

УДК 612.17.015.21:616.127-002.4

А.Г. Бабаева, Н.А. Чиж, С.Е. Гальченко, Б.П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА СЕРДЦА ПОРОСЯТ НА НЕКРОЗ МИОКАРДА

Введение экстракта криоконсервированных фрагментов сердца поросят животным с некрозом миокарда способствует восстановлению баланса симпатического и парасимпатических отделов вегетативной нервной системы и увеличению мощности спектра нейрогуморальной регуляции до уровня нормы. При этом наблюдается уменьшение выраженности цитолиза, более ранняя нормализация лейкоцитарной формулы крови и снижение эндогенной интоксикации организма, а эффективность экстракта не ниже, чем у кардиопротекторного препарата Неотон.

Ключевые слова: некроз миокарда, экстракт сердца поросят, вариабельность сердечного ритма, биохимические показатели, лейкоцитарная формула.

Проблема профилактики и лечения острых патологических состояний, связанных с ишемией и некрозом сердечной мышцы, остаётся одной из наиболее актуальных в медицине [1–3]. В настоящее время в клиническую практику внедрены протоколы лечения ишемической болезни сердца, по которым используются препараты, улучшающие коронарный кровоток, а также фармакологические средства, снижающие энергетическую потребность миокарда. Это коронародилататоры, антикоагулянты, антиагреганты и основные субстраты синтеза макроэргов: лактат, глюкоза и др. [1, 3]. Однако названные средства не решают полностью проблему ограничения зоны некроза и слабо влияют на процесс ремодуляции сердца.

Современные клеточные и молекулярные технологии в области кардиомиопластики дают определённую надежду на улучшение результатов лечения инфаркта миокарда, особенно на стимуляцию репаративной регенерации сердечной мышцы в зоне рубцевания [4–8].

Одним из направлений тканевой и клеточной терапии, активно развивающейся в настоящее время, является использование соответствующих пептидов для нормализации процесса физиологической и репаративной регенерации [9–12]. Ранее было показано, что состав пептидных комплексов в экстрактах, полученных из криоконсервированных фраг-

ментов органов свиней и поросят, органо-специфичен, и такие экстракты стимулируют репаративную регенерацию при различных экспериментальных патологических состояниях [13]. В том числе показано, что экстракт криоконсервированных фрагментов сердца поросят способствует нормализации некоторых электрофизиологических показателей состояния сердца при экспериментальном некрозе миокарда [14]. Однако такой подход требует более углублённых экспериментальных исследований.

Цель работы – изучить влияния экстракта криоконсервированных фрагментов сердца поросят на вариабельность сердечного ритма, активность маркерных ферментов в сыворотке крови и выраженность воспалительного процесса при экспериментальном некрозе миокарда.

Материал и методы. Эксперименты выполнены в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), а методы, использованные в работе, одобрены Комиссией по биоэтике ИПКиК НАН Украины.

Работа проведена на 130 беспородных крысах-самцах массой 180–250 г. Крионекроз миокарда моделировали путём воздействия на

© А.Г. Бабаева, Н.А. Чиж, С.Е. Гальченко, Б.П. Сандомирский, 2013

стенку левого желудочка криоинструментом с диаметром аппликатора 3 мм при температуре рабочей поверхности -195°C в течение 15 с. Оперативный доступ осуществляли в 4-е–5-е межреберье [15].

Криоконсервированные фрагменты сердца поросят отогревали, отмывали и инкубировали в физиологическом растворе в течение 60 мин [16]. Концентрацию пептидов определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм.

Животные были разбиты на пять групп по 6 особей в каждой. В 1-ю группу вошли интактные животные (ИГ), во 2-ю – животные после торакотомии без какого-либо воздействия на сердце (Т), 3-ю группу составили крысы с некрозом миокарда (НМ), 4-ю – крысы с некрозом миокарда и введением препарата сравнения Неотон в дозе 20 мг на 100 г, а 5-ю – крысы с некрозом миокарда и введением в брюшную полость на протяжении всего эксперимента экстракта сердца поросят из расчёта 50 мкг пептидов на 100 г массы животного (НМ + ЭСцП).

