

# КАРДИОПРОТЕКТОРНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДИСТАНТНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИЕЙ

*Висмонт Ф. И., Чепелев С. 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 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 прекондиционирования (далее — ДИПК) миокарда у крыс с экспериментальной гиперлипидемией (далее — ГЛЕ). Установлено, что ДИПК неэффективно 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.

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

**Введение.** В настоящее время ишемическая болезнь сердца (ИБС) является основной причиной смертности в большинстве развитых стран мира, в т. ч. и 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].

В последние годы объектом повышенного внимания ведущих ученых мира в области клинической и экспериментальной кардиологии являются кардиопротекторные (противоишемический и антиаритмический) эффекты дистантного ишемического прекодиционирования. 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 относится и гиперлипидемия [2].

В современной литературе имеются данные экспериментальных исследований, касающихся воспроизводимости кардиопротекторных эффектов локального ишемического прекодиционирования у экспериментальных животных с гиперхолестеролиемией (далее — ГХЕ), которые весьма противоречивы. Так, согласно данным одних исследований имеется выраженный инфаркклимитирующий эффект ДИПК у экспериментальных животных с ГХЕ [6], однако по результатам других исследований противоишемический эффект ДИПК отсутствует [7]. До сих пор 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 работы** — выяснение 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  $225 \pm 25$  г, а их возраст — 3–4 мес. Для исследования все животные были разделены на 4 группы: Контроль<sub>Ф.Р.</sub> ( $n = 7$ ), Контроль<sub>ГЛЕ</sub> ( $n = 11$ ), ДИПК<sub>Ф.Р.</sub> ( $n = 7$ ), ДИПК<sub>ГЛЕ</sub> ( $n = 14$ ). ГЛЕ вызывали путем однократного интрагастрального введения животным 10 % раствора холестерина на оливковом масле в дозе 10 мл/кг в течение 10 дней. В качестве контроля использовали крыс с налогичными 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 определялись в сыворотке крови уровни общего холестерина (далее — ОХ) и триглицеридов (далее — ТГ). Дальнейшее моделирование экспериментальных протоколов выполнялось через 24 ч 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 последующим внутривенным введением поддерживающей дозы 10 мг/кг/ч. Крысы при помощи аппарата искусственной вентиляции легких переводились на искусственное дыхание атмосферным воздухом с частотой дыхания 56–60 в мин. Пройодимость дыхательных путей проверялась по давлению в трахее, значение которого в норме на вдохе составляет 10–15 мм рт. ст. В ходе экспериментов постоянно регистрировалось 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  $15 \pm 5$  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 мин. 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 (АД<sub>ср</sub>), частоты сердечных сокращений (ЧСС), двойного произведения (ДП). АД<sub>ср</sub> рассчитывалась как  $АД_{ср} = АД_{диастолическое} + 1/3 (АД_{систолическое} - АД_{диастолическое})$ ; ДП рассчитывалось как

ЧСС × 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 мин окклюзии левой коронарной артерии, в начале периода реперфузии, а также через каждые 30 мин во время периода реперфузии.

Зону риска определяли с помощью внутривенного введения в левую общую яремную вену 0,5 мл 5 % раствора синего 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 мин (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 MS 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 ± стандартная ошибка среднего (M±m). Значения p<0,05 рассматривались как достоверные.

Для оценки антиаритмического эффекта ДИПК подсчитывалась общая длительность аритмий — пароксизмальные желудочковые тахикардии (далее — ПЖТ), фибрилляции желудочков (далее — 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 Краскела–Уоллиса и тест множественных сравнений Данна.

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

**Результаты и их 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 КонтрольГЛЕ показатель выживаемости составил 63,64 %, а в группе ДИПКГЛЕ — 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: КонтрольФ.Р. (n = 7), КонтрольГЛЕ (n = 7), ДИПКФ.Р. (n = 7), ДИПКГЛЕ (n = 7).

У крыс с ГЛЕ содержание ТГ в сыворотке крови составило 1,54±0,12 ммоль/л (p<0,01), ОХ — 5,86±0,38 ммоль/л (p<0,01). У крыс без ГЛЕ содержание ТГ составило 0,62±0,06 ммоль/л, ОХ — 2,62±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 показателем у крыс без ГЛЕ (p<0,01). Следовательно, показатели биохимического исследования сыворотки крови указывают на наличие 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 мин в течение периода реперфузии) у крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ отображены в таблице 1.

