На правах рукописи

ГАЛАГУДЗА
Михаил Михайлович

ПРЕ- И ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ КАК СПОСОБЫ ЗАЩИТЫ МИОКАРДА ОТ ИШЕМИЧЕСКОГО И РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

14.00.16 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Санкт-Петербург – 2007

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор Власов Тимур Дмитриевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор Тюкавин Александр Иванович

доктор медицинских наук,
профессор Калинкин Михаил Николаевич

доктор медицинских наук,
профессор Николаев Валентин Иванович

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова».

Защита состоится «____» _____ 2007 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.089.02 при ГОУ ДПО «Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (191015, г. Санкт-Петербург, ул Кирочная, д. 41).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГОУ ДПО «Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (195196, Санкт-Петербург, Заневский пр., д. 1/82).

Автореферат разослан «____» _____ 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент Г. Н Горбунов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Ишемическая болезнь сердца представляет собой чрезвычайно широко распространенное заболевание и является основной причиной летальности и инвалидизации в большинстве промышленно развитых стран мира. Изучение эндогенных и экзогенных (фармакологических, физических) кардиопротективных воздействий в последние годы привлекает к себе значительное внимание исследователей.

Феномен локального ишемического прекондиционирования миокарда, впервые описанный в конце 80–х годов (Murry C.E. et al., 1986) и заключающийся в повышении устойчивости сердца к ишемическому повреждению после кратковременных эпизодов ишемии-реперфузии миокарда, вызвал очень большой интерес среди специалистов-кардиологов (Писаренко О. И., 2005; Hausenloy D.J., Yellon D.M., 2006). Молекулярным механизмам локального прекондиционирования посвящено большое количество публикаций, однако выраженный защитный потенциал данного феномена по целому ряду причин трудно применим в клинической практике (Kloner R.A., Rezkalla S.H , 2006). В то же время, гораздо более реальной представляется перспектива практического использования варианта прекондиционирования миокарда, возникающего после короткого эпизода ишемии–реперфузии анатомически удаленного от сердца органа (почки, тонкой кишки, скелетной мышцы) и называемого дистантным ишемическим прекондиционированием (Gho B.C. et al., 1996; Przyklenk K. et al., 2003; Cheung M.M. et al., 2006). Механизмы дистантного прекондиционирования в настоящее время изучены недостаточно. В частности, остается неизвестным, имеются ли принципиальные отличия в путях передачи кардиопротективного сигнала от ишемизированного органа к сердцу в зависимости от функциональных и анатомических особенностей данного органа. Немногочисленны сведения о роли активных форм кислорода в реализации кардиопротективных эффектов дистантного прекондиционирования (Yamashita N. et al., 1998; Toufektsian M.C. et al., 2003).

Согласно современным представлениям, кардиопротективный ответ, проявляющийся в повышении устойчивости миокарда к ишемии–реперфузии, может быть индуцирован с помощью некоторых неишемических стимулов, не требующих инвазивного вмешательства. Данное направление находится в стадии интенсивной разработки и может включать использование некоторых фармакологических препаратов, имитирующих эффекты прекондиционирования

(Riess M.L. et al., 2004; Kukreja R.C et al., 2005; Downey J.M., Cohen M.V., 2006), и физических факторов, активирующих определенные звенья внутриклеточных сигнальных систем, ответственных за увеличение устойчивости миокарда к ишемии–реперфузии (Domenech R., Macho P., 1998; Tahepold P. et al., 2003).

Инфаркт миокарда у большинства пациентов развивается на фоне сопутствующих хронических заболеваний. Это обстоятельство затрудняет экстраполяцию экспериментальных данных, полученных на здоровых животных, на клиническую практику. Весьма ограниченное количество работ посвящено исследованию прекондиционирования на фоне экспериментально индуцированных фоновых заболеваний, таких как артериальная гипертензия и сахарный диабет. Имеющиеся данные говорят о том, что влияние этих заболеваний на реализацию эффектов прекондиционирования неоднозначно. Например, сахарный диабет 2 типа у крыс не влияет на устойчивость миокарда к ишемии или понижает ее (Kristiansen S.B. et al., 2004), тогда как сахарный диабет 1 типа, по данным некоторых авторов, сопровождается повышенной устойчивостью миокарда крыс к ишемии (Ravingerova T et al., 2000). Эти результаты позволяют трактовать имеющие место при диабете 1 типа метаболические изменения как одну из малоизученных форм кардиопротективного ответа, называемого метаболическим прекондиционированием

Понятие ишемического постконднционирования подразумевает уменьшение выраженности реперфузионного повреждения миокарда, возникающего в результате создания нескольких коротких эпизодов ишемии в раннем реперфузионном периоде (Zhao Z.Q. et al., 2003; Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J., 2006). В связи с этим, степень выраженности различных кардиопротективных эффектов постконднционирования, оптимальные протоколы его воспроизведения и молекулярно–клеточные механизмы данного феномена являются малоизученными.

Данные экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что пре– и постконднционирование обладают значительным эндогенным кардиопротективным потенциалом, пути использования которого в клинике остаются не до конца разработанными. Дальнейшее изучение феноменов пре– и постконднционирования способствует решению важных в практическом смысле вопросов, связанных с созданием новых методов ограничения степени ишемического и реперфузионного повреждения миокарда.

Цель работы. Определить кардиопротективные эффекты и установить отдельные механизмы ишемического, фармакологического и метаболического прекондиционирования, прекондиционирования с помощью физических факторов и ишемического постконди ционирования миокарда.

Задачи исследования

1. Сравнить эффективность различных способов защиты сердца от ишемического и реперфузионного повреждения.
2. Изучить роль активных форм кислорода в реализации эффектов локального и дистантного ишемического прекондиционирования миокарда.
3. Изучить кардиопротективные эффекты некоторых фармакологических агентов (фармакологического прекондиционирования), в частности, ингаляционных анестетиков, ингибиторов ангиотензин–превращающего фермента.
4. Исследовать кардиопротективные эффекты метаболического прекондиционирования миокарда при экспериментальном сахарном диабете и проанализировать эффекты сочетанного использования метаболического и ишемического прекондиционирования миокарда.
5. Исследовать влияние малоинтенсивного ультразвука на функциональное состояние интактного сердца и оценить возможность использования ультразвука в качестве триггера прекондиционирования.
6. Изучить роль активных форм кислорода и АТФ–чувствительных калиевых каналов в реализации эффектов прекондиционирования миокарда, индуцированного ультразвуком.
7. Оценить эффективность инфаркт–лимитирующего и антиаритмического действия ишемического постконди ционирования миокарда.

Научная новизна

Систематизированы данные об эффективности различных вариантов прекондиционирования, а также ишемического постконди ционирования в отношении разных аспектов ишемического и реперфузионного повреждения миокарда.

Впервые исследована инфаркт-лимитирующая эффективность локального ишемического прекондиционирования в зависимости от продолжительности тестовой ишемии. Показано, что активные формы кислорода играют важную роль в реализации эффекта локального ишемического прекондиционирования, но не участвуют в реализации аналогичного эффекта дистантного прекондиционирования.

Установлено, что использование ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента приводит к потенциации инфаркт-лимитирующего эффекта ишемического прекондиционирования. Впервые доказана возможность использования терапевтического ультразвука в качестве триггера прекондиционирования миокарда. Кроме того, впервые продемонстрировано, что кардиопротективный эффект, вызванный терапевтическим ультразвуком, зависит от функции АТФ–чувствительных калиевых каналов, но, в то же время, реализуется без участия активных форм кислорода.

Получены новые свидетельства наличия эндогенного кардиопротективного фенотипа (метаболического прекондиционирования) при экспериментальном сахарном диабете. Показано, что эффективность ишемического прекондиционирования при сахарном диабете значительно снижена. Впервые продемонстрирован антиаритмический эффект ишемического посткондиционирования в отношении персистирующих реперфузионных тахиаритмий.

Теоретическая и практическая значимость

На основании полученных данных обоснована концепция о неспецифическом характере фактора, вызывающего повышение устойчивости миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению за счет предшествующего ему сублетального повреждения миокарда.

Выраженный защитный эффект прекондиционирования миокарда и, в частности, его неинвазивных разновидностей (дистантное, фармакологическое прекондиционирование, а также прекондиционирование с помощью физических факторов) создает обоснование для его более широкого внедрения в клиническую практику, особенно в кардиохирургической клинике. Значительный кардиопротективный потенциал ишемического посткондиционирования миокарда позволяет рекомендовать использование данного метода кардиопротекции для уменьшения последствий реперфузионного синдрома при проведении реваскуляризации миокарда путем баллонной ангиопластики и стентирования.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личное участие автора выразилось в предложении основной идеи исследования, воспроизведении и отработке необходимых методических подходов. Автором лично осуществлены эксперименты, составившие основное содержание работы, собран необходимый фактический материал и проведена статистическая обработка результатов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Прекондиционирование миокарда – универсальный феномен, вызываемый широким спектром факторов, оказывающих слабое повреждающее действие на сердце: кратковременной локальной и дистантной ишемией-реперфузией, фармакологическими препаратами, изменениями метаболизма и физическими факторами.
2. Локальное ишемическое прекондиционирование оказывает наиболее выраженный кардиопротективный эффект в сравнении с другими изученными видами прекондиционирования.
3. Ведущее значение в реализации различных видов прекондиционирования имеет активация АТФ-чувствительных калиевых каналов.
4. Кардиопротективные эффекты изученных видов прекондиционирования могут суммироваться или не усиливать действие друг друга.
5. Прерывистая реперфузия миокарда после длительной ишемии (постконди-ционирование) обеспечивает более слабый кардиопротективный эффект, чем прекондиционирование.

Апробация работы

Основные положения работы доложены на заседаниях кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ГОУ ВПО «Санкт–Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», на заседании Санкт–Петербургского научного общества патофизиологов 31.10 2006, на юбилейной научной конференции молодых ученых Северо–Западного региона, посвященной 60–летию РАМН (Санкт–Петербург, 2004), на межвузовской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт–Петербург, 2006), на ежегодной конференции Скандинавского общества исследований в области кардиоторакальной хирургии (Гейло, Норвегия, 2004), на V международном конгрессе патофизиологов (Пекин, Китай, 2006).

