

## ПРОТОВОИШЕМИЧЕСКАЯ И АНТИАРИТМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДИСТАНТНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИСЛИПИДЕМИЕЙ

Чепелев С.Н.

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

**Ключевые слова:** ишемия, реперфузия, дистантное ишемическое прекондиционирование.

**Резюме:** в ходе исследования установлено, что дистантное ишемическое прекондиционирование (ДИПК) не эффективно в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с дислипидемией (ДЛЕ). В то же время, после воспроизведения ДИПК у крыс с ДЛЕ имеет место выраженный антиаритмический эффект.

**Resume:** the study found that remote ischemic preconditioning (RIPC) is not effective in limiting the size of the necrosis area in the left ventricular myocardium during ischemia-reperfusion of myocardium in rats with dyslipidemia (DLE). At the same time, after using RIPC in rats with DLE, a pronounced antiarrhythmic effect takes place.

**Актуальность.** 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 прекондиционирования (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 относится и дислипидемия (ДЛЕ) [2].

В современной литературе имеются данные экспериментальных исследований, касающихся воспроизводимости кардиопротекторных эффектов локального ишемического прекондиционирования у экспериментальных животных с гиперхолестеролиемией (ГХЕ), которые весьма противоречивы. Так, согласно данным одних исследований имеется выраженный инфарктулирующий 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 ДЛЕ, которая не ограничивается только ГХЕ, до сих пор не было предметом специального исследования.

**Цель:** выяснение воспроизводимости кардиопротекторных (противоишемических и антиаритмических) эффектов ДИПК при ишемии и реперфузии миокарда у крыс с экспериментальной ДЛЕ.

**Задачи:** 1. Выяснение воспроизводимости противоишемической эффективности ДИПК при ишемии и реперфузии миокарда у крыс с экспериментальной ДЛЕ; 2. Выяснение эффективности ДИПК в снижении длительности нарушений сердечного ритма при ишемии и реперфузии миокарда у крыс с экспериментальной ДЛЕ.

**Материалы и методы.** Исследование кардиопротекторной эффективности ДИПК выполнено на 39 наркотизированных нелинейных белых крысах-самцах (масса  $225 \pm 25$  г, возраст 3-4 мес.), разделенных на 4 группы: Контроль<sub>Ф.Р.</sub> (n=7), Контроль<sub>ДЛЕ</sub> (n=11), ДИПК<sub>Ф.Р.</sub> (n=7), ДИПК<sub>ДЛЕ</sub> (n=14). ДЛЕ 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 ДЛЕ). Для подтверждения наличия ДЛЕ 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 ДЛЕ), либо физиологического раствора (крысы без ДЛЕ). Для наркотизации животных использовался тиопентал натрия, который вводился внутривенно в дозе 50 мг/кг. Крысы при помощи аппарата искусственной вентиляции легких переводились на искусственное дыхание атмосферным воздухом с частотой дыхания 56-60 в мин. В ходе экспериментов постоянно регистрировалась системное артериальное давление (АД) и ЭКГ во II стандартном отведении.

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 ишемизированной 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

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  $-20^{\circ}\text{C}$  (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 ( $37^{\circ}\text{C}$ ). 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 CC 2018. Полученные в ходе выполнения исследования результаты вносились в таблицу Microsoft Excel 2013 и обрабатывались в программе Statistica 10. 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, фибрилляции желудочков, 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.

**Результаты и их обсуждение.** Выживаемость крыс с ДЛЕ после острой коронарной окклюзии составила 56,0% (11 из 25 крыс погибли во время острой

ишемии миокарда). Так, в группе Контроль<sub>ДЛЕ</sub> показатель выживаемости составил 63,64%, а в группе ДИПК<sub>ДЛЕ</sub> – 50,0%. У крыс без ДЛЕ выживаемость составила 100%. Таким образом, из каждой экспериментальной группы крыс для последующего анализа данных было отобрано по 7 животных: Контроль<sub>Ф.Р.</sub> (n=7), Контроль<sub>ДЛЕ</sub> (n=7), ДИПК<sub>Ф.Р.</sub> (n=7), ДИПК<sub>ДЛЕ</sub> (n=7)

У крыс с ДЛЕ 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 ДЛЕ содержание ТГ составило  $0,62 \pm 0,06$  ммоль/л, ОХ –  $2,62 \pm 0,09$  ммоль/л. Таким образом, у крыс с ДЛЕ 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 ДЛЕ ( $p < 0,01$ ).

Продолжительность нарушений сердечного ритма во время ишемии миокарда и периода реперфузии у крыс с ДЛЕ и крыс без ДЛЕ представлена на рис. 1.

