

КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЙ, ИНОТРОПНЫЙ И ХРОНОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТЫ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА МОДЕЛИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫСЫ

А.С. Горбунов, Л.Н. Маслов, Т.В. Ласукова, Ю.Б. Лишманов

НИИ кардиологии СО РАМН, Томск

E-mail: maslov@cardio.tsu.ru

CARDIOPROTECTIVE, INOTROPIC AND CHRONOTROPIC EFFECTS OF ISCHEMIC POSTCONDITIONING ON THE MODEL OF ISOLATED RAT HEART

A.S. Gorbunov, L.N. Maslov, T.V. Lasukova, Yu.B. Lishmanov

Institute of Cardiology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk

В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крысы оценивали эффект глобальной ишемии (45 мин) и реперфузии (30 мин) на давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ), частоту сердечных сокращений (ЧСС), конечное диастолическое давление (КДД). Повреждения клеток оценивали по выбросу в перфузионный раствор креатинфосфокиназы. Были использованы следующие модели посткондиционирования: 1) три цикла реперфузии (10 с) и ишемии (10 с, РИ), общая продолжительность цикла 20 с; 2) шесть циклов реперфузии (10 с) и ишемии (10 с), общая продолжительность цикла 20 с; 3) три цикла реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), общая продолжительность цикла 40 с; 4) шесть циклов реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), общая продолжительность цикла 40 с; 5) три цикла реперфузии (30 с) и ишемии (30 с), общая продолжительность цикла 60 с. Обнаружено, что только посткондиционирование с общей продолжительностью цикла 40 с или 60 с предупреждает появление реперфузионных повреждений кардиомиоцитов. Использование нескольких циклов РИ продолжительностью по 20 с не влияет на ДРЛЖ, но вызывает снижение КДД на протяжении всего реперфузионного периода. Посткондиционирование с помощью трех циклов РИ по 40 с способствует восстановлению ДРЛЖ в реперфузионном периоде, не влияет на КДД и замедляет восстановление ЧСС. Шесть циклов РИ по 40 с не влияют на ДРЛЖ и КДД, но препятствуют восстановлению ЧСС в реперфузионном периоде. Посткондиционирование с помощью трех циклов РИ по 60 с способствует увеличению ДРЛЖ, уменьшает контрактуру, но эти эффекты были транзиторными и сопровождаются замедлением восстановления ЧСС.

Ключевые слова: сердце, ишемия, реперфузия, посткондиционирование.

In the experiments on the isolated perfused rat heart an effect of global ischemia (45 min) and reperfusion (30 min) on the left ventricular developed pressure (LVDP), heart rate (HR) and diastolic pressure (EDP) were estimated. Cell damage was estimated by creatine kinase release to perfusion solution. The following models of postconditioning were used: (1) three cycles of 10 s reperfusion and 10 s ischemia (RI), total cycle duration was 20 s; (2) six cycles of 10 s reperfusion and 10 s ischemia, total cycle duration was 20 s; (3) three cycles of 20 s reperfusion and 20 s ischemia, total cycle duration was 40 s; (4) six cycles of 20 s reperfusion and 20 s ischemia, total cycle duration was 40 s; (5) three cycles of 30 s reperfusion and 30 s ischemia, total cycle duration was 60 s. It was found that only postconditioning with total cycle duration 40 s or 60 s prevents an appearance of reperfusion injury of cardiomyocytes. The use of some cycles of RI with duration of 20 s has no effect on LVDP, but induces a decrease in EDP during the whole reperfusion period. Postconditioning by three cycles of RI of 40 s promoted a recovery of LVDP in reperfusion but did not affect EDP and delayed the recovery of HR. Six cycles of RI of 40 s has no effect on LVDP and EDP, but counteracts a recovery of HR in reperfusion period. Postconditioning by three cycles of RI of 60 s promotes an elevation in LVDP, decreases contracture but these effects are transient and are accompanied by the delay of recovery of HR.

Key words: heart, ischemia, reperfusion, postconditioning.

