

Ф. Юшкевич, Ф.И. Висмонт

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 преко́ндиционирования у старых крыс не воспроизводится.

**Ключевые слова:** противоишемический эффект, антиаритмический эффект, дистантное ишемическое преко́ндиционирование, 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 преко́ндиционирование (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]. Вопросы, 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 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 *n. 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 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 белесой. 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 ± 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 (Me) 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 их 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. противоаритмический 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 п. 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 преко́ндиционирования не воспроизводится.

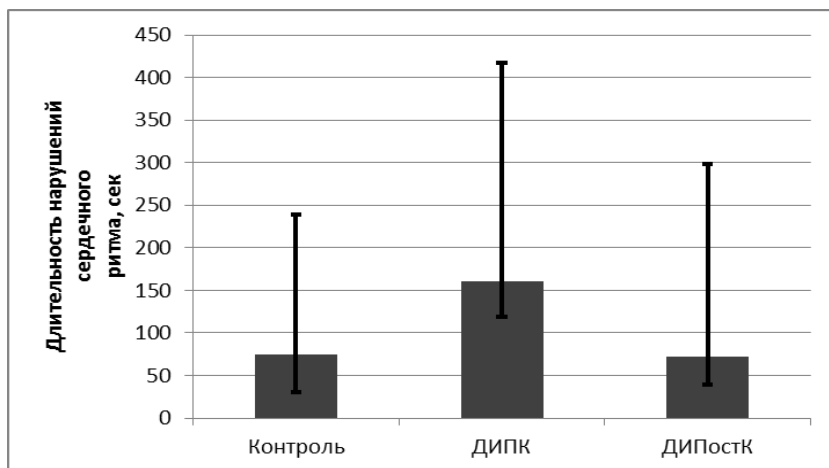


Рис. 1 Длительность нарушений сердечного ритма (в сек) во время 30-минутной коронарной окклюзии в контрольной группе и группах крыс, в которых воспроизводились феномены ДИПК и ДИПостК

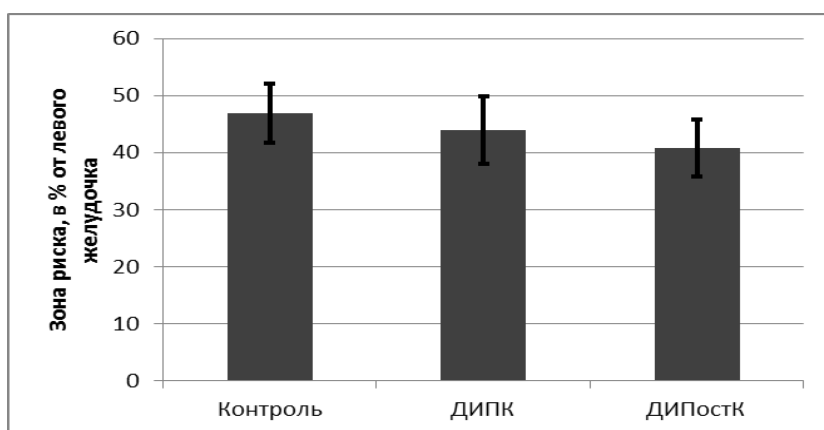


Рис. 2 Размеры зоны риска (в % от левого желудочка) в контрольной группе и группах крыс, в которых воспроизводились феномены ДИПК и ДИПостК

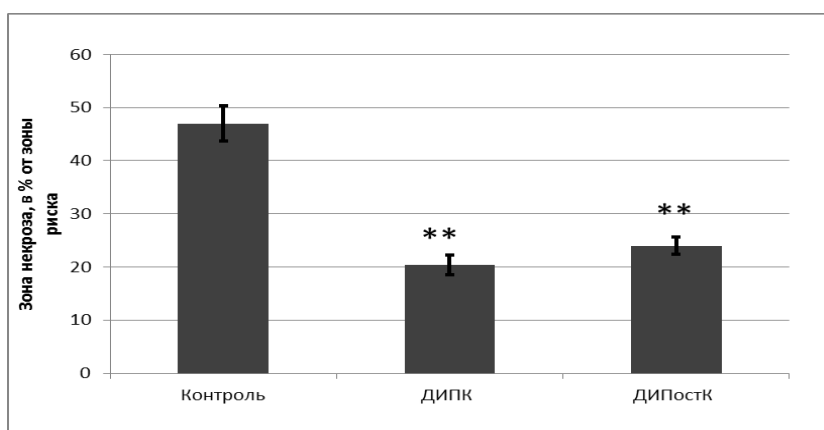


Рис. 3 Размеры зоны некроза (в % от зоны риска) в контрольной группе и группах крыс, в которых воспроизводились феномены ДИПК и ДИПостК

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

## 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.