

ЗНАЧИМОСТЬ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ М-ХОЛИНОРЕАКТИВНЫХ СИСТЕМ В РЕАЛИЗАЦИИ КАРДИОПРОТЕКТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ ДИСТАНТНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У СТАРЫХ КРЫС

Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И.

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра патологической физиологии, г. Минск*

Ключевые слова: М-холинореактивные системы, дистантное ишемическое посткондиционирование, кардиопротекторная эффективность, зона некроза, старые крысы.

Резюме: *установлено, что дистантное ишемическое посткондиционирование (ДИПостК) оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при ишемии-реперфузии миокарда как у молодых, так и старых крыс, однако в условиях системного действия атропина (2 мг/кг) инфаркт-лимитирующий эффект ДИПостК сохранялся только у старых крыс. По-видимому, активность периферических М-холинореактивных систем имеет значение в механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ДИПостК у молодых, но не у старых крыс.*

Resume: *it was revealed that remote ischemic postconditioning (RIPostC) has an infarct-limiting effect during ischemia-reperfusion of myocardium in young and old rats, however, under the conditions of the systemic action of atropine (2 mg / kg), the infarction-limiting effect of RIPostC persisted only in old rats. Apparently, the activity of peripheral M-cholinergic systems is important in the mechanisms of the infarction-limiting effect realization of RIPostC in young but not in old rats.*

Актуальность. В последние годы объектом повышенного интереса ведущих мировых исследователей в области экспериментальной и клинической кардиологии являются кардиопротекторные (инфаркт-лимитирующий и антиаритмический) эффекты дистантного ишемического посткондиционирования (ДИПостК).

В клинической практике необходимость защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения чаще возникает у пациентов с различными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, к числу которых относится и возраст [1, 2, 3, 4, 5, 9].

Известно, что процессы старения организма сопровождаются ослаблением влияния парасимпатической регуляции на сердце, что связано с деструкцией холинергических нервных окончаний, снижением интенсивности процессов синтеза ацетилхолина и числа М-холинорецепторов в миокарде [6, 8, 10].

Принимая во внимание имеющиеся факты, что в организме старых животных происходят значительные морфофункциональные и биохимические изменения, были основания полагать, что возрастные изменения органов и тканей могут оказывать существенное влияние на кардиопротекторную эффективность ДИПостК у старых крыс [3, 9]. В то же время, имеющиеся сведения о противоишемической и антиаритмической эффективности ДИПостК в условиях наличия такого сопутствующего фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний как возраст не многочисленны и весьма противоречивы [3, 9]. Вместе с тем, выяснение значимости М-холинореактивных систем в реализации кардиопротекторных эффектов у старых животных до сих пор не было предметом специального исследования.

Цель: выяснить значимость периферических М-холинореактивных систем в реализации кардиопротекторных эффектов ДИПостК при ишемии-реперфузии миокарда у старых крыс.

Задачи: 1. Изучить кардиопротекторные эффекты ДИПостК при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс; 2. Выяснить значимость М-холинореактивных систем в реализации кардиопротекторных эффектов ДИПостК при ишемии-реперфузии миокарда у старых крыс.

Материал и методы. Исследование выполнено на 42 крысах-самцах, разделенных на две возрастные группы: 21 молодая (молод) крыса, массой – 220 ± 20 г, возрастом – 4 ± 1 мес. и 21 старая (стар) крыса, массой – 400-450 г, возрастом – 24 ± 1 мес. Все животные были разделены на 6 групп по 7 особей: Контроль_{молод}, Контроль_{стар}, ДИПостК_{молод}, ДИПостК_{молод+атропин}, ДИПостК_{стар}, ДИПостК_{стар+атропин}.

Животных наркотизировали тиопенталом натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно, после чего переводили на искусственное дыхание. Грудную клетку у крыс вскрывали в IV межреберном промежутке слева. После стабилизации гемодинамики крысам выполняли 30-мин. окклюзию левой коронарной артерии (ЛКА) путем пережатия фишкой. Реперфузия (120 мин) достигалась удалением фишки.

ДИПостК выполнялось в соответствии с протоколом исследования, представленным М. Basalay et al. [7], согласно которому животные групп ДИПостК дополнительно подвергались воздействию 15-мин. окклюзии обеих бедренных артерий через 10 мин после 30-мин. острой ишемии миокарда.

В ходе экспериментов непрерывно регистрировались ЭКГ во II стандартном отведении и системное артериальное давление (АД). Изучались также следующие показатели гемодинамики: среднее АД (АД_{ср.}), частота сердечных сокращений (ЧСС), двойное произведение (ДП). Показатели гемодинамики оценивались в конце 15-мин. стабилизации гемодинамики после вскрытия грудной клетки, в начале 30-мин. окклюзии ЛКА, в начале реперфузии, а также каждые 30 мин реперфузии.

Зону риска определяли путем введения в левую общую яремную вену 0,5 мл 5% р-ра синьки Эванса в конце реперфузии при кратковременной повторной окклюзии ЛКА. Зона риска определялась как зона не окрашенная в синий цвет. Затем сердце извлекали и отделяли левый желудочек. После замораживания (-20°C в течение 30 мин) из левого желудочка изготавливали 6 поперечных срезов. Срезы взвешивали и сканировали с обеих сторон. После этого, для идентификации зоны некроза, срезы помещали в 1% р-р трифенилтетразолия хлорида на 15 мин при температуре 37°C . При этом жизнеспособный миокард окрашивался в кирпично-красный цвет, а некротизированная ткань была белесой. После 24-ч. инкубации срезов в 10% р-ре формалина срезы сканировали повторно с обеих сторон. При помощи программы Adobe Photoshop CC 2017 для каждого среза определяли зону некроза.

Для оценки антиаритмического эффекта ДИПостК подсчитывалась общая длительность аритмий во время острой коронарной окклюзии и периода реперфузии – фибрилляции желудочков (ФЖ), пароксизмальные желудочковые тахикардии (ПЖТ), парные желудочковые экстрасистолы, желудочковые экстрасистолы по типу бигеминии. На основе полученных данных рассчитывались медиана и

интерквартильный размах (25-й; 75-й процентиля). При сравнении групп использовали критерий Крускала-Уоллиса и тест множественных сравнений Данна.

Изучение кардиопротекторной эффективности ДИПостК при ишемии и реперфузии миокарда у старых и молодых крыс в условиях блокады периферических М-холинореактивных систем проводилось путем введения в левую общую яремную вену 0,2% р-ра М-холиноблокатора атропина в дозе 2 мг/кг за 10 мин до ДИПостК.

Полученные в исследовании результаты анализировались с использованием стандартных пакетов статистических программ Statistica 10 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 с использованием тестов множественных сравнений Данна и Бонферрони. Результаты исследования при их параметрическом распределении представлялись в виде: $M \pm m$. Для оценки статистической значимости различий данных в случае их непараметрического распределения использовали критерий Крускала-Уоллиса и тест множественных сравнений Данна. При непараметрическом распределении результаты исследования были представлены в виде: медиана и интерквартильный размах (25-й; 75-й процентиля). Уровень $p < 0,05$ рассматривался как статистически значимый.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что в исследуемых группах статистически значимых отличий АД_{ср}, ЧСС и ДП на протяжении эксперимента по сравнению с их исходными значениями не выявлено. Следовательно, были основания полагать, что старые и молодые животные до начала и на протяжении эксперимента характеризовались сходной потребностью миокарда в кислороде.

В исследуемых группах была установлена следующая длительность аритмий: в группе Контроль_{стар} составила 75 (44; 164) с, в группе ДИПостК_{стар} – 72 (33; 226) с, в группе ДИПостК_{стар}+атропин – 50 (22; 151) с, в группе Контроль_{молод} – 198 (14; 239) с, в группе ДИПостК_{молод} – 153 (109; 166) с, в группе ДИПостК_{молод}+атропин – 108 (52; 136) с. (рисунок 1).

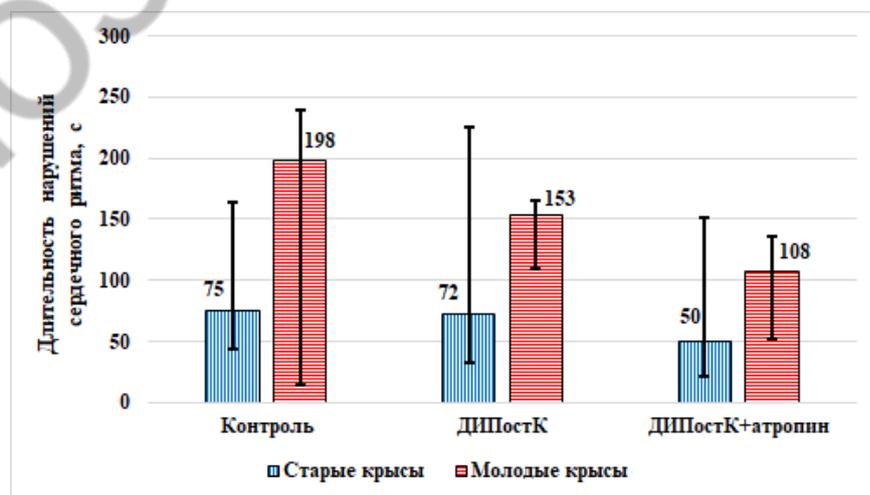


Рис. 1 – Длительность нарушений сердечного ритма во время ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс

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

Таким образом, у старых крыс длительность ишемических нарушений сердечного ритма в группах ДИПостК_{стар} и ДИПостК_{стар+атропин} сопоставима с таковой в группе Контроль_{стар}, что вполне очевидно, учитывая то, что ДИПостК и введение животным на 1-ой мин реперфузии атропина не могли оказывать влияние на выраженность нарушений сердечного ритма во время 30-мин. ишемии миокарда.

У молодых крыс длительность нарушений сердечного ритма во время острой ишемии миокарда в группах ДИПостК_{молод} и ДИПостК_{молод+атропин} статистически значимо не отличалась по сравнению с группой Контроль_{молод}.

В исследуемых группах были установлены следующие размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка: в группе Контроль_{стар} составил $47 \pm 3\%$, в группе ДИПостК_{стар} – $24 \pm 2\%$ ($p < 0,01$ по сравнению с группой Контроль_{стар}), в группе ДИПостК_{стар+атропин} – $19 \pm 2\%$ ($p < 0,01$ по сравнению с группой Контроль_{стар}), в группе Контроль_{молод} – $46 \pm 4\%$, в группе ДИПостК_{молод} – $25 \pm 2\%$ ($p < 0,01$ по сравнению с группой Контроль_{молод}), в группе ДИПостК_{молод+атропин} – $38 \pm 3\%$ ($p < 0,05$ по сравнению с группой Контроль_{молод}) (рисунок 2).

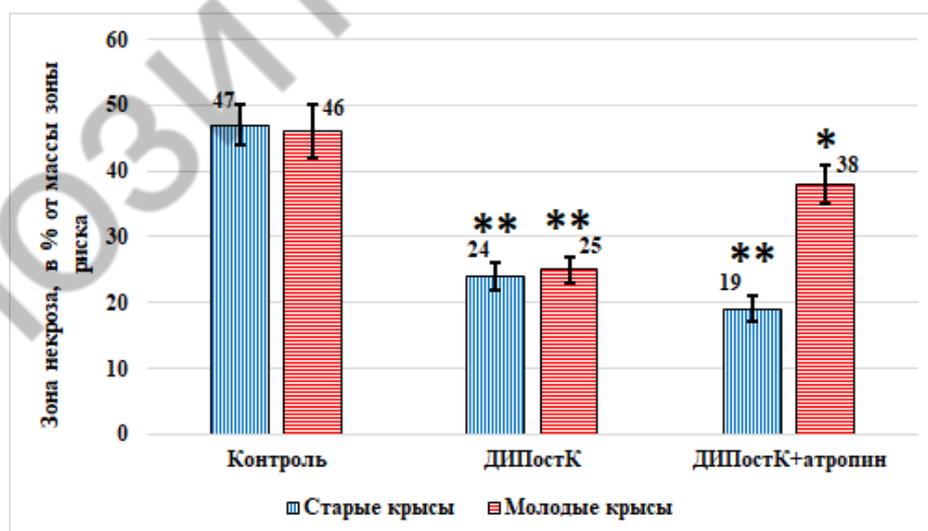


Рис. 2 – Размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка у молодых и старых крыс
*/** – $p < 0,05$ / $p < 0,01$ – статистически значимые отличия размеров зоны некроза по сравнению с соответствующими возрастными группами Контроль

Результаты исследования свидетельствуют о том, что у старых крыс после воспроизведения ДИПостК, а также после внутривенного введения животным

атропина в дозе 2 мг/кг при ишемии и реперфузии миокарда в левом желудочке формировались менее обширные зоны некроза по сравнению с группой Контроль_{стар.}

При проведении исследования установлено, что у молодых крыс после воспроизведения ДИПостК имело место статистически значимое снижение размеров зоны риска в миокарде левого желудочка по сравнению с группой Контроль_{молод.} Однако, после внутривенного введения животным атропина в дозе 2 мг/кг у молодых крыс при ишемии-реперфузии миокарда в левом желудочке формировались сопоставимые по размерам с группой Контроль_{молод.} зоны некроза.