Электрокардиограммы выполнены с помощью аппаратно-программного комплекса «Полиспектр-8/В» («Нейрософт», Россия). Активность АлАТ, АсАТ и ЛДГ в сыворотке крови определяли с помощью наборов «Фелисит диагностика» (Днепропетровск, Украина). Анализ лейкоцитарной формулы крови проводили на мазках, окрашенных азур-2-эозином по Романовскому–Гимзе, подсчитывая по 500 клеток с помощью световой микроскопии. Индекс сдвига лейкоцитов крови и лейкоцитарный индекс интоксикации модифицированный рассчитывали по методу [17]. Цифровые данные статистически обработали непараметрическим методом.

Результаты и их обсуждение. Исползованная модель некроза миокарда даёт возможность получить прогнозируемую зону криодеструкции с формированием субэпикардального некроза миокарда [18]. Послеоперационных осложнений как в ранние, так и поздние сроки при формировании модели отмечено не было, при этом выживаемость экспериментальных животных составляла 100 %.

На электрокардиограммах всех животных после криовоздействия на миокард наблюдалось снижение амплитуды зубцов R, появление зубца $q \leq R$ и отрицательных зубцов T в I- и avL-отведениях, что свидетельствовало о разви-

тии у животных субэпикардального некроза миокарда. В качестве препарата сравнения было выбрано лекарственное средство Неотон, широко применяющееся в клинической практике при инфаркте миокарда, которое улучшает метаболизм в повреждённом органе, тормозит процесс деструкции сарколеммы ишемизированных кардиомиоцитов и миоцитов, обеспечивает внутриклеточный транспорт энергии. Вследствие улучшения препаратом микроциркуляции уменьшается размер зоны некроза и ишемии. При ишемии и пост-ишемической реперфузии проявляется антиаритмический эффект, что связано с уменьшением эктопической активности желудочков и сохранением физиологической функции клеток волокон Пуркинье.

ЭКГ-изменения в группе с нелеченым некрозом миокарда, отмеченные через сутки после операции, сохранялись на протяжении всего срока наблюдения. Процесс ремоделирования сердца у крыс, которым вводили неотон или экстракт сердца поросят после моделирования некроза миокарда, сопровождался соответствующими изменениями на кардиограммах, которые свидетельствовали о защитном действии исследуемых препаратов: на 14-е сутки в этих группах отмечали снижение амплитуды зубца $q \leq 1/4R$, а также снижение высоты зубца T в соответствующих отведениях.

Сразу после проведения оперативных вмешательств на сердце наблюдалось снижение частоты сердечных сокращений (ЧСС). В дальнейшем во всех опытных группах отмечалось восстановление этого показателя, и начиная с 14-х суток ЧСС достоверно не отличалась от показателей в норме (табл. 1).

Стандартное отклонение (SDNN) является интегральным показателем вариабельности сердечного ритма (BCP), и этот показатель оставался неизменным у животных с торакотомией на протяжении всего срока наблюдения (табл. 1). На 14-е сутки у животных с некрозом миокарда стандартное отклонение оставалось в 2 раза ниже нормы, а в группе животных, которым вводили неотон или экстракт криоконсервированных фрагментов сердца поросят, к этому сроку наблюдения SDNN возвращалось к норме.

