

## ЗНАЧИМОСТЬ NO В РЕАЛИЗАЦИИ ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ДИСТАНТНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС

Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И.

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

**Ключевые слова:** дистантное ишемическое посткондиционирование, инфаркт-лимитирующий эффект, монооксид азота, ишемия-реперфузия, миокард.

**Резюме:** выявлено, что дистантное ишемическое посткондиционирование (ДИПостК) оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при ишемии-реперфузии миокарда как у молодых, так и у старых крыс, однако в условиях системного действия ингибитора NO-синтазы метилового эфира N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина в дозе 25 мг/кг (внутривенное введение за 5 мин до начала реперфузии и 15 мин до ДИПостК) эффект сохраняется, хотя и не полностью, у старых, но не у молодых крыс.

**Resume:** it was revealed that remote ischemic postconditioning (RIPostC) has a heart attack-limiting effect in myocardial ischemia-reperfusion in both young and old rats, however, under the conditions of the systemic action of the NG-nitro-L-arginine methyl ester inhibitor, at a dose of 25 mg / kg (intravenous administration 5 minutes before the start of reperfusion and 15 minutes before RIPostC) the effect remains, although not completely, in old but not in young rats.

**Актуальность.** В настоящее время ишемическая болезнь сердца (ИБС) является основной причиной смертности в развитых странах мира и Республике Беларусь в частности. 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 [1].

В последнее десятилетие объектом повышенного интереса ведущих мировых исследователей в области экспериментальной и клинической кардиологии являются кардиопротекторные эффекты дистантного ишемического посткондиционирования (ДИПостК), которые воспроизводятся ишемией конечностей, осуществляемой после острой ишемии миокарда (ОИМ) [2–3].

К настоящему времени накоплен определенный объем знаний о феномене ДИПостК и механизмах его защитного влияния на миокард. Показано, что ДИПостК значительно снижает проявления реперфузионного повреждения миокарда [4]. В тоже время имеющиеся сведения о кардиопротекторной эффективности ишемического посткондиционирования в условиях наличия такого сопутствующего фактора риска сердечно-сосудистого заболевания как возраст, немногочисленны и весьма противоречивы. Так, результаты ряда экспериментальных исследований указывают на то, что возраст животных является фактором, препятствующим

воспроизведению кардиопротекторных эффектов ишемического посткондиционирования [5]. В тоже время имеются сообщения о противоишемической эффективности посткондиционирования у старых животных [6]. Причины такого расхождения результатов исследования до сих пор не выяснены.

Известно, что процессы старения организма сопровождаются значительными морфофункциональными и биохимическими изменениями [7]. Можно было полагать, что возрастные изменения органов и тканей могут оказывать существенное влияние на кардиопротекторную эффективность посткондиционирования у старых крыс.

Как известно, большинство заболеваний сердца связаны с ишемией миокарда. А одной из причин ишемии является дефицит монооксида азота (NO). В миокарде NO может регулировать функции органа как непосредственно, так и через влияние на сосуды. По современным представлениям дефицит NO является ключевым звеном эндотелиальной дисфункции и развития сердечной недостаточности [8, 9]. Роль экзогенного NO в кардиопротекции при ишемии была продемонстрирована A.Nakano et al. [10]. Результаты целого ряда исследований подтвердили роль NO в кардиопротекторном эффекте ишемического прекодиционирования [8, 10]. Показано, что доноры NO оказывают кардиопротекторный эффект, уменьшая опосредованное реактивными формами кислорода повреждение тканей [8–10]. Однако биохимические механизмы кардиопротекции, лежащие в основе инфаркт-лимитирующего эффекта кондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда изучены недостаточно и во многом не ясны, хотя находятся в процессе интенсивного изучения.

Учитывая, что старение повышает чувствительность сердца к ишемическо-реперфузионному повреждению, а также данные о том, что в организме старых животных происходят значительные морфофункциональные и биохимические изменения, можно было предположить, что возрастные изменения органов и тканей и, в частности, в активности L-аргинин-NO системы, ответственной за образование NO, могут оказывать существенное влияние на кардиопротекторную эффективность ДИПостК у старых крыс.

