

© Коллектив авторов, 2012
УДК 613.863.07:575.112.612.017.2

Л.М. Белкина¹, Е.А. Смирнова¹, М.В. Шимкович¹, О.Л. Терехина¹,
А.В. Горячева¹, Д.А. Чепурнова¹, Г.Ф. Дауни², Р.Т. Маллет², Е.Б. Манухина^{1,2}

Кардиопротекторный эффект адаптации к периодической нормобарической гипоксии у крыс

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, Москва

² Медицинский факультет Университета Северного Техаса, Форт-Уэрт, США

Защитное действие адаптации к периодической нормобарической гипоксии (АПНГ) при ишемических повреждениях сердечно-сосудистой системы изучено недостаточно. В данной работе изучали на крысах влияние предварительной АПНГ на размеры ишемического некроза и интенсивность аритмий, вызванных *in situ* перевязкой левой коронарной артерии на 30 мин с последующей 60-минутной реперфузией. АПНГ заключалось в вдыхании гипоксической газовой смесью (9,5–10% O₂) в течение 5–10 мин с 4-минутными интервалами нормоксии (по 5–8 циклов ежедневно) в течение 21 дня. После завершения реперфузии сердца перфузировали 2%-ным раствором красителя синего Эванса, чтобы отличить зону риска инфаркта от нормальной ткани. Затем разрезали на поперечные срезы и инкубировали в 1%-ном растворе трифенилтетразолия хлорида, что позволяло отличить зону инфаркта от зоны риска. АПНГ уменьшала частоту и длительность ишемических, но не реперфузионных аритмий, а также уменьшала на 42% размеры ишемических некрозов.

Ключевые слова: адаптация, нормобарическая гипоксия, инфаркт миокарда, сердечные аритмии

L.M. Belkina¹, E.A. Smirnova¹, M.V. Shimkovich¹, O.L. Terechina¹,
A.V. Goryacheva¹, D.A. Chepurnova¹, H.F. Downey², R.T. Mallet², E.B. Manukhina^{1,2}

Cardioprotective effect of the adaptation to periodic normobaric hypoxia in rats

¹ Institute of general pathology and pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

² University of North Texas, Health Science Center, 3500 Camp Bowie Blvd., Fort Worth, TX, 76107, USA

Intermittent hypoxic conditioning (IHC) may provide novel, non-invasive cardioprotection against ischemia-reperfusion (IR) damage. In the current study, rats were subjected to normobaric IHC (5–8 cycles/d for 20 days, FIO₂ 9.5–10% for 5–10 min/cycle, with intervening 4 min normoxia), a regimen that may have clinical applications. Control rats were sham-conditioned with 21% O₂. Ischemia was produced *in situ* by ligation of the left coronary artery for 30 min, followed by 60-min reperfusion, while arrhythmias were monitored. Hearts were excised, perfused with Evans blue dye (area at risk, AR) and then stained with triphenyltetrazolium chloride (infarct size, IS). AR and IS were planimetrically measured, and IS was expressed as %AR. IHC reduced the frequency and duration of ischemic, but not reperfusion arrhythmias, and the adaptation also reduced by 42% the sizes of ischemic necroses. Thus, IHC possesses the antiarrhythmic and cytoprotective action.

Key words: adaptation, normobaric hypoxia, myocardial infarction, heart arrhythmias

Сердечно-сосудистые реакции на длительную периодическую гипоксию неоднозначны и зависят от режима гипоксических воздействий. Так, известно, что тяжелая периодическая гипоксия, характерная для апноэ во сне, способствует развитию гипертензии и повышает риск ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда [22]. Однако умеренная периодическая гипоксия обладает кардио- и вазопротекторным действием [11, 17]. В эксперименте и в клинике показано, что адаптация организма к периодической гипобарической гипоксии, создаваемая в барокамере, об-

ладает антиаритмическим эффектом [4, 19], снижает артериальное давление при гипертензии [2, 23], используется при реабилитации пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование [1], и предупреждает дисфункцию эндотелия у животных с экспериментальной гипертензией [1, 3].

В то же время экспериментальных данных о защитных эффектах периодической нормобарической гипоксии на сердечно-сосудистую систему и механизмах ее действия значительно меньше, хотя в настоящее время этот вид гипоксии более широко, чем гипобарическая гипоксия, используется в клинике для лечения артериальной гипертензии и других сердечно-сосудистых заболеваний [23], а также при трени-

Для корреспонденции: Людмила Михайловна Белкина, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. патофизиологии кровообращения ФГБУ НИИОПП РАМН. E-mail: belkinal@yandex.ru

ровках спортсменов [8]. На собаках были получены первые данные, свидетельствующие о том, что периодическая нормобарическая гипоксия может ограничивать развитие ишемических и реперфузионных повреждений миокарда [25].

Цель исследования состояла в изучении возможности ограничения зоны ишемического поражения и аритмий в условиях острой ишемии и реперфузии (ИР) миокарда у крыс путем предварительной адаптации к нормобарической периодической гипоксии.

Методика

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 250—280 г. Использовано 4 группы животных:

- 1) контроль (n=18);
- 2) адаптация к гипоксии (n=16);
- 3) ИР (n=16);
- 4) адаптация к гипоксии + ИР (n=16).

Адаптацию к периодической нормобарической гипоксии (АПНГ) проводили в гипоксической камере цикламы. Каждый цикл состоял в дыхании гипоксической газовой смесью (9,5—10% O₂) в течение 5—10 мин, чередуя с дыханием атмосферным воздухом в течение 4 мин. Каждый сеанс адаптации состоял из 5—8 циклов ежедневно. Полный курс адаптации длился 21 день. Контрольные животные находились в тех же условиях, при которых проводилась адаптация к гипоксии, в течение 21 дня, но вместо гипоксической газовой смеси дышали атмосферным воздухом.

На следующий день после завершения курса адаптации к гипоксии у адаптированных и контрольных крыс проводили торакотомию под уретановым наркозом (150 мг/кг) и искусственном дыхании атмосферным воздухом (ВИТА-I, СССР). После 30-минутного периода стабилизации вызывали локальную ишемию миокарда путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на 30 мин с последующей реперфузией в течение 60 мин. Во время ИР проводили непрерывную регистрацию ЭКГ в I отведении на установке полиграф RM-6000 (Nihon Kohden, Япония). Критерием ишемии служили цианоз передней стенки левого желудочка и подъем сегмента ST в первом отведении на ЭКГ, а реперфузии — развитие гиперемической реакции эпикарда.

Сразу после окончания периода реперфузии сердце извлекали, отмывали от крови, перфузировали через аорту 2%-ным раствором красителя синего Эванса, что позволяет отличить в левом желудочке зону риска инфаркта от окружающей нормальной ткани, которая приобретает синюю окраску. После этого сердце замораживали при -20°C в течение 20 мин и разрезали на 5—6 поперечных срезов толщиной 2 мм. Срезы инкубировали в 1%-ном растворе трифенилтетразолия хлорида в фосфатном буфере (рН=7,4) в течение 20 мин при температуре 37°C. Это позволяет отличить зону инфаркта (зону ишемии), которая остается светлой, от зоны риска, которая приобретает красную окраску. Срезы фиксировали в 10%-ном растворе формальдегида и фотографировали. Зону инфаркта и зону риска измеряли с помощью компьютерной планиметрии и рассчитывали величину зоны инфаркта в процентах от зоны риска. Данные представлены как среднее ± SEM. Для статистической обработки результатов использовали критерий Вилкоксона—Манна—Уитни (критерий U) и критерий χ^2 .

Результаты и обсуждение

Адаптация к гипоксии сама по себе не вызывала достоверных изменений относительной массы правого желудочка (таблица), т.е. при данном режиме периодической гипоксии правожелудочковая гипертрофия отсутствовала. Частота сердечных сокращений между группами также достоверно не различалась (358±10 уд./мин в контроле, 352±15 уд./мин после адаптации, $p>0,05$).

На рис. 1 приводится суммарная длительность разных видов аритмии во время ишемии миокарда. Видно, что длительность ишемической экстрасистолии, желудочковой тахикардии и желудочковой фибрилляции у крыс, предварительно адаптированных к гипоксии, была достоверно меньше, чем у неадаптированных животных. Однако адаптация к гипоксии не влияла на длительность реперфузионных аритмий.

Аналогичная закономерность наблюдалась при сопоставлении частоты случаев аритмий: у адаптированных к гипоксии аритмии всех видов во время ишемии наблюдались реже, чем у неадаптированных крыс (рис. 2). Однако в отношении реперфузионных аритмий защитный эффект адаптации также отсутствовал.

Таблица

Влияние адаптации к гипоксии на относительную массу правого желудочка у крыс (МПЖ = масса правого желудочка, г; МЛЖ = масса левого желудочка, г; МТ = масса тела)

	МТ, г	МПЖ / (МПЖ + МЛЖ)	МПЖ / МТ
Контроль	314±31	0,23±0,03	0,00061±0,00008
Адаптация к гипоксии	342±16	0,22±0,03	0,00064±0,00008

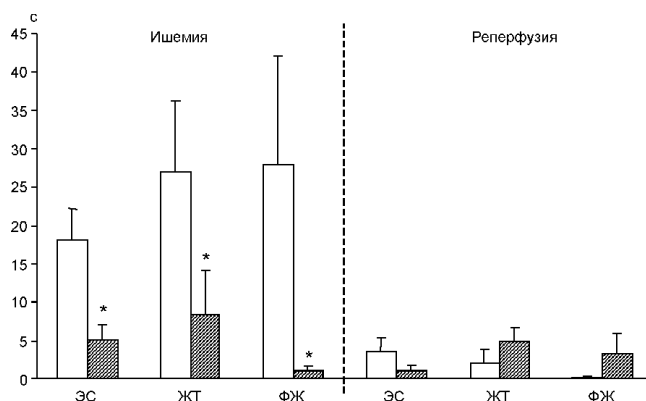


Рис. 1. Влияние адаптации к периодической нормобарической гипоксии на длительность аритмий во время ишемии и реперфузии миокарда крысы.

По вертикали — длительность аритмий в секундах. Белые столбики — контроль, заштрихованные — адаптация к гипоксии. Здесь и на рис. 2 и 3: ЭС — экстрасистолия; ЖТ — желудочковая тахикардия; ФЖ — фибрилляция желудочков.
* — $p < 0,05$ — статистически значимые различия между адаптацией и контролем (по критерию χ^2)

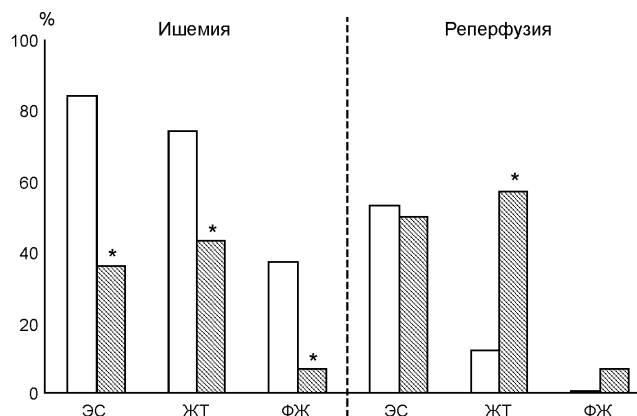


Рис. 2. Влияние адаптации к периодической нормобарической гипоксии на частоту развития аритмий во время ишемии и реперфузии миокарда крысы.

По вертикали — количество животных с аритмиями в процентах от общего числа животных, взятого за 100%. Остальные обозначения как на рис. 1.
* — $p < 0,05$ — статистически значимые различия между адаптацией и контролем (по критерию χ^2).

Сравнение величины зоны инфаркта и зоны риска после 1 ч реперфузии (рис. 3) показало, что у неадаптированных крыс величина зоны инфаркта составляла от величины зоны риска $30,6 \pm 4,6\%$, а у адаптированных к гипоксии животных $17,7 \pm 3,5\%$, т.е. почти вдвое больше ($p < 0,05$). В то же время абсолютная величина зоны риска у адаптированных и неадаптированных крыс достоверно не различалась и составляла соответственно $26,8 \pm 1,4$ и $30,1 \pm 1,6\%$ от площади среза левого желудочка сердца.

Главный результат настоящего исследования состоит в том, что предварительная адаптация к нормобарической гипоксии оказывает достоверное кардиопротекторное действие при ИР повреждении сердца, которое проявляется в уменьшении интенсивности ишемических аритмий и ограничении размера инфаркта миокарда.

Многочисленные данные свидетельствуют о выраженном антиаритмическом и цитопротекторном эффекте гипоксического или ишемического прекондиционирования [10, 14]. Возможные механизмы, лежащие в его основе, широко изучаются и включают индукцию фактора HIF-1 α [7], активацию синтеза оксида азота [5], β -адренергических механизмов [15]. Некоторые механизмы гипоксического или ишемического прекондиционирования могут быть общими с механизмами адаптации к гипоксии. Это подтверждается отсутствием аддитивного кардиопротекторного эффекта при применении комбинации адаптации и прекондиционирования [21]. Важно отметить, что защитный эффект гипоксического прекондиционирования сохраняется только 3—4 дня [13, 16], тогда как кардиопротекторный эффект, обусловленный адаптацией

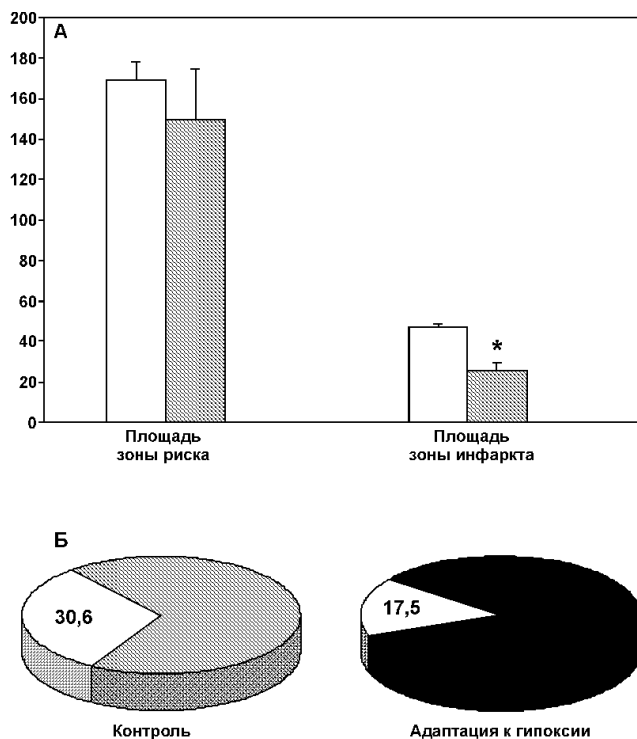


Рис. 3. Влияние адаптации к гипоксии на площадь зоны инфаркта миокарда и зоны риска:

А — абсолютная величина зоны риска и зоны инфаркта в планиметрических единицах (по вертикали);
Б — соотношение площади зоны риска и зоны инфаркта. Светлые сегменты — зона инфаркта, темные сегменты — зона риска.
* — $p < 0,05$ — статистически значимые различия между адаптацией и контролем (по критерию U).

к периодической гипоксии, наблюдается более 35 дней [20]. Это указывает на наличие существенных различий в механизмах ишемического preconditionирования и адаптации к гипоксии, возможно, связанных с адаптивной активацией синтеза протекторных белков при долговременной адаптации [19]. Поэтому изучение защитных возможностей и механизмов долговременной адаптации к периодической нормобарической гипоксии представляет большой интерес.

Адаптация к периодической гипоксии успешно используется в эксперименте и клинике для предупреждения и лечения многих заболеваний, включая бронхиальную астму, аллергический нейродермит, гипертензию, сахарный диабет, паркинсонизм, эмоциональные расстройства, дислипидемию, параноидную форму шизофрении, радиационные повреждения, ряд профессиональных заболеваний, а также для повышения эффективности тренировки спортсменов [8, 19, 23]. Механизмы, лежащие в основе защитных, в частности, кардиопротекторных эффектов адаптации к нормобарической гипоксии недостаточно хорошо изучены. В то же время известно, что адаптация к гипобарической гипоксии индуцирует экспрессию протекторных белков и фактора HIF-1 α , стимулирует антиоксидантную защиту организма, стабилизирует клеточные мембраны, модулирует синтез оксида азота, активирует АТФ-чувствительные калиевые каналы, предупреждает открытие митохондриальных пор МРТР (mitochondrial permeability transition pore) при реперфузии, перегрузку клеток кальцием и улучшает транспорт кислорода в тканях. Кроме того, адаптация к гипоксии вызывает ряд благоприятных изменений в митохондриях, вовлекающих НАД-зависимый метаболизм, которые направлены на повышение эффективности утилизации кислорода при продукции АТФ [11, 17, 19, 24].

Важную роль в кардиопротекторном эффекте периодической гипоксии, по-видимому, играет фактор чередования периодов гипоксии и нормоксии. Было показано [6], что защитным эффектом при ИР повреждении обладает только preconditionирование умеренной (10% O₂) периодической гипоксией, в то время как непрерывная гипоксия или более тяжелая (5% O₂) периодическая гипоксия, напротив, увеличивают размер инфаркта миокарда [9]. Существует предположение, что в формирование кардиопротекции вносит вклад периодическая активация свободно-радикальных процессов, развивающихся в периоды возвращения от гипоксии к нормоксии, т.е. реоксигенации, поскольку антиоксиданты отменяют защитный эффект адаптации к гипоксии [12, 15]. Однако это предположение нуждается в дополнительных доказательствах.

В клинических исследованиях адаптация к нормобарической гипоксии оказывала антиаритмическое и антиангинальное действие у пациентов с ишемической болезнью сердца, которое превышало эффективность лекарственной терапии. Преимущество адаптации к гипоксии состояло в том, что при ее использовании не происходило угнетения сократительной функции миокарда и нарушения сердечной проводимости. В то же время адаптация к гипоксии обеспечивала более стабильный и продолжительный эффект, чем антиаритмические и антиангинальные препараты [18].

Экспериментальные данные, полученные в настоящем исследовании, подтверждают возможность клинического использования метода адаптации к периодической нормобарической гипоксии и показывают, что адаптация к гипоксии способна оказывать не только антиаритмический, но также и цитопротекторный эффект на сердце, подвергшееся действию ишемии и реперфузии.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №10-04-00980)

Список литературы

1. **Амирян В.Ю.** Особенности адаптации к условиям гипоксии на низкогорном курорте больных ИБС после аортокоронарного шунтирования // Терапевтический архив. — 1996. — Т. 68, №9. — С. 52–54.
2. **Лямина Н.П., Сенчихин В.Н., Покидышев Д.А., Манухина Е.Б.** Нарушение продукции NO у мужчин молодого возраста с артериальной гипертензией и немедикаментозный метод ее коррекции // Кардиология. — 2001. — №9. — С. 17–21.
3. **Манухина Е.Б., Мальшев И.Ю., Бувальцев В.И.** Эндотелиальная дисфункция и артериальная гипертензия: механизмы и пути коррекции // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2003. — №4. — С. 26–30.
4. **Asemu G., Neckar J, Szarsoi O.** et al. Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats // Physiol. Res. — 2000. — Vol. 49, №5. — P. 597–606.
5. **Baker C.S., Kumar S., Rimoldi O.E.** Effects of brief ischemia and reperfusion on the myocardium and the role of nitric oxide // Heart Fail Rev. — 2003. — Vol. 8, №2. — P. 127–141.
6. **Beguin P.C., Joyeux-Faure M., Godin-Ribuot D.** et al. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia // J. Appl. Physiol. — 2005. — Vol. 99, №3. — P. 1064–1069.
7. **Cai Z., Bosch-Marce M, Fox-Talbot K.** et al. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha // Cardiovasc. Res. — 2008. — Vol. 77, №3. — P. 463–470.
8. **Dufour S.P., Ponsot E, Zoll J.** et al. Exercise training in normobaric hypoxia in endurance runners. I. Improvement in aerobic performance capacity // J. Appl. Physiol. — 2006. — Vol. 100, №4. — P. 1238–1248.
9. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart // J. Appl Physiol. — 2005. — Vol. 98. — P. 1691–1696.

10. **Kharbanda R.K.** Cardiac conditioning: a review of evolving strategies to reduce ischaemia-reperfusion injury // *Heart*. — 2010. — Vol. 96, №15. — P. 1179–1186.
11. **Kolar F., Ostadal B.** Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia // *Physiol. Res.* — 2004. — Vol. 53. — S3–S13.
12. **Kolar F., Szarszoi O., Neckar J., Ostadal B.** Improved cardiac ischemic tolerance in rats adapted to chronic hypoxia is reduced by stimulation treatment with N-acetylcysteine // *Eur. J. Heart Fail.* — 2003. — Suppl 2/1. — P. 46.
13. **Kuzuya T., Hoshida S, Yamashita N.** et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia // *Circ. Res.* — 1993. — Vol. 72. — P. 1293–1299.
14. **Lochner A., Marais E., Genade S.** et al. Protection of the ischaemic heart: investigations into the phenomenon of ischaemic preconditioning // *Cardiovasc. J. Afr.* — 2009. — Vol. 20, №1. — P. 43–51.
15. **Mallet R.T., Ryou M.-G., Manukhina E.B., Downey H.F.** Beta-Adrenergic Signaling and ROS: Pivotal Roles in Intermittent, Normobaric Hypoxia-Induced Cardioprotection. Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms To Clinical Applications // Eds. L. Xi, T.V. Serebrovskaya. — Nova Science Publishers, Hauppauge. — 2009. — P. 189–212.
16. **Marber M.S., Latchman D.S., Walker J.M., Yellon D.M.** Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction // *Circulation*. — 1993. — Vol. 88. — P. 1264–1272.
17. **Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T.** Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia // *Exp. Biol. Med.* — 2006. — Vol. 231. — P. 343–365.
18. **Manukhina E.B., Downey H.F., Lyamina S.V., Lyamina N.P.** Beneficial effects of adaptation to hypoxia in patients with ischemic heart disease and extrasystolic arrhythmias // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2007. — Vol. 42, №6. — Suppl. 1. — S9.
19. **Meerson F.Z.** Essentials of Adaptive Medicine: Protective Effects of Adaptation. — Moscow: Hypoxia Medical LTD, 1994.
20. **Neckar J., Ostadal B., Kolar F.** Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery // *Physiol. Res.* — 2004. — Vol. 53. — P. 621–628.
21. **Neckar J., Papousek F., Novakova O.** et al. Cardio-protective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive // *Basic Res. Cardiol.* — 2002. — Vol. 97. — P. 161–167.
22. **Parish J.M., Somers V.K.** Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease // *Mayo Clin. Proc.* — 2004. — Vol. 79. — P. 1036–1046.
23. **Serebrovskaya T.V., Manukhina E.B., Smith M.L.** et al. Intermittent hypoxia: Cause of or therapy for systemic hypertension? // *Exp. Biol. Med.* — 2008. — Vol. 233, №6. — P. 627–650.
24. **Zhu W.Z., Xie Y, Chen L.** et al. Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2006. — Vol. 40, №1. — P. 96–106.
25. **Zong P., Setty S., Sun W.** et al. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). — 2004. — Vol. 229, №8. — P. 806–812.

Поступила 20.03.12

Сведения об авторах:

Смирнова Елена Александровна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаб. патофизиологии кровообращения ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Шимкович Мария Вадимовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаб. молекулярных механизмов адаптации ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Терехина Ольга Леонидовна, науч. сотр. лаб. патофизиологии кровообращения ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Горячева Анна Владимировна, науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов адаптации, ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Чепурнова Дарья Александровна, аспирант лаб. регуляторных механизмов адаптации, ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Дауни Г.Ф., проф. Отдела интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса

Маллет Р.Т., проф. отд. интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса

Манухина Евгения Борисовна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. регуляторных механизмов адаптации, ФГБУ «НИИОПП» РАМН, адъюнкт-профессор отд. интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса