

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

ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКАЯ И АНТИАРИТМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДИСТАНТНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИЕЙ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Поиск новых эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического повреждения миокарда и механизмов их реализации является актуальной задачей современной экспериментальной и клинической медицины и важным направлением исследований в физиологии.

Целью исследования было выявление воспроизводимости противоишемического и антиаритмического эффектов дистантного ишемического preconditionирования (ДИПК) миокарда у крыс с экспериментальной гиперлипидемией (ГЛЕ). Установлено, что ДИПК не эффективно в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с ГЛЕ. В то же время, после воспроизведения ДИПК у крыс с ГЛЕ имеет место выраженный антиаритмический эффект, о чем свидетельствует снижение длительности ишемических нарушений сердечного ритма на 85% ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие такого фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний как ГЛЕ может служить критерием для исключения ДИПК в качестве способа уменьшения ишемических и реперфузионных повреждений миокарда у пациентов с острым инфарктом миокарда.

Ключевые слова: *противоишемический эффект, антиаритмический эффект, дистантное ишемическое preconditionирование, гиперлипидемия, зона риска, зона некроза.*

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

ANTIISCHEMIC AND ANTIARRHYTHMIC EFFICIENCY OF REMOTE ISCHEMIC PRECONDITIONING DURING ISCHEMIA-REPERFUSION IN RATS WITH EXPERIMENTAL HYPERLIPIDEMIA

The search for new effective methods of preventing or reducing ischemic myocardial injury and its mechanisms of realization 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 preconditioning myocardium of rats with hyperlipidemia (HLE). It was found that the remote ischemic preconditioning (RIPC) is not effective in terms of necrosis area size limits in the left ventricle during ischemia-reperfusion in rats with HLE. At the same time, after the reproduction of RIPC in rats with HLE, a pronounced antiarrhythmic effect take place, as evidenced by a 85% decrease in the duration of ischemic heart rhythm disturbances by 85% ($p < 0,05$). Remote ischemic preconditioning in rats with HLE has no antiarrhythmic effect. The findings indicate that the existence of such a risk factor for cardiovascular diseases such as HLE can be a criterion for exclusion RIPC as a way of reducing ischemic and reperfusion injury of the myocardium in patients with acute myocardial infarction.

Key words: *antiischemic effect, antiarrhythmic effect, remote ischemic preconditioning, hyperlipidemia, the area of risk, the area of necrosis.*

В настоящее время ишемическая болезнь сердца (ИБС) является основной причиной смертности в большинстве развитых стран мира, в том числе и в Республике Беларусь [4]. Принимая во внимание большую

частоту инвалидизации и сложность реабилитации пациентов с инфарктом миокарда, ИБС представляет собой не только значительную медицинскую, но и важную государственную проблему. В связи с этим поиски новых

эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического и аритмического повреждения сердца и механизмов их реализации остаются существенной задачей современной клинической и экспериментальной медицины и важным направлением исследований в физиологии [5, 7].

В последние годы объектом повышенного внимания ведущих мировых ученых в области клинической и экспериментальной кардиологии являются кардиопротекторные (противоишемический и антиаритмический) эффекты дистантного ишемического прекодиционирования (ДИПК). Данный феномен воспроизводится ишемией конечности, осуществляемой до острой ишемии миокарда [3, 5, 6].

В клинической практике необходимость кардиопротекции от ишемического и реперфузионного повреждения чаще необходима пациентам с различными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), к которым относятся и гиперлипидемия (ГЛЕ) [2].

В современной литературе имеются данные экспериментальных исследований, касающихся воспроизводимости кардиопротекторных эффектов локального ишемического прекодиционирования у экспериментальных животных с гиперхолестеролиемией (ГХЕ), которые весьма противоречивы. Так, согласно данным одних исследований имеется выраженный инфарктомитирующий эффект ДИПК у экспериментальных животных с ГХЕ [6, 9], однако по результатам других исследований противоишемический эффект ДИПК отсутствует [8, 10]. До сих пор остаются не выяснены причины такого расхождения результатов исследований. В то же время, изучение противоишемической и антиаритмической эффективности ДИПК в условиях наличия такого сопутствующего фактора риска ССЗ как ГЛЕ, которая не ограничивается только ГХЕ, до сих пор не было предметом специального исследования.

