

ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКИЙ И АНТИАРИТМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ ФЕНОМЕНОВ ДИСТАНТНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕ- И ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МИОКАРДА У КРЫС

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Настоящее исследование посвящено выявлению воспроизводимости противоишемического и антиаритмического эффектов феноменов дистантного ишемического пре- и посткондиционирования в условиях возрастных изменений миокарда у крыс.

Установлено, что указанные феномены весьма эффективны в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка старых крыс. Однако, антиаритмический эффект феномена дистантного ишемического прекодиционирования у старых крыс не воспроизводится.

Ключевые слова: *противоишемический эффект, антиаритмический эффект, дистантное ишемическое прекодиционирование, дистантное ишемическое посткондиционирование, ишемия, реперфузия, старые крысы, возрастные изменения миокарда, зона риска, зона некроза.*

P.F. Jushkevich, F.I. Vismont

ANTIISCHEMIC AND ANTIARRHYTHMIC EFFECTS PHENOMENONS OF REMOTE ISCHEMIC PRE- AND POSTCONDITIONING IN CONDITION AGE- RELATED CHANGES IN THE MYOCARDIUM IN RATS

The aim of this study was to determine the antiischemic and antiarrhythmic effects phenomenon of remote ischemic pre- and postconditioning in old rats. It was found that remote ischemic pre- and postconditioning equally protect myocardium against irreversible ischemia-reperfusion injury.

However, remote ischemic preconditioning was not protects myocardium against arrhythmias in old rats.

Key words: *antiischemic effect, antiarrhythmic effect, remote ischemic preconditioning, remote ischemic postconditioning, ischemia, reperfusion, old rats, age-related changes in the myocardium, the area at risk, the area of necrosis.*

Исследования последних лет продемонстрировали, что размер инфаркта миокарда и длительность ишемических нарушений сердечного ритма могут быть значительно уменьшены при помощи ишемии конечности, не только предшествующей длительной ишемии миокарда – дистантное ишемическое прекодиционирование (ДИПК), но и осуществляемой через определенное (10 мин) время после начала реперфузии миокарда – дистантное ишемическое посткондиционирование (ДИПостК) [1, 3, 5]. На сегодняшний день наиболее распространенной является нервно-гуморальная теория развития противоишемического эффекта феноменов ДИПК и ДИПостК. Согласно данной теории, реализация противоишемического эффекта указанных феноменов напрямую зависит от различных гуморальных факторов, в частности от высвобождения при дистантной ишемии аденозина, брадикинина и опиоидных пептидов,

запускающих в миокарде каскад внутриклеточных превращений, конечным звеном которых является открытие АТФ-зависимых калиевых каналов [7, 8, 9, 11]. Кроме того, реализация противоишемического эффекта феноменов ДИПК и ДИПостК также зависит от парасимпатической регуляции сердца [1].

Однако, согласно данным ряда экспериментальных исследований, одним из наиболее неблагоприятных факторов для воспроизведения ДИПК и ДИПостК следует считать возраст [2, 6]. Вопросу, воспроизводятся ли противоишемический и антиаритмический эффекты феноменов ДИПК и ДИПостК у старых животных, посвящено несколько экспериментальных исследований, причем результаты данных исследований весьма противоречивы [4, 10, 12]. Согласно литературным данным, в миокарде старых животных имеет место значительное снижение содержания

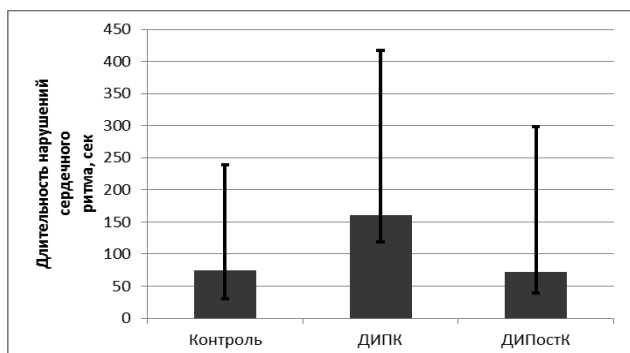


Рис. 1. Длительность нарушений сердечного ритма (в сек) во время 30-минутной коронарной окклюзии в контрольной группе и группах крыс, в которых воспроизводились феномены ДИПК и ДИПостК

