

КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ЗОНИПОРИДА НА МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО И РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА У КРЫС

Н. А. Гурова, А. А. Спасов, А. С. Тимофеева, А. А. Желтова, В. Ю. Федорчук¹

В экспериментах на крысах на модели ишемии/реперфузии миокарда показано, что ингибитор Na^+/H^+ -обменника зонипорид статистически достоверно в 1,4 раза уменьшает размеры зоны некроза миокарда, в 2,1 раза снижает уровень тропонина I в плазме и в 2 раза — тяжесть постреперфузионных нарушений ритма.

Ключевые слова: ингибиторы Na^+/H^+ -обменника; ишемия/реперфузия миокарда; тропонин I; зонипорид

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших подходов к лечению сердечно-сосудистых заболеваний наряду с базовой терапией является защита кардиомиоцитов от необратимых повреждений, предупреждение ремоделирования миокарда, направленное на восстановление энергетических процессов и электролитного баланса [2 – 4]. Поэтому в настоящее время в фармакологии активно изучаются эффекты как ишемического [1], так и фармакологического прекодиционирования² миокарда [3, 10]. Одним из таких подходов является использование ингибиторов Na^+/H^+ -обменника (NHE-1) [9, 10]. В экспериментальных и клинических исследованиях соединений этой группы показано, что они улучшают восстановление сократительной функции левого желудочка: повышают скорость нарастания левожелудочкового давления, восстанавливают сердечный выброс, сохраняют в клетках АТФ, снижают вероятность возникновения и тяжесть желудочковых аритмий, ограничивают размеры некроза [3, 7]. В настоящее время наиболее активным для селективного ингибирования NHE-1 является производное бензоилгуанидина — зонипорид [11, 12].

Целью исследования явилось комплексное изучение кардиопротекторных свойств зонипорида по влиянию на выраженность нарушений ритма, размеры зоны некроза и маркеры ишемического повреждения миокарда у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполняли на 22 крысах-самках, массой 260 – 300 г, которых содержали в условиях вивария ВолгГМУ с естественным световым режимом на стандартной диете лабораторных животных в соответствии с ГОСТ Р 50258 – 92 [1993].

¹ Кафедра фармакологии (зав. – акад. РАМН А. А. Спасов) ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, 400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

² Феномен, когда предварительное воздействие потенциально вредным стимулом напряжения может увеличить клеточную переносимость к последующим стимулам.

Исследование проводили в соответствии с применимыми требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025 – 2009, ГОСТ Р ИСО 5725 – 2002 и “Правил лабораторной практики”, утвержденных приказом Минздрава РФ от 23 августа 2010 № 708н, с соблюдением “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” [8]. Все эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями Этического комитета Волгоградского государственного медицинского университета (протокол № 126 – 2011 от 02 февраля 2011 года).

Животные были разделены на 3 группы: 1 — “ложнооперированные”; 2 — “контроль-ишемия/реперфузия” — животным с перевязкой левой коронарной артерии вводили физиологический раствор за 10 мин до реперфузии; 3 — “ишемия/реперфузия + зонипорид” — животным с перевязкой левой коронарной артерии внутривенно вводили зонипорид (1 мг/кг) за 10 мин до реперфузии.

Эксперименты выполняли по стандартной методике в условиях наркоза (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутривенно), искусственной вентиляции легких, торакотомии, перикардотомии. Ишемию миокарда моделировали путем перевязки общего ствола левой коронарной артерии (ЛКА) в течение 60 мин с последующей 60-минутной реперфузией. Зонипорид (“Sigma”, США) вводили за 10 мин до реперфузии. Визуализацию границ зон риска и зон некроза проводили методом двойного окрашивания синим Эвансом (СЭ) (“Sigma”, США) и 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТТС) (“Sigma”, США) [5]. Поперечные срезы левого желудочка готовили с помощью матрицы Alto, США. Базальные поверхности фотографировали цифровым фотоаппаратом Sony Cyber-shot 7.2 mega pixels (Япония), расчет площадей осуществляли на компьютере с помощью программы Image J. Общий объем зон риска и инфаркта для каждого сердца рассчитывали способом, описанным ранее [5]. Данные по размерам зон риска и инфаркта представляли в виде отношения объема зоны риска к общему объему сердца, а также в виде отношения объема зоны некроза к объему зоны риска (в процентах).

Регистрацию ЭКГ производили на компьютерном электрокардиографе Поли-Спектр 8/В (“Нейрософт”, Россия) во II стандартном отведении. Тяжесть аритмий оценивали с помощью балльной системы, где 0 баллов — нет нарушений ритма; 1 балл — единичные экстрасистолы, синусовые тахи- и брадикардии; 2 балла — множественные экстрасистолы, блокады; 3 балла — пароксизмальная тахикардия, электромеханическая диссоциация; 4 балла — фибрилляция, асистолия [6].

