

УДК 616.127-001-085

П. Ф. ЮШКЕВИЧ¹, Ф. И. ВИСМОНТ¹, А. Г. МРОЧЕК²

ПРОТОВОИШЕМИЧЕСКИЙ И АНТИАРИТМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ ДИСТАНТНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕ- И ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ У КРЫС С ТОКСИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск,

²Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Беларусь

(Поступила в редакцию 12.02.2014)

Введение. На сегодняшний день заболевания сердечно-сосудистой системы занимают лидирующее положение среди причин инвалидности и смертности населения экономически развитых стран мира, в том числе и Республики Беларусь. В структуре данной группы заболеваний одна из ведущих позиций принадлежит ишемической болезни сердца (ИБС). Учитывая медицинскую и социальную значимость проблемы, поиск новых, эффективных методов кардиопротекции при острых нарушениях коронарного кровотока является актуальной задачей современной экспериментальной и клинической медицины. В частности, результаты экспериментальных исследований 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 прекондиционирование – ДИПК), но и осуществляемой через определенное время (10 мин) после начала реперфузии миокарда (дистантное ишемическое посткондиционирование – ДИПостК) [1–4, 13].

В клинической практике необходимость защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения возникает в основном у пациентов пожилого возраста, имеющих различную сопутствующую патологию, в том числе и печени. Учитывая значимость функционального состояния печени в процессах жизнедеятельности и многообразие механизмов реализации кардиопротекторных эффектов (противоишемического и антиаритмического) ДИПК и ДИПостК [5–8, 12], были основания полагать, что сопутствующая патология печени влияет на способность ДИПК и ДИПостК оказывать противоишемическое и антиаритмическое действие. В то же время в современной литературе сведения о воспроизводимости противоишемического и антиаритмического эффектов ДИПК и ДИПостК у экспериментальных животных с различными вариантами токсического поражения печени (ТПП) отсутствуют.

Цель исследования – выявление воспроизводимости противоишемического и антиаритмического эффектов дистантного ишемического пре- и посткондиционирования миокарда у крыс с токсическим поражением печени.

Материалы и методы исследования. Исследование эффективности ДИПК и ДИПостК выполнено на 32 наркотизированных крысах-самцах линии Wistar с ТПП. Масса крыс составляла 200–250 г, возраст – 3–4 мес. ТПП вызывали путем однократного интрагастрального введения животным 50 %-ного раствора тетрахлорметана (ТХМ), приготовленного на оливковом масле, в дозе 1 мл/кг в течение 5 сут. Группа контроля включала 21 крысу с аналогичными характеристиками, которым в течение 5 сут интрагастрально вводили оливковое масло в дозе 1 мл/кг (крысы без ТПП). Для подтверждения наличия ТПП крысам выполняли биохимическое исследование сыворотки крови с помощью биохимического анализатора Olympus (7 животным – с ТПП, 8 – без ТПП). Определяли активность в сыворотке крови аспаратаминотрансферазы (АСАТ), аланин-

аминотрансферазы (АЛАТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТ), а также содержание в ней мочевины, креатинина, общего холестерина (ОХ), триглицеридов (ТГ), общего билирубина, глюкозы, общего белка и альбуминов. Моделирование острого инфаркта миокарда на крысах с ТПП выполнялось через 48 ч после последнего введения ТХМ. Для наркотизации животных использовали этаминал натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно с последующей внутривенной инфузией поддерживающей дозы 10 мг/кг/ч. Крыс переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом при помощи аппарата искусственной вентиляции легких с частотой дыхания 56–60 вдохов в минуту. Наличие проходимости дыхательных путей контролировали по уровню давления в трахее, нормальным значением которого на вдохе считалось 10–15 мм рт. ст. В ходе экспериментов непрерывно регистрировали ЭКГ во II стандартном отведении и системное артериальное давление (АД) с помощью компьютерной программы Spike 4. Для определения АД крысам канюлировали правую общую сонную артерию. Температуру тела в прямой кишке измеряли с помощью электротермометра Harvard (Великобритания) и поддерживали ее на уровне 37 °С, используя электрогрелку.