Внедрение результатов работы

Результаты и выводы диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре патофизиологии с курсом клинической патофизиологии и кафедре факультетской терапии ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», кафедре патофизио-

логии ГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 36 научных работ, в том числе 20 публикаций в центральных журналах, 3 авторских свидетельства об официальной регистрации программ для ЭВМ и 1 авторское свидетельство на полезную модель.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 283 страницах машинописного текста, содержит 19 таблиц и 52 рисунка.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 79 отечественных и 349 зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Эксперименты были проведены на 450 самцах крыс линии Вистар массой 200–300 г (питомник «Рапполово» РАМН, г. Санкт-Петербург) и 60 самцах мышей линии C57B массой 25–30 г (B&K, Соллентуна, Швеция). Животные содержались в условиях 12/12–часового светового режима и получали стандартный корм и питьевую воду ad libitum. Все эксперименты проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального Института Здоровья США № 85–23) и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» и были одобрены этическим комитетом ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И. П. Павлова».

Моделирование регионарной ишемии–реперфузии миокарда на анестезированных животных in vivo. Анестезию осуществляли внутрибрюшинным введением этаминала–натрия (нембутала) в дозе 7 мг/100 г однократно. Эксперименты проводили при искусственной вентиляции легких через трахеостому (частота дыхания – 60/мин, дыхательный объем – 3 мл/100 г массы тела). Артериальное давление (АД) в течение эксперимента измеряли миниатюрным

датчиком давления (Baxter, США) через гепаринизированный катетер, введенный в левую общую сонную артерию. В ходе эксперимента регистрировали электрокардиограмму (ЭКГ) (Кардиотехника–ЭКГ–8, ЗАО «Инкарт», Санкт-Петербург) в стандартных отведениях. Для мониторирования и последующей обработки сигналов АД, частоты сердечных сокращений (ЧСС) и ЭКГ использовали программное обеспечение PhysExp для Windows. В течение эксперимента животные находились на термостатируемом операционном столике; при этом температура тела животного поддерживалась в пределах 37,5±0,5°С. Ишемию миокарда моделировали путем перевязки общего ствола левой коронарной артерии (ЛКА), под который с помощью атравматической иглы (6–0, Cardiopoint, CV–301) подводили полипропиленовую лигатуру и формировали окклюдер (Himory H., Matsuura A., 1989). В большинстве экспериментов тестовая (некрозпродуцирующая) ишемия продолжалась 30 минут и сменялась 90-минутной реперфузией.

Перфузия изолированного сердца. Животных наркотизировали уретаном в дозе 350 мг/100 г, одновременно с которым внутрибрюшинно вводили 500 ЕД гепарина. Грудную клетку вскрывали широким чрездиафрагмальным билатеральным разрезом, сердце быстро вырезали и помещали в модифицированный ледяной (4°С) раствор Кребса–Хенселейта с гепарином, содержащий (в mM): глюкозы – 11; NaCl – 118; KCl – 4,7; $CaCl_2$ – 1,5; $MgSO_4$ – 1,2; KH_2PO_4 – 1,2; $NaHCO_3$ – 25. После остановки сердца его присоединяли к модифицированному аппарату Лангендорфа (Leiris J. et al., 1984) и осуществляли ретроградную перфузию через канюлю, введенную в аорту, раствором Кребса–Хенселейта под постоянным давлением гидростатического столба 80 мм рт. ст. Температуру перфузионного раствора, насыщенного газовой смесью (карбогеном), содержащей 95% кислорода и 5% углекислого газа, поддерживали на уровне 37±0,5°С. pH раствора равнялось 7,3–7,4. В ходе эксперимента регистрировали уровень электрокардиосигнала и давление в левом желудочке (ДЛЖ), по кривой которого программным методом вычисляли конечно-диастолическое (КДД), систолическое (СД) и пульсовое давление (ПД). Мониторирование ДЛЖ, ЭКС и ЧСС осуществляли с использованием кардиомонитора Servomed (Германия). Величину коронарного кровотока (КК) измеряли путем сбора оттекающего от сердца перфузата в градуированный цилиндр и выражали в мл/мин. Глобальную ишемию воспроизводили в течение 30 минут путем полного прекращения подачи перфузата к сердцу, после чего осуществляли 60–минутную реперфузию.

Локальное ишемическое прекондиционирование (ЛИПК). Для моделирования ЛИПК в экспериментах на анестезированных животных in vivo использовали три различных протокола: 1. однократную 5–минутную окклюзию ЛКА с последующей 5–минутной реперфузией; 2. серию из трех 5–минутных коронарооккклюзий, разделенных между собой и длительной окклюзией 5–минутными эпизодами реперфузии; 3. серию из четырех эпизодов 3–минутной окклюзии ЛКА, разделенных 6–минутными эпизодами реперфузии. В экспериментах на изолированном сердце ЛИПК воспроизводили путем создания трех 5–минутных эпизодов глобальной ишемии, разделенных 5–минутными эпизодами реперфузии.

Дистантное ишемическое прекондиционирование (ДИПК). ДИПК в экспериментах in vivo моделировали путем создания одиночного эпизода ишемии тонкой кишки в течение 20 минут с последующей 15 минутной реперфузией.

Фармакологическое прекондиционирование. В экспериментах на изолированном сердце мыши исследовали влияние различных видов анестезии на исходы ишемического и реперфузионного повреждения миокарда. При использовании анестезии изофлюраном животные помещались в герметичную камеру, соединенную с шприцевым насосом (Baxter, США) для подачи газообразного изофлюрана. Другие виды анестезии осуществляли путем внутрибрюшинного введения соответствующих веществ. Так, пентобарбитал–натрий (Umea, Швеция) дозировали из расчета 80 мг/кг. Кроме того, применяли комбинацию мидазолама (Hoffman–La Roche, Швейцария) в дозе 25 мг/кг и фентанила с флюанизоном (Janssen Pharmaceutica, Бельгия) в дозах 1 и 25 мг/кг, соответственно.

Исследовали также изменения устойчивости миокарда к ишемии, возникающие в результате предварительного внутривенного введения различных ингибиторов АПФ, а именно, каптоприла, зофеноприла (Berlin-Chemie, Германия) и спираприла (AWD/Pliva, Германия). Спираприл вводили внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг за 1,5–2 часа до коронарооккклюзии, а каптоприл и зофеноприл – в дозах 1 и 2,5 мг/кг за 30 минут до коронарооккклюзии. В отдельной серии экспериментов изучались эффекты сочетанного использования спираприла в дозе 1 мг/кг и ЛИПК, вызванного однократным 5–минутным эпизодом ишемии–реперфузии.

Метаболическое прекондиционирование (экспериментальный сахарный диабет). Для изучения эффектов метаболического прекондиционирования использовалась химическая модель сахарного диабета. Для этого животным массой 150–200 г натощак подкожно вводили аллоксан моногидрат (Lancaster,

Англия) в дозе 125 мг/кг. Уровень глюкозы крови контролировали дважды – на 3 неделе после инъекции аллоксана и непосредственно перед моделированием инфаркта миокарда с использованием глюкометра Elite 3904M (Швейцария). В эксперимент отбирали животных с уровнем глюкозы не менее 18 ммоль/л, измеренным на 3 неделе. Инфаркт миокарда (ИМ) и ЛИПК воспроизводили через 6 недель (42±3 дня) после инъекции аллоксана.

Прекондиционирование с помощью физических факторов (ультразвук, локальная гипертермия). В качестве физических факторов, потенциально способных индуцировать прекондиционирование миокарда, использовали среднечастотный малоинтенсивный ультразвук (УЗ) и локальную гипертермию. Для прекондиционирования миокарда использовали УЗ с частотой 190–200 кГц и интенсивностью 0,5–1,5 Вт/см^2. При этом периоды воздействия УЗ по 50 секунд чередовались с 10–секундными интервалами без воздействия УЗ; суммарное время воздействия УЗ составляло 10 минут. Предварительные эксперименты показали, что воздействие УЗ с указанными параметрами вызывает умеренный тепловой эффект, проявляющийся повышением температуры миокарда на 1,5–2°С. Для облегчения разделения тепловых и нетепловых эффектов УЗ на сердце были предприняты эксперименты, в которых изучалось влияние локальной гипертермии на устойчивость миокарда к ишемии–реперфузии. С этой целью выполняли три 3–минутных эпизода перфузии сердца раствором Кребса–Хенселейта с температурой 43°С, разделенных 60–секундными интервалами нормотермической перфузии.

Ишемическое посткондиционирование миокарда. В экспериментах in vivo посткондиционирование воспроизводили созданием трех эпизодов 15–секундной реперфузии и 15–секундной ишемии, выполненных непосредственно после окончания 30–минутной регионарной ишемии миокарда. Для изучения инфаркт–лимитирующего эффекта дистантного посткондиционирования в экспериментах на анестезированных животных in vivo использовали транзиторную ишемию почки в течение 5 минут, причем окклюзию левой почечной артерии в этом случае осуществляли на 24 минуте ишемии миокарда, а реперфузию – за 1 минуту до реперфузии миокарда. В экспериментах на изолированном сердце посткондиционирование моделировали путем создания глобальной ишемии в течение 2 минут по истечении 15 минут реперфузии.

Оценка размера анатомической зоны риска и зоны инфаркта. Определение размера зоны риска и зоны инфаркта осуществлялось дифференциальным индикаторным методом с помощью синего Эванса и трифенилтетразолия хлорида (Елисеев О. М. и соавт., 1979; Швилкин А. В. и соавт., 1990; Fishbein

M. et al., 1981). Суммарный объем зоны риска и зоны инфаркта вычисляли путем планиметрии изображений базальных поверхностей срезов сердца. Компьютерная обработка изображений осуществлялась с помощью программы LittleMed для Windows. Данные представляли в виде отношения объема зоны риска к общему объему сердца, а также объема зоны инфаркта к объему зоны риска.