У животных подопытных групп на 1-е сутки после операции было выявлено снижение в 2 раза общей мощности спектра нейрогумо-

Таблиця 1. Показатели вариабельности сердечного ритма на 14-е сутки после оперативных вмешательств

Группа животных	ЧСС	SDNN, мс	VLF, мс ²	LF, мс ²	HF, мс ²
1-я (ИГ)	420±25	10,4±0,8	129±58	26±4	15±1
2-я (Т)	417±11	10,1±1,5 [#]	156±52 [#]	65±22 [#]	22±5 [#]
3-я (НМ)	429±20	5,0±2,1*	15±2*	6±1*	4±1*
4-я (НМ+неотон)	425±20	8,2±1,8	123±24 [#]	10±2*	9,2±2 ^{#*}
5-я (НМ+ЭСЦП)	415±25	10,3±2,5	78,7±27 [#]	10±2*	10±1 ^{#*}

Примечание. $p < 0,05$; *различия статистически достоверны в сравнении с нормой; # в сравнении с НМ того же срока наблюдения.

ральной модуляции. Такое транзитное снижение ВСР после моделирования некроза миокарда является реакцией нервной системы на острую фазу некроза миокарда.

В процессе ремоделирования миокарда под влиянием экстракта сердца поросят или неотона начиная с 7-х суток наблюдалось увеличение мощности спектра до полного восстановления этого показателя к 14-м суткам, в отличие от животных с некрозом миокарда (табл. 1).

После моделирования некроза миокарда наблюдалось уменьшение вклада гуморально-метаболической составляющей в спектр и усиление влияния вегетативной регуляции на синусовый ритм, что может свидетельствовать об активации регуляторного влияния со стороны ЦНС. После криодеструкции миокарда отме-

чали изменение симпатовагального баланса в результате усиления влияния парасимпатического звена нервной системы. Введение экстракта сердца поросят способствовало более раннему восстановлению соотношения вклада в спектр симпатического и парасимпатического отделов вегетативной системы по сравнению с другими опытными группами.

Воспалительная реакция в мышце сердца после моделирования некроза миокарда сопровождалась синдромом цитолиза, что отражалось в соответствующей динамике активности исследуемых биохимических маркёров (табл. 2).

Повышения активности АлАТ не наблюдалось, а активность АсАТ в сыворотке крови экспериментальных животных после криодеструкции миокарда увеличивалась в 1,5 раза.

Таблиця 2. Динамика активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови крыс с экспериментальным некрозом миокарда (НМ), ($M \pm m$) мкмоль·ч⁻¹·мл⁻¹

Группа животных	Сутки			
	1-е	7-е	14-е	30-е
<i>АлАТ</i>				
1-я (ИГ)			1,6±0,1	
2-я (Т)	1,6±0,4	1,6±0,3	1,7±0,3	1,6±0,3
3-я (НМ)	1,7±0,2	1,7±0,1	1,7±0,1	2,2±0,6
4-я (НМ+неотон)	1,5±0,1	0,8±0,1	1,3±0,1	1,4±0,2
5-я (НМ+ЭСЦП)	1,4±0,1	0,7±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1
<i>АсАТ</i>				
1-я (ИГ)			2,9±0,2	
2-я (Т)	3,0±0,1 [#]	2,9±0,2 [#]	2,6±0,1 [#]	2,8±0,1
3-я (НМ)	4,4±0,1*	4,1±0,1*	3,2±0,1*	2,9±0,1
4-я (НМ+неотон)	4,4±0,1*	2,3±0,2 [#]	2,5±0,1 [#]	2,3±0,1
5-я (НМ+ЭСЦП)	4,4±0,6*	2,4±0,1 [#]	2,5±0,2 [#]	2,4±0,1

Примечания: 1. ЭСЦП – экстракт криоконсервированных фрагментов сердца поросят.

2. $p < 0,05$; * различия статистически достоверны в сравнении с нормой; # в сравнении с НМ того же срока наблюдения.

Через 7 суток после начала эксперимента активность АсАТ в сыворотке крови наиболее выражено снижалась у крыс, которым вводили неотон или экстракт сердца поросят. На 30-е сутки активность аминотрансфераз во всех группах статистически достоверно не отличалась от нормы.

