

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

Висмонт Ф. И., Чепелев С. Н., Глебов А. Н., Юшкевич П. Ф.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Поиск новых эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического повреждения миокарда является актуальной задачей современной экспериментальной и клинической медицины.

Установлено, что дистантное ишемическое посткондиционирование эффективно в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка при ишемии-реперфузии миокарда у старых крыс и неэффективно в плане снижения продолжительности нарушений сердечного ритма во время острой ишемии-реперфузии миокарда у этих животных. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дифференцированного подхода к назначению дистантного ишемического посткондиционирования пациентам с острым инфарктом миокарда (далее — ОИМ). Наличие такого фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний, как пожилой возраст, может служить критерием для исключения дистантного ишемического посткондиционирования в качестве способа уменьшения нарушений ритмической деятельности сердца у пожилых пациентов при ишемических и реперфузионных повреждениях миокарда.

Ключевые слова: противоишемический эффект, антиаритмический эффект, дистантное ишемическое посткондиционирование, зона риска, зона некроза, старые крысы.

Введение. В настоящее время ишемическая болезнь сердца (далее — ИБС) является ведущей причиной смертности как в развитых странах мира, так и Республике Беларусь [1]. Учитывая большую частоту инвалидизации и сложность реабилитации пациентов с инфарктом миокарда, ИБС представляет собой не только значимую медицинскую, но и важную государственную проблему. В связи с этим поиск новых эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического повреждения миокарда остается актуальной задачей современной экспериментальной и клинической медицины [2, 3].

В последние годы объектом повышенного интереса ведущих мировых исследователей в области экспериментальной и клинической кардиологии являются кардиопротекторные (противоишемический и антиаритмический) эффекты дистантного ишемического посткондиционирования (далее — ДИПостК), которые воспроизводятся ишемией конечностей, осуществляемой до острой ишемии миокарда [3, 4].

Важнейшее преимущество ДИПостК перед локальным, облегчающим его внедрение в клиническую практику, состоит в его малой инвазивности, технической простоте и оказании сопоставимого эффекта с эффектом локального посткондиционирования [2, 5]. Более того, для эффективного применения любого варианта прекодиционирования (локального или дистантного) как меры профилактической кардиопротекции необходимо точно знать, когда наступит ишемия, требующая защиты миокарда, что практически невозможно. Посему мощный кардиопротекторный потенциал прекодиционирования остается по большей части клинически не использованным. Отсюда ишемическое посткондиционирование и особенно дистантное имеет несомненное преимущество перед различными вариантами прекодиционирования, т. к. может быть использовано после наступления продолжительной ишемии миокарда, в то время как попытка реализовать прекодиционирование в прединфарктный период осложняется непредсказуемостью времени развития инфаркта.

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 возраст. Вопросу, воспроизводятся ли противоишемический и антиаритмический эффекты ДИПостК у старых животных, посвящен ряд экспериментальных исследований, причем результаты данных исследований весьма противоречивы [5–7]. Причины такого расхождения до сих пор не выяснены. Согласно литературным данным, в миокарде старых животных имеет место значительное снижение содержания креатинфосфата и АТФ, что оказывает существенное влияние на энергетический баланс кардиомиоцитов и их отдельных структур, в частности, АТФ-зависимых калиевых каналов [6]. Кроме того, у старых животных имеет место снижение тонуса *n. vagus*. Отсюда следует предположение, что указанные возрастные изменения миокарда животных могут оказывать существенное влияние на воспроизводимость кардиопротекторных эффектов ДИПостК.

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

Материалы и методы. Исследование эффективности ДИПостК выполнено на 76 наркотизированных нелинейных белых крысах-самцах, разделенных на две возрастные группы: 36 молодых крыс, масса которых составляла 200–240 г, возраст — 4 ± 1 мес., и 40 старых крыс массой 400–450 г, возраст которых составлял 24 ± 1 мес.

Эксперименты выполнялись в соответствии с требованиями Директивы Европейского этического комитета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986, «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» от 18.03.1986 и ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика», утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 56 от 28.03.2008.

Животные содержались в условиях вивария УО БГМУ в соответствии с нормативами индивидуального размещения. Температура воздуха в виварии поддерживалась на уровне 20–25 °С, что находится в пределах термонейтральной зоны для крыс. Относительная влажность воздуха составляла 50–70 %. Все манипуляции с животными проводились в течение дня с 8.00 до 18.00.