Введение

Ишемическим посткондиционированием (ИП) принято называть повышение устойчивости органов и тканей к повреждающему действию постишемической реоксигенации, достигаемое с помощью нескольких сеансов кратковременной ишемии на фоне реперфузии. Феномен ИП был открыт в 2003 г. группой физиологов из Атланты (США) во главе с проф. J. Vinten-Johansen [5] в опытах *in vivo* на собаках. Позднее было установлено, что ИП можно воспроизвести и в экспериментах на изолированном перфузируемом сердце [1, 3, 4]. Одни исследо-

ватели в экспериментах на изолированном перфузируемом сердце использовали троекратно чередующиеся сеансы реперфузии (30 с) и ишемии (30 с) [5]. Другие авторы применяли три цикла реперфузии и ишемии по 10 с+10 с каждый [1]. Нередко используют 6 таких циклов [4]. Вместе с тем, некоторым исследователям в экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крыс не удалось воспроизвести феномен посткондиционирования ни по одному из использованных протоколов [1]. Таким образом, общепринятой модели ИП на сегодня не существует.

Цель исследования: сопоставить несколько моделей ишемического посткондиционирования и оценить их кардиопротекторный, инотропный и хронотропный эффекты *in vitro*.

Материал и методы

Эксперименты проведены на изолированных сердцах крыс-самцов линии Вистар массой 250–300 г, наркотизированных этиловым эфиром. После извлечения сердца из грудной клетки его быстро переносили в ванночку с охлажденным до +4 °С раствором Кребса–Хензелята до прекращения спонтанных сокращений. Затем в восходящую дугу аорты вводили канюлю, через которую выполняли ретроградную перфузию сердца раствором Кребса–Хензелята по методу Лангендорфа. Для приготовления оксигенированного перфузионного раствора (37 °С, pH 7,4), содержащего (в мм): NaCl – 120; KCl – 4,8; CaCl₂ – 2,0; MgSO₄ – 1,2; KH₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 20,0; глюкоза – 10,0, применяли реактивы компании MP Biomedicals (Ирвин, США).

В контрольной серии по окончании 20-минутной адаптации сердца к условиям нормоксической перфузии его подвергали 45-минутной тотальной ишемии и 30-минутной реперфузии. Степень некротического повреждения кардиомиоцитов оценивали по уровню креатинфосфокиназы (КФК) в перфузате, оттекающем от сердца за весь период реперфузии. Активность последней определяли с помощью энзиматических наборов CK-NAC компании Biocon Diagnostik (Vohl/Marienhagen, Германия) и пересчитывали на 1 г ткани сердца. Для регистрации параметров сократимости сердца в полость левого желудочка вводили катетер с латексным баллончиком, заполненным дистиллированной водой, объем которой был достаточным для создания конечного диастолического давления на уровне 10–15 мм рт. ст. Показатели насосной функции сердца измеряли в изоволюмическом режиме с помощью датчика давления SS13L (Biopac System, Inc., Goleta, Калифорния, США), сопряженного с указанным баллончиком. Запись изменения давления в левом желудочке осуществляли с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System, Inc., Goleta, США). Количественную обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System, Inc. (Goleta, США). В ходе опыта регистрировали частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ, мм рт. ст.). Последнее вычисляли как разницу между систолическим и диастолическим давлением. В динамике эксперимента измеряли также конечное диастолическое давление (КДД, мм рт. ст.).

Использовали следующие протоколы посткондиционирования:

- 1) три сеанса реперфузии (10 с) и ишемии (10 с), цикл – 20 с;
- 2) шесть циклов реперфузии (10 с) и ишемии (10 с), цикл – 20 с;
- 3) три сеанса реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), цикл – 40 с;

- 4) шесть циклов реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), цикл – 40 с;
- 5) три сеанса реперфузии (30 с) и ишемии (30 с), цикл – 60 с.

Для того, чтобы исключить возможность влияния на результаты экспериментов сезонных колебаний толерантности сердца к ишемии реперфузии ежедневно проводили контрольный эксперимент (ишемия реперфузия) и опыт по посткондиционированию.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием общепринятых методов. Вычисляли среднее значение параметра в экспериментальной группе и ошибку среднего. Поскольку выборки не имели нормального распределения, для проверки гипотезы их однородности, либо неоднородности использовали критерий Манна–Уитни. За критический уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты

Как показано на рисунке 1, три сеанса реперфузии (10 с) и ишемии (10 с) не оказывали по сравнению с контролем (ишемия и реперфузия без посткондиционирования) достоверного влияния на уровень КФК в перфузате, оттекающем от сердца.

Не удалось добиться повышения толерантности сердца к патогенному действию реперфузии и с помощью шести циклов реперфузии и ишемии (РИ) продолжительностью по 20 с. Посткондиционирование с помощью трех циклов РИ по 40 с вызывало снижение уровня КФК в перфузате на 19% по сравнению с контролем. При использовании шести сеансов РИ продолжительностью по 40 с удалось добиться снижения уровня КФК на 29% по отношению к группе контроля. Максимальный кардиопротекторный эффект посткондиционирования был зафиксирован при использовании трех циклов реперфузии и ишемии по 60 с. В этом случае уровень КФК в перфузате был на 32% ниже, чем в контроле.

Как показано на рисунке 2, в группе контроля через 5 мин после 45-минутной ишемии ДРЛЖ составляет 13% от исходного значения.

В случае использования трех циклов РИ динамика изменения ДРЛЖ была практически идентичной. В группе контроля ЧСС через 5 мин от момента начала реперфузии была на 52% ниже исходного значения (рис. 3).

Если сердце было прекоординировано, снижение ЧСС также составляло 52%. На 5-й мин реперфузии в контрольной группе КДД было выше исходной величины в 5,5 раза (рис. 4). В группе посткондиционирования КДД увеличивалось только в 4,5 раза. Эти различия между группами по КДД были статистически не достоверны. Следовательно, ИП с помощью трех циклов РИ по 20 с препятствует формированию реперфузионной контрактуры, но не оказывает достоверного эффекта на ЧСС, ДРЛЖ.

В следующей серии экспериментов было показано, что в контроле на пятой минуте реперфузии ДРЛЖ составляет 12% от исходной величины (рис. 2). В случае, если сердце было посткондиционировано с помощью 6 циклов РИ по 20 с, ДРЛЖ снижалось на 85%. В контроле через 5 мин реперфузии ЧСС снижалось в 2,2 раза отно-

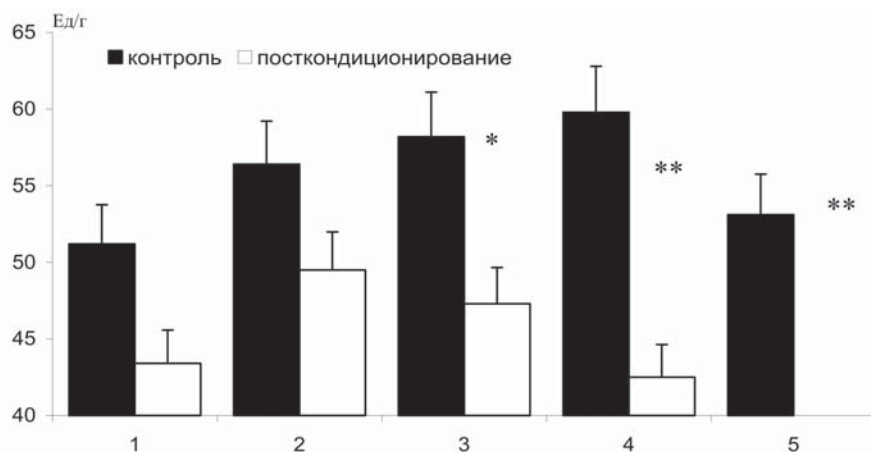


Рис. 1. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после ишемического посткондиционирования ($M \pm SEM$): 1) три сеанса реперфузии (10 с) и ишемии (10 с), цикл – 20 с; 2) шесть циклов реперфузии (10 с) и ишемии (10 с), цикл – 20 с; 3) три сеанса реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), цикл – 40 с; 4) шесть циклов реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), цикл – 40 с; 5) три сеанса реперфузии (30 с) и ишемии (30 с), цикл – 60 с. Статистическая значимость различий относительно аналогичных значений в контроле: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