Анализ экспериментально индуцированных нарушений ритма сердца. Частоту встречаемости ишемических и реперфузионных нарушений ритма анализировали в соответствии с международным соглашением Lambeth Conventions (Walker M.J. et al., 1988), представляющем собой инструкции по трактовке и учету различных экспериментально индуцированных нарушений ритма. В качестве значимых нарушений ритма рассматривались эпизоды желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков, объединяемые в группу желудочковых тахиаритмий (ЖТА). Анализировали следующие показатели, характеризующие ЖТА: 1. наличие (факт возникновения) хотя бы одного эпизода ЖТА; 2. число эпизодов ЖТА в пересчете на одно животное; 3. средняя длительность одного эпизода ЖТА в пересчете на одно животное (в секундах); 4. время наступления первого эпизода ЖТА (в минутах); 5. число животных, у которых развились персистирующие формы фибрилляции желудочков (ФЖ), приводившие к гибели животного.

Оценка биохимических маркеров повреждения миокарда в сыворотке крови. Использовали определение содержания следующих маркеров в сыворотке крови: аланин–аминотрансферазы (АЛТ), аспартат–аминотрансферазы (АСТ), общей креатинфосфокиназы (КФК), МВ фракции КФК (КФК–МВ), общей лактатдегидрогеназы (ЛДГ), ЛДГ изоформы 1 (ЛДГ 1), тропонина I. Содержание ферментативных маркеров в сыворотке выражали в международных единицах в литре (МЕ/л), а тропонина I – в нг/мл. Концентрацию тропонина I определяли на анализаторе ACS 180 иммунохемилюминесцентным методом, разработанным фирмой Bayer. Активность ферментативных маркеров повреждения миокарда определяли на биохимическом анализаторе Spectrum (Abbot, США) методом ферментативной кинетики и иммуноингибирования.

Статистическая обработка. Статистическая достоверность различий функциональных данных в каждой временной точке, а также размеры анатомической зоны риска и зоны инфаркта оценивалась с помощью программного пакета SPSS (ANOVA, тест Шеффе). Категориальные данные, в частности, частота возникновения нарушений ритма, сравнивались с помощью теста Фишера. Для анализа корреляции между размером зоны инфаркта и содержанием раз-

личных маркеров повреждения миокарда в сыворотке крови использовали коэффициент корреляции Пирсона. Все функциональные данные выражались в виде «среднее ± стандартное отклонение». Значения *P* менее чем 0,05 рассматривались как достоверные.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Инфаркт–лимитирующий и антиаритмический эффекты локального и дистантного ишемического прекондиционирования

Для изучения инфаркт–лимитирующего и антиаритмического эффектов ЛИПК и ДИПК на модели коронарооккклюзионного инфаркта миокарда in vivo животные были разделены на следующие группы:

1. Контроль: 30–минутная окклюзия ЛКА с последующей 90–минутной реперфузией;
2. ЛИПК 1: перед 30–минутной окклюзией ЛКА выполнялся однократный 5–минутный эпизод ЛИПК;
3. ЛИПК 3: 30–минутной окклюзии ЛКА предшествовала серия из трех 5–минутных эпизодов ЛИПК;
4. ЛИПК 4: 30–минутной окклюзии ЛКА предшествовало четыре эпизода ЛИПК, причем каждый эпизод состоял из 3–минутной окклюзии и 6–минутной реперфузии;
5. ДИПК: перед 30–минутной окклюзией ЛКА осуществлялось ДИПК в виде 20–минутной окклюзии и 15–минутной реперфузии верхней брыжеечной артерии.

Показатели системной гемодинамики, а именно, средние величины АД и ЧСС, не отличались между собой в экспериментах различных групп. Размер анатомической зоны риска также не отличался в экспериментах различных групп, что свидетельствует об одинаковом объеме миокарда, подвергавшегося ишемии. В то же время, размер зоны инфаркта был различным в зависимости от условий эксперимента (рис. 1).

В частности, ЛИПК, вызванное однократным эпизодом ишемии–реперфузии миокарда, приводило к достоверному уменьшению размера зоны некроза ($P<0,05$ в сравнении с контролем). Увеличение числа циклов ЛИПК до трех в группе № 3 в значительной степени усиливало его инфаркт–

лимитирующий эффект – размер инфаркта снижался в сравнении с контролем в 5 раз ($P<0,01$).

Рис. 1. Размер анатомической зоны риска и зоны инфаркта в экспериментах с локальным (ЛИПК) и дистантным (ДИПК) ишемическим прекондиционированием. * – $P<0,05$ в сравнении с контролем; ** – $P<0,01$ в сравнении с контролем; ## – $P<0,01$ в сравнении с ЛИПК 1.

С другой стороны, модификация протокола ЛИПК, включающая четыре эпизода ишемии–реперфузии, не сопровождалась дальнейшим усилением инфаркт–лимитирующего эффекта ЛИПК: в группе № 4 (ЛИПК 4) размер инфаркта достоверно не отличался от группы № 3 (ЛИПК 3). Эти данные позволяют считать оптимальным для достижения максимального инфаркт–лимитирующего эффекта ЛИПК протокол, состоящий из 3–х эпизодов 5–минутной ишемии–реперфузии. В группе № 5 (ДИПК) также наблюдалось достоверное ограничение размера инфаркта, сопоставимое по эффективности с однократным ЛИПК. Ишемическое прекондиционирование вызывает не только инфаркт–лимитирующий эффект, но и обладает антиаритмическим действием. Данные по частоте возникновения и выраженности ишемических ЖТА суммированы в табл. 1.

Таблица 1.

Характеристики ишемических желудочковых тахиаритмий в экспериментах с локальным и дистантным ишемическим прекондиционированием.

	Контроль (n=14)	ЛИПК 1 (n=12)	ЛИПК 3 (n=15)	ЛИПК 4 (n=8)	ДИПК (n=12)
Число животных с ЖТА	13 (93%)	3 (25%)**	0**	0**	11 (92%)
Число эпизодов ЖТА	2,7±0,9	1,3±0,6*	–	–	3,1±1,1
Время наступления первого эпизода ЖТА, с	274±43	408±69*	–	–	475±63*
Суммарная продолжительность эпизодов ЖТА, с	48±27	16±13*	–	–	56±29
Число животных с персистирующей ФЖ	2 (14%)	0	0	0	2 (17%)

Примечание: * – $P<0,05$ в сравнении с контролем; ** – $P<0,01$ в сравнении с контролем).

Согласно полученным нами результатам, ДИПК не обладает антиаритмическим эффектом в отношении ранних ишемических ЖТА, хотя и обеспечивает достоверный инфаркт–лимитирующий эффект, который сопоставим по выраженности с эффектом однократного эпизода ЛИПК. При этом однократный эпизод ЛИПК приводит к значимому уменьшению частоты возникновения и выраженности ишемических ЖТА, что указывает на отсутствие прямой связи между двумя важнейшими эффектами ИПК – инфаркт–лимитирующим и антиаритмическим. Предположительно, ишемия–реперфузия дистантных органов обеспечивает ограничение размера инфаркта миокарда за счет активации хорошо известных внутриклеточных каскадных сигнальных путей, но при этом не затрагивает механизмы подавления аритмогенеза, для реализации которых необходимы короткие эпизоды ишемии–реперфузии самого миокарда.

Таким образом, инфаркт-лимитирующий эффект ЛИПК зависит от числа эпизодов кратковременной ишемии и достигает максимальной выраженности при трехкратной окклюзии ЛКА. Инфаркт-лимитирующий эффект ДИПК усту-

пает по выраженности аналогичному эффекту ЛИПК. Кроме того, ДИПК не обладает антиаритмическим действием в отношении ишемических ЖТА, тогда как однократный эпизод ЛИПК уже обеспечивает близкий к максимальному антиаритмический эффект, наблюдаемый при повторных эпизодах ЛИПК.

Влияние продолжительности тестовой ишемии на выраженность инфаркт–лимитирующего эффекта локального ишемического прекондиционирования

Традиционно инфаркт–лимитирующий эффект прекондиционирования оценивается при определенной стандартной продолжительности тестовой (пролонгированной) ишемии. В то же время большой теоретический и практический интерес представляет исследование противоишемической эффективности прекондиционирования в зависимости от длительности тестовой ишемии. С этой целью нами были предприняты эксперименты, в которых инфаркт–лимитирующий эффект ЛИПК, вызванного тремя эпизодами 5–минутной ишемии, разделенными 5–минутными эпизодами реперфузии, изучался при продолжительностях последующей ишемии 20, 30, 40, 50 и 60 минут. В контроле наблюдалось прогрессивное увеличение размера инфаркта с увеличением продолжительности ишемии (рис. 2).

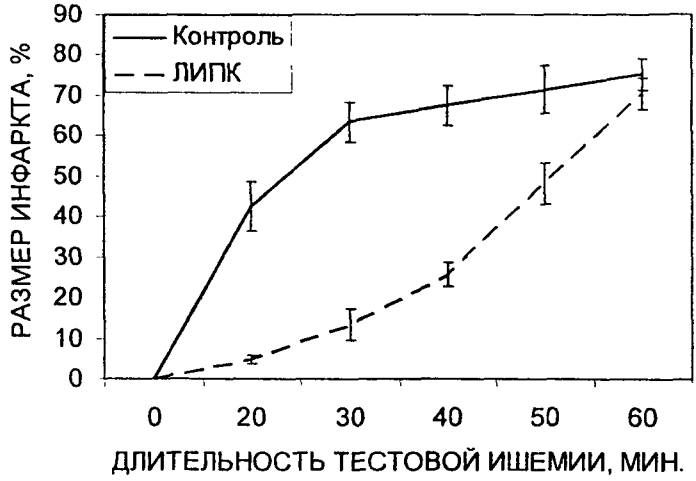

Рис. 2. Инфаркт–лимитирующая эффективность локального ишемического прекондиционирования при различной продолжительности тестовой ишемии.

При увеличении продолжительности ишемии некроз распространялся в направлении от эндокарда к эпикарду, что приводило к формированию трансмурального инфаркта, захватывающего практически всю массу миокарда ЛЖ, при продолжительности ишемии 50–60 минут. Примечательно, что при продолжительности ишемии более 30 минут происходило значительное замедление нарастания размера инфаркта. Так, за первые 30 минут ишемии некрозу подвергалось в среднем 63% зоны риска, тогда как в период с 30–й по 60–ю минуту ишемии размер инфаркта увеличивался всего на 12%.

ЛИПК обеспечивало наиболее выраженный инфаркт-лимитирующий эффект при сравнительно небольшой продолжительности тестовой ишемии, а именно, 20–40–минутной ишемии. Однако, при большей продолжительности тестовой ишемии защитный эффект ЛИПК начинал ослабевать. Если при 50–минутной ишемии инфаркт–лимитирующий эффект ЛИПК еще был статистически достоверным, то при 60–минутной ишемии достоверные различия в размере инфаркта между группами контроля и ЛИПК отсутствовали. Таким образом, увеличение продолжительности тестовой ишемии миокарда вдвое приводит к практически полной нейтрализации протективного эффекта ЛИПК у крыс, что необходимо учитывать при оценке эффективности ЛИПК.

Роль активных форм кислорода в реализации локального и дистантного ишемического прекондиционирования

Изучению роли активных форм кислорода (АФК) в механизмах запуска и опосредования ЛИПК посвящен ряд исследований, результаты которых, однако, остаются весьма противоречивыми (Richard V. et al., 1993; Yamashita N. et al., 1998; Toufektsian M.C. et al. 2003). В то же время, значение активных форм кислорода в реализации кардиопротективных эффектов ДИПК практически не изучалось. Для изучения роли активных форм кислорода в механизмах ЛИПК и ДИПК были выполнены следующие группы экспериментов:

1. Контроль: окклюзия ЛКА в течение 30 минут с последующей 90–минутной реперфузией без дополнительных вмешательств;
2. Контроль + N–2–МПГ: моделированию инфаркта предшествовала внутривенная инфузия синтетического антиоксиданта N–2–меркаптопропионилглицина в суммарной дозе 90 мг/кг в течение 60 минут перед окклюзией ЛКА;

3. ЛИПК: 30–минутной окклюзии ЛКА предшествовало четыре эпизода ее 3–минутной окклюзии, разделенных четырьмя 6–минутными эпизодами реперфузии;
4. ЛИПК + N–2–МПГ: моделирование ЛИПК сопровождалось внутривенной инфузией N–2–МПГ в том же режиме, что и в группе 2;
5. ДИПК: 30–минутной окклюзии ЛКА предшествовала 20–минутная окклюзия и 15–минутная реперфузия верхней брыжеечной артерии;
6. ДИПК + N–2–МПГ: моделирование ДИПК сопровождалось внутривенной инфузией N–2–МПГ.

Показатели системной гемодинамики, а именно средние величины АД и ЧСС, достоверно не различались между собой в экспериментах различных групп. Инфузия N–2–МПГ не сопровождалась значимыми гемодинамическими эффектами, а гемодинамические последствия окклюзии ЛКА и верхней брыжеечной артерии были кратковременными. Инфузия N–2–МПГ не приводила к значимому изменению размера зоны инфаркта в сравнении с контролем (рис. 3).

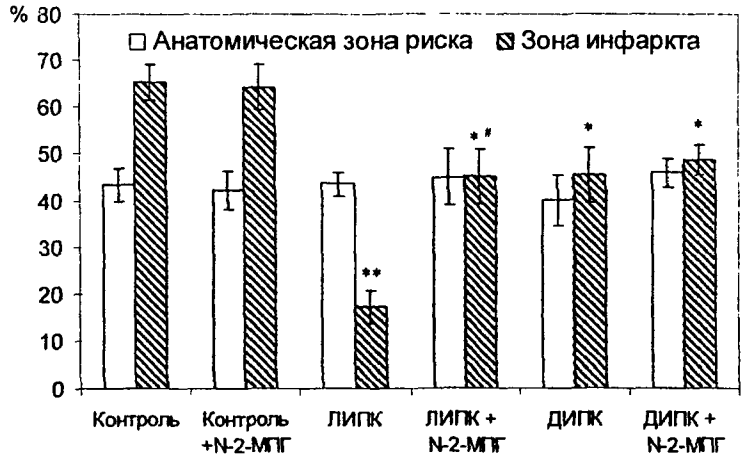

Рис. 3. Размер анатомической зоны риска и зоны инфаркта в экспериментах, посвященных изучению роли активных форм кислорода в механизмах локального (ЛИПК) и дистантного (ДИПК) ишемического прекондиционирования. N–2–МПГ – N–2–меркаптопропионилглицин; * – $P<0,05$ в сравнении с контролем, ** – $P<0,01$ в сравнении с контролем, # – $P<0,05$ в сравнении с ЛИПК.

В группе № 3 наблюдалось существенное ограничение размера зоны инфаркта – она снижалась более чем в 3,5 раза ($P<0,01$ в сравнении с контролем). Введение N–2–МПГ приводило к частичному устранению инфаркт–лимитирующего эффекта ЛИПК. ДИПК (группа № 5) способствовало снижению размера инфаркта в среднем на 20% в сравнении с контролем ($P<0,05$). Однако, инфаркт–лимитирующий эффект ДИПК не устранялся инфузией N–2–МПГ, и размер некротической зоны в группе № 6 статистически не отличался от такового в группе № 5 ($P>0,05$).

Таким образом, внутривенная инфузия N–2–МПГ приводит к ослаблению инфаркт–лимитирующего эффекта ЛИПК, но не влияет на эффект ДИПК.

Влияние ингибиторов ангиотензин–превращающего фермента на проявления ишемического–реперфузионного повреждения миокарда

Несмотря на то, что положительные эффекты ингибиторов АПФ при хронической сердечной недостаточности в настоящее время не вызывают сомнения, возможность ослабления острого ишемического повреждения миокарда под действием этих препаратов является спорной. Литературные данные указывают на то, что ингибиторы АПФ при введении до наступления ишемии могут снижать выраженность комплексного ишемического–реперфузионного повреждения миокарда, т. е. обеспечивать эффект фармакологического прекондиционирования (Hartman J.C. et al., 1993). С другой стороны, существуют исследования, в которых инфаркт–лимитирующее действие ингибиторов АПФ обнаружено не было (Miki T. et al., 1993).

Нами оценивалось инфаркт–лимитирующее и антиаритмическое действие ингибиторов АПФ каптоприла и зофеноприла в дозах 1 и 2,5 мг/кг на модели инфаркта миокарда у крыс in vivo. Внутривенное введение каптоприла и зофеноприла в дозе 1 мг/кг приводило к понижению АД в среднем на 20–25% от исходной величины в течение 20–30 минут; внутривенное введение каптоприла и зофеноприла в дозе 2,5 мг/кг приводило к значительному понижению АД (на 40–45% от исходной величины), причем гипотензивный эффект сохранялся в течение всего эксперимента. Данные по величине зоны риска и зоны инфаркта в экспериментах с введением ингибиторов АПФ каптоприла и зофеноприла приведены на рис. 4. Достоверно меньшая величина размера зоны инфаркта была получена только при использовании зофеноприла в дозе 2,5 мг/кг. Каптоприл в аналогичной дозе не вызывал статистически достоверного уменьшения

размера некроза. Кроме того, зофеноприл в дозе 2,5 мг/кг в отличие от каптоприла вызывал уменьшение частоты возникновения и выраженности ишемических ЖТА. Указанная разница может объясняться различными фармакодинамическими характеристиками этих препаратов. В частности, известно, что зофеноприл, будучи более липофильным, имеет повышенный аффинитет к ткани миокарда (Subissi A. et al., 1999). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительной кардиопротективной эффективности зофеноприла при его внутривенном введении в дозе 2,5 мг/кг.

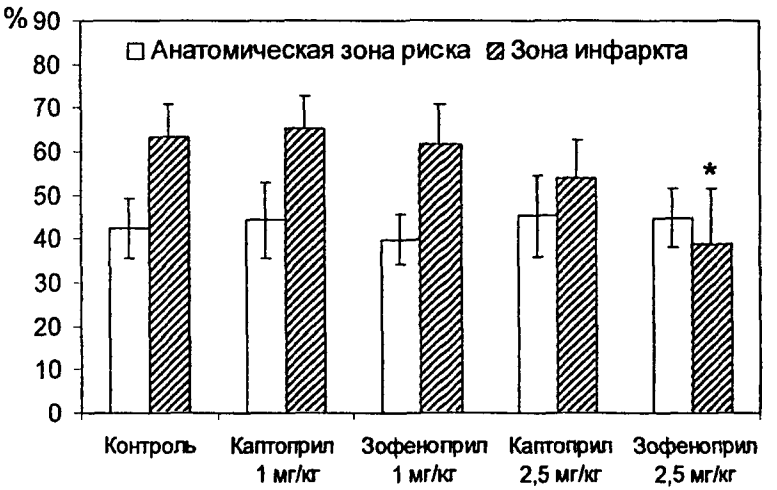

Рис. 4. Размер анатомической зоны риска и зоны инфаркта в экспериментах с ингибиторами АПФ каптоприлом и зофеноприлом. * – $P<0,01$ в сравнении с контролем.

Определенный интерес представляет возможность усиления кардиопротективных эффектов ЛИПК под действием фармакологических препаратов. С этой целью нами исследовался эффект сочетанного применения однократного эпизода ЛИПК и ингибитора АПФ спираприла в субгипотензивной дозе 1 мг/кг. При воспроизведении ЛИПК путем однократной 5–минутной ишемии-реперфузии отмечалось умеренное, но достоверное снижение размера зоны инфаркта (рис. 5). При внутрибрюшинном введении спираприла за 1,5–2 часа до окклюзии коронарной артерии размер зоны инфаркта достоверно не отличался от контроля. Однако, при моделировании ЛИПК на фоне внутрибрюшинного введения спираприла происходило более чем двухкратное снижение размера

зоны инфаркта. Таким образом, введение животным спираприла в субгипотензивной дозе приводило к значительной потенциации инфаркт–лимитирующего эффекта ЛИПК. Механизм такой потенциации может заключаться в наступающем под действием ингибиторов АПФ замедлении деградации брадикинина.

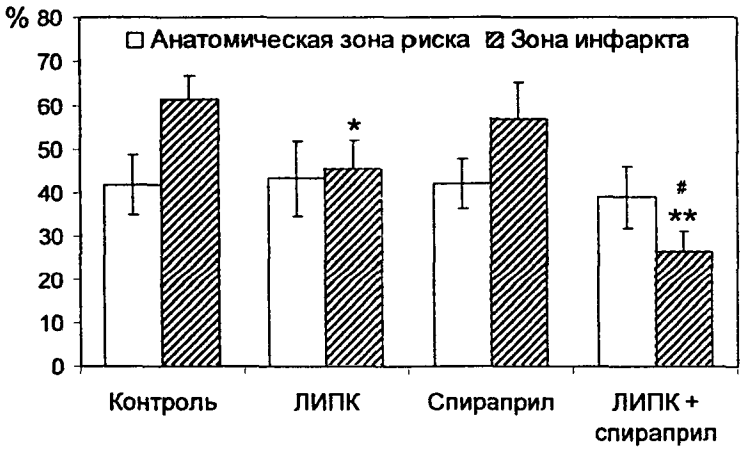

Рис. 5. Размер анатомической зоны риска и зоны инфаркта в экспериментах с локальным ишемическим прекондиционированием и ингибитором АПФ спираприлом. * – $P<0,05$ в сравнении с контролем; ** – $P<0,01$ в сравнении с контролем; # – $P<0,05$ в сравнении с ЛИПК.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что определенные представители группы ингибиторов АПФ могут обеспечивать эффект фармакологического прекондиционирования миокарда либо понижать порог реализации ишемического прекондиционирования при профилактическом введении до наступления ишемии.

К числу фармакологических препаратов, способных индуцировать состояние повышенной устойчивости миокарда к ишемии, относятся некоторые широко используемые в эксперименте и в клинической практике анестетики. Так, забор сердца для методики перфузии изолированного сердца обычно осуществляется после предварительной анестезии животных с помощью барбитуратов, опиоидов или галогенсодержащих ингаляционных анестетиков. В то же время, данные литературы свидетельствуют, что некоторые из этих препаратов обладают кардиопротективными эффектами у крыс, кроликов, собак и свиней (Ross S., Foex P., 1999; Zaugg M. et al., 2003). С связи с этим, нами были изуче-

ны эффекты таких широко используемых анестетиков, как изофлюран, мидазолам, фентанил и пентобарбитал на устойчивость изолированного сердца мыши к ишемическому и реперфузионному повреждению. В контрольных экспериментах с целью эвтаназии нами выполнялась цервикальная дислокация (ЦД). Процедура ЦД позволяет избежать любых потенциальных протективных эффектов анестетиков. Достоверных различий в величине размера инфаркта между группами зарегистрировано не было. Таким образом, результаты проведенных экспериментов говорят о том, что наиболее часто используемые виды анестезии не индуцируют кардиопротективный ответ, называемый фармакологическим прекондиционированием, на модели изолированного сердца мыши. Поскольку защитные эффекты таких препаратов, как ингаляционные анестетики и опиоиды, убедительно продемонстрированы на других видах животных, полученные результаты могут указывать на значительные видовые отличия в механизмах кардиопротекции.

Эффективность метаболического прекондиционирования при экспериментальном сахарном диабете

Некоторые данные свидетельствуют о том, что экспериментальный сахарный диабет 1 типа (СД1) сопровождается повышением устойчивости миокарда к ишемии, однако срок заболевания и модель ишемии–реперфузии могут существенно влиять на результаты экспериментов (Ravingerova T. et al., 2003). С другой стороны, остается неясным, насколько эффективно ишемическое прекондиционирование в условиях СД1.

Для изучения устойчивости миокарда к ишемии при экспериментальном СД1 и анализа эффективности ЛИПК при сопутствующем СД1 были выполнены следующие группы экспериментов:

1. Контроль (инфаркт): здоровые крысы, у которых моделировалась 30–минутная ишемия миокарда с последующей 90–минутной реперфузией;
2. Контроль + ЛИПК: один эпизод ЛИПК в виде 5–минутной ишемии миокарда с последующей 5–минутной реперфузией;
3. СД1 + инфаркт: группа животных с СД1, в которой осуществлялись те же манипуляции, что и в группе № 1.
4. СД1 + ЛИПК: животные с СД1, у которых ЛИПК создавалось так же, как в группе № 2.

В группе № 1 (контроль) концентрация глюкозы в венозной крови перед началом эксперимента составляла 5,6±0,83 ммоль/л, в группе № 2 – 5,3±0,62

ммоль/л. В группах № 3 и № 4 уровень гликемии не различался и составлял 21,3±5,58 и 23,1±4,84 ммоль/л, соответственно, что было достоверно выше, чем в контроле ($P<0,01$).

ЛИПК приводило к статистически значимому уменьшению размера зоны инфаркта у здоровых животных (рис. 6). У крыс с СД1 размер зоны инфаркта был достоверно меньше, чем в контроле ($P<0,01$). Выполнение ЛИПК у животных с СД1 не приводило к дальнейшему ограничению размера зоны инфаркта.

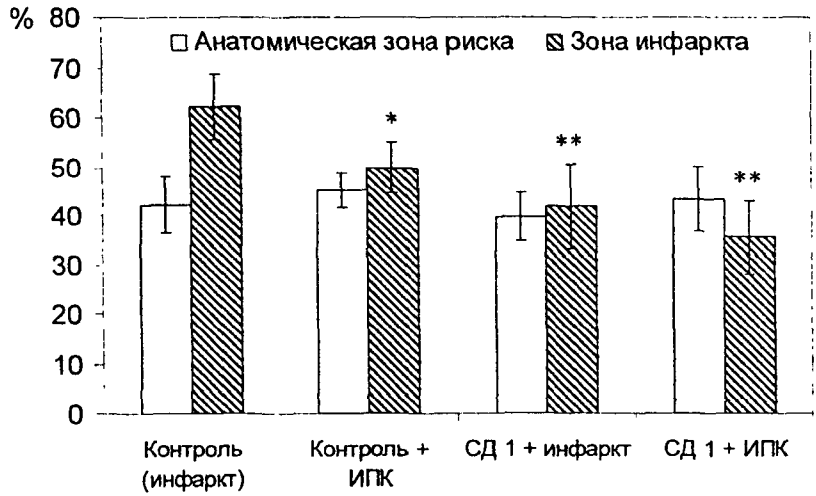

Рис. 6. Размер анатомической зоны риска и зоны инфаркта в экспериментах с метаболическим прекондиционированием. * – $P<0,05$ в сравнении с контролем, ** – $P<0,01$ в сравнении с контролем.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что, во-первых, миокард животных с СД1 на сроке заболевания 6 недель более устойчив к ишемическому повреждению, чем миокард здоровых животных, и, во-вторых, ЛИПК у животных с СД1 гораздо менее эффективно в ограничении размера инфаркта, чем у животных без СД1.

Прекондиционирование миокарда с помощью физических факторов

Данный фрагмент исследования посвящен изучению возможности повышения устойчивости миокарда к ишемии под действием некоторых физических факторов, а именно, малоинтенсивного ультразвука и локальной гипертермии.

На первом этапе изучались особенности распространения ультразвукового поля в экспериментальном сосуде как в отсутствие каких–либо препятствий, так и при прохождении УЗ через фрагмент грудной стенки. Далее оценивались эффекты УЗ на интактное изолированное перфузируемое сердце при различных режимах воздействия. На следующем этапе работы исследовалось влияние УЗ и локальной гипертермии на устойчивость миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению. Кроме того, были изучены механизмы вызванного ультразвуком прекондиционирования, связанные с участием АФК и $K_{АТФ}$ каналов.

Предварительные данные свидетельствуют о двух важнейших эффектах малоинтенсивного УЗ на изолированное сердце. С одной стороны, УЗ воздействие различных частот вызывало более значительное в сравнении с контролем увеличение конечно–диастолического внутрижелудочкового давления, т. е. приводило к выраженной диастолической дисфункции миокарда. С другой стороны, воздействие УЗ обнаруживало аритмогенный эффект, проявлявшийся в виде увеличения числа ЖЭС и возникновения эпизодов ЖТ. Эти данные, свидетельствующие о наличии слабого повреждающего эффекта малоинтенсивного УЗ на сердце, позволили сформулировать гипотезу о возможности повышения устойчивости миокарда к последующей продолжительной ишемии–реперфузии путем предварительного воздействия УЗ. Поскольку воздействие УЗ на сердце сопровождается умеренным тепловым эффектом, нами также были проведены эксперименты, в которых отдельно изучалось влияние локальной гипертермии на устойчивость миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению.

Для изучения кардиопротективных эффектов малоинтенсивного УЗ и локальной гипертермии были проведены следующие группы экспериментов:

1. Контроль: в данной группе выполнялась 30–минутная глобальная ишемия с последующей 60–минутной реперфузией;
2. ЛИПК: 30–минутной глобальной ишемии предшествовали три 5–минутных эпизода ишемии–реперфузии;
3. УЗ ПреК: 30–минутной глобальной ишемии предшествовали 10 минут прерывистого воздействия УЗ (частота 190–210 кГц; интенсивность 0,5–1,5 Вт/см^2) и 15 минут перфузии в отсутствие УЗ;
4. Температурное ПреК: перед 30–минутной глобальной ишемией сердца перфузировали буфером Кребса-Хенселейта, нагретым до 43°С, в течение 10 минут, после чего в течение 10 минут осуществляли нормотермическую перфузию.

В постишемическом периоде в группах № 2–4 наблюдалось более раннее и полное восстановление величины ПД, причем разница с контролем была достоверной уже на 20–й минуте реперфузии и сохранялась в течение всего постишемического периода (рис. 7).

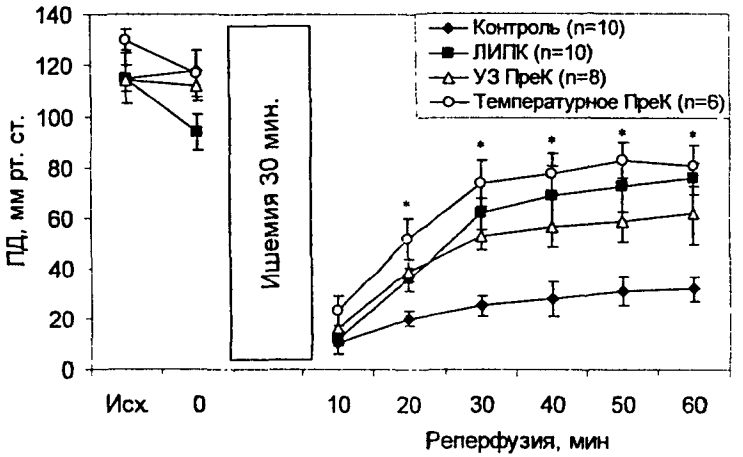

Рис. 7: Динамика постишемического восстановления пульсового давления в экспериментах с прекондиционированием физическими факторами. * – $P<0,05$ в сравнении с контролем для групп ЛИПК, УЗ ПреК и температурное ПреК.

Наиболее чувствительным показателем, характеризующим функциональное состояние ЛЖ после ишемии-реперфузии, является КДД. Величина КДД была достоверно меньше в группах № 2–4 в сравнении с контролем в течение всего периода реперфузии, что свидетельствует о лучшей сохранности диастолической функции миокарда (рис. 8). Необходимо отметить, что как прекондиционирование с помощью УЗ, так и прекондиционирование, вызванное локальной гипертермией, обеспечивали практически такой же протективный эффект в отношение постишемической функции ЛЖ, как и «золотой стандарт» кардиопротекции – ишемическое прекондиционирование.

Кардиопротективный эффект прекондиционирования физическими факторами проявлялся также в виде уменьшения размера инфаркта. Размер инфаркта в контрольной группе составил 62,3±5,84% от общего объема сердца. При этом в группе № 2 (ЛИПК) наблюдалось достоверное уменьшение размера инфаркта до 42,3±6,32% ($P<0,05$ в сравнении с контролем). Размер инфаркта в

группах № 3 и 4 также был достоверно меньше, чем в контроле, и составлял 50,5±3,93 и 41,8±7,72%, соответственно (P<0,05 в сравнении с контролем).

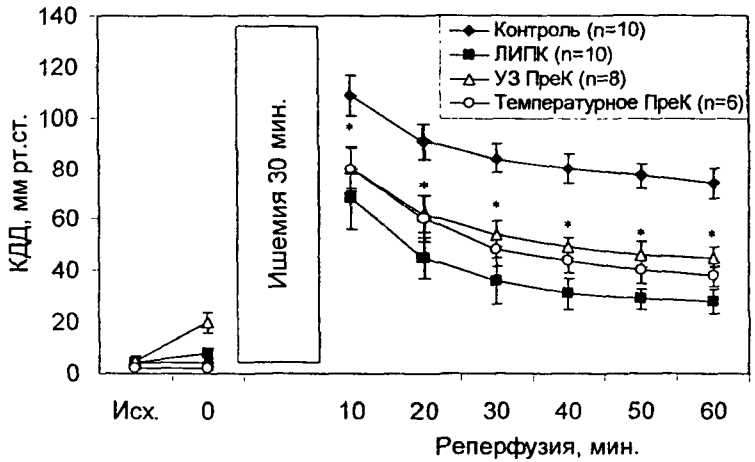

Рис. 8. Динамика конечно–диастолического давления в постишемическом периоде в экспериментах с прекондиционированием физическими факторами. * – P<0,05 в сравнении с контролем для групп ЛИПК, УЗ ПреК и температурное ПреК.

Таким образом, воздействие на сердце УЗ с частотой 190–210 кГц и интенсивностью 0,5–1,5 Вт/см^2 приводит к значительному повышению устойчивости миокарда к ишемии, проявляющемуся как улучшением постишемического восстановления функции ЛЖ, так и ограничением размера инфаркта. Аналогичными эффектами обладает локальная гипертермия. Большой интерес представляют возможные механизмы прекондиционирования, вызванного физическими факторами.

Роль активных форм кислорода и АТФ–чувствительных калиевых ($К_{АТФ}$) каналов в реализации прекондиционирования, индуцированного УЗ

В настоящее время участие АФК и $К_{АТФ}$ каналов в механизмах реализации ЛИПК можно считать доказанным. В то же время, триггерная и/или эффекторная роль АФК и $К_{АТФ}$ каналов в механизмах прекондиционирования, индуцированного УЗ, остается неизученной. С целью выяснения возможного уча-

стия АФК и $K_{АТФ}$ каналов в прекондиционировании, вызванном воздействием малоинтенсивного УЗ, были выполнены следующие группы экспериментов:

1. Контроль: 30–минутная ишемия и 60–минутная реперфузия;
2. УЗ ПреК: 30–минутной глобальной ишемии предшествовали 10 минут прерывистого воздействия УЗ (частота 190–210 кГц; интенсивность 0,5–1,5 Вт/см^2) и 15 минут перфузии в отсутствие УЗ;
3. УЗ ПреК + N–2–МПГ: перед 30–минутной ишемией сердца перфузировали раствором, содержащим 1 mM N–2–МПГ;
4. УЗ ПреК + глибенкламид: перед 30–минутной ишемией сердца перфузировали раствором, содержащим 10 μM глибенкламида.

В ходе реперфузии отмечалось лучшее восстановление величины ПД в группах № 2 и № 3 (рис. 9). При этом постишемическая динамика ПД в группе № 4 не отличалась от таковой в контроле. Аналогичная ситуация отмечалась и применительно к динамике КДД в постишемическом периоде.

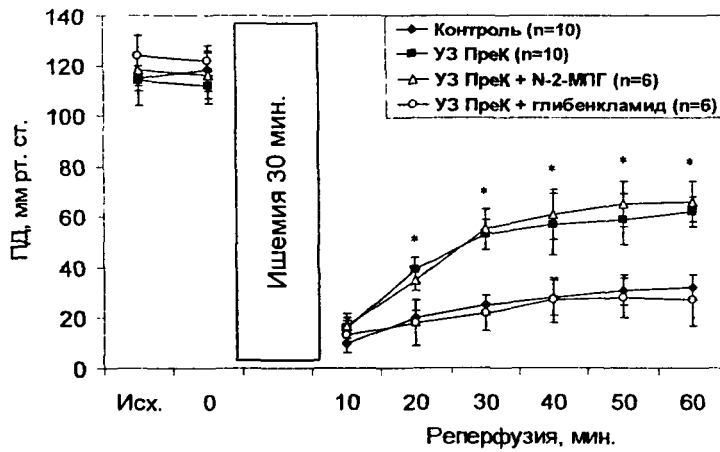

Рис. 9. Динамика постишемического восстановления пульсового давления в экспериментах, направленных на изучение механизмов прекондиционирования, индуцированного ультразвуком. * – P<0,05 в сравнении с контролем для групп УЗ ПреК и УЗ ПреК + N–2–МПГ.

При оценке размера инфаркта было обнаружено, что инфаркт-лимитирующий эффект УЗ прекондиционирования полностью устранялся блокатором $K_{АТФ}$ каналов глибенкламидом, но сохранялся при сочетании УЗ воздействия с введением N–2–МПГ.

Таким образом, полученные результаты показывают, что протективный эффект прекондиционирования, индуцированного с помощью воздействия на сердце малоинтенсивным УЗ, может быть устранен при использовании блокатора $К_{АТФ}$ каналов глибенкламида. Эти данные говорят о том, что $К_{АТФ}$ каналы и/или иные в настоящее время неизвестные мишени действия глибенкламида играют важную роль в реализации прекондиционирования, вызванного УЗ.

Поскольку ключевая роль $К_{АТФ}$ каналов в реализации других видов прекондиционирования (ЛИПК, ДИПК, фармакологическое прекондиционирование) доказана большим количеством работ, они могут рассматриваться в качестве универсальных конечных эффекторов повышения устойчивости миокарда к ишемии, вызванного различными стимулами ишемической и неишемической природы (Gross G.J., 2000; Gross G.J., Peart J.N., 2003; Hanley P.J., Daut J., 2005). С другой стороны, результаты наших экспериментов не дают оснований считать, что активные формы кислорода являются необходимым звеном сигнальной цепи, лежащей в основе прекондиционирования с помощью УЗ.

Кардиопротективная эффективность ишемического посткондиционирования миокарда

Изучение феномена ишемического посткондиционирования (ПостК) миокарда в настоящее время находится в начальной стадии. Остается неясным, каково соотношение кардиопротективной эффективности ишемического пре– и посткондиционирования.

С целью изучения различных аспектов кардиопротективного действия ишемического ПостК нами были выполнены эксперименты на изолированном сердце, направленные на исследование антиаритмического эффекта ПостК в отношение персистирующих реперфузионных ЖТА, а также эксперименты на анестезированных животных in vivo, в которых изучался инфаркт–лимитирующий эффект ПостК и его влияние на реперфузионные ЖТА.

В экспериментах на изолированном сердце установлено, что ПостК миокарда, выполненное в виде однократного 2-минутного эпизода глобальной ишемии, начатого на 15-й минуте реперфузии, в 100% случаев приводит к купированию персистирующей фибрилляции желудочков, вызванной реперфузией. В отсутствие ПостК персистирующая фибрилляция продолжалась до конца эксперимента, т. е. до 30-й минуты реперфузии. В то же время, в экспериментах in vivo ПостК миокарда, выполненное в виде четырех эпизодов ишемии-реперфузии по 10 секунд сразу после 30-минутной ишемии, не приводило к ос-

лаблению выраженности реперфузионных тахиаритмий (табл. 2). Таким образом, ПостК не предотвращает развитие реперфузионных ЖТА, но, с другой стороны, способствует купированию состоявшегося затяжного эпизода ЖТА.

Таблица 2.

Частота возникновения и характеристика реперфузионных желудочковых тахиаритмий в экспериментах с ишемическим постконди ционированием (ПостК) in vivo.

Показатель	Контроль (n=8)	ПостК (n=8)
Число животных с ЖТА	8	8
Число эпизодов ЖТА	2,4±1,1	2,1±0,9
Суммарная продолжительность ЖТА, с	42±27	33±21
Число животных с летальными формами ЖТА	1	2

С целью сопоставления выраженности инфаркт–лимитирующего эффекта ПостК и его соотношения с эффектом ЛИПК нами на модели инфаркта миокарда у крыс in vivo были выполнены следующие группы экспериментов:

1. Контроль: 30–минутная ишемия миокарда и 90–минутная реперфузия;
2. ЛИПК: три 5–минутных эпизода ишемии-реперфузии перед тестовой ишемией;
3. ПостК: три эпизода 15–секундной реперфузии и 15–секундной ишемии, выполненных непосредственно после окончания 30–минутной ишемии.

В контрольной группе размер инфаркта составил 62,5±5,21% от размера анатомической зоны риска (рис. 10). ЛИПК приводило к ограничению размера инфаркта до 15,8±3,38% (P<0,01). В группе с ПостК размер инфаркта был также достоверно ниже, чем в контроле, и составлял 49,3±5,93% (P<0,05). Таким образом, на модели инфаркта миокарда in vivo ишемическое ПостК оказывало достоверный инфаркт–лимитирующий эффект, который, однако, был слабее аналогичного эффекта ЛИПК. Данное наблюдение согласуется с результатами исследований, проведенных ранее на сходных моделях (Kin H. et al., 2004; Tang X. L. et al., 2006).

Рис. 10. Размер анатомической зоны риска и зоны инфаркта в экспериментах с локальным ишемическим прекондиционированием и посткондиционированием. * – $P<0,05$ в сравнении с контролем; ** – $P<0,01$ в сравнении с контролем.

Значимость биохимических маркеров повреждения миокарда для оценки эффективности пре– и посткондиционирования

Анализ содержания различных маркеров повреждения миокарда (МПМ) в сыворотке крови в сочетании с гистохимическим методом оценки размера инфаркта нередко используется в экспериментальных исследованиях для дополнительной верификации инфаркт–лимитирующего эффекта фармакологических и нефармакологических методов кардиопротекции (Конорев Е.А. и соавт., 1990; Zacharowski K. et al., 1999; Liang J.C. et al., 2006). При этом в настоящее время имеются лишь единичные работы, в которых проводилось сопоставление данных по содержанию МПМ и по размеру инфаркта, измеренному с помощью прямого гистохимического метода. Мы построили диаграммы разброса данных и вычислили коэффициенты корреляции между содержанием различных МПМ в сыворотке крови и размером инфаркта. В общей сложности для корреляционного анализа использовались данные 40 экспериментов, что позволяет считать выборку репрезентативной (Metzler B. et al., 2002). Данные по степени корреляции размера инфаркта и уровня различных МПМ приведены в табл. 3.

Таблица 3.

Корреляция размера инфаркта и уровней различных маркеров повреждения миокарда.

Показатель	Коэффициент корреляции	Достоверность корреляции
Тропонин I	r=0,84	*P*<0,01
Лактатдегидрогеназа 1	r=0,79	*P*<0,01
Аспартат-аминотрансфераза	r=0,65	*P*<0,01
Лактатдегидрогеназа общая	r=0,49	*P*<0,05
Креатинфосфокиназа-МВ	r=0,19	*P*=нд
Креатинфосфокиназа общая	r=0,18	*P*=нд
Аланин-аминотрансфераза	r=0,16	*P*=нд

Достоверная корреляционная связь наблюдалась между размером инфаркта и сывороточной концентрацией тропонина I, а также ЛДГ 1, АСТ и ЛДГ. В то же время, КФК-МВ, КФК и АЛТ не коррелировали с размером инфаркта. Эти результаты вступают в противоречие с многочисленными данными литературы о достаточно тесной корреляции активности КФК и размера инфаркта (Gibbons R.J. et al., 2004; Kin H. et al., 2004). В то же время имеются данные, что КФК не является кардиоспецифическим маркером и ее активность может повышаться при повреждении других тканей, в частности, скелетной мышцы (Rajappa M., Sharma A., 2005). В ходе моделирования инфаркта миокарда у животных происходит значительное повреждение скелетных мышц, что связано с обеспечением оперативного доступа, термокоагуляцией мышечной ткани с проходящими в ней сосудами и другими процедурами. Возможно, именно этим объясняется отсутствие корреляции между размером инфаркта и сывороточной активностью КФК и КФК–МВ, обнаруженное в наших экспериментах.

Таким образом, результаты наших исследований позволили подтвердить кардиопротективную эффективность различных видов прекондиционирования, а также посткондиционирования миокарда с использованием биохимических маркеров повреждения миокарда, наиболее тесно коррелирующих с размером инфаркта.

ВЫВОДЫ

1. Защита миокарда, формирующаяся в результате прекондиционирования, вызванного различными факторами, проявляется уменьшением объема некроза, постишемической сократительной дисфункции и нарушений ритма сердца; защитные эффекты прекондиционирования не зависят друг от друга и имеют разный порог возникновения.
2. Степень выраженности кардиопротективного эффекта локального ишемического прекондиционирования пропорциональна числу кратковременных эпизодов ишемии–реперфузии и достигает максимума после трех адаптирующих эпизодов на модели инфаркта миокарда у крыс.
3. Инфаркт-лимитирующий эффект локального ишемического прекондиционирования имеет максимальную выраженность при длительности последующей (тестовой) ишемии 20-40 минут и исчезает при тестовой ишемии длительностью 60 минут на модели инфаркта миокарда у крыс.
4. Эффект прекондиционирования, вызванного малоинтенсивным ультразвуком, зависит от активации АТФ–чувствительных калиевых каналов, что подтверждает неспецифичность данного механизма прекондиционирования.
5. Активные формы кислорода играют важную роль в механизме защитного эффекта локального прекондиционирования, но не принимают участия в реализации эффекта дистантного прекондиционирования и прекондиционирования, вызванного малоинтенсивным ультразвуком.
6. Ингибиторы ангиотензин–превращающего фермента способны вызывать эффект фармакологического прекондиционирования и усиливать кардиопротективное действие локального ишемического прекондиционирования
7. Повышение устойчивости миокарда к ишемии при экспериментальном сахарном диабете 1 типа является проявлением метаболического прекондиционирования; в то же время, эффективность ишемического прекондиционирования при сахарном диабете 1 типа снижена.
8. Ишемическое посткондиционирование оказывает выраженный кардиопротективный эффект в отношении персистирующей фибрилляции желудочков, вызванной постишемической реперфузией, и характеризуется умеренным инфаркт-лимитирующим действием.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Различные варианты прекондиционирования миокарда, включая локальное и дистантное ишемическое прекондиционирование, целесообразно использовать в кардиохирургической клинике для оптимизации защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения, формирующегося при проведении операций, сопровождающихся искусственным кровообращением.
2. Малоинвазивные методы прекондиционирования (с помощью фармакологических агентов и физических факторов) при их регулярном использовании могут быть рекомендованы для повышения устойчивости миокарда к ишемии у пациентов со стабильной и нестабильной стенокардией.
3. Выполнение ишемического посткондиционирования рекомендуется для предотвращения реперфузионного повреждения при осуществлении экстренной реваскуляризации миокарда у пациентов с инфарктом миокарда.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Шляхто Е.В Влияние ингибитора ангиотензин–превращающего фермента спираприла на размер инфаркта и феномен ишемической адаптации миокарда в эксперименте / Е.В. Шляхто, В.А. Цырлин, А.В. Сыренский, Т.Д. Власов, Е.М. Нифонтов, Д.Л. Сонин, М.М. Галагудза // Российский кардиологический журнал. – 2001. – № 6. – С. 60–64.
2. Галагудза М.М. Термостатическая камера для перфузии изолированного сердца / М.М. Галагудза, Т.Д. Власов, Д.И. Курапеев // Свидетельство на полезную модель 18481 RU, МКИЗ 7 А 61 Н 31/00. – 2 с.: ил.
3. Королев Д.В. Кардиомониторинг (Kardio plus) / Д.В. Королев, И.В. Александров, Д Л. Сонин, М.М. Галагудза, А.В. Сыренский, Н.В. Кузьменко, М.Г. Плис // Официальный бюллетень Российского агентства по патентам и товарным знакам «Программы для ЭВМ, базы данных и топологии интегральных микросхем». – 2002. – № 1(38). – ч. 2. – С. 339.
4. Цырлин В.А. Влияние ингибитора ангиотензин–превращающего фермента спираприла на размер экспериментального инфаркта, выраженность ишемических тахиаритмий и ишемическую адаптацию миокарда / В.А. Цырлин, Е В Шляхто, Е.М. Нифонтов, А.В. Сыренский, Т. Д. Власов, Д. Л. Сонин, М.М. Галагудза // Кардиология. – 2002. – Т. 41, № 12. – С. 91–95.
5. Сыренский А.В. Влияние ингибитора ангиотензин–превращающего фермента спираприла на механизмы оптимизации артериального давления / А.В. Сыренский, Д.Л. Сонин, М.М. Галагудза // Артериальная гипертония в ряду других сердечно–сосудистых факторов риска: Материалы 3–ей всероссийской научно–практической конференции. – М., 2002. – С. 227–229.
6. Петрищев Н.Н. Влияние низкочастотного малоинтенсивного ультразвука на сократительную функцию изолированного сердца / Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов, М М. Галагудза, Ю.Н. Маков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 133, № 4. – С. 380–383.
7. Королев Д.В. Программный комплекс для исследования артериального, перфузионного давлений и сигнала ЭКГ / Д.В. Королев, И.В. Александров, М.М. Галагудза, Н.В. Кузьменко, Д.Л. Сонин // Математические методы в технике и технологиях: Сб. трудов XV международной научной конференции. – Тамбов, 2002. – С. 155–156.
8. Vlasov T D. The effectiveness of cardiac ischemic preconditioning at a distance depends on the duration of the remote organ ischemia / T.D. Vlasov, M.M. Galagudza // Acta Physiologica Hungarica. – 2002. – Vol. 89, № 1–3 – P. 126.