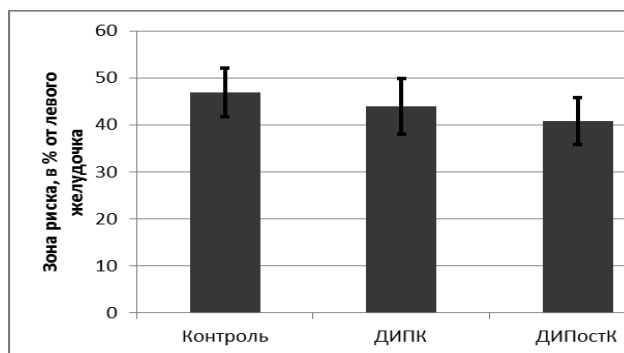


Рис. 2. Размеры зоны риска (в % от левого желудочка) в контрольной группе и группах крыс, в которых воспроизводились феномены ДИПК и ДИПостК

креатинфосфата и АТФ, что оказывает существенное влияние на энергетический баланс кардиомиоцитов и их отдельных структур, в частности, АТФ-зависимых калиевых каналов [10]. Кроме того, у старых животных имеет место снижение тонуса *p. vagus* [2]. Отсюда следует предположение, что указанные возрастные изменения миокарда животных могут оказывать существенное влияние на воспроизводимость феноменов ДИПК и ДИПостК.

Целью настоящего исследования являлось выявление воспроизводимости противоишемического и антиаритмического эффектов феноменов дистантного ишемического пре- и посткондиционирования миокарда у старых крыс.

Материалы и методы

Для изучения эффективности ДИПК и ДИПостК исследование проводили на 40 старых наркотизированных крысах-самцах линии Wistar. Масса старых крыс составляла 400-450 гр. Возраст крыс составлял 18 мес. Животные содержались в стандартных условиях вивария БГМУ с свободным доступом к пище и воде. В качестве наркоза использовался этаминал натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно с последующей внутривенной инфузией поддерживающей дозы 10 мг/кг/час. Животных переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом при помощи аппарата ИВЛ с частотой дыхания 56-60 в минуту. Наличие проходимости дыхательных путей контролировалось по давлению в трахее, нормальным значением которого на вдохе считалось 10-15 мм. рт. ст. В ходе экспериментов непрерывно регистрировались ЭКГ во II стандартном отведении и системное артериальное давление (АД) с помощью компьютерной программы Spike 4. Для измерения АД крысам канюлировали правую общую сонную артерию. Температура тела измерялась в прямой кишке с помощью электротермометра и поддерживалась электрогрелкой на уровне 37,0°C.

Грудную клетку вскрывали в четвертом межреберном промежутке. В контрольной группе после 15-минутной стабилизации гемодинамики крысам выполняли 30-минутную окклюзию передней нисходящей коронарной артерии (ПНКА) путем механического ее пережатия при помощи

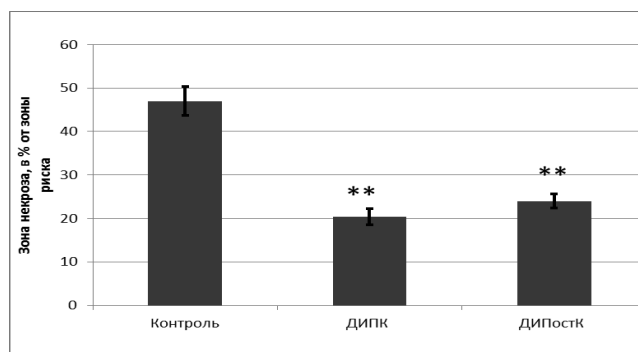


Рис. 3. Размеры зоны некроза (в % от зоны риска) в контрольной группе и группах крыс, в которых воспроизводились феномены ДИПК и ДИПостК

** - отличия в группах ДИПК и ДИПостК по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$)

фишки (Контроль, $n=11$). Реперфузия миокарда достигалась простым удалением фишки. Длительность реперфузии составляла 120 минут. Животные опытных групп (ДИПК, $n=12$ и ДИПостК, $n=17$) дополнительно подвергались воздействию 15-минутной окклюзии обеих бедренных артерий соответственно за 10 мин до и через 10 мин после 30-минутной острой ишемии миокарда.