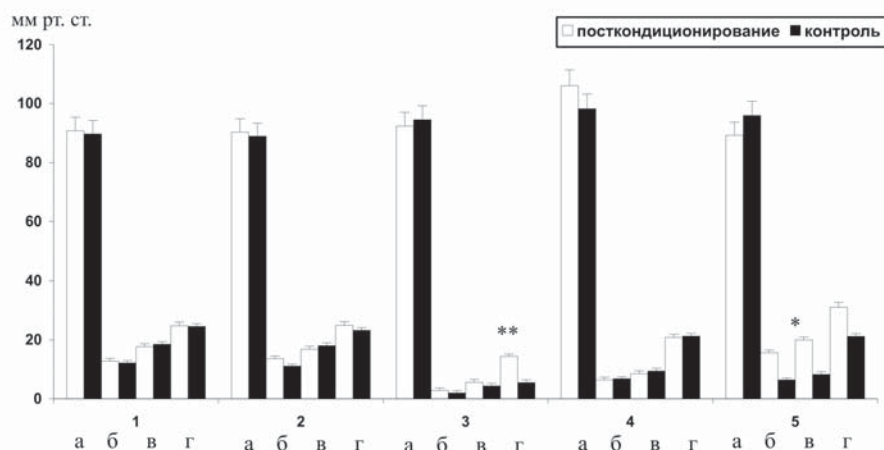


Рис. 2. Давление, развиваемое левым желудочком после ишемического посткондиционирования ($M \pm SEM$): 1) три сеанса реперфузии (10 с) и ишемии (10 с), цикл – 20 с; 2) шесть циклов реперфузии (10 с) и ишемии (10 с), цикл – 20 с; 3) три сеанса реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), цикл – 40 с; 4) шесть циклов реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), цикл – 40 с; 5) три сеанса реперфузии (30 с) и ишемии (30 с), цикл – 60 с; а – 20 мин адаптации; б – 5 мин реперфузии; в – 15 мин реперфузии; г – 30 мин реперфузии. Статистически значимые различия относительно контроля: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

сительно исходной величины, в группе посткондиционирования этот показатель уменьшался в 2 раза (рис. 3). В контрольной группе КДД увеличивалось в 5,5 раза. Для сердец, подвергшихся ИП, этот показатель повышался в 4,2 раза (рис. 4). Различия между группами по КДД были статистически достоверны. Полученные данные свидетельствуют, что прекондиционирование с помощью 6 циклов РИ по 20 с уменьшает КДД, но не влияет на реперфузионное снижение силы и частоты сокращений сердца.

Как показано на рисунке 2, в группе контроля через 5 мин после начала реперфузии ДЛРЖ составляет 2% от ис-

ходного значения. Такой же показатель был характерен для сердец, подвергшихся посткондиционированию с помощью трех циклов по 40 с. Однако через 30 мин реперфузии в контроле ДЛРЖ было равно 5,8% от исходной величины, а в группе посткондиционирования – 15,5%. Эти различия между группами были статистически достоверны. Через 5 мин реперфузии как в контроле, так и в группе посткондиционирования отмечалась выраженная брадикардия. Через 30 мин в группе контроля отмечалась частичная нормализация сердечного ритма, а в группе посткондиционирования сохранялась выраженная брадикардия (рис. 3). После ишемииреперфузии в обеих группах было зафиксировано практически идентичное увеличение КДД (рис. 4). Следовательно, ИП с помощью трех циклов РИ по 40 с увеличивает силу сокращений сердца, но не оказывает достоверного эффекта на КДД. К сожалению, посткондиционирование усугубляло реперфузионную брадикардию.

Как показано на рисунках 2 и 4, посткондиционирование с помощью 6 сеансов реперфузии и ишемии по 40 с не оказывало достоверного эффекта на реперфузионные значения ДЛРЖ и КДД, но усугубляло реперфузионную брадикардию (рис. 3). Следовательно, ИП с помощью 6 циклов РИ по 40 с не оказывает положительного эффекта на насосную функцию изолированного сердца.

В случае использования трех циклов РИ по 60 с на 15-й мин реперфузии отмечалось увеличение в 2,4 раза ДЛРЖ по сравнению с контролем (рис. 2). При использовании этого протокола посткондиционирования было зафиксировано снижение КДД на 15-й мин реперфузии (рис. 4). К сожалению, посткондиционирование замедляло восстановление ЧСС. Если на 5-й мин реперфузии разницы между контролем и посткондиционированием по ЧСС нам выявить не удалось, то на 15 и 30-й мин реперфузии в группе контроля отмечалось увеличение ЧСС, а в группе посткондиционирования ЧСС сохранялось практически на прежнем уровне. Следовательно, посткондиционирование с использованием трех циклов РИ по 60 с оказывает транзиторный положитель-

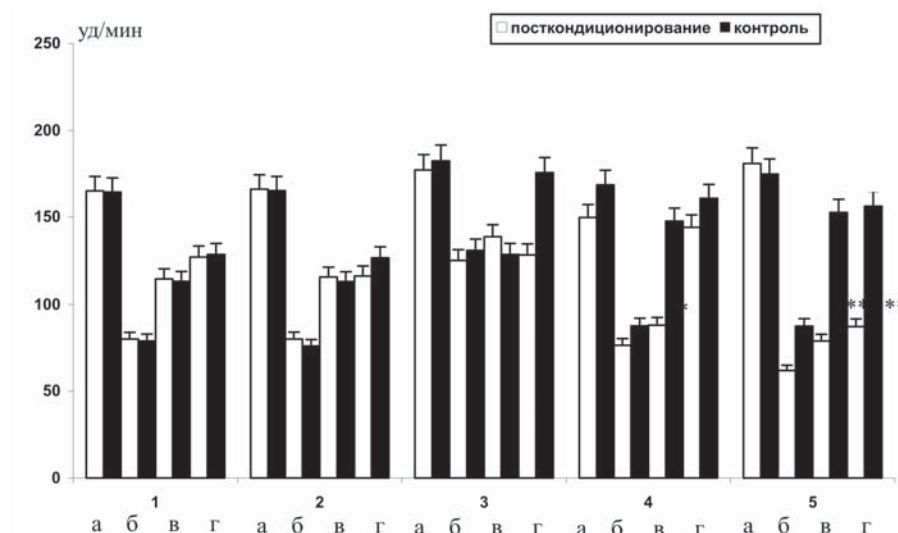


Рис. 3. Частота сердечных сокращений после ишемического посткондиционирования ($M \pm SEM$): 1) три сеанса реперфузии (10 с) и ишемии (10 с), цикл – 20 с; 2) шесть циклов реперфузии (10 с) и ишемии (10 с), цикл – 20 с; 3) три сеанса реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), цикл – 40 с; 4) шесть циклов реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), цикл – 40 с; 5) три сеанса реперфузии (30 с) и ишемии (30 с), цикл – 60 с; а – 20 мин адаптации; б – 5 мин реперфузии; в – 15 мин реперфузии; г – 30 мин реперфузии. Статистически значимые различия относительно контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

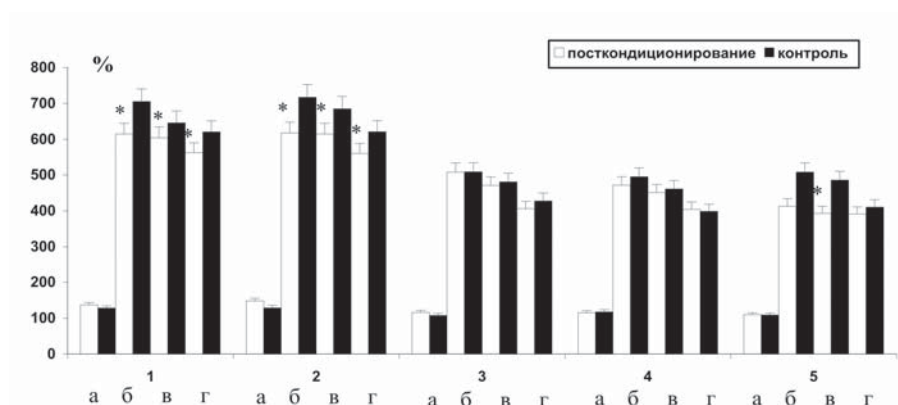


Рис. 4. Конечное диастолическое давление после ишемического посткондиционирования ($M \pm SEM$): 1) три сеанса реперфузии (10 с) и ишемии (10 с), цикл – 20 с; 2) шесть циклов реперфузии (10 с) и ишемии (10 с), цикл – 20 с; 3) три сеанса реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), цикл – 40 с; 4) шесть циклов реперфузии (20 с) и ишемии (20 с), цикл – 40 с; 5) три сеанса реперфузии (30 с) и ишемии (30 с), цикл – 60 с; а – 20 мин адаптации; б – 5 мин реперфузии; в – 15 мин реперфузии; г – 30 мин реперфузии. Статистически значимые различия показателей относительно контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

ный инотропный эффект, но замедляет восстановление нормального сердечного ритма.

Обсуждение

Таким образом, согласно нашим данным, повышения толерантности сердца к реперфузионным повреждениям удастся добиться только с помощью нескольких циклов реперфузии и ишемии продолжительностью по 40–60 с. Можно предположить, что существует пороговая по продолжительности РИ, которая индуцирует сигнальный механизм посткондиционирования. Указанный порог

представляет цикл реперфузии и ишемии продолжительностью менее 40 с, но более 20 с. Максимальный антиинекторический эффект ИП достигается при использовании трех сеансов реперфузии (30 с) и ишемии (30 с), цикл – 60 с.

Эффект посткондиционирования на насосную функцию сердца и сердечный ритм во многом зависит от выбранного протокола посткондиционирования. Использование нескольких циклов РИ продолжительностью по 20 с не влияет на давление, развиваемое левым желудочком, но вызывает снижение величины реперфузионной контрактуры на протяжении всего реперфузионного периода. Посткондиционирование с помощью трех циклов РИ по 40 с способствует восстановлению ДРЛЖ в реперфузионном периоде, не влияет на КДД и замедляет восстановление нормального сердечного ритма. Шесть циклов РИ по 40 с не влияют на ДРЛЖ и КДД, но препятствуют восстановлению ЧСС в реперфузионном периоде. Посткондиционирование с помощью трех циклов РИ по 60 с способствует увеличению силы сокращений сердца, уменьшает контрактуру, но эти эффекты носят транзиторный характер и сопровождаются замедлением восстановления нормального сердечного ритма.

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (контракт 02.740.11.0714).

Литература

1. Goodman M.D., Koch S.E., Fuller-Bicer G.A. et al. Regulating RISK: a role for JAK-STAT signaling in postconditioning? // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2008. – Vol. 295(4). – P. H1649–H1656.
2. Kaljusto M.L., Mori T., Mohammad Husain Rizvi S. et al. Postconditioning in rats and mice // Scand. Cardiovasc. J. – 2006. – Vol. 40(6). – P. 334–341.
3. Schreckenber R., Maier T., Schluter K.D. Post-conditioning restores pre-ischaemic receptor coupling in rat isolated hearts // Br. J. Pharmacol. – 2009. – Vol. 156(6). – P. 901–908.
4. van Vuuren D., Genis A., Genade S. et al. Postconditioning the

- isolated working rat heart // Cardiovasc. Drugs Ther. – 2008. – Vol. 22(5). – P. 391–397.
5. Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E. et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – Vol. 285(2). – P. H579–H588.
- Поступила 13.09.2010*