Острую коронарную недостаточность у крыс воспроизводили по методике, описанной С. Clark et al. [7]. Моделирование острой коронарной недостаточности у старых и молодых крыс выполнялось через 24 ч после последнего введения животным холестерина/оливкового масла. Для наркотизации животных использовали этаминал натрия в дозе 50 мг/кг внутривентрально с последующей внутривенной инфузией поддерживающей дозы 10 мг/кг/ч. Крыс переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом при помощи аппарата ИВЛ с частотой дыхания 56–60/мин. Наличие проходимости дыхательных путей контролировалось по давлению в трахее, нормальным значением которого на вдохе считалось 10–15 мм рт. ст. Температура тела измерялась в прямой кишке с помощью электротермометра Harvard (Великобритания) и поддерживалась электрогрелкой на уровне $37,0 \pm 0,5$ °С. Грудную клетку наркотизированного животного вскрывали в четвертом межреберном промежутке слева.

После периода 15-минутной стабилизации гемодинамики крысам выполняли 30-минутную окклюзию передней нисходящей коронарной артерии (далее — ПНКА) путем механического ее пережатия при помощи фишки. Согласно современным экспериментальным данным считается, что длительность коронарной окклюзии у крыс, равная 30–40 мин, является достаточной для формирования зоны некроза миокарда, составляющей около 50 % от зоны риска [5]. Окклюзия артерии подтверждалась цианозом ишемизированной области, снижением АД (на 10–20 мм рт. ст.) и подъемом сегмента ST на ЭКГ.

Реперфузия миокарда достигалась удалением фишки и подтверждалась исчезновением цианоза и возвращением сегмента ST к изолинии. Длительность реперфузии составляла 120 мин, поскольку согласно имеющимся литературным данным указанный интервал времени является достаточным для формирования в миокарде крыс зоны некроза.

ДИПостК выполняли в соответствии с протоколом исследования, представленным Basalay M. и соавт. [5], согласно которому животные опытных групп (ДИПостК) 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 (далее — АД), полученные при этом данные обрабатывались с помощью компьютерной программы Spike 4. Для определения АД крысам канюлировали правую общую сонную артерию. Изучались также следующие показатели гемодинамики: среднее АД (далее — АД_{ср.}), частота сердечных сокращений (далее — ЧСС), двойное произведение (далее — ДП). АД_{ср.} считывали как АД диастолическое + $\frac{1}{3}$ (АД систолическое – АД диастолическое), ДП — как ЧСС × АД систолическое/100. Показатели гемодинамики регистрировались непрерывно в течение эксперимента и оценивались в конце 15-минутной стабилизации гемодинамики после вскрытия грудной клетки, в начале 30-минутной окклюзии ПНКА, в начале реперфузии, а также каждые 30 мин в течение реперфузии.

Зону риска выявляли внутривенным введением в левую общую яремную вену 0,5 мл 5 %-го раствора синьки Эванса (Sigma, США) в конце периода реперфузии миокарда при кратковременной повторной окклюзии ПНКА. Для идентификации зоны риска в миокарде левого желудочка крыс использовали метод, основанный на определении активности дегидрогеназ. Зона риска определялась как зона, не окрашенная в синий цвет. Затем сердце извлекали и отделяли правый желудочек. После замораживания в морозильной камере (-20 °С в течение 30 мин) левый желудочек разрезали на 6 поперечных срезов. Срезы взвешивали на торсионных весах, затем их сканировали при помощи сканера HP с обеих сторон. После этого для идентификации зоны некроза срезы помещали в 1 %-й раствор трифенилтетразолия хлорида на 15 мин при температуре 37 °С. Жизнеспособный миокард (клетки, сохранившие дегидрогеназную активность) окрашивался в кирпично-красный цвет, а некротизированная ткань была белесой. После 24-часовой инкубации срезов в 10 %-м растворе формалина срезы сканировали повторно для определения соотношения площадей зоны риска и зоны некроза. При помощи компьютерной планиметрии и взвешивания срезов миокарда левого желудочка определяли соотношение масс зон риска и некроза с использованием программы Adobe Photoshop 6.0.