Выявлено, что после формирования некроза миокарда у крыс всех групп коэффициент де Ритиса увеличивался до 3 при норме 1,8. На 7-е сутки коэффициент де Ритиса уменьшался наиболее выражено в группе крыс, которым вводили экстракт сердца поросят.

В клинической практике для лабораторного подтверждения и изучения динамики протекания инфаркта миокарда обычно определяют общую активность ЛДГ, которая складывается из суммарной активности всех изоформ этого фермента.

Выявлено, что на 1-е сутки после моделирования некроза миокарда у крыс, не получавших лечения, наблюдалось увеличение активности ЛДГ в 3 раза, у крыс, которым вводили неотон, – в 2,4 раза, а у крыс, которым вводили экстракт криоконсервированных фрагментов сердца поросят, – в 2 раза (табл. 3). К 7-м суткам в 5-й группе активность фермента возвращалась к норме.

Диагностическое значение лейкоцитарной формулы крови заключается в том, что она даёт представление о тяжести заболевания и эффективности лечения (табл. 4). У крыс с некрозом миокарда на протяжении всего периода эксперимента наблюдался сдвиг лейкоцитарной формулы влево за счёт увеличенного количества эозинофилов и нейтрофилов. При этом индекс сдвига лейкоцитов крови на 30-е сутки составлял 0,83. Массовый выход гранулоцитов в периферическую кровь связан с развитием асептического воспаления в сердце, и основная роль нейтрофилов заключается в утилизации погибших кардиомиоцитов.

В группе крыс, которым вводили экстракт сердца поросят, в 1-е сутки эксперимента отмечался сдвиг лейкоцитарной формулы вправо за счёт лимфоцитарного звена. Это свидетельствует о напряжённости гуморального звена иммунитета при введении биологически активных веществ (экстрактов). К 7-м суткам этот показатель увеличивался, а на 14-е сутки возвращался к норме.

Использование интегральных показателей эндогенной интоксикации позволяет оценить в динамике состояние различных звеньев иммунной системы, не прибегая к специальным методам исследований [17, 19]. Одним из таких

Таблица 3. Динамика активности ЛДГ в сыворотке крови крыс с экспериментальным некрозом миокарда, (M±m)мккат/л

Группа животных	Сутки			
	1-е	7-е	14-е	30-е
1-я (ИГ)	4,6±0,5			
2-я (Т)	5,3±0,7	5,7±0,5	4,3±0,5	4,7±0,3
3-я (НМ)	11,4±1,1*	8,1±3,7*	7,0±1,0	6,2±0,4
4-я (НМ+неотон)	10,7±2,6*	7,8±1,6	8,9±2,0	7,8±1,6
5-я (НМ+ЭСЦП)	8,2±0,5*	6,4±1,2	4,3±0,4 [#]	4,8±0,5 [#]

Таблица 4. Индекс сдвига лейкоцитов крови крыс с экспериментальным некрозом миокарда

Группа животных	Сутки			
	1-е	7-е	14-е	30-е
1-я (ИГ)	0,45			
2-я (Т)	0,47	0,52	0,43	0,50
3-я (НМ)	0,44	0,53	0,61	0,83
4-я (НМ+неотон)	0,59	0,29	0,46	0,63
5-я (НМ+ЭСЦП)	0,23	0,41	0,52	0,32

показателей является лейкоцитарный индекс интоксикации модифицированный. Его увеличение свидетельствует о росте эндогенной интоксикации организма при заболеваниях, связанных с усиленным распадом тканей и недостаточностью детоксикационной функции на организменном и молекулярном уровнях. Наиболее выраженное увеличение этого индекса наблюдали у крыс с некрозом миокарда (табл. 5). Введение неотона или экстракта сердца поросят способствовало его снижению.

Выводы

1. После введения экстракта криоконсервированных фрагментов сердца поросят на фоне криодеструкции миокарда в процессе ремоделирования сердца мощность спектра нейрогуморальной регуляции увеличивается до нормы и восстанавливается баланс симпатического и парасимпатических отделов вегетативной нервной системы.

