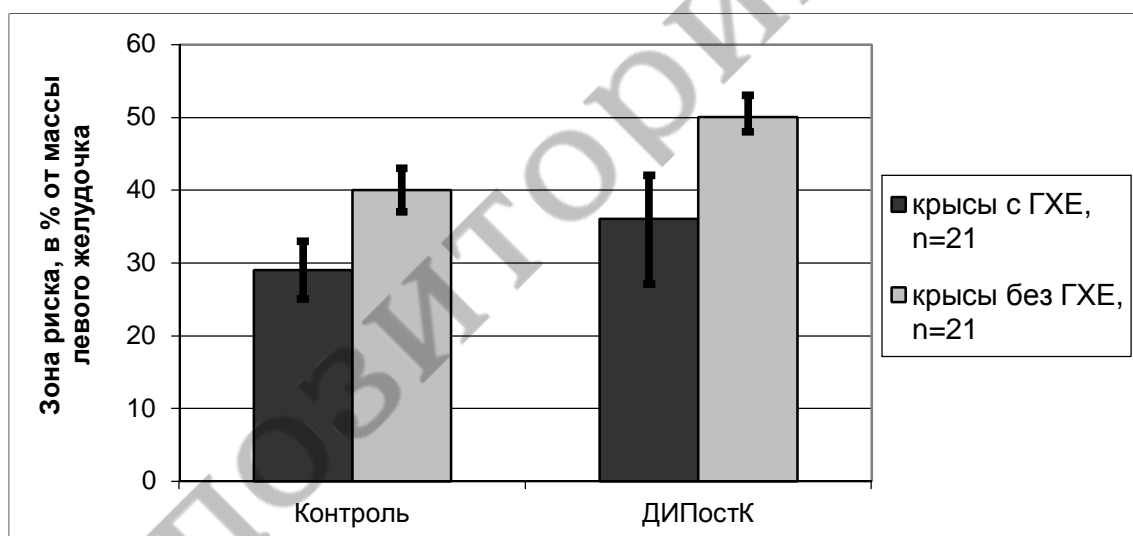


Рис. 2. Размеры зоны риска (в % от массы левого желудочка) в контрольной группе и группах крыс, в которых воспроизводилось ДИПостК (крысы с ГХЕ и крысы без ГХЕ)

Размер зоны некроза в миокарде левого желудочка в контрольной группе крыс с ГХЕ составил 38 ± 4 % (у крыс без ГХЕ — 44 ± 5 %) (рис. 3). В группе крыс с ГХЕ, в которой воспроизводилось ДИПостК, отмечался сопоставимый с группой контроля размер зоны некроза — 43 ± 6 %. У крыс без ГХЕ в группе контроль выявлена зона некроза размером 46 ± 4 %, а в группе ДИПостК — 25 ± 2 % ($p < 0,01$).

Следовательно, данные исследования свидетельствуют об отсутствии противоишемического эффекта ДИПостК у крыс с ГХЕ. У крыс без ГХЕ, напротив, воспроизводится выраженный противоишемический эффект ДИПостК.