Для оценки антиаритмического эффекта ДИПостК подсчитывалась общая длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной острой коронарной окклюзии — фибрилляции желудочков (далее — ФЖ), пароксизмальной желудочковой тахикардии (далее — ПЖТ), парной желудочковой экстрасистолии, желудочковой экстрасистолии по типу бигеминии, также оценивалось наличие реперфузионных нарушений сердечного ритма. На основе полученных данных рассчитывались медиана (Me) и интерквартильный размах (25-й; 75-й процентиля). При сравнении групп использовали критерий Краскела–Уоллиса и тест множественных сравнений Данна.

Критериями исключения животных из опытов являлись ЧСС до начала эксперимента менее 300 уд./мин и среднее АД ниже 60 мм рт. ст.

Полученные результаты анализировались с использованием программ Statistica 8.0 и GraphPad Prism. Для оценки нормальности распределения анализируемых показателей применялся критерий Колмогорова–Смирнова. Статистическую значимость различий полученных данных в случае их параметрического распределения оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием тестов множественных сравнений Данна и Бонферрони. Результаты исследования при их параметрическом распределении представлялись в виде: среднее ± стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Для оценки статистической значимости различий данных в случае их непараметрического распределения использовали критерий Краскела–Уоллиса и тест множественных сравнений Данна. При непараметрическом распределении результаты исследования были представлены в виде: медиана и интерквартильный размах (25-й; 75-й процентиля). Для оценки статистической значимости различий качественных параметров применялся точный метод Фишера. Уровень $p < 0,05$ рассматривался как статистически значимый.

Результаты и их обсуждение. Показатель выживаемости после острой ишемии миокарда у старых крыс составил 52,5 % (19 старых крыс из 40 погибли после острой коронарной окклюзии). При

этом в группе Контроль_{стар} выживаемость животных составила 63,6 %, в группе ДИПостК_{стар} — 41,2 %. В результате из каждой экспериментальной группы старых крыс для последующего анализа данных было отобрано по 7 животных. Во всех экспериментальных группах молодых крыс во время острой коронарной недостаточности наблюдалась 100%-я выживаемость животных. Таким образом, у старых крыс во время 30-минутной ишемии миокарда имело место 2-кратное снижение выживаемости животных по сравнению с молодыми крысами ($p < 0,01$), что свидетельствует об уменьшении устойчивости миокарда старых крыс к повреждению, вызванному его длительной ишемией.

Изменение показателей гемодинамики на протяжении эксперимента у старых и молодых крыс представлено в таблице. Во всех анализируемых группах старых и молодых крыс АД_{ср.} и ЧСС на протяжении эксперимента статистически значимо не изменялись по сравнению с их исходными значениями.

Таблица — Изменение показателей гемодинамики на протяжении эксперимента у старых и молодых крыс

Группа возраст крыс		Контроль		ДИПостК	
		старые крысы, n = 7	молодые крысы, n = 7	старые крысы, n = 7	молодые крысы, n = 7
До начала ОИМ	АД _{ср.}	88±10	86±5	97±7	73±3
	ЧСС	462±18	417±9	436±24	410±16
Начало ОИМ	АД _{ср.}	64±4	77±8	77±6	74±4
	ЧСС	408±48	439±6	458±10	429±14
Начало реперфузии	АД _{ср.}	72±6	74±2	87±6	74±4
	ЧСС	410±46	413±16	476±16	410±23
30' реперфузии	АД _{ср.}	69±3	74±4	84±4	75±4
	ЧСС	403±50	411±12	473±7	404±22
60' реперфузии	АД _{ср.}	74±5	73±4	84±6	78±4
	ЧСС	403±43	413±15	464±14	410±22
90' реперфузии	АД _{ср.}	79±7	78±3	83±5	77±4
	ЧСС	411±42	433±14	461±10	396±19
120' реперфузии	АД _{ср.}	76±6	82±5	82±5	85±3
	ЧСС	388±42	436±20	471±13	426±16

В группах старых крыс в течение первых минут после окклюзии ПНКА отмечалось статистически незначимое, кратковременное (3–5 мин) снижение АД_{ср.} примерно на 20 мм рт. ст. В дальнейшем на протяжении эксперимента АД_{ср.} в группах старых крыс оставалось относительно стабильным по сравнению с исходным значением ($p > 0,05$). В группе ДИПостК_{стар} в течение первых минут после начала острой ишемии миокарда имело место статистически незначимое повышение ЧСС, а в группе Контроль_{стар}, напротив, наблюдалось снижение ЧСС ($p > 0,05$). В последующем на протяжении эксперимента в группе Контроль_{стар} отмечалось дальнейшее постепенное снижение ЧСС по сравнению с ее исходным значением ($p > 0,05$), в то время как в группе ДИПостК_{стар} данный показатель оставался относительно стабильным.