Грудную клетку наркотизированного животного вскрывали в четвертом межреберном промежутке слева. Крысам контрольной группы (с ТПП) после 15-минутной стабилизации гемодинамики выполняли 30-минутную окклюзию передней нисходящей коронарной артерии (ПНКА) путем механического ее пережатия при помощи фишки (контроль – $n = 11$). Окклюзия артерии подтверждалась цианозом ишемизированной области, снижением АД (на 10–20 мм рт. ст.) и подъемом сегмента ST на ЭКГ. Реперфузия миокарда достигалась путем удаления фишки и подтверждалась исчезновением цианоза и возвращением сегмента ST к изолинии. Длительность реперфузии составляла 120 мин. Экспериментальных животных с ТПП (ДИПК – $n = 11$, ДИПостК – $n = 10$) дополнительно подвергали воздействию 15-минутной окклюзии обеих бедренных артерий соответственно за 10 мин до и через 10 мин после 30-минутной острой ишемии миокарда. Через 48 ч после последнего введения оливкового масла аналогичные протоколы экспериментов выполняли на крысах без ТПП (контроль – $n = 7$, ДИПК – $n = 7$, ДИПостК – $n = 7$).

Зону риска определяли с помощью внутривенного введения в левую общую яремную вену 0,5 мл 5 %-ного раствора синьки Эванса в конце реперфузии при кратковременной повторной окклюзии ПНКА. Зона риска определялась как не окрашенная в синий цвет. Затем сердце извлекали и отделяли правый желудочек. После замораживания в морозильной камере (–20 °С в течение 30 мин) левый желудочек разрезали на 6 поперечных срезов, которые сначала взвешивали на торсионных весах, а затем сканировали при помощи сканера с обеих сторон. После этого для идентификации зоны некроза срезы помещали в 1 %-ный раствор трифенилтетразолия хлорида на 15 мин при температуре 37 °С. Жизнеспособный миокард (клетки, сохранившие дегидрогеназную активность) окрашивался в кирпично-красный цвет, а некротизированная ткань была белой. После 24-часовой инкубации срезов в 10 %-ном 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 заносили в электронную таблицу Excel 7.0 и обрабатывали с помощью стандартного пакета статистических программ Statistica 8. Статистическую значимость различий данных оценивали при помощи ANOVA и теста множественных сравнений Данна. Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Значения считали достоверными при $p < 0,05$.

Для оценки антиаритмического эффекта ДИПК и ДИПостК подсчитывали общую длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной острой коронарной окклюзии (фибрилляции желудочков (ФЖ), пароксизмальной желудочковой тахикардии (ПЖТ), парной желудочковой экстрасистолы, желудочковой экстрасистолы по типу бигеминии), а также оценивали наличие реперфузионных нарушений сердечного ритма. На основе полученных данных рассчитывали медиану (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 ЧСС до начала эксперимента менее 300 уд/мин и среднее АД ниже 60 мм рт. ст.

Результаты и их обсуждение. Выживаемость крыс с ТПП после острой коронарной окклюзии составила 65,6 % (11 крыс из 32 погибли во время острой ишемии миокарда). Причем выживаемость животных в контрольной группе и в группе ДИПК составила по 63,6 %, в группе ДИПостК – 70,0 %. Таким образом, из каждой экспериментальной группы крыс с ТПП для последующего анализа данных было отобрано по 7 животных.

Результаты биохимического исследования сыворотки крови крыс с ТПП и крыс без ТПП представлены в таблице. Из данных, представленных в таблице, видно, что у крыс с ТПП по сравнению с животными без ТПП в сыворотке крови отмечается статистически значимое повышение активности АСАТ, АЛАТ и ГГТ, а также содержания в ней мочевины, ОХ, ТГ, общего билирубина, глюкозы, общего белка и альбуминов. Активность ЛДГ и содержание креатинина в сыворотке крови у крыс с ТПП и крыс без ТПП статистически значимо не отличались. Таким образом, результаты биохимического исследования сыворотки крови указывают на наличие ТПП у крыс, которым в течение 5 сут интрагастрально вводили ТХМ. Стоит отметить, что указанные биохимические изменения сыворотки крови в клинической практике могут отмечаться у пациентов с гепатитами различной этиологии (вирусными, алкогольными, токсическими, лекарственными и др.).