Содержание тропонина I в плазме крыс в качестве маркера повреждения миокарда определяли иммунохимически с помощью набора реактивов для иммуноферментного анализа Rat cardiac troponin I (cTn-I) фирмы “Cusabio Biotech Co.”, LTD. (Китай) на универсальном микропланшетном ридере ELX 800 (Bio-Tek Instruments, Inc, США). Содержание тропонина I выражали в пкг/мл плазмы.

Все статистические расчеты проводили с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0, фирмы StatSoft, Inc. (США). Проводили попарное сравнение выборок с использованием U-критерия Манна — Уитни. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексную оценку кардиопротекторного действия зонипорида проводили с учетом показателей наиболее приближенных к клиническим условиям, в первую очередь размеров анатомической зоны повреждения, тяжести возникающих нарушений ритма, повышения уровня специфического маркера повреждения миокарда тропонина I в крови.

У всех животных при проведении перевязки левой коронарной артерии развивалось ишемическое повреждение миокарда. На ЭКГ во II стандартном отведении наблюдали признаки ишемии (подъемы сегмента ST, снижение амплитуды зубца R), регистрировали нарушения ритма от единичных и множественных экстрасистол, до блокад проведения и единичных случаев пароксизмальной тахикардии. При балльной оценке аритмий, возникших в ишемический период, нарушения ритма составили в среднем 2 балла во всех экспериментальных группах (табл. 1).

Реперфузионные нарушения ритма, возникшие у контрольных животных, характеризовались утяжелением состояния как на раннем (через 5 мин), так и на позднем (через 60 мин) этапах. Тяжесть нарушений ритма составила 2,75 балла (табл. 1).

В конце периода реперфузии после внутривенного введения СЭ у животных с ишемией/реперфузией наблюдали визуализацию зоны риска. У животных контрольной группы она составила в среднем 53,2 % площади левого желудочка (табл. 2). При последующем окрашивании поперечных срезов ТТС была определена зона некроза, которая составила 44,36 % от зоны риска.

В крови животных группы “контроль-ишемия/реперфузия” был показан высокий уровень тропонина I (528,32 пкг/мл), в 4 раза превосходящий данный показатель у ложнооперированных крыс (табл. 2).

При анализе ЭКГ у животных, которым за 10 мин до реперфузии вводили зонипорид, было отмечено статистически не значимое утяжеление постреперфузионных нарушений ритма на ранних этапах (через 5 мин). Однако эти изменения были менее выраженными: тяжесть нарушений ритма составила в среднем 2,33 балла по сравнению с контрольной — 2,75. К концу 60-минутного периода реперфузии в группе “ишемия/реперфузия+зонипорид” данный показатель снизился в 2 раза до 1,33 баллов по сравнению с контролем (табл. 1).

Зона ишемии у животных, которым вводился зонипорид, при окрашивании СЭ составила 47,25 % площади левого желудочка и существенно не отличалась от контрольных животных, что указывает на стандартный уровень перевязки ЛКА и равные начальные условия ишемии в обеих группах. При последующем окрашивании срезов сердец ТТС в этой группе наблюдали уменьшение зоны инфаркта по сравнению со 2 группой в 1,4 раза (табл. 2).

В группе “ишемия/реперфузия + зонипорид” наблюдался в 2,1 раза более низкий уровень маркера повреждения миокарда тропонина I в плазме по отношению к группе “контроль-ишемия/реперфузия” ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таким образом, на основании проведенных исследований было показано, что зонипорид оказывает кардиопротекторное действие в модели ишемии/реперфу-

Таблица 1. Оценка тяжести аритмий, вызванных ишемическими и реперфузионными повреждениями миокарда у крыс (баллы, $M \pm m$)

Временной период	Контроль– ишемия/реперфузия	Ишемия/реперфузия + зонипорид
До перевязки левой коронарной артерии	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Ишемия 30 мин	2,0 ± 0,7	2,0 ± 1,0
Ишемия 60 мин	2,25 ± 0,48	2,0 ± 0,6
Реперфузия 5 мин	2,75 ± 0,25	2,33 ± 0,37
Реперфузия 60 мин	2,79 ± 0,26	1,33 ± 0,32*

* — значение статистически значимо по отношению к группе “контроль — ишемия/реперфузия”, $p < 0,05$.