Зону риска определяли с помощью внутривенного введения в левую общую яремную вену 0,5 мл 5% раствора синьки Эванса в конце реперфузии при кратковременной повторной окклюзии коронарной артерии. Таким образом, зона риска определялась, как не окрашенная в синий цвет. Затем сердце извлекали и отделяли правый желудочек. После замораживания в морозильной камере при температуре -20 °C в течение 30 мин левый желудочек разрезали на 6 поперечных срезов. Срезы взвешивали при помощи торсионных весов, затем сканировали при помощи сканера с обеих сторон. После этого, для идентификации зоны некроза срезы помещали в 1% раствор трифенилтетразолия хлорида на 15 минут при температуре 37 °C. Жизнеспособный миокард (клетки, сохранившие дегидрогеназную активность) окрашивался в кирпично-красный цвет, некротизированная ткань была белой. После 24-часовой инкубации срезов в 10% растворе формалина срезы сканировали повторно для определения соотношения площадей зоны риска и зоны некроза. Размеры зон риска и некроза определяли при помощи компьютерной планиметрии с использованием программы Adobe Photoshop 6.0. Полученные в исследовании результаты заносились в электронную таблицу Excel 7.0 и обрабатывались с помощью стандартного пакета статистических программ Statistica 8. Статистическая значимость различий размеров зон риска и некроза оценивалась при помощи ANOVA и теста множественных сравнений Данна. Данные представлены в формате среднее \pm стандартная ошибка среднего. Значения $p < 0,05$ рассматривались как достоверные.

Для оценки антиаритмического эффекта ДИПК и ДИПостК подсчитывалась общая длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной острой коронарной

окклюзии - фибрилляции желудочков (ФЖ), пароксизмальной желудочковой тахикардии (ПЖТ), парной желудочковой экстрасистолии, желудочковой экстрасистолии по типу бигеминии, также оценивалось наличие реперфузионных нарушений сердечного ритма. На основе полученных данных рассчитывались медиана (Ме) и интерквартильный размах (25-й; 75-й процентиля). При сравнении групп использовали критерий Крускала—Уоллиса и тест множественных сравнений Данна.

Критериями исключения животных из опытов являлись, частота сердечных сокращений до начала эксперимента менее 300 ударов в минуту и среднее АД ниже 60 мм. рт. ст.

Результаты и обсуждение

Показатель выживаемости старых крыс во время острой коронарной окклюзии составил 52,5% (19 крыс из 40 погибли во время острой ишемии миокарда). Причем показатель выживаемости в контрольной группе составил 63,6%, в группе ДИПК – 58,3%, в группе ДИПостК – 41,2%. Таким образом, из каждой экспериментальной группы старых крыс для последующего анализа данных было отобрано по 7 животных.

Выраженность нарушений ритма сердца во время 30-минутной окклюзии ПНКА (медиана и интерквартильный размах) у старых крыс представлена на рис. 1. Значимых отличий между группами старых крыс по показателю общей длительности нарушений сердечного ритма во время острой коронарной окклюзии выявлено не было ($p > 0,05$). В контрольной группе старых крыс во время ишемии миокарда наблюдались нарушения ритма сердца общей длительностью от 18 до 246 сек. При этом, у 4 из 7 крыс отмечалась ФЖ, у 6 из 7 – ПЖТ. Реперфузионные нарушения сердечного ритма отмечались у 6 старых крыс контрольной группы. В группе старых крыс, в которой воспроизводился феномен ДИПК, длительность ишемических нарушений ритма составила от 11 до 294 сек. ФЖ и ПЖТ наблюдалась у 4 крыс данной группы. Реперфузионные нарушения сердечного ритма имели место у 3 старых крыс группы ДИПК. В группе ДИПостК во время острой ишемии миокарда отмечались нарушения ритма сердца продолжительностью от 15 до 269 сек. У 3 из 7 крыс отмечалась ФЖ, а ПЖТ отмечалась у 4 крыс данной группы. Реперфузионные нарушения сердечного ритма присутствовали у 5 животных группы ДИПостК. Длительность аритмий в контрольной группе составила 75 (44; 164) сек, в группе ДИПК – 161 (42; 256) сек, в группе ДИПостК - 72 (33; 226) сек (рис. 1).

Таким образом, установлено, что у старых крыс длительность аритмий во время острой коронарной окклюзии в контрольной группе и группе ДИПостК сопоставима, что вполне логично, учитывая тот факт, что ДИПостК не может оказывать влияние на нарушения сердечного ритма во время острой ишемии миокарда. Однако, несмотря на отсутствие значимых различий ($p > 0,05$), из рис. 1 видно, что имеет место тенденция к увеличению длительности аритмий во время острой ишемии миокарда в группе ДИПК по сравнению с контрольной группой, т.е. противоритмический эффект феномена ДИПК у старых крыс не только не воспроизводится, более того, напротив, имеет место стимуляция аритмогенеза у старых крыс данной группы. В отличие от старых крыс, у молодых крыс антиаритмический эффект феномена ДИПК воспроизводится [1]. Одним из возможных механизмов, объясняющих отсутствие антиаритмического эффекта ДИПК у старых крыс, по нашему мнению, является снижение у старых крыс тонуса n. vagus, что приводит к повышению симпатических влияний на сердце и стимуляции аритмогенеза.

Значимых различий между группами старых крыс по

показателю размеров зоны риска в миокарде левого желудочка не выявлено ($p > 0,05$), т.о. размеры зоны риска во всех группах крыс были сопоставимы (рис. 2).

На рис. 3 представлены размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка в анализируемых группах старых крыс. Средняя зона некроза в контрольной группе составила $47 \pm 3\%$. В группе старых крыс, в которой воспроизводился феномен ДИПК, формировался менее обширный некроз по сравнению с группой контроля - $20 \pm 2\%$ ($p < 0,01$). В группе старых крыс, в которой воспроизводился феномен ДИПостК, также отмечались меньшие размеры зоны некроза по сравнению с группой контроля - $24 \pm 2\%$ ($p < 0,01$). Таким образом, представленные данные свидетельствуют о выраженном противоишемическом эффекте феноменов ДИПК и ДИПостК у старых крыс. У молодых крыс противоишемический эффект феноменов ДИПК и ДИПостК также воспроизводится [1].

Выводы

1. Феномены дистантного ишемического пре- и посткондиционирования эффективны в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка старых крыс.

2. У старых крыс антиаритмический эффект феномена дистантного ишемического прекодиционирования не воспроизводится.

Литература

1. Basalay, M., Barsukevich V., Mastitskaya S., Mrochek A. et al. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms // *Experimental Physiology*. 2012. Vol.97(8). p.908-917.
2. Ferdinandy, P., Schulz R., Baxter G. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning and postconditioning // *Pharmacol. Rev.* 2007. Vol.59. p.418-458.
3. Hausenloy, D.J., Yellon D.M. Preconditioning and postconditioning: new strategies for cardioprotection // *Diabetes Obes. Metab.* 2008. Vol.10(6). p.451-459.
4. Lauzier, B., Delemasure S., Debin R. et al. Beneficial effects of myocardial postconditioning are associated with reduced oxidative stress in a senescent mouse model // *Transplantation*. 2008. Vol.85(12). p.1802-1808.
5. Magill, P., Murphy T., Bouchier-Hayes D.J., Mulhall K.J. Preconditioning and its clinical potential // *Ir. J. Med. Sci.* 2009. Vol.178(2). p.129-134.
6. Przyklenk, K., Maynard M., Darling C.E. et al. Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with postconditioning // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008. Vol.51(14). p.1393-1398.
7. Parratt, J.R., Vegh A., Zeitlin I.J. et al. Bradykinin and endothelial-cardiac myocyte interactions in ischemic preconditioning // *Am. J. Cardiol.* 1997. Vol.80(3). p.124-131.
8. Parratt, J.R., Vegh A., Papp J.G. Bradykinin as an endogenous myocardial protective substance with particular reference to ischemic preconditioning - a brief review of the evidence // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1995. Vol.73(7). p.837-842.
9. Parratt, J.R., Vegh A. Coronary vascular endothelium-myocyte interactions in protection of the heart by ischaemic preconditioning // *J. Physiol. Pharmacol.* 1999. Vol.50(4). p.509-524.
10. Przyklenk, K., Maynard M., Darling C.E. et al. Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with postconditioning // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008. Vol.51(14). p.1393-1398.
11. Sivaraman, V., Hausenloy D.J., Kolvekar S. et al. The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009. Vol.46(5). p.758-764.
12. Tang, X.L., Sato H., Tiwari S. et al. Cardioprotection by postconditioning in conscious rats is limited to coronary occlusions <45 min // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. Vol.291(5). p.H2308-H2317.

Поступила 5.09.2013 г.