2. Введение животным с крионекрозом миокарда экстракта криоконсервированных фраг-

Таблица 5. Лейкоцитарный индекс интоксикации модифицированный крыс с экспериментальным некрозом миокарда

Группа животных	Сутки			
	1-е	7-е	14-е	30-е
1-я (ИГ)	0,42			
2-я (Т)	0,48	0,39	0,44	0,41
3-я (НМ)	0,54	0,68	0,57	0,82
4-я (НМ+неотон)	0,55	0,36	0,52	0,55
5-я (НМ+ЭСЦП)	0,21	0,35	0,44	0,36

При этом количество эозинофилов соответствовало норме. На 3-и сутки в контрольной группе с некрозом миокарда их количество практически в 2 раза превышало норму, а в группе крыс, которым вводили экстракт сердца поросят, нормализовалось начиная с 14-х суток. Введение неотона оказывало несколько менее выраженный эффект.

ментов сердца поросят уменьшает выраженность цитолиза и способствует более раннему восстановлению лейкоцитарной формулы крови и снижению эндогенной интоксикации организма.

3. Эффективность экстракта криоконсервированных фрагментов сердца поросят при экспериментальном некрозе миокарда не ниже, чем у кардиопротекторного препарата Неотон.

Список литературы

1. Бабушкина А.В. Инфаркт миокарда: от фундаментальных исследований – к практическим достижениям // Укр. мед. часопис. – 2009. – Т. 53, № 5. – С. 10–13.
2. Копица Н.П. Быстрая идентификация и прогноз у пациентов с острым коронарным синдромом / Н.П. Копица, Е.И. Литвин // Укр. терапев. журн. – 2011. – № 1. – С. 102–106.
3. Окороков А.И. Лечение болезней внутренних органов: Т. 3, кн. 1. Лечение болезней сердца и сосудов. – М.: Мед. лит-ра, 2002. – С. 48. – 130.
4. Гринь В.К. Посттрансплантологические эффекты аутологичных мезенхимальных стволовых клеток при инфаркте миокарда у крыс после системного введения / В.К. Гринь, В.Ю. Михайличенко // Міжнар. вісник медицини. – 2008. – Т. 1, № 3–4. – С. 174–177.
5. Влияние аутотрансплантации различных клеток костного мозга на функциональное состояние миокарда кролика после инфаркта / В.В. Давыденко, А.А. Матюков, Н.В. Цупкина [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 11, № 2. – С. 52–61.
6. Михайличенко В.Ю. Роль ізогенної клітинної кардіоміопластики при експериментальному інфаркті міокарда / В.Ю. Михайличенко // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – Т. 13, № 1. – С. 90–96.
7. Improving cardiac gap junction communication as a new antiarrhythmic mechanism: the action of antiarrhythmic peptides / S. Dhein, A. Hagen, J. Jozwiak [et al.] // Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. – 2010. – Vol. 381, № 3. – P. 221–234.