Таблица 2. Основные показатели кардиопротекторного действия зонипорида на модели ишемии/реперфузии миокарда у крыс ($M \pm m$)

Группа	n	Размеры зоны		Уровень тропонина I (пкг/мл)
		риска (% левого желудочка)	некроза (% к зоне риска)	
Ложнооперированные	6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	136,65 ± 38,03
Контроль-ишемия/реперфузия	7	53,20 ± 4,99 [#]	44,36 ± 3,79 [#]	528,32 ± 81,32 [#]
Ишемия/реперфузия + зонипорид	9	47,25 ± 3,82 [#]	31,18 ± 2,98 ^{*#}	252,76 ± 72,05 ^{*#}

[#] — значение статистически значимо по отношению к группе “ложнооперированные”, $p < 0,05$;

^{*} — значение статистически значимо по отношению к группе “контроль — ишемия/реперфузия”, $p < 0,05$.

зии миокарда у крыс. Препарат снижает тяжесть постреперфузионных нарушений ритма, уменьшают зону некроза, при этом содержание тропонина I уменьшается.

Известно [3, 9, 10], что одним из повреждающих факторов в период ишемии и реперфузии является активация сарколемного NHE-1 кардиомиоцитов. При этом обменник начинает выводить из саркоплазмы клетки ионы H^+ , накапливающиеся там из-за активизации процесса гликолиза, в обмен на вход ионов Na^+ . Возросший уровень внутриклеточного Na^+ активирует $3Na^+/Ca^{2+}$ -реверсионный обмен (NCE-обменник) через сарколемму, инициируя вход ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты. Во время реперфузии рост уровня кальция продолжается за счет большого градиента вне/внутриклеточных протонов. “ Ca^{2+} -перегрузка” приводит к ухудшению функции проводящей системы и сократительного миокарда, активации апоптоза. Полученные данные свидетельствуют о том, что ингибиторы NHE-1, предотвращая избыточное поступление кальция внутрь кардиомиоцитов, способны ограничивать ишемические и постреперфузионные повреждения.

ВЫВОД

В исследованиях *in vivo* на модели ишемии/реперфузии показано кардиопротекторное действие селективного ингибитора NHE-1 зонипорида при внутривенном введении за 10 мин до реперфузии в дозе

1 мг/кг. Препарат в 1,4 раза уменьшал размеры зоны некроза миокарда, в 2,1 раза снижал уровень тропонина I в плазме крови, в 2 раза снижал тяжесть постреперфузионных нарушений ритма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. Н. Петрищев, Е. В. Шляхто, В. А. Цырлин и др., *Вестн. РАМН*, № 8, 10 – 15 (2006).
2. В. И. Петров, В. В. Иванченко, Н. А. Давыдова и др., *Сердечная недостаточность*, 4(8), 175 – 177 (2007).
3. А. А. Спасов, Н. А. Гурова, М. В. Харитонова, *Экспер. и клин. фармакол.*, 76(1), 43 – 48 (2013).
4. А. А. Спасов, М. В. Харитонова, И. Н. Иежица и др., *Кардиология*, № 10, 39 – 44 (2012).
5. А. В. Сыренский, М. М. Галагудза, Е. И. Егорова и др., *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, 10(94), 1171 – 1180 (2008).
6. И. Б. Цорин, Г. Г. Чичканов, *Экспер. и клин. фармакол.*, 4(67), 16 – 18 (2004).
7. I. M. Ayoub, J. D. Kolarova, R. L. Kantola, et al., *Crit. Care Med.*, 35(10), 2329 – 2336 (2007).
8. Directive 2010 / 63 / EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010. Official Journal L 276, 20.10.2010 p. 33 – 79. (revising Directive 86 / 609 / EEC).
9. L. Fliegel, *Expert. Opin. Ther. Targets.*, 13(1), 55 – 68 (2009).
10. I. Andreadou, E. K. Iliodromitis, M. Koufaki, et al., *Curr. Med. Chem.*, 30(15), 3204 – 3213 (2008).
11. K. S. Oh, H. W. Seo, K. Y. Yi, et al., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 21(3), 255 – 263 (2007).
12. W. R. Tracey, M. C. Allen, D. E. Frazier, et al., *Cardiovascular Drug Rev.*, 21(1), 17 – 32 (2003).

Поступила 11.03.13

CARDIOPROTECTIVE PROPERTIES OF ZONIPORIDE STUDIED ON EXPERIMENTAL ISCHEMIA AND REPERFUSION MODELS IN RAT MYOCARDIUM

N. A. Gurova, A. A. Spasov, A. S. Timofeeva, A. A. Zheltova, and V. Yu. Fedorchuk

Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131, Russia

Using the experimental model of rat heart ischemia/reperfusion, it is established that zoniporide (inhibitor of Na^+/H^+ exchanger) produces a significant (1.4-fold) decrease in the area of myocardial necrosis, 2.1-fold decrease in the serum troponin I level, and 2-fold decrease in the severity of post-reperfusion arrhythmias.

Keywords: Na^+/H^+ exchanger inhibitor; ischemia/reperfusion; troponin I; zoniporide