Принимая во внимание такие данные о возрастных изменениях, а также известные сведения о том, что уровень NO имеет значение в процессах эндотелиальной дисфункции и в механизмах реперфузионного повреждения миокарда были основания полагать, что активность NO-синтазы в органах и тканях, уровень NO и возраст животных имеют значение в кардиопротекторных эффектах ДИПостК.

**Цель:** выяснить значимость NO в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ДИПостК при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс.

**Материал и методы.** Исследование кардиопротекторной эффективности ДИПостК выполнено на 106 наркотизированных нелинейных белых крысах-самцах, разделенных на две возрастные группы, включавшие 44 молодые (молод) крысы массой 200–220 г в возрасте  $4 \pm 1$  мес. и 62 старые (стар) крысы массой 400–430 г в возрасте  $24 \pm 1$  мес. Все животные были разделены на 6 групп: Контроль<sub>молод</sub> ( $n = 10$ ), Контроль<sub>стар</sub> ( $n = 11$ ), ДИПостК<sub>молод</sub> ( $n = 16$ ), ДИПостК<sub>стар</sub> ( $n = 25$ ), L-NAME + ДИПостК<sub>молод</sub> ( $n = 18$ ), L-NAME + ДИПостК<sub>стар</sub> ( $n = 26$ ).

Для наркотизации животных использовали тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно с последующей внутривенной инфузией в левую общую яремную вену поддерживающей дозы 10 мг/кг·ч. Крыс переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом через трахеостому при помощи аппарата ИВЛ. В ходе экспериментов непрерывно регистрировались ЭКГ во II стандартном отведении и системное АД, полученные при этом данные обрабатывались с помощью компьютерной программы Spike 4 (Великобритания). Для измерения АД прямым методом крысам канюлировали правую общую сонную артерию. Грудную клетку наркотизированного животного вскрывали в IV межреберном промежутке слева.

После периода 15-минутной стабилизации гемодинамики крысам выполняли 30-минутную окклюзию передней нисходящей ветви левой коронарной артерии путем механического ее пережатия при помощи лигатуры. Реперфузия (120 минут) миокарда достигалась снятием лигатуры.

ДИПостК выполняли в соответствии с протоколом исследования, представленным M. Basalay et al. [2], согласно которому животных опытных групп ДИПостК дополнительно подвергали воздействию 15-минутной окклюзии обеих бедренных артерий через 10 минут после 30-минутной ОИМ.

Для выявления зоны риска в левую общую яремную вену вводили 0,5 мл 5% р-ра синьки Эванса в конце реперфузии. Сердце извлекали и отделяли левый желудочек, который замораживали и разрезали на 6 поперечных срезов. Срезы взвешивали и сканировали с обеих сторон. Для определения зоны некроза, срезы помещали в 1% р-р трифенилтетразолия хлорида на 15 мин (37°C), затем инкубировали 24 часа в 10% р-ре формалина, после чего повторно сканировали и определяли соотношения площадей зоны риска и зоны некроза.

Изучение кардиопротекторной эффективности ДИПостК при ишемии и реперфузии миокарда у старых и молодых крыс в условиях депрессии NO-синтазы проводилось у животных, которым за 5 минут до начала реперфузии и 15 минут до воспроизведения ДИПостК внутривенно вводили в левую общую яремную вену водный раствор метилового эфира N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина (L-NAME, Acros Organics, США) в дозе 25 мг/кг.