Изменение биохимических показателей сыворотки крови у крыс с токсическим поражением печени

Показатель	Крысы с ТПП	Крысы без ТПП
Аспаргатаминотрансфераза, Е/л	371,5 ± 48,7**	116,2 ± 8,3
Аланинаминотрансфераза, Е/л	189,9 ± 33,6**	36,3 ± 3,1
Лактатдегидрогеназа, Е/л	1434,7 ± 541,8	874,0 ± 119,0
Мочевина, ммоль/л	6,4 ± 0,4**	4,1 ± 0,6
Креатинин, мкмоль/л	47,3 ± 2,7	42,8 ± 1,9
Общий холестерин, ммоль/л	2,6 ± 0,2**	1,6 ± 0,1
Триглицериды, ммоль/л	1,8 ± 0,6*	0,5 ± 0,1
Общий билирубин, мкмоль/л	5,1 ± 0,8**	1,3 ± 0,2
Глюкоза, ммоль/л	10,3 ± 1,9*	5,8 ± 0,6
Общий белок, г/л	76,3 ± 2,6**	54,2 ± 3,9
Альбумины, г/л	32,9 ± 1,0**	22,4 ± 1,6
Гаммаглутамилтрансептидаза, Е/л	0,9 ± 0,2**	0,0 ± 0,0

Примечание. Статистически значимое увеличение анализируемых показателей у крыс с токсическим поражением печени по сравнению с аналогичными показателями: * – у крыс без ТПП ($p < 0,05$); ** – у крыс без ТПП ($p < 0,01$).

Выраженность нарушений ритма сердца во время 30-минутной окклюзии ПНКА (медиана и интерквартильный размах) у крыс с ТПП и животных без ТПП представлена на рис. 1. Статистически значимых отличий между группами крыс с ТПП по показателю общей длительности нарушений сердечного ритма во время острой коронарной окклюзии не выявлено ($p > 0,05$). В контрольной группе крыс с ТПП во время острой ишемии миокарда наблюдались нарушения ритма общей длительностью от 67 до 199 с. При этом у 4 из 7 крыс была выявлена ФЖ, у 5 из 7 – ПЖТ. Реперфузионные нарушения сердечного ритма отмечались у 5 крыс контрольной группы. В группе крыс с ТПП, которым воспроизводилось ДИПК, длительность ишемических нарушений ритма сердца составила от 31 до 322 с. ФЖ имела место у 4 из 7 животных данной группы, а ПЖТ – у 3. Реперфузионные нарушения сердечного ритма отмечались у 5 крыс группы ДИПК. В группе ДИПостК во время острой ишемии миокарда имели место нарушения ритма сердца продолжительностью от 34 до 303 с. У 4 из 7 животных была выявлена ФЖ, у 4 – ПЖТ. Реперфузионные нарушения сердечного ритма имели место у 3 крыс группы ДИПостК. Длительность аритмий в контрольной группе составила 110 (93; 188) с, в группе ДИПК – 165 (57; 197), в группе ДИПостК – 131 (48; 255) с (рис. 1).

Таким образом, установлено, что во всех анализируемых группах крыс с ТПП показатели длительности аритмий во время острой коронарной окклюзии сопоставимы. Отсутствие различий по данному показателю между контрольной группой и группой ДИПостК вполне очевидно, учитывая тот факт, что ДИПостК не может оказывать влияние на нарушения сердечного ритма во время острой

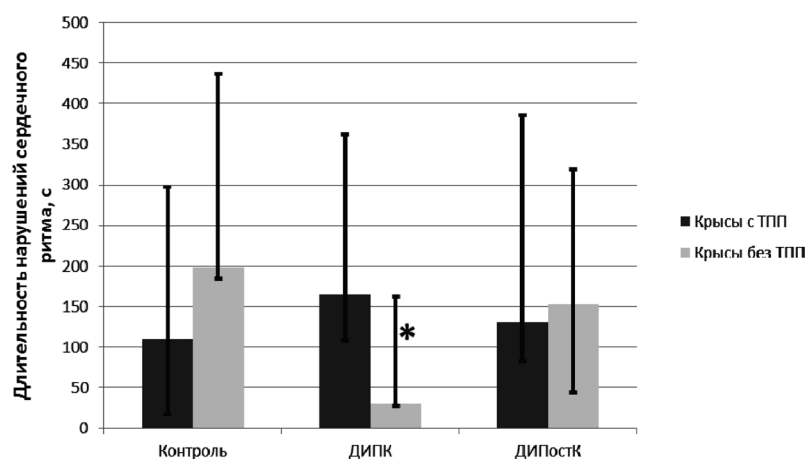


Рис. 1. Длительность нарушений сердечного ритма (в секундах) во время 30-минутной коронарной окклюзии у животных контрольной группы и у крыс, которым воспроизводились ДИПК и ДИПостК (крысы с токсическим поражением печени и крысы без токсического поражения печени соответственно). * – статистически значимые отличия длительности нарушений сердечного ритма у крыс без токсического поражения печени в группе ДИПК по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)

ишемии миокарда. В то же время отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$) длительности ишемических нарушений сердечного ритма между животными контрольной группы и крысами с ДИПК указывает на то, что антиаритмический эффект ДИПК у крыс с ТПП не воспроизводится.

При воспроизведении ДИПК и ДИПостК у крыс без ТПП длительность аритмий во время острой коронарной ишемии в контрольной группе составила 198 (14; 239) с, в группе ДИПК – 30 (3; 133), в группе ДИПостК – 153 (109; 166) с. Следовательно, у крыс без ТПП показатели длительности аритмий во время острой коронарной ишемии в контрольной группе и в группе ДИПостК сопоставимы и превышают таковые в соответствующих группах животных с ТПП ($p < 0,05$ в контрольной группе). Общая продолжительность ишемических нарушений ритма сердца в группе ДИПК у крыс без ТПП значительно меньше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$), т. е. у крыс без ТПП антиаритмический эффект ДИПК воспроизводится.

Таким образом, антиаритмический эффект ДИПК у крыс с ТПП не воспроизводится, в то время как у крыс без ТПП, напротив, имеет место выраженный антиаритмический эффект ДИПК.

Статистически значимых различий между группами крыс с ТПП и крыс без ТПП по показателю размеров зоны риска в миокарде левого желудочка не выявлено ($p > 0,05$). Таким образом, размеры зоны риска у животных всех групп были сопоставимы (рис. 2).

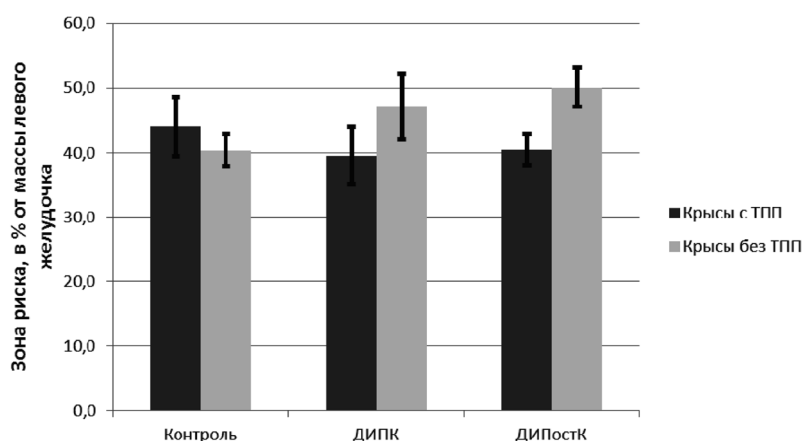


Рис. 2. Размеры зоны риска (в % от массы левого желудочка) у животных контрольной группы и у крыс, которым воспроизводились ДИПК и ДИПостК (крысы с токсическим поражением печени и крысы без токсического поражения печени соответственно)

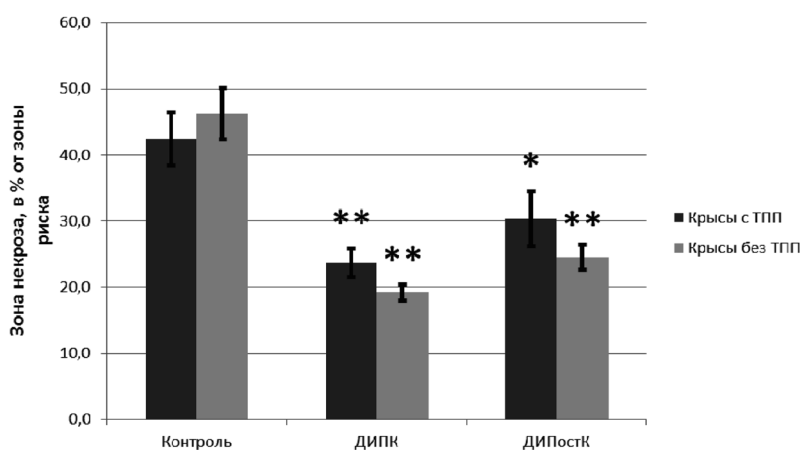


Рис. 3. Размеры зоны некроза (в % от зоны риска) у животных контрольной группы и у крыс, которым воспроизводились ДИПК и ДИПостК (крысы с токсическим поражением печени и крысы без токсического поражения печени соответственно). Статистически значимые отличия: * – в группе ДИПостК по сравнению с контрольной группой животных с токсическим поражением печени ($p < 0,05$); ** – в группах ДИПК и ДИПостК по сравнению с контрольной группой крыс без токсического поражения печени, а также в группе ДИПК по сравнению с контрольной группой крыс с токсическим поражением печени ($p < 0,01$)

На рис. 3 представлены размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка как у крыс с ТПП, так и у крыс без ТПП. Средняя зона некроза в контрольной группе крыс с ТПП составила 42 ± 4 % (у крыс без ТПП – 44 ± 5 %). У крыс с ТПП, которым воспроизводилось ДИПК, формировался менее обширный некроз по сравнению с группой контроля – 24 ± 2 %, $p < 0,01$ (у крыс без ТПП – 19 ± 2 %). У крыс с ТПП, которым воспроизводилось ДИПостК, также отмечались меньшие размеры зоны некроза по сравнению с группой контроля – 30 ± 4 %, $p < 0,05$ (у крыс без ТПП – 20 ± 3 %).

Таким образом, данные исследования свидетельствуют о наличии противоишемического эффекта ДИПК и ДИПостК как у крыс с ТПП, так и у животных без ТПП.

Принимая во внимание имеющиеся в литературе сведения о том, что в механизме повреждающего действия ТХМ определяющее значение имеет активация процессов перекисного окисления липидов [9], можно полагать, что у крыс с ТПП, вызванным интрагастральным введением ТХМ, имеет место накопление в органах и тканях продуктов β -окисления жирных кислот, а также активных форм кислорода (АФК). Учитывая, что действие ТХМ в организме приводит к снижению содержания в тканях глутатиона и активности антиоксидантных ферментов [9–11], есть основания полагать, что образовавшиеся в результате действия ТХМ АФК, оказывая повреждающее действие на миокард, осугубляют тем самым ишемическое и реперфузионное повреждение миокарда.

Заключение. Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что дистантное ишемическое пре- и посткондиционирование эффективны в плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка крыс с токсическим поражением печени. Антиаритмический эффект дистантного ишемического preconditionирования у крыс с токсическим поражением печени не воспроизводится.

Литература

1. Basalay M., Barsukevich V., Mastitskaya S. et al. // *Exp. Physiol.* 2012. Vol. 97, N 8. P. 908–917.
2. Magill P., Murphy T., Bouchier-Hayes D. J., Mulhall K. J. // *Ir. J. Med. Sci.* 2009. Vol. 178, N 2. P. 129–134.
3. Ludman A. J., Yellon D. M., Hausenloy D. J. // *Dis. Model Mech.* 2010. Vol. 3. P. 35–38.
4. Hausenloy D. J., Yellon D. M. // *Diabetes Obes. Metab.* 2008. Vol. 10, N 6. P. 451–459.
5. Шляхто Е. В., Нуфонт Е. М., Галагудза М. М. // *Креативная кардиология.* 2007. № 1–2. С. 75–101.
6. Cokkinos D. V., Pantos C. // *Heart Fail. Rev.* 2007. Vol. 12. P. 345–362.
7. Ferdinandy P., Schulz R., Baxter G. // *Pharmacol. Rev.* 2007. Vol. 59. P. 418–458.
8. Rezkalla S. H., Kloner R. A. // *Heart Fail. Rev.* 2007. Vol. 12. P. 201–206.

9. Fujii T., Fuchs B. C., Yamada S. et al. // BMC Gastroenterol. 2010. Vol. 10. P. 79–93.
10. Kaplowitz N. // Clin. Infect. Dis. 2004. Vol. 38, N 2. P. 44–48.
11. Bataller R., Brenner D. A. // J. Clin. Invest. 2005. Vol. 115. P. 209–218.
12. Heusch G., Schulz R. // Cardiovasc. Res. 2009. Vol. 84, N 1. P. 11–14.
13. Przyklenk K., Maynard M., Darling C. E. et al. // J. Am. Coll. Cardiol. 2008. Vol. 51, N 14. P. 1393–1398.

P. F. JUSHKEVICH, F. I. VISMONT, A. G. MROCHEK

**ANTIISCHEMIC AND ANTIARRHYTHMIC EFFECTS OF REMOTE ISCHEMIC PRE-
AND POSTCONDITIONING IN RATS WITH THE TOXIC LIVER INJURY**

Summary

The aim of this study was to determine the antiischemic and antiarrhythmic effects of the remote ischemic pre- and postconditioning in rats with the toxic liver injury. It was found that the remote ischemic pre- and postconditioning equally protected the myocardium against the irreversible ischemia-reperfusion injury. However, unlike intact rats, the remote ischemic preconditioning did not protect the myocardium against arrhythmias in rats with the toxic liver injury.