9. Сонин Д.Л. Влияние ингибитора ангиотензин–превращающего фермента спираприла на статические и динамические параметры сосудистого тонуса в условиях эксперимента / Д.Л. Сонин, М.М. Галагудза, А.В. Сыренский // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 58–63.
10. Петрищев Н.Н. Автоматизация микроскопического анализа в области медицины (LittleMed) / Н.Н. Петрищев, Т.Д Власов, Д.В. Королев, А.В. Сыренский, И.В. Александров, Д.Л. Сонин, М.М. Галагудза // Официальный бюллетень Российского агентства по патентам и товарным знакам «Программы для ЭВМ, базы данных и топологии интегральных микросхем». – 2003. – № 1. – ч. 4. – С. 8.
11. Петрищев Н.Н. Частотно–зависимые эффекты воздействия малоинтенсивного ультразвука на показатели работы изолированного сердца / Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов, М.М. Галагудза, С.М. Минасян, Ю.Н. Маков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 136, № 3. – С. 239–241.
12. Петрищев Н.Н. Механизмы адаптации миокарда к ишемии / Н.Н.Петрищев, Т.Д. Власов, М.М. Галагудза, М.Э. Колпакова // Медицинский академический журнал. – 2003. – Т. 3, № 3, Прил. – С. 84–85.
13. Galagudza M.M. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm / M.M. Galagudza, D.I. Kurapeev, S.M. Minasian, G. Valen, J. Vaage // European journal of cardiothoracic surgery. – 2004. – Vol. 25, № 6. – P. 1006–1010.
14. Шляхто Е.В. Влияние ингибиторов ангиотензин–превращающего фермента и локальной адаптации к ишемии на ишемическое повреждение миокарда / Е.В. Шляхто, Н.С. Щербак, М.М. Галагудза, Е.М. Нифонтов // Кардиология СНГ. – 2004. – Т. 2, № 2. – С. 154–158.
15. Королев Д.В. Автоматизация физиологического эксперимента, сопровождающаяся регистрацией основных гемодинамических показателей (PhysExp 2) / Д.В. Королев, Е.И. Егорова, И.В. Александров, М.М. Галагудза, А.В. Сыренский // Официальный бюллетень Российского агентства по патентам и товарным знакам «Программы для ЭВМ, базы данных и топологии интегральных микросхем». – 2004. – № 4(49). – С. 142.
16. Петрищев Н.Н. Феномен ишемического постконционирования миокарда: кратковременная ишемия приводит к переходу персистирующей реперфузионной фибрилляции желудочков в синусовый ритм / Н.Н. Петрищев, Т.Д.

Власов, М.М. Галагудза, Д.И. Курапеев, С.М. Минасян // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2004. – Т. 90, № 9. – С. 1138–1144.

17. Galagudza M.M. Reactive oxygen species are not important for myocardial protection evoked by remote preconditioning in the rat / M.M. Galagudza, J. Vaage, G. Valen //14th annual meeting of the scandinavian society for research in cardiothoracic surgery: Abstract book. – Geilo, 2004. – P. 25.
18. Петрищев Н.Н. Ишемическое посткондиционирование миокарда – новый способ защиты сердца от реперфузионного повреждения / Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов, М.М. Галагудза // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2004. – Т. 3, № 11. – С. 68–71.
19. Сыренский А.В. Предпосылки к изучению сердечно-сосудистых эффектов производных фуллерена (литературный обзор) / А.В. Сыренский, М.М. Галагудза, Е.И. Егорова // Артериальная гипертензия. – 2004. – Т. 10, № 3. – С. 151–154.
20. Галагудза М.М. Роль активных форм кислорода в механизмах локального и дистантного ишемического прекондиционирования миокарда / М.М. Галагудза // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 72–78.
21. Шляхто Е.В. Кардиопротективные эффекты феномена ишемического посткондиционирования миокарда / Е.В. Шляхто, М.М. Галагудза, А.В. Сыренский, Е.М. Нифонтов // Кардиология. – 2005. – Т. 45, № 7. – С. 44–48.
22. Шляхто Е.В. Метаболизм миокарда при хронической сердечной недостаточности и современные возможности метаболической терапии / Е.В. Шляхто, М.М. Галагудза, Е.М. Нифонтов, Д.В. Рыжкова, В.А. Цырлин // Сердечная недостаточность. – 2005. – Т. 6, № 4. – С. 148–155.
23. Шляхто Е.В. Ишемическое посткондиционирование миокарда: новый способ защиты сердца от реперфузионного повреждения / Е.В. Шляхто, М.М. Галагудза, А.В. Сыренский, В.А. Цырлин // Терапевтический архив. – 2005. – Т. 77, № 5. – С. 77–80.
24. Шляхто Е.В. Кардиопротективные эффекты высокодозной глюкозо–инсулино–калиевой смеси и ишемического прекондиционирования в эксперименте на модели изолированного сердца крысы / Е.В. Шляхто, Е.М. Нифонтов, Н.С. Щербак, М.М. Галагудза, А.Н. Яковлев // Кардиология СНГ. – 2005. – Т. 3, № 1. – С. 37–41.
25. Маков Ю.Н. Неинвазивное ультразвуковое воздействие на сердце: экспериментальные исследования и возможности практического применения / Ю.Н. Маков, М.М. Галагудза, А.А. Шмонин // Медицинская физика–2005: Мате-

риалы II Евразийского конгресса по медицинской физике и инженерии. – М., 2005. – С. 214–215.

26. Galagudza M.M. Isoflurane and other commonly used anaesthetics do not protect the isolated buffer perfused mouse heart from ischemia-reperfusion injury / M.M. Galagudza, J. Vaage, G. Valen // Clinical and experimental pharmacology and physiology. – 2006. – Vol. 33, № 4. – P. 315–319.
27. Галагудза М.М. Устойчивость миокарда к ишемии и эффективность ишемического прекондиционирования при экспериментальном сахарном диабете / М.М. Галагудза, М.К. Некрасова, Е.М. Нифонтов, А.В. Сыренский // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2006. – Т. 92, № 3. – С 284–291.
28. Шмонин А.А. Изучение среднечастотного малоинтенсивного ультразвука как пускового фактора прекондиционирования миокарда и анализ его механизмов / А.А. Шмонин, К.А. Мищенко, М.М. Галагудза // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы межвузовской конференции молодых ученых. – СПб., 2006. – С 145–146.
29. Галагудза М.М. Влияние ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента зофеноприла и каптоприла на выраженность ранних ишемических желудочковых тахиаритмий при экспериментальном инфаркте миокарда / М.М. Галагудза, И.О. Блохин, А.В. Сыренский, Е.И. Егорова, Е.М. Нифонтов // Вестник аритмологии. – 2006. – № 44. – С. 35–39.
30. Галагудза М.М. Исследование прохождения низкочастотного ультразвука через костно-мышечный фрагмент грудной клетки in vitro / М.М. Галагудза, Ю.Н. Маков, А.А. Шмонин // Медицинская техника. – 2006. – № 5. – С. 31–34.
31. Шляхто Е.В. Противоишемическое и антиаритмическое действие ингибитора ангиотензин–превращающего фермента зофеноприла при острой ишемии миокарда в эксперименте / Е.В. Шляхто, М.М. Галагудза, И.О. Блохин, Е.И. Егорова, Е.М. Нифонтов, А.В. Сыренский, В.А. Цырлин // Артериальная гипертензия. – 2006. – Т. 12, № 3. – С. 237– 242.
32. Петрищев Н.Н. Значение свободных радикалов кислорода в реализации кардиопротективного эффекта локального и дистантного ишемического прекондиционирования / Н.Н. Петрищев, Е.В. Шляхто, В.А. Цырлин, Т.Д Власов, А.В. Сыренский, М.М. Галагудза // Вестник РАМН. – 2006. – № 8. – С. 10–15.

33. Vlasov T.D. Non–ischemic myocardial preconditioning with therapeutic ultrasound / T.D. Vlasov, Y.N. Makov, M.M. Galagudza // Chinese journal of pathophysiology. – 2006. – Vol. 22, № 13 (Suppl.). – P. 38.
34. Kaljusto M.L. Postconditioning in rats and mice / M.L. Kaljusto, T. Mori, S.M Rizvi, M.M. Galagudza, M.L. Frantzen, G. Valen, J. Vaage // Scandinavian cardiovascular journal. – 2006. – Vol. 40. – P. 334–341.
35. Галагудза М.М. Значимость миокардиальных маркеров для оценки кардиопротективной эффективности пре- и посткондиционирования миокарда / М.М. Галагудза, Т.Д. Власов, Л.Ю. Морозова, В.Л. Эмануэль // Клинико-лабораторный консилиум. – 2006. – № 13. – С. 64–69.
36. Галагудза М.М. Влияние локального и дистантного прекондиционирования на частоту возникновения и выраженность экспериментально индуцированных ишемических тахиаритмий / М.М. Галагудза // Вестник РАМН. – 2007. – № 4. – С 12–17.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД	–	артериальное давление
АЛТ	–	аланин–аминотрансфераза
АПФ	–	ангиотензин–превращающий фермент
АСТ	–	аспартат–аминотрансфераза
АФК	–	активные формы кислорода
ДИПК	–	дистантное ишемическое прекондиционирование
ДЛЖ	–	давление в левом желудочке
ЖТА	–	желудочковые тахиаритмии
ИМ	–	инфаркт миокарда
КДД	–	конечно-диастолическое давление
КК	–	коронарный кровоток
КФК	–	креатинфосфокиназа
КФК–МВ	–	МВ изоформа креатинфосфокиназы
ЛДГ	–	лактатдегидрогеназа
ЛДГ1	–	миокардиальная изоформа лактатдегидрогеназы
ЛЖ	–	левый желудочек
ЛИПК	–	локальное ишемическое прекондиционирование
ЛКА	–	левая коронарная артерия
МПМ	–	маркеры повреждения миокарда
ПД	–	пульсовое давление

ПостК	–	посткондиционирование
ПреК	–	прекондиционирование
СД	–	систолическое давление
СД1	–	сахарный диабет 1 типа
УЗ	–	ультразвук
ФЖ	–	фибрилляция желудочков
N–2–МПГ	–	N–2–меркаптопропионилглицин

Подписано в печать 10.04.07 г. Формат 60x84 1/16.
Объем 2 п.л. Тираж 100 экз. Заказ 15.

Типография "СПбМАПО"
191015,СПб.,ул.Кирочная д.41