Таблица 1. — Изменение показателей гемодинамики (АДср и ЧСС) на протяжении эксперимента у крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ

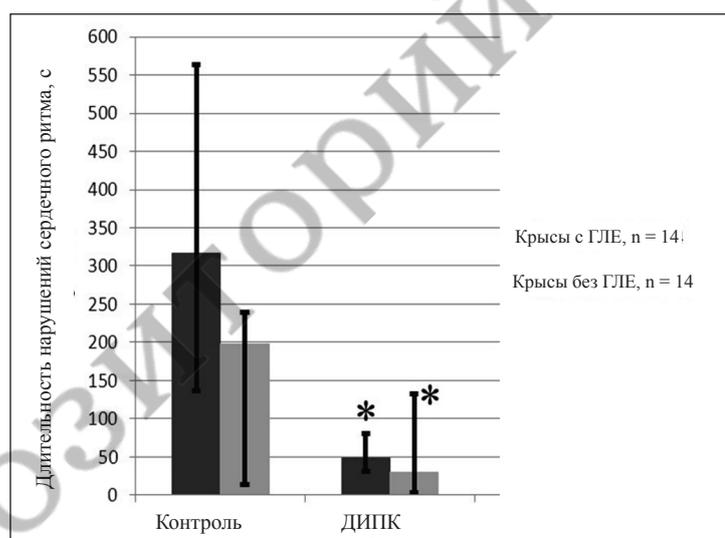
Группа		Контроль		ДИПК	
		крысы с ГЛЕ (n = 7)	крысы без ГЛЕ (n = 7)	крысы с ГЛЕ (n = 7)	крысы без ГЛЕ (n = 7)
До начала ОИМ	АДср	76±5	86±5	82±7	71±3
	ЧСС	424±16	417±9	463±14	397±7
Начало ОИМ	АДср	73±3	77±8	68±4	74±6
	ЧСС	425±12	439±6	468±12	405±15

Продолжение таблицы 1

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)
Начало реперфузии	АД <sub>сер</sub>	78±5	74±2	84±5	74±4
	ЧСС	446±25	413±16	481±13	420±18
30' реперфузии	АД <sub>сер</sub>	83±7	74±4	87±7	78±5
	ЧСС	466±20	411±12	462±8	410±19
60' реперфузии	АД <sub>сер</sub>	77±8	73±4	84±7	82±5
	ЧСС	433±13	413±15	457±7	414±17
90' реперфузии	АД <sub>сер</sub>	71±6	78±3	70±4	75±6
	ЧСС	432±13	433±14	441±11	411±17
120' реперфузии	АД <sub>сер</sub>	70±5	82±5	65±4	73±4
	ЧСС	434±10	436±20	436±11	417±14

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 статистически значимо не различалась ( $p > 0,05$ ) по сравнению с 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.



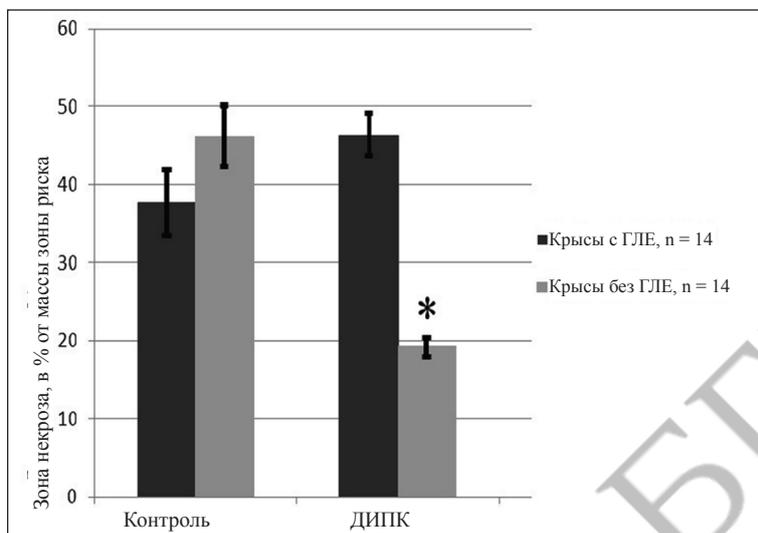
\* —  $p < 0,05$  — различия статистически значимы

**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

У крыс с ГЛЕ во время 30-минутной острой ишемии миокарда фиксировались аритмии длительностью в группе Контроль<sub>ГЛЕ</sub> — 316 (138; 564) с, в группе ДИПК<sub>ГЛЕ</sub> — 48 (31; 81) с ( $p < 0,05$ ), в группе Контроль<sub>Ф.Р.</sub> — 198 (14; 239) с, в группе ДИПК<sub>Ф.Р.</sub> — 30 (3; 132) с ( $p < 0,05$ ). В группе животных ДИПК<sub>ГЛЕ</sub> имело место статистически значимое снижение продолжительности аритмий во время 30-минутной острой ишемии миокарда по сравнению с группой Контроль<sub>ГЛЕ</sub> ( $p < 0,05$ ). В группе Контроль<sub>ГЛЕ</sub> у 6 крыс отмечалась ПЖТ, у 5 крыс — ФЖ и у 6 крыс — реперфузионные нарушения сердечного ритма. В группе ДИПК<sub>ГЛЕ</sub> ПЖТ наблюдалась у 2 крыс, ФЖ только у одной крысы и реперфузионные нарушения сердечного ритма — у 3 животных. Таким образом, в группе ДИПК<sub>ГЛЕ</sub> 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<sub>ГЛЕ</sub>. 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 (% от зоны риска) в миокарде левого желудочка у анализируемых групп крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ статистически значимо не различался (рисунок 2).

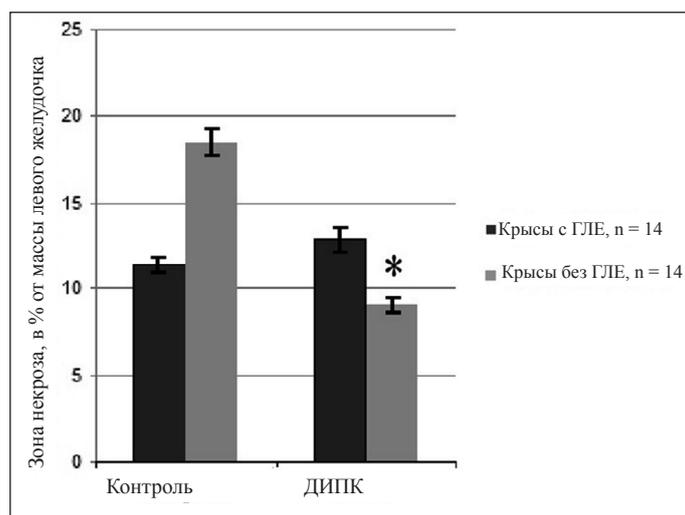


\* —  $p < 0,01$  — различия статистически значимы

**Рисунок 2. — Размеры зоны некроза (% от зоны риска) в миокарде левого желудочка у крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ**

Размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка были следующими: в группе Контроль<sub>ГЛЕ</sub> —  $38 \pm 4\%$ , в группе ДИПК<sub>ГЛЕ</sub> —  $46 \pm 4\%$ , в группе Контроль<sub>Ф.Р.</sub> —  $46 \pm 4\%$ , в группе ДИПК<sub>Ф.Р.</sub> —  $19 \pm 1\%$  ( $p < 0,01$ ). Следовательно, можно сделать заключение, что в группе животных с ГЛЕ ДИПК не оказывает противоишемический эффект. У крыс в группе ДИПК<sub>Ф.Р.</sub>, наоборот, отмечается статистически значимое снижение размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка по сравнению с группой Контроль<sub>Ф.Р.</sub>; это указывает на то, 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 т. ч. 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).



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

**Рисунок 3. — Размеры зоны некроза (% от массы левого желудочка) в миокарде левого желудочка у крыс с ГЛЕ и крыс без ГЛЕ**

Выявлено, что средняя зона некроза в группе Контроль<sub>ГЛЕ</sub> составила  $11,4 \pm 0,6\%$ , в группе Контроль<sub>Ф.Р.</sub> —  $18,5 \pm 0,8\%$ , в группе ДИПК<sub>ГЛЕ</sub> —  $12,8 \pm 0,7\%$ , в группе ДИПК<sub>Ф.Р.</sub> —  $9,1 \pm 0,4\%$  ( $p < 0,01$ ). Таким образом, в группе ДИПК<sub>ГЛЕ</sub> размеры зоны некроза также были сопоставимы с таковыми в группе Контроль<sub>ГЛЕ</sub>. 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 неэффективно 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 [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 посткондиционирования: 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 mechanisms / M. Basalay, V. Barsukevich, S. Mastitskaya // Exp Physiol. — 2012. — Vol. 97, № 8. — P. 908–917.
7. 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.

### **CARDIOPROTECTIVE EFFICIENCY OF REMOTE ISCHEMIC PRECONDITIONING DURING ISCHEMIA-REPERFUSION OF MYOCARDIUM IN RATS WITH EXPERIMENTAL HYPERLIPIDEMIA**

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

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

The search for new effective methods for preventing or reducing ischemic myocardial damage and mechanisms for their realization is an urgent task of modern experimental and clinical medicine and an important area of

research in physiology. The aim of the study was to reveal the reproducibility of antiischemic and antiarrhythmic effects of remote ischemic preconditioning (RIPC) of the myocardium in rats with experimental hyperlipidemia (HLE). It was found that RIPC is not effective in limiting the size of the necrosis area in the left ventricular of myocardium during myocardial ischemia-reperfusion in rats with HLE. At the same time, after the reproduction of RIPC in rats with HLE, there is a pronounced antiarrhythmic effect.

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

Поступила 09.07.2018