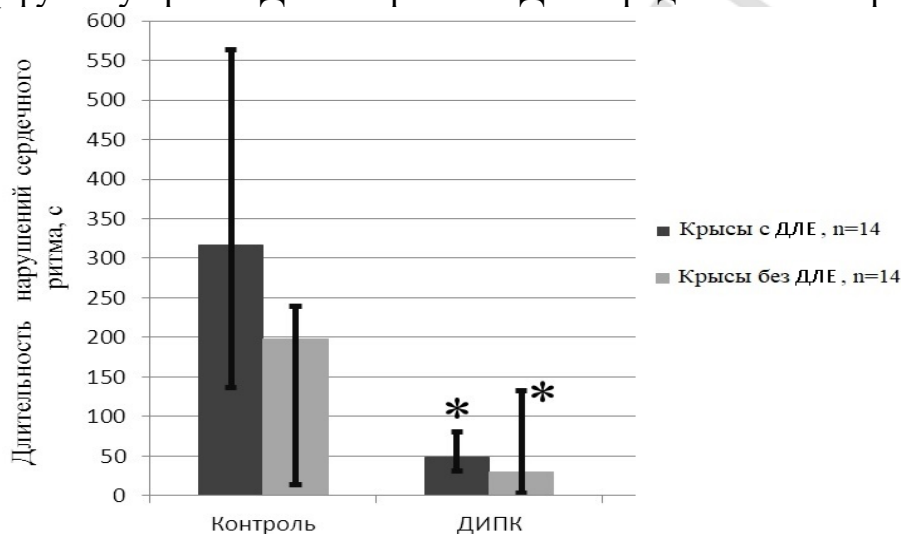
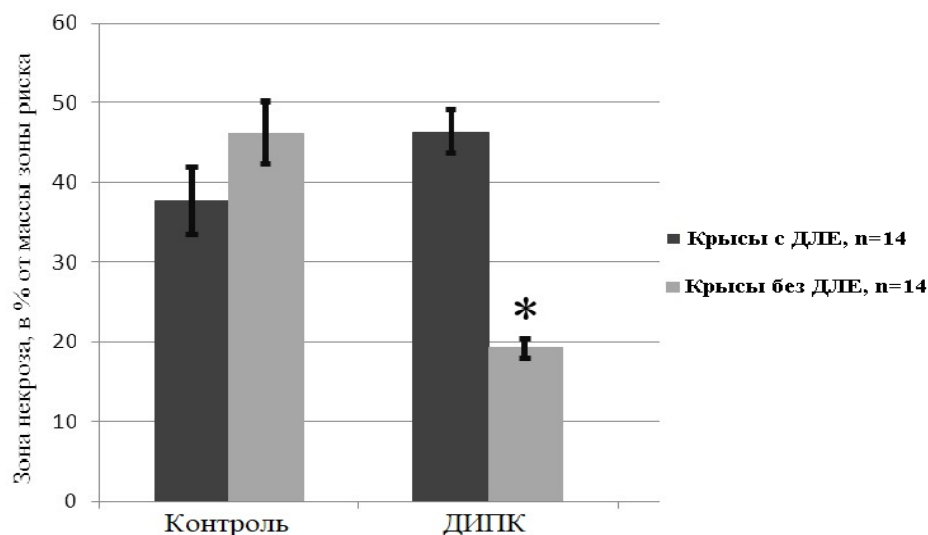


Рис. 1 – Длительность аритмий во время ишемии-реперфузии миокарда у крыс с ДЛЕ и без ДЛЕ; \* $p < 0,05$  – различия статистически значимы

У крыс с ДЛЕ во время 30-минутной острой ишемии миокарда фиксировались аритмии длительностью в группе Контроль<sub>ДЛЕ</sub> – 316 (138; 564) сек, в группе ДИПК<sub>ДЛЕ</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>ДЛЕ</sub> имело место статистически значимое снижение продолжительности аритмий во время 30-минутной острой ишемии миокарда по сравнению с группой Контроль<sub>ДЛЕ</sub> ( $p < 0,05$ ).

Показатель размера зоны некроза (в % от зоны риска) в миокарде левого желудочка у анализируемых групп крыс с ДЛЕ и крыс без ДЛЕ статистически значимо не отличался (рис. 2).



**Рис. 2** – Размеры зоны некроза в % от зоны риска в миокарде левого желудочка у крыс с и без ДЛЕ; \* $p < 0,01$  – различия статистически значимы

Размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка были следующими: в группе Контроль<sub>ДЛЕ</sub> –  $38 \pm 4\%$ , в группе ДИПК<sub>ДЛЕ</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 ДЛЕ 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>, что указывает о том, что у крыс без ДЛЕ имеет место выраженный противоишемический эффект ДИПК.

**Выводы:** ДИПК не эффективно в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с экспериментальной ДЛЕ. ДИПК эффективно в плане снижения длительности нарушений сердечного ритма во время ишемии-реперфузии миокарда у крыс с экспериментальной ДЛЕ.

#### 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 mechanisms / 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.
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.