При сравнении ДП, характеризующего потребность миокарда в кислороде, в группах старых и молодых крыс до начала острой ишемии миокарда статистически значимых различий выявлено не было. Показатель ДП на протяжении эксперимента в группах старых и молодых крыс оставался относительно стабильным по сравнению с его значением до начала острой коронарной окклюзии ($p > 0,05$). Таким образом, были основания полагать, что в анализируемых группах старых и молодых крыс потребность миокарда в кислороде на протяжении 30-минутной ишемии и 120-минутной реперфузии миокарда не изменялась.

У старых крыс длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной острой ишемии миокарда в группе Контроль_{стар} составила 75 (44; 164) с, в группе ДИПостК_{стар} — 72 (33; 226) с. У молодых крыс в группе Контроль были выявлены ишемические нарушения сердечного ритма продолжительностью 198 (14; 239) с, в группе ДИПостК — 153 (109; 166) с ($p < 0,05$ по сравнению с группой Контроль) (рисунок 1).

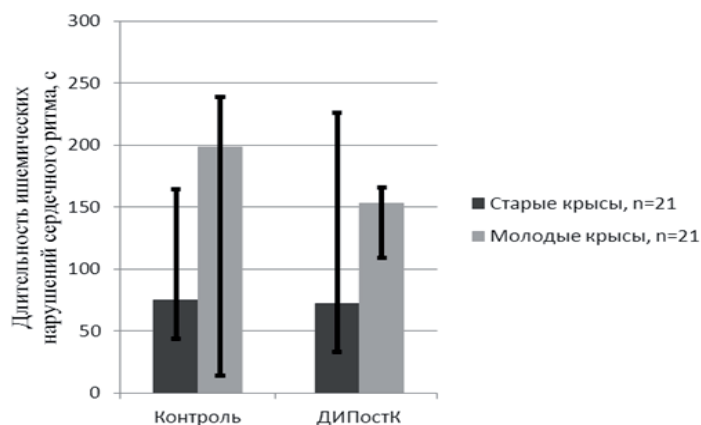


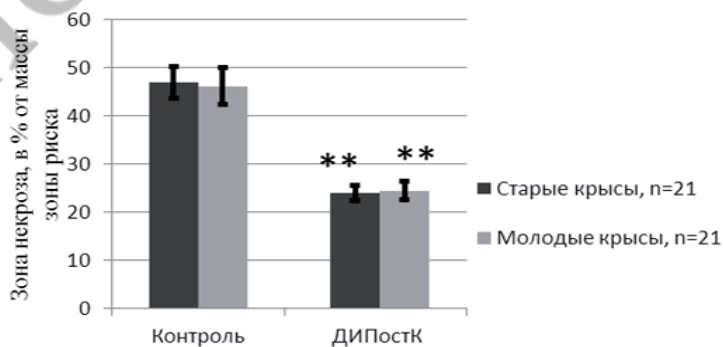
Рисунок 1. — Длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной ишемии миокарда у старых и молодых крыс

При выполнении исследования также установлено, что во время острой ишемии миокарда в группе Контроль_{стар} у 4 из 7 крыс отмечалась ФЖ, а у 6 из 7 животных была выявлена ПЖТ. Реперфузионные нарушения сердечного ритма имели место у 6 крыс группы Контроль_{стар}. В группе ДИПК_{стар} во время 30-минутной ишемии миокарда ФЖ и ПЖТ наблюдались у 4 из 7 крыс ($p > 0,05$). В период реперфузии миокарда в группе ДИПК_{стар} нарушения сердечного ритма были выявлены у 3 крыс данной группы ($p > 0,05$). В группе ДИПостК_{стар} в период острой коронарной окклюзии у 3 из 7 крыс отмечалась ФЖ, а ПЖТ имела место у 4 крыс данной группы ($p > 0,05$). Реперфузионные нарушения сердечного ритма наблюдались у 5 животных группы ДИПостК_{стар} ($p > 0,05$).

Выявлено, что у старых и молодых крыс длительность аритмий во время 30-минутной острой ишемии миокарда в группах Контроль_{стар} и ДИПостК_{стар} и соответственно в группах Контроль и ДИПостК сопоставима, что вполне очевидно, учитывая тот факт, что ДИПостК не может оказывать влияние на нарушения сердечного ритма во время острой ишемии миокарда, т. к. воспроизводился на 10-й мин реперфузии.

Установлено, что в группе ДИПостК_{стар} имеет место статистически незначимое увеличение длительности ишемических нарушений сердечного ритма по сравнению с группой Контроль_{стар}. Следовательно, у старых крыс ДИПостК не оказывает антиаритмический эффект. У молодых крыс в группе ДИПостК, напротив, наблюдается статистически значимое снижение продолжительности аритмий во время 30-минутной коронарной окклюзии по сравнению с группой Контроль, что свидетельствует о наличии у молодых крыс выраженного антиаритмического эффекта ДИПостК.

Статистически значимых различий между анализируемыми группами старых и молодых крыс по показателю размеров зоны риска в миокарде левого желудочка не выявлено. У старых крыс отмечались следующие размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка: в группе Контроль_{стар} — 47 ± 3 %, в группе ДИПостК_{стар} — 24 ± 2 % ($p < 0,01$ по сравнению с группой Контроль_{стар}). У молодых крыс размер зоны некроза в группе Контроль составил — 46 ± 4 %, в группе ДИПостК — 25 ± 2 % ($p < 0,01$) (рисунок 2).



** — $p < 0,01$ — различия статистически значимы

Рисунок 2. — Размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка у старых и молодых крыс

Таким образом, в группах старых и молодых крыс с острой коронарной недостаточностью, в которых воспроизводили ДИПостК, выявлено статистически значимое снижение размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка по сравнению с соответствующей контрольной группой.

Заключение:

1. Дистантное ишемическое посткондиционирование эффективно в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка при ишемии-реперфузии миокарда у старых крыс.
2. У старых крыс антиаритмический эффект дистантного ишемического посткондиционирования не воспроизводится.

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. Cokkinos, D. V. Myocardial protection in man — from research concept to clinical practice / D. V. Cokkinos, C. Pantos // Heart Fail. Rev. — 2007. — Vol. 12. — P. 345–362.
3. Preconditioning and its clinical potential / P. Magill [et al.] // Ir. J. Med. Sci. — 2009. — Vol. 178, № 2. — P. 129–134.
4. Schmidt, M. R. Remote ischemic preconditioning: no loss in clinical translation / M. R. Schmidt, S. B. Kristiansen, H. E. Botker // Circ. Res. — 2013. — Vol. 113, № 12. — P. 1278–1280.
5. 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.
6. Przyklenk, K. Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with postconditioning / K. Przyklenk, M. Maynard, C. E. Darling // J. Am. Coll. Cardiol. — 2008. — Vol. 51, № 14. — P. 1393–1398.
7. 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 PRECONDITIONING DURING ISCHEMIA-REPERFUSION IN OLD RATS

Vismont F. I., Chepelev S. N., Glebov A. N., Jushkevich P. F.

Educational Establishment “Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus

The search for new effective methods of preventing or reducing ischemic myocardial injury is an actual problem of modern experimental and clinical medicine.

The aim of the study was to determine the reproducibility of antiischemic and antiarrhythmic effects of remote ischemic postconditioning myocardium during ischemia-reperfusion of old rats. It was found that the remote ischemic postconditioning is effective in terms of necrosis area size limits in the left ventricle during ischemia-reperfusion in old rats. Remote ischemic postconditioning in old rats during ischemia-reperfusion has no antiarrhythmic effect. The findings indicate the need for a differentiated approach to the appointment of remote ischemic postconditioning in patients with acute myocardial infarction. The existence of such a risk factor for cardiovascular diseases as age can be a criterion for exclusion remote ischemic postconditioning as a way of reducing arrhythmias in old patients with ischemia-reperfusion injury.

Keywords: antiischemic effect, antiarrhythmic effect, remote ischemic postconditioning, the area of risk, the area of necrosis, old rats.