Цель исследования – выявление воспроизводимости антиаритмического и противоишемического эффектов ДИПК при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с ГЛЕ.

Материалы и методы

Исследование эффективности ДИПК выполнено на 39 наркотизированных белых крысах-самцах. Масса крыс составляла – 225 ± 25 г., а их возраст – 3–4 мес. Для исследования все животные были разделены на 4 группы: Контроль_{Ф.Р.} (n = 7), Контроль_{ГЛЕ} (n = 11), ДИПК_{Ф.Р.} (n = 7), ДИПК_{ГЛЕ} (n = 14). ГЛЕ вызывали путем однократным интрагастрального введения животным 10% раствора холестерина на оливковом масле в дозе 10 мл/кг в течение 10 дней. В качестве контроля использовали крыс с аналогичными характеристиками, которым в течение 10 дней интрагастрально вводился 0,9% раствор NaCl (физиологический раствор – Ф. Р.) в объеме 10 мл/кг (крысы без ГЛЕ). Для подтверждения наличия ГЛЕ крысам выполнялось биохимическое исследование сыворотки крови с помощью автоматического анализатора **Random Access A-25 (BioSystems S. A., Испания)**, которым определялось в сыворотке крови уровни общего холестерина (ОХ) и триглицеридов (ТГ). Дальнейшее моделирование экспериментальных протоколов выполнялось через 24 часа после последнего введения холестерина на оливковом масле (крысы с ГЛЕ), либо физиологического раствора (крысы без ГЛЕ). Для наркотизации животных использовался тиопентал натрия, который вводился внутривенно в дозе 50 мг/кг с последую-

ющим внутривенным введением поддерживающей дозы 10 мг/кг/час. Крысы при помощи аппарата искусственной вентиляции легких переводились на искусственное дыхание атмосферным воздухом с частотой дыхания 56–60 в мин. Проходимость дыхательных путей проверялась по давлению в трахее, значение которого в норме на вдохе составляет 10–15 мм рт. ст. В ходе эксперимента постоянно регистрировалась системное артериальное давление (АД) и ЭКГ во II стандартном отведении. Полученные данные обрабатывались в компьютерной программе **Spike 4. Для определения АД крысам проводилась канюляция правой общей сонной артерии.** Измерение температуры тела осуществлялось в прямой кишке электротермометром **Harvard (Великобритания)**. С помощью электрогрелки поддерживалась температура тела животных на уровне 36,5–37,5 °С.

Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности у крыс осуществляли путем окклюзии левой коронарной артерии [1]. Для этого наркотизированным животным вскрывали грудную клетку в IV межреберном промежутке слева. После 15-минутной стабилизации гемодинамики осуществляли 30-минутную окклюзию левой коронарной артерии путем ее механического пережатия фишкой. Окклюзия артерии идентифицировалась синюшностью ишемизированного участка, снижением АД на 15 ± 5 мм рт. ст. и подъемом сегмента ST на ЭКГ. Реперфузия миокарда осуществлялась простым удалением фишки. Подтверждалась реперфузия исчезновением синюшности ишемизированного участка и возвратом сегмента ST на изолинию. Период реперфузии продолжался 120 минут. Животные, у которых воспроизводилось ДИПК, дополнительно подвергались воздействию 15-минутной окклюзии обеих бедренных артерий за 25 мин до 30-минутной острой ишемии миокарда.

В ходе исследования проводилось изучение следующих показателей гемодинамики: среднего АД (АДср), частоты сердечных сокращений (ЧСС), двойного произведения (ДП). АДср рассчитывалась как $\text{АДср} = \text{АД диастолическое} + 1/3 (\text{АД систолическое} - \text{АД диастолическое})$, ДП рассчитывалось как $\text{ЧСС} \times \text{АД систолическое} / 100$. Показатели гемодинамики регистрировались постоянно в ходе эксперимента. Оценка их проводилась в конце 15-минутной стабилизации кровообращения после вскрытия грудной клетки, на 30-й минуте окклюзии левой коронарной артерии, в начале периода реперфузии, а также через каждые 30 минут во время периода реперфузии.

Зону риска определяли с помощью внутривенного введения в левую общую яремную вену 0,5 мл 5% раствора синьки Эванса в конце реперфузии при непродолжительной повторной окклюзии левой коронарной артерии. Синий Эванса окрашивает только перфузируемый миокард, а неперфузируемый остается неокрашенным, поэтому зона риска определялась как не окрашенная в синий цвет. Затем сердце извлекалось из грудной клетки и проводилось отделение левого желудочка сердца для дальнейшего изучения. Левый желудочек замораживали в морозильной камере при -20 °С (30 мин), после чего его разрезали на 6 поперечных срезов размером по 1,5 мм. Срезы взвешивались на торсионных весах, затем проводилось их сканирование при помощи сканера Epson с обеих сторон. После этого, для идентификации зоны некроза, срезы помещали в 1% раствор трифенилтетразолия хлорида на 15 минут (37 °С). Жизнеспособный

миокард (клетки, которые сохранили дегидрогеназную активность) окрашивался в ярко-красный цвет, а некротизированная ткань оставалась неокрашенной (белесой). После 24-часовой инкубации срезов в 10% растворе формалина проводилось повторное сканирование срезов для определения отношения площади зоны некроза ко всей зоне риска. Размеры зоны риска и зоны некроза определяли в программе Adobe Photoshop 13.0.1. Полученные в ходе выполнения исследования результаты вносились в таблицу Microsoft Excel 2013 и обрабатывались в программе Statistica 8.0. Статистическая значимость различий, полученных данных, оценивалась при помощи теста множественных сравнений Данна и дисперсионного анализа ANOVA. Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Значения $p < 0,05$ рассматривались как достоверные.

Для оценки антиаритмического эффекта ДИПК подсчитывалась общая длительность аритмий – пароксизмальные желудочковые тахикардии (ПЖТ), фибрилляции желудочков (ФЖ), желудочковые бигеминии, парные желудочковые экстрасистолы – при ишемии-реперфузии миокарда. По полученным данным рассчитывалась медиана (Me) и интерквартильный размах (25-й; 75-й процентиля). При сравнении групп использовали критерий Крускала–Уоллиса и тест множественных сравнений Данна.

Критериями, исключающими животных из проведения эксперимента, являлись: ЧСС до начала проведения эксперимента менее 300 ударов/минуту и АДср ниже 60 мм рт. ст.

Результаты и обсуждение

Выживаемость крыс с ГЛЕ после острой коронарной окклюзии составила 56,0% (11 из 25 крыс погибли во время острой ишемии миокарда). Так, в группе Контроль_{ГЛЕ} показатель выживаемости составил 63,64%, а в группе ДИПК_{ГЛЕ} – 50,0%. У крыс без ГЛЕ выживаемость составила 100%. Таким образом, из каждой экспериментальной группы крыс для последующего анализа данных было отобрано по 7 животных: Контроль_{Ф.Р.} ($n = 7$), Контроль_{ГЛЕ} ($n = 7$), ДИПК_{Ф.Р.} ($n = 7$), ДИПК_{ГЛЕ} ($n = 7$).

У крыс с ГЛЕ содержание ТГ в сыворотке крови составило $1,54 \pm 0,12$ ммоль/л ($p < 0,01$), ОХ – $5,86 \pm 0,38$ ммоль/л ($p < 0,01$). У крыс без ГЛЕ содержание ТГ составило $0,62 \pm 0,06$ ммоль/л, ОХ – $2,62 \pm 0,09$ ммоль/л. Таким образом, у крыс с ГЛЕ имело место статистически значимое повышение содержания в сыворотке крови ТГ в 2,5 раза и ОХ в 2,2 раза по сравнению с их содержанием у крыс без ГЛЕ ($p < 0,01$). Следовательно, показатели биохимического исследования сыворотки крови указывают о наличии ГЛЕ у крыс, которым интрагастрально в течение 10 дней вводился 10% раствор холестерина на оливковом масле.