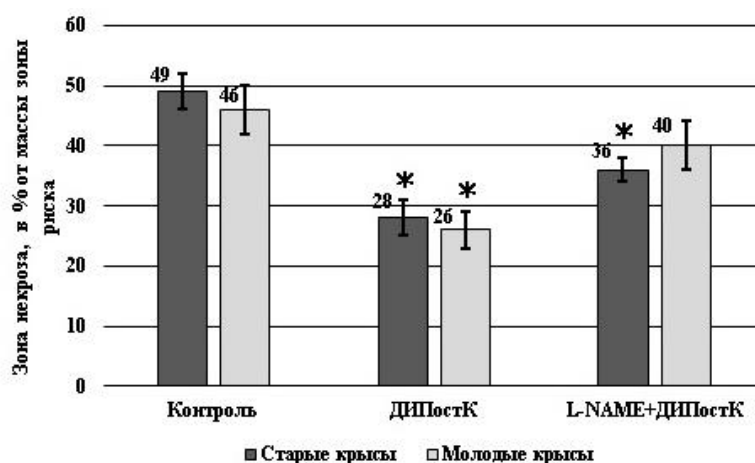
Полученные в исследовании результаты анализировались при помощи компьютерной программы Statistica 13.3. Уровень  $p < 0,05$  рассматривался как статистически значимый.

**Результаты и их обсуждение.** Показатель выживаемости после острой ишемии миокарда у старых крыс составил 51,6 % (30 старых крыс из 62 погибли во время острой коронарной окклюзии и периода реперфузии). При этом в группе Контроль<sub>стар</sub> выживаемость животных составила 62,5 %, в группе ДИПостК<sub>стар</sub> – 48,0 %, а в группе L-NAME + ДИПостК<sub>стар</sub> – 46,2 %. У молодых крыс показатель выживаемости после острой ишемии миокарда составил 72,7 % (12 молодых крыс из 44 погибли в период острой коронарной окклюзии и реперфузии). Выживаемость в исследуемых группах молодых крыс была следующей: в группе Контроль<sub>молод</sub> – 80,0 %, в группе ДИПостК<sub>молод</sub> – 75,0 %, а в группе L-NAME + ДИПостК<sub>молод</sub> – 66,7 %. Более низкая выживаемость у старых крыс является следствием снижения устойчивости миокарда

к повреждению, вызванному продолжительной ишемией и реперфузией. Таким образом, количество животных в экспериментальных группах с учетом их выживаемости стало следующим: Контроль<sub>молод</sub> ( $n = 8$ ), Контроль<sub>стар</sub> ( $n = 8$ ), ДИПостК<sub>молод</sub> ( $n = 12$ ), ДИПостК<sub>стар</sub> ( $n = 12$ ), L-NAME + ДИПостК<sub>молод</sub> ( $n = 12$ ), L-NAME + ДИПостК<sub>стар</sub> ( $n = 12$ ).

В анализируемых группах старых и молодых крыс отмечались сопоставимые размеры зоны риска в миокарде левого желудочка ( $p > 0,05$ ).

При изучении инфаркт-лимитирующей эффективности ДИПостК при ишемии и реперфузии миокарда у старых крыс в условиях системного действия в организме животных ингибитора NO-синтазы L-NAME установлено, что размер зоны некроза в миокарде левого желудочка в группе Контроль<sub>стар</sub> составил  $49 \pm 3$  %, в группе ДИПостК<sub>стар</sub> –  $28 \pm 3$  ( $p < 0,05$ ), в группе L-NAME + ДИПостК<sub>стар</sub> –  $36 \pm 2$  % ( $p < 0,05$ ) (рисунок 1).



**Рис. 1** – Размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка у старых и молодых крыс.  
Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующими контрольными возрастными группами

Результаты исследования свидетельствуют о том, что у старых крыс после воспроизведения как ДИПостК, так и ДИПостК в условиях внутривенного введения животным L-NAME, которое осуществлялось за 5 мин до начала реперфузии и 15 мин до выполнения ДИПостК, при ишемии-реперфузии миокарда в левом желудочке формировались менее обширные зоны некроза по сравнению с группой Контроль<sub>стар</sub>. Таким образом, у старых крыс имел место выраженный противоишемический эффект ДИПостК. В условиях системного действия в организме животных ингибитора NO-синтазы L-NAME у старых крыс ДИПостК также оказывал противоишемический эффект, но менее выраженный.

У молодых крыс выявлены следующие размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка: в группе Контроль<sub>молод</sub> –  $46 \pm 4$  %, в группе ДИПостК<sub>молод</sub> –  $26 \pm 3$  ( $p < 0,05$  по сравнению с группой Контроль<sub>молод</sub>), в группе L-NAME + ДИПостК<sub>молод</sub> –  $40 \pm 4$  %.

При проведении исследования установлено, что у молодых крыс после воспроизведения ДИПостК имело место статистически значимое снижение размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка по сравнению с группой Контроль. Однако после внутривенного введения животным L-NAME, которое осуществлялось за 5 минут до начала реперфузии и 15 минут до воспроизведения ДИПостК, у молодых крыс при ишемии и реперфузии миокарда в левом желудочке формировались сопоставимые по размерам с группой Контроль зоны некроза.

Следовательно, результаты исследования свидетельствуют о наличии выраженного противоишемического эффекта ДИПостК у молодых крыс. Однако в условиях системного действия в организме животных ингибитора NO-синтазы L-NAME (25 мг/кг) у молодых крыс ДИПостК не оказывало противоишемического эффекта.

Полученные данные дают основания полагать, что активность NO-синтазы и уровень NO имеют большую значимость в механизмах реализации противоишемического эффекта ДИПостК у молодых, но не у старых крыс.

**Выводы:** ДИПостК оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при ишемии-реперфузии миокарда как у молодых, так и у старых крыс, однако в условиях системного действия L-NAME этот эффект ДИПостК сохраняется только у старых крыс, хотя был менее выраженным. Установлено, что ДИПостК у старых крыс в условиях системного действия в организме животных L-NAME в дозе 25 мг/кг приводит к уменьшению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка на 26,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с таковой у старых крыс контрольной группы. По-видимому, активность NO-синтазы и уровень NO играет более значимую роль в механизмах реализации кардиопротекторных эффектов ДИПостК у молодых, чем у старых крыс, что позволяет говорить о необходимости дифференцированного подхода к применению ДИПостК при ишемии-реперфузии миокарда в молодом и пожилом возрасте.

#### Литература

1. Кардиопротективные эффекты ишемического кондиционирования: современные представления о механизмах, экспериментальные подтверждения, клиническая реализация / А. Е. Баутин [и др.] // Трансляц. медицина. – 2016. – Т. 3, № 1. – С. 50–62.
2. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms / M. Basalay [et al.] // Exp. Physiol. – 2012. – Vol. 97, N 8. – P. 908–917.
3. Висмонт, Ф. И. Периферические М-холинореактивные системы в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда в эксперименте / Ф. И. Висмонт, С. Н. Чепелев, П. Ф. Юшкевич // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 4. – С. 424–433.
4. Чепелев С. Н. Кардиопротекторная эффективность дистантного ишемического пре- и посткондиционирования при ишемии и реперфузии миокарда у старых крыс / С. Н. Чепелев, Ф. И. Висмонт // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2018. – Т. 17, № 5. – С. 40b-41a.
5. Conditioning-induced cardioprotection: Aging as a confounding factor / K. R. Puneet [et al.] // Korean Journal of Physiology and Pharmacology. – 2018. – Vol. 22 (5). – P. 467–479.
6. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning / P. Ferdinandy [et al.] // Pharmacol. Rev. – 2014. – Vol. 66, N 4. – P. 1142–1174.

7. Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart / O. R. Rana [et al.] // *Autonom. Neurosci.* – 2010. – Vol. 156, N 1–2. – P. 82–89.
8. Оксид азота (NO) и цикл NO в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты / В.П.Реутов [и др.] // *Успехи физиологических наук.* – 2007. – Т.38, №4. – С. 39–58.
9. Чепелев, С. Н. О значимости монооксида азота в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс / С. Н. Чепелев, Ф. И. Висмонт // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук.* – 2020. – Т. 17, № 3. – С. 353–364.
10. Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classic ischemic preconditioning / A. Nakano [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2000. – Vol 32 (7). – P. 1159–1167.