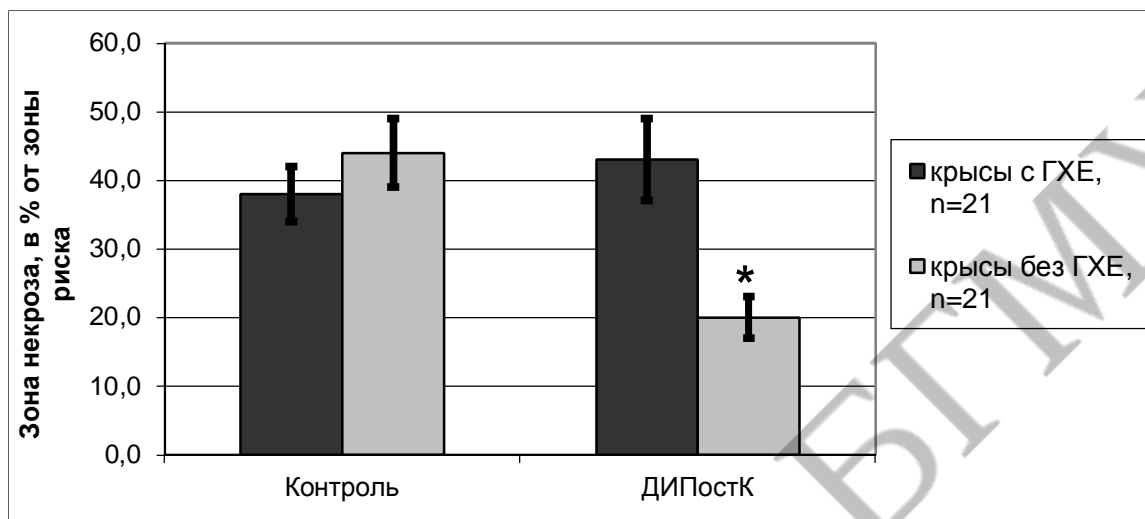


Рис. 3. Размеры зоны некроза (в % от зоны риска) в контрольной группе и группах крыс, в которых воспроизводилось ДИПостК (крысы с ГХЕ и крысы без ГХЕ)

* — статистически значимые отличия размеров зоны некроза в группе ДИПостК по сравнению с контрольной группой у крыс без ГХЕ ($p < 0,01$)

Учитывая наличие тенденции к снижению размеров зоны риска в миокарде левого желудочка в группе крыс с ГХЕ по сравнению с крысами без ГХЕ, можно предполагать, что меньшие размеры зоны риска у крыс с ГХЕ способствовали формированию более низких значений размеров зоны некроза миокарда. Был проведен дополнительный расчет размеров зоны некроза миокарда в % от массы левого желудочка (рис. 4). В результате средняя зона некроза в контрольной группе крыс с ГХЕ составила $11,4 \pm 0,6$ % (у крыс без ГХЕ — $18,5 \pm 0,8$ %). В группе крыс с ГХЕ, в которой воспроизводилось ДИПостК, размер зоны некроза составил $14,3 \pm 0,7$ % (у крыс без ГХЕ — $12,3 \pm 0,6$ %, $p < 0,01$). Таким образом, в группах крыс с ГХЕ, в которых воспроизводилось ДИПостК, размеры зоны некроза также были сопоставимы с таковыми в контрольной группе.

Известно, что при наличии ГХЕ у экспериментальных животных отсутствие противоишемического эффекта локального ишемического пре- и посткондиционирования может быть связано с нарушением синтеза монооксида азота (NO), который также имеет важное значение в реализации кардиопротекторных эффектов указанных феноменов. В частности, при ГХЕ нарастающая митохондриальная дисфункция приводит к повышению оксидации тетрагидробиоптерина (ТГБП), что приводит к снижению его содержания в клетке. Потеря ТГБП, как молекулы-кофактора эндотелиаль-

ной NO-синтазы, приводит к значительному снижению активности данного фермента.