8. Xenogenic cardiomyocytes transplantation for the treatment of curing acute myocardial infarction / X. Wang, Z. Guo, Q. Li, J. Lin // *Biologia*. – 2011. – Vol. 66, № 3. – P. 556–561.
9. Влияние эндотелиального фактора роста на постинфарктное ремоделирование миокарда крыс / Н.Н. Дремина, И.А. Шурыгина, Е.Л. Лушникова [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и медицины*. – 2009. – Т. 148, № 9. – С. 330–336.
10. Natriuretic peptides in therapy for decompensated heart failure / N. Gassanov, E. Biesenbach, E. Caglayan [et al.] // *Europ. J. Clinical Pharmacology*. – 2012. – Vol. 68, № 3. – P. 223–230.
11. Myocardial regeneration induced by granulocyte-colony-stimulating factor mobilization of stem cells in patients with acute or chronic ischaemic heart disease: a non-invasive alternative for clinical stem cell therapy? / J. Kastrup, R.S. Ripa, Y. Wang [et. al.] // *Europ. Heart J.* – 2006. – Vol. 27. – P. 2748–2754.
12. Metformin in non-diabetic patients presenting with ST elevation myocardial infarction: Rationale and design of the glycometabolic intervention as adjunct to primary percutaneous intervention in ST Elevation Myocardial Infarction (GIPS)-III Trial / С.Р.Н. Lexis, I.C.C. Horst, E. Lipsic [et al.] // *Cardiovascular Drugs and Therapy*. – 2012. – Vol. 26, № 5. – P. 417–426.
13. Гальченко С.Є. Екстракти кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія / С.Є. Гальченко // *Проблеми кріобіології*. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 403–406.
14. Вплив екстрактів серця на міокард / Г.Г. Бабаєва, Л.А. Рогоза, М.О. Чиж [та ін.] // *Вестник неотложной и восстановительной медицины*. – 2012. – Т. 13, № 1. – С. 16–18.
15. Пат. 53408 Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання інфаркту міокарда / Чиж М.О., Слета І.В., Гальченко С.Є., Сандомирський Б.П.; ІПКіК НАН України. – № u201002820; заявл. 12.03.10; опубл. 11.10.10. Бюл. № 19.
16. Пат. 64381 А Україна, МПК А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів Гальченко С.Є., Шкодовська Н.Ю., Сандомирський Б.П., Грищенко В.І.; ІПКіК НАН України. – № 2003054649; заявл. 22.05.03; опубл. 16.02.04. Бюл. № 2.
17. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях / В.К. Островский, А.В. Машенко, Д.В. Янголенко, С.В. Макаров // *Клин. лаб. диагностика*. – 2006. – № 6. – С. 50–53.
18. Моделирование некроза миокарда с помощью криотехнологии / И.В. Слета, Н.А. Чиж, С.Е. Гальченко, Б.П. Сандомирский // *Біотехнологія*. – 2011. – Т. 4, № 4. С. 73?79.
19. Назаренко Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований // Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун. – М.: Медицина, 2000. – 544 с.

Г.Г. Бабаєва, М.О. Чиж, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський

ВПЛИВ ЕКСТРАКТУ СЕРЦЯ ПОРОСЯТ НА НЕКРОЗ МІОКАРДА

Введення екстракту кріоконсервованих фрагментів серця поросят тваринам з некрозом міокарда сприяє відновленню балансу симпатичного і парасимпатичного відділів вегетативної нервової системи і збільшенню потужності спектра нейрогуморальної регуляції до рівня норми. При цьому спостерігається зменшення вираженості цитолізу, більш рання нормалізація лейкоцитарної формули крові і зниження ендогенної інтоксикації організму, а ефективність екстракту не нижча, ніж у кардіопротекторного препарату Неотон.

Ключові слова: некроз, міокард, екстракт серця поросят, варіабельність серцевого ритму, біохімічні показники, лейкоцитарна формула.

G.G. Babaieva, M.O. Chizh, S.Ye. Galchenko, B.P. Sandomirsky

EFFECT OF PIGLETS' HEART EXTRACT ON MYOCARDIAL NECROSIS

Injection with the extract of cryopreserved piglets' heart fragments to the animals with myocardial necrosis helps to restore the balance of the contribution of sympathetic and parasympathetic divisions of vegetative nervous system and increase the indices of power spectrum of neurohumoral regulation to the standard level. At the same time there is observed a decrease of cytolysis expression, earlier normalization of blood leukogram and reduction of endogenous intoxication, and its efficiency is lower than the Neoton cardioprotective drug.

Key words: necrosis of myocard, extract of piglets' heart, variability of cardiac rhythm, biochemical parameters, leukocytic counts.

Поступила 26.04.13