Выводы: ДИПостК оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при ишемии-реперфузии миокарда как у молодых, так и старых крыс, однако в условиях системного действия атропина этот эффект ДИПостК сохранялся только у старых крыс. По-видимому, активность периферических М-холинореактивных систем имеет значение в механизмах реализации кардиопротекторных эффектов ДИПостК у молодых, но не у старых крыс, что позволяет говорить о необходимости дифференцированного подхода к применению ДИПостК при ишемии-реперфузии миокарда в молодом и пожилом возрасте.

Литература

1. Висмонт, Ф. И. Антиаритмическая эффективность дистантного ишемического прекодиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с экспериментальной дислипидемией / Ф. И. Висмонт, С. Н. Чепелев, А. Н. Глебов, А. Ф. Висмонт, П. Ф. Юшкевич // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования. Материалы X юбилейной международной науч.-практ. конф. Главный редактор С.С.Лазуко, Витебск, 2018. – С. 22-27.
2. Висмонт, Ф. И. Дистантное ишемическое прекодиционирование у крыс с толерантностью к нитратам / Ф. И. Висмонт, С. Н. Чепелев, П. Ф. Юшкевич // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования. Материалы X юбилейной международной науч.-практ. конф. Главный редактор С.С.Лазуко, Витебск, 2018. – С. 27-32.
3. Висмонт, Ф. И. Кардиопротекторная эффективность дистантного ишемического посткодиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у старых крыс / Ф. И. Висмонт, С. Н. Чепелев, П. Ф. Юшкевич, А. Н. Глебов // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сб. рецензир. науч. работ / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. В. Сикорский, О. К. Доронина. – Минск: ГУ РНМБ, 2017. – Вып. 7. – С. 181-186.
4. Висмонт, Ф. И. Кардиопротекторная эффективность дистантного ишемического прекодиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с экспериментальной дислипидемией / Ф. И. Висмонт, С. Н. Чепелев, А. Н. Глебов, А. Ф. Висмонт, П. Ф. Юшкевич // Весці нацыянальнай акадэміі навук беларусі. Сeryя медыцынскіх навук. – 2018. – Т. 15, № 2. – С. 215-221.
5. Висмонт, Ф. И. Противоишемическая и антиаритмическая эффективность дистантного ишемического прекодиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с экспериментальной гиперлипидемией / Ф. И. Висмонт, С. Н. Чепелев, А. Н. Глебов, А. Ф. Висмонт, П. Ф. Юшкевич // Медицинский журнал. – 2018. – № 3. – С. 55-59.
6. Мрочек, А. Г. Механизмы парасимпатических влияний на сердце в развитии противоишемического эффекта дистантного кодиционирования миокарда / А. Г. Мрочек, А. Г. Булгак, М. В. Басалай, В. Ч. Барсукевич, А. В. Гурин // Евразийский кардиологический журнал. – 2014. – № 1. – С. 81-88.

7. Basalay, M. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms / M. Basalay, V. Barsukevich, S. Mastitskaya // *Experimental Physiology*. – 2012. – Vol. 97, № 8. – P. 908-917.

8. Donato, M. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning / M. Donato, B. Buchholz, M. Rodriguez, V. Perez, J. Inserte, D. Garcia-Dorado, R. J. Gelpi // *Experimental Physiology*. – 2013. – Vol. 98, № 2. – P. 425-434.

9. Ferdinandy, P. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning / P. Ferdinandy, D. J. Hausenloy, G. Heusch // *Pharmacological Reviews*. – 2014. – Vol. 66, № 4. – P. 1142-1174.

10. Intachai, K. Revisiting the cardioprotective effects of acetylcholine receptor activation against myocardial ischemia/reperfusion injury / K. Intachai, S. C. Chattipakorn, N. Chattipakorn, K. Shinlapwittayatorn // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 9. – P. 2466.

Репозиторий БГМУ