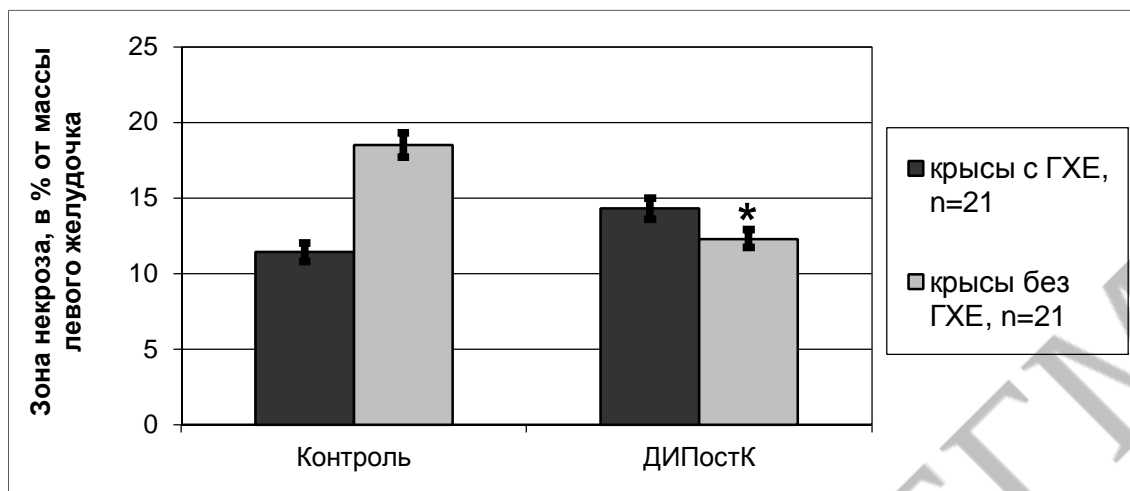


Рис. 4. Размеры зоны некроза (в % от массы левого желудочка) в контрольной группе и группах крыс, в которых воспроизводилось ДИПостК (крысы с и без ГХЕ)

* — статистически значимые отличия размеров зоны некроза в группе ДИПостК по сравнению с контрольной группой у крыс без ГХЕ ($p < 0,01$)

Таким образом, принимая во внимание возможную общность механизмов реализации кардиопротекторных эффектов феноменов локального и дистантного ишемического посткондиционирования, нарушение синтеза NO может объяснить отсутствие противоишемического эффекта ДИПостК у крыс с экспериментальной моделью ГХЕ.

Заключение. Дистантное ишемическое посткондиционирование не эффективно в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с ГХЕ. Дистантное ишемическое посткондиционирование эффективно в плане снижения продолжительности нарушений сердечного ритма во время острой ишемии-реперфузии миокарда у крыс с ГХЕ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сердечно-сосудистые заболевания в Республике Беларусь : анализ ситуации и стратегии контроля* / А. Г. Мрочек [и др.]. Минск : Беларус. навука, 2011. 341 с.
2. *Шляхто, Е. В.* Ограничение ишемического и реперфузионного повреждения миокарда с помощью пре- и посткондиционирования : молекулярные механизмы и мишени для фармакотерапии / Е. В. Шляхто, Е. М. Нифонтов, М. М. Галагурда // Креативная кардиология. 2007. № 1–2. С. 75–102.
3. *Hausenloy, D. J.* Preconditioning and postconditioning : united at reperfusion / D. J. Hausenloy, D. M. Yellon // Pharmacol. Ther. 2007. Vol. 116, № 2. P. 173–191.
4. *Basalay, M.* Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning — similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms / M. Basalay, V. Barsukevich, S. Mastitskaya // Exp. Physiol. 2012. Vol. 97, № 8. P. 908–917.

5. *Clark, C.* Coronary artery ligation in anesthetized rats as a method for the production of experimental dysrhythmias and for the determination of infarct size / *C. Clark // J. Pharmacol. Methods.* 1980. Vol. 3, № 4. P. 357–368.

Cardioprotective efficiency of remote ischemic postconditioning during ischemia-reperfusion in rats with hypercholesterolemia

Chepelev S. N., Vismont F. I.

This study is devoted to the identification of reproducibility cardioprotective effect of remote ischemic postconditioning myocardium of rats with hypercholesterolemia. It was found that the remote ischemic postconditioning is not effective in terms of necrosis area size limits in the left ventricle during ischemia-reperfusion in rats with hypercholesterolemia. Remote ischemic postconditioning is effective in reducing the duration of cardiac arrhythmias during acute myocardial ischemia-reperfusion injury in rats with hypercholesterolemia. The existence of hypercholesterolemia can be a criterion for exclusion remote ischemic postconditioning as a way of reducing ischemic and reperfusion injury of the myocardium in patients with acute myocardial infarction.