Изменения гемодинамических показателей в течение эксперимента (сразу после вскрытия грудной клетки, в начале 30-минутной острой ишемии миокарда, в начале периода реперфузии и далее каждые 30 минут в течение периода реперфузии) у крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ отображены в таблице. Статистически значимых различий между исследуемыми группами животных с ГЛЕ по показателю ЧСС во время всего эксперимента выявлено не было ($p > 0,05$). Величина ДП при проведении эксперимента в группах крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ статисти-

Таблица. Изменение показателей гемодинамики (АДср и ЧСС) на протяжении эксперимента у крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ

Группа		Контроль		ДИПК	
Крысы с ГЛЕ/без ГЛЕ		Крысы с ГЛЕ, n = 7	Крысы без ГЛЕ, n = 7	Крысы с ГЛЕ, n = 7	Крысы без ГЛЕ, n = 7
До начала ОИМ	АД _{ср}	76 \pm 5	86 \pm 5	82 \pm 7	71 \pm 3
	ЧСС	424 \pm 16	417 \pm 9	463 \pm 14	397 \pm 7
Начало ОИМ	АД _{ср}	73 \pm 3	77 \pm 8	68 \pm 4	74 \pm 6
	ЧСС	425 \pm 12	439 \pm 6	468 \pm 12	405 \pm 15
Начало реперфузии	АД _{ср}	78 \pm 5	74 \pm 2	84 \pm 5	74 \pm 4
	ЧСС	446 \pm 25	413 \pm 16	481 \pm 13	420 \pm 18
30' реперфузии	АД _{ср}	83 \pm 7	74 \pm 4	87 \pm 7	78 \pm 5
	ЧСС	466 \pm 20	411 \pm 12	462 \pm 8	410 \pm 19
60' реперфузии	АД _{ср}	77 \pm 8	73 \pm 4	84 \pm 7	82 \pm 5
	ЧСС	433 \pm 13	413 \pm 15	457 \pm 7	414 \pm 17
90' реперфузии	АД _{ср}	71 \pm 6	78 \pm 3	70 \pm 4	75 \pm 6
	ЧСС	432 \pm 13	433 \pm 14	441 \pm 11	411 \pm 17
120' реперфузии	АД _{ср}	70 \pm 5	82 \pm 5	65 \pm 4	73 \pm 4
	ЧСС	434 \pm 10	436 \pm 20	436 \pm 11	417 \pm 14

ски значимо не различалась ($p > 0,05$) по сравнению со своими исходными значениями.

Продолжительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной острой ишемии миокарда у крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ представлена на рисунке 1. У крыс с ГЛЕ во время 30-минутной острой ишемии миокарда фиксировались аритмии длительностью в группе Контроль_{ГЛЕ} – 316 (138; 564) с, в группе ДИПК_{ГЛЕ} – 48 (31; 81) с ($p < 0,05$), в группе Контроль_{Ф.Р.} – 198 (14; 239) с, в группе ДИПК_{Ф.Р.} – 30 (3; 132) с ($p < 0,05$). В группе животных ДИПК_{ГЛЕ} имело место статистически значимое снижение продолжительности аритмий во время 30-минутной острой ишемии миокарда по сравнению с группой Контроль_{ГЛЕ} ($p < 0,05$). В группе Контроль_{ГЛЕ} у 6 крыс отмечалась ПЖТ, у 5 крыс – ФЖ и у 6 крыс – реперфузионные нарушения сердечного ритма. В группе ДИПК_{ГЛЕ} ПЖТ наблюдалась у 2 крыс, ФЖ только у одной крысы и реперфузионные

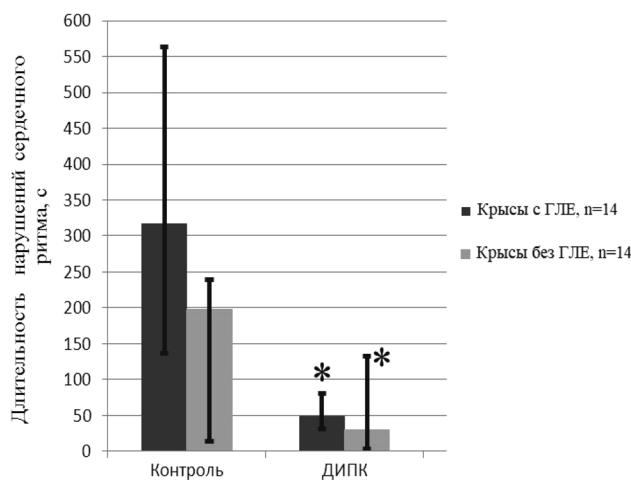


Рисунок 1. Длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной острой ишемии миокарда и 120-минутной реперфузии у крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ

* $p < 0,05$ – различия статистически значимы

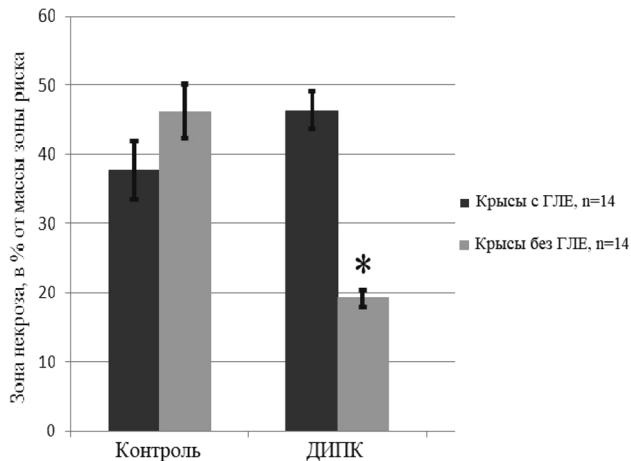


Рисунок 2. Размеры зоны некроза (в % от зоны риска) в миокарде левого желудочка у крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ
* $p < 0,01$ – различия статистически значимы

нарушения сердечного ритма у 3 животных. Таким образом, в группе ДИПК_{ГЛЕ} во время острой ишемии миокарда отмечалась статистически незначимая тенденция к снижению частоты возникновения ФЖ и ПЖТ, а также незначимое снижение частоты возникновения реперфузионных нарушений сердечного ритма по сравнению с группой Контроль_{ГЛЕ}. У крыс без ГЛЕ в группе ДИПК продолжительность аритмий оказалась статистически значимо меньше в сравнении с группой Контроль. Таким образом, у крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ имел место выраженный антиаритмический эффект ДИПК.

Показатель размера зоны некроза (в % от зоны риска) в миокарде левого желудочка у анализируемых групп крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ статистически значимо не отличался (рисунок 2). Размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка были следующими: в группе Контроль_{ГЛЕ} – $38 \pm 4\%$, в группе ДИПК_{ГЛЕ} – $46 \pm 4\%$, в группе Контроль_{Ф.Р.} – $46 \pm 4\%$, в группе ДИПК_{Ф.Р.} – $19 \pm 1\%$ ($p < 0,01$). Следовательно, можно сделать заключение, что в группе животных с ГЛЕ ДИПК не оказывает противоишемического эффекта. У крыс в группе ДИПК_{Ф.Р.}, наоборот, отмечается статистически значимое снижение размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка по сравнению с группой Контроль_{Ф.Р.}, что указывает о том, что у крыс без ГЛЕ имеет место значимый противоишемический эффект ДИПК.

Согласно имеющимся современным представлениям размер области некроза в миокарде зависит от множества факторов, в частности от температуры тела, продолжительности ишемии миокарда, состояния сосудистого русла, размера зоны риска, наличия сопутствующей патологии и нарушений обмена веществ, в том числе обмена липидов. В исследовании температура тела и продолжительность ишемии миокарда имели одинаковые значения во всех экспериментальных группах животных. Учитывая имеющуюся тенденцию к снижению размера зоны риска в миокарде левого желудочка во всех группах крыс с ГЛЕ по сравнению с крысами без ГЛЕ, можно предположить, что меньшие размеры зоны риска у крыс с ГЛЕ могли способствовать формированию и более низких размеров зоны некроза миокарда. Поэтому был проведен дополнительный расчет размеров зоны некроза миокарда в % от массы левого желудочка (рисунок 3). Выявлено, что средняя зона некроза в группе Контроль_{ГЛЕ}

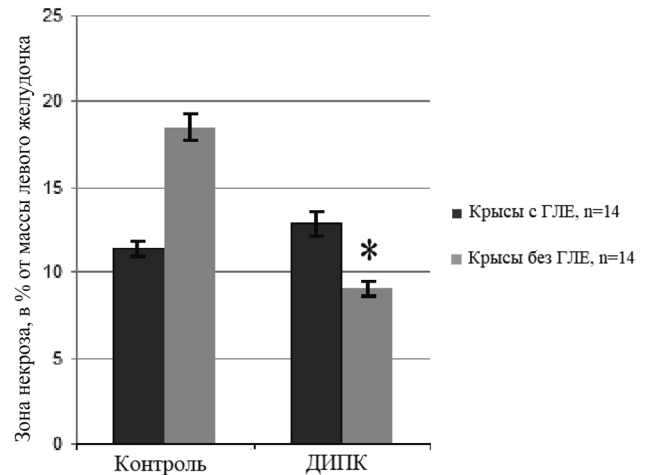


Рисунок 3. Размеры зоны некроза (в % от массы левого желудочка) в миокарде левого желудочка крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ
* – статистически значимые отличия размеров зоны некроза в группе ДИПК по сравнению с контрольной группой крыс без ГЛЕ ($p < 0,01$)

составила $11,4 \pm 0,6\%$, в группе Контроль_{Ф.Р.} – $18,5 \pm 0,8\%$, в группе ДИПК_{ГЛЕ} – $12,8 \pm 0,7\%$, в группе ДИПК_{Ф.Р.} – $9,1 \pm 0,4\%$ ($p < 0,01$). Таким образом, в группе ДИПК_{ГЛЕ} размеры зоны некроза также был сопоставим с таковыми в группе Контроль_{ГЛЕ}. Следовательно, можно предположить, что в данной ситуации размеры зоны риска в миокарде левого желудочка не оказывали значимого влияния на воспроизводимость противоишемического эффекта ДИПК у крыс с ГЛЕ.

Выводы

1. ДИПК не эффективно в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с ГЛЕ.
2. ДИПК эффективно в плане снижения длительности нарушений сердечного ритма во время ишемии-реперфузии миокарда у крыс с ГЛЕ.

Литература

1. Карпов, А. А. Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: Техника и методы морфофункциональной оценки / А. А. Карпов, Д. Ю. Ивкин, А. В. Драчева, Н. В. Питухина [и др.] // Биомедицина. – 2014. – №3. – С. 32–48.
2. Липовецкий, Б. М. Дислипидемии, атеросклероз и их связь с ишемической болезнью сердца и мозга: рук. для врачей и студентов-медиков / Б. М. Липовецкий. – СПб.: Эко-Вектор, 2012. – 75 с.
3. Любимов, А. В. Ишемия, реперфузия и прекодиционирование: традиционные и новые подходы в лечении инфаркта миокарда / А. В. Любимов, П. Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2016. – Т. 14, №3. – С. 3–11.
4. Мрочек, А. Г. Сердечно-сосудистые заболевания в Республике Беларусь: анализ ситуации и стратегии контроля / А. Г. Мрочек [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 2011. – 341 с.
5. Шляхто, Е. В. Ограничение ишемического и реперфузионного повреждения миокарда с помощью пре- и посткодиционирования: молекулярные механизмы и мишени для фармакотерапии / Е. В. Шляхто, Е. М. Нифонтов, М. М. Галагурда // Креативная кардиология. – 2007. – №1-2. – С. 75–102.
6. Basalay, M. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mecha-

nisms / M. Basalay, V. Barsukevich, S. Mastitskaya // Exp Physiol. – 2012. – Vol. 97, № 8. – P. 908–917.

7. *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.*

8. *Görbe, A. Cholesterol diet leads to attenuation of ischemic preconditioning-induced cardiac protection: the role of connexin 43 / A. Görbe [et al.] // Am J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2011. – Vol. 300, № 5. – P. H1907–H1913.*

Оригинальные научные публикации

9. *Kremastinos, D. T. Preconditioning limits myocardial infarct size in hypercholesterolemic rabbits / D. T. Kremastinos, E. Bofilis, G. K. Karavolias [et al.] // Atherosclerosis. – 2000. – Vol. 150. – P. 81–89.*

10. *Szilvassy, Z. The loss of pacing-induced preconditioning in atherosclerotic rabbits: role of hypercholesterolemia / Z. Szilvassy, P. Ferdinandy // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1995. – Vol. 27, № 12. – P. 2559–2569.*

Поступила 07.05.2018 г.