

УДК 616.127-005.8.016

©Коллектив авторов

**ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО ПРЕПАРАТА ГИСТОХРОМ НА
СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ И МЕТАБОЛИЗМ ИЗОЛИРОВАННОГО
СЕРДЦА КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ «КАЛЬЦИЕВОГО ПАРАДОКСА»,
ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ**

**А.А. ВИНОКУРОВ, В. В.АЛАБОВСКИЙ, В.С.ШУЛЬЖЕНКО, М.В.ИВАНОВА,
А.В.ЛЕБЕДЕВ.**

Воронежская государственная медицинская академия имени Н.Н. Бурденко,
НИИ экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-
производственного комплекса МЗ РФ, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15А,
факс: (095)414-6699, электронная почта: avleb@mail.ru

Проведено сравнительное изучение действия антиоксидантного препарата гистохром на метаболизм и сократительную функцию изолированного сердца крысы в условиях кальциевого парадокса, тотальной глобальной ишемии и реперфузии. Показано, что перфузия изолированного сердца крысы кальций-содержащей средой после 10-мин перфузии в бескальциевой среде вызывала снижение уровня макроэргических фосфатов, выход миоглобина в перфузионный раствор, разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях сердца, развитие контрактуры миокарда. Предварительное введение гистохрома животным приводило к снижению выхода миоглобина, предотвращению сильного падения уровня АТФ и фосфокреатина, сохранению сопряжения окисления и фосфорилирования в митохондриях, и, как результат, к замедлению развития контрактуры при кальциевом парадоксе. Меньший эффект гистохрома наблюдали на модели ишемии-реперфузии изолированного сердца. Сделан вывод, что гистохром обладает кардиопротекторным действием, эффективно защищает сердце от нарушений, вызванных дисбалансом кальция.

Ключевые слова: изолированное сердце крысы, тотальная глобальная ишемия, реперфузия, кальциевый парадокс, митохондрии сердца, антиоксиданты, полигидроксиды, 1,4-нафтохиноны, гистохром, эхинохром, кардиопротективный препарат

ВВЕДЕНИЕ. Во многих исследованиях показано, что развитие реперфузионных повреждений миокарда сопровождается активацией перекисного окисления липидов и нарушением кальций-транспортирующей функции мембранных структур, приводящих к перегрузке кардиомиоцитов свободным кальцием и, как следствие, к нарушению их сократительной функции [1]. В терапии острого инфаркта миокарда применение антагонистов кальция и препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами, направлено на предупреждении подобных нарушений [2].

Фибрилляции желудочков и развитие контрактуры происходят и при перфузии сердца кальций-содержащим раствором после непродолжительной перфузии в бескальциевой среде (так называемый «кальциевый парадокс») [3, 4]. Как и реперфузия после тотальной ишемии, «кальциевый парадокс» приводит к тем же последствиям — кальциевой перегрузке кардиомиоцитов и необратимым повреждениям миокарда, что позволяет использовать модель кальциевого парадокса для поиска и тестирования новых кардиопротективных лекарственных средств и исследования механизма их действия.

Антиоксидантный препарат гистохром предложен для совместного применения с тромболитиками [5, 6]. Активной субстанцией этого препарата является эхинохром — природный полигидроксид-1,4-нафтохинон с выраженным антиоксидантным действием [7, 8]. Гистохром проявил кардиопротекторные свойства в клинических испытаниях при остром инфаркте миокарда [9]. Биохимические механизмы фармакологического действия гистохрома требуют дополнительного изучения.

Целью настоящей работы является исследование действия препарата гистохром на энергетическое состояние митохондрий, повреждение кардиомиоцитов, сократительную функцию изолированного сердца крысы в условиях «кальциевого парадокса», тотальной ишемии и реперфузии.

МЕТОДИКА. Эксперименты проводили на изолированных сердцах белых крыс-самцов Wistar. За 24 часа до эксперимента крысам 1-й (контрольной) группы вводили внутрибрюшинно 0,1 мл физиологического раствора (0,9% хлорид натрия), а крысам 2-й группы — 0,1 мл гистохрома в дозе 1 мг/кг массы («1% гистохром для внутривенного введения» разбавляли физиологическим раствором). Крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку и помещали сердце в охлажденный раствор Рингера-Локка (мМ): NaCl — 140; NaH_2PO_4 — 0,5; KCl — 5,0; трис-ОН — 5 (pH 7,4); CaCl_2 — 2; глюкозы — 11. Перфузию сердца проводили ретроградно через аорту по методу Лангендорфа оксигенированным (95% кислород, 5% CO_2) раствором Рингера-Локка при 37°C с объемной скоростью 10 мл/мин на 1 г массы. Сократительную функцию измеряли в изоволюмическом режиме с помощью латексного баллончика, введенного в полость левого желудочка. В работе использовали электроманометр фирмы «Bentley Lab. Europe» и электронный потенциометр НЗ030-4. Эксперименты проводили через 15 мин после стабилизации сократительной функции.

Глобальную тотальную ишемию создавали прекращением перфузии на 30 мин. Реперфузию проводили в течение 15 минут раствором того же состава. В

контрольной группе было 12 сердец, а в группе с гистохромом – 9. «Кальциевый парадокс» моделировали перфузией бескальциевым раствором с 0,5 мМ ЭДТА в течение 10 мин, а затем - исходным раствором с CaCl_2 в течение 5 мин. По этому протоколу работали с 18 сердцами: 12 контрольной группы и 6 группы с гистохромом.

Концентрацию миоглобина в оттекающем перфузате определяли спектрофотометрически ($\lambda=420$ нм) с помощью проточной кюветы [10], затем рассчитывали суммарное количество миоглобина на один грамм сухой массы, потерянное сердцем при перфузии.

Сердца помещали в жидкий азот после окончания опыта или после 20-мин перфузии (исходное состояние). Тканевые экстракты готовили в 6 % трихлоруксусной кислоте при 0 - 4°C, центрифугировали (3000 g), супернатант нейтрализовали 2 М КОН. Содержание адениннуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ) в тканевых экстрактах определяли общепринятыми ферментативными методами [11]. Концентрацию креатина (Кр) определяли по реакции с α -нафтолом спектрофотометрически [12]. Фосфокреатин (ФКр) вычисляли по разности концентраций суммарного креатина (креатин+фосфокреатин) и креатина. Сухую массу ткани определяли высушиванием при 100 °С в течение 24 ч.

Митохондрии выделяли после окончания перфузии методом дифференциального центрифугирования [13]. Скорость поглощения кислорода определяли с помощью полярографа УП-1 и электрода Кларка, используя среду следующего состава: 200 мМ сахарозы, 10 мМ КСl, 10 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ Трис, 0,2 мМ ЭДТА, pH 7,45; содержание белка было 1 мг/мл. Сопряжение дыхания и фосфорилирования исследовали при добавлении 0,2 мМ АДФ. В качестве субстрата использовали α -кетоглутарат (10 мМ) или смесь глутамата и малата (по 5 мМ). Концентрацию белка определяли биуретовым методом [14].

Сахароза, КСl, NaCl, CaCl_2 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , трис-HCl, ЭДТА, КОН, АТФ, АДФ и АМФ, α -кетоглутарат, глутамат, малат – были производства «Serva», (Германия), ферменты для определения концентраций аденилнуклеотидфосфатов – «Boehringer Mannheim» (Германия), трихлоруксусная кислота, α -нафтол – «Sigma» (США). Препарат «Раствор гистохрома 1% для инъекций» – производства Экспериментального предприятия медико-биологических препаратов КНЦ РАМН, Москва (Россия).

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. «Кальциевый парадокс». Перфузия сердца контрольных животных кальций-содержащим раствором после 10 минут перфузии бескальциевой средой сопровождалась развитием контрактуры миокарда (табл. 1) и выходом миоглобина во внеклеточную среду (493 ± 22 мкг/г сухой массы). Концентрация АТФ и фосфокреатина (ФКр) в экстрактах миокарда при этом снижалась на 71-86 % по сравнению с интактным сердцем (табл. 2). В митохондриях сердца после «кальциевого парадокса» отмечено существенное снижение скорости свободного и нефосфорилирующего дыхания (V_1 и V_4), падение скорости фосфорилирования (АДФ/t) в 14-15 раз в сравнении с митохондриями интактного

сердца, разобщение дыхания и фосфорилирования, уменьшение коэффициента АДФ/О (табл. 3). Таким образом, моделирование "кальциевого парадокса" приводит к развитию контрактуры, выходу миоглобина из клеток, существенному изменению показателей энергетического обмена миокарда.

Таблица 1. Влияние предварительного введения препарата гистохром на параметры контрактуры миокарда при "кальциевом парадоксе"

Условия опыта	Скорость развития контрактуры, мм рт.ст./сек	Давление в левом желудочке (контрактура), мм рт. ст.	
		30 сек от начала реперфузии	60 сек от начала реперфузии
Контроль	4,02±0,06	121,0±1,8	110,1±1,3
Гистохромом	3,61±0,05	101,8±0,8	79,8±0,9
	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Таблица 2. Влияние гистохрома на содержание макроэргических соединений в миокарде крысы (мкмоль/г сухой массы) при "кальциевом парадоксе"

Параметр	Интактное сердце (20)	"Кальциевый парадокс" (без гистохрома) (12)	"Кальциевый парадокс" (с гистохромом) (6)
АТФ	23,5±0,7	6,8±0,1*	14,1±0,4****
АДФ	8,5±0,3	4,56±0,08*	8,7±0,2****
АМФ	1,1±0,1	9,44±0,09*	11,8±1,1**
ФКр	34±2	4,8±0,1*	9,8±3,2
Кр	52±2	35±3*	56,6±4,9***

Примечание: *) p < 0,001 – сравнение с интактным изолированным сердцем; **) p < 0,05; ***) p < 0,01; ****) p < 0,001 – сравнение с контрольной группой без гистохрома. В скобках число экспериментов.

Предварительное введение препарата гистохром (вторая группа животных) замедляло развитие контрактуры изолированного сердца, возникающей в условиях «кальциевого парадокса» (табл. 1), и уменьшало количество разрушенных кардиомиоцитов, которое оценивали по снижению выхода миоглобина в перфузат до 95 мкг/г сухой массы. Концентрация АТФ и фосфокреатина в экстрактах сердец животных с гистохромом была в 2 раза выше, чем в экстрактах сердец животных без гистохрома. Содержание общего креатина снижалось в меньшей степени: от 86,0±3,9 мкмоль/г сухой массы в интактном сердце до 66,4±4,8 мкмоль/г во 2-й группе по сравнению с 39,9±2,7 в контрольной группе (p<0,05) (табл. 2). В митохондриях сердца скорость фосфорилирования, величина дыхательного контроля, отношение АДФ/О были выше соответствующих показателей митохондрий сердца контрольных животных. Важно отметить, что предварительное введение гистохрома способствовало сохранению скорости свободного (V_1) и

фосфорилирующего (V_3) дыхания, дыхательного контроля, скорости фосфорилирования на уровне близком к уровню митохондрий интактного сердца (табл. 3).

Таблица 3. Влияние предварительного введения препарата гистохром на некоторые показатели окислительного фосфорилирования митохондрий изолированного сердца крысы в модели "кальциевого парадокса".

Субстраты окисления	Параметры дыхания и фосфорилирования	Интактное изолированное сердце	"Кальциевый парадокс", контрольные животные	"Кальциевый парадокс", животные с гистохромом
Глутамат + малат (по 5мМ)	V_1	49±1	26±1	41±2
	V_3	172±3	32±1	122±3
	V_4	40±2	28±2	38±4
	ДК	4,1±0,2	1,1±0,1	3,2±0,1
	АДФ/О	3,07±0,05	1,2±0,2	2,8±0,1
	$V_{АДФ}$	422±5	28±12	322±6
α -кетоглутарат (10 мМ)	V_1	87±2	25±1	85±2
	V_3	268±3	27±2	253±3
	V_4	73±2	27±1	82±2
	ДК	3,7±0,1	1,0±0,1	3,0±0,1
	АДФ/О	3,0±0,1	0,6±0,1	2,8±0,1
	$V_{АДФ}$	358±4	26±2	263±3

Примечание: V_1 , V_3 и V_4 (натом O_2 /мин мг белка) – скорости поглощения кислорода в состояниях 1, 3, 4 по Чансу, ДК = V_3 / V_4 – дыхательный контроль по Чансу, АДФ/О – отношения молей фосфорилированного АДФ к атомам поглощенного кислорода, $V_{АДФ}$ (нмоль/мин мг белка) – скорость фосфорилирования. Средние значения рассчитаны по результатам 4-8 опытов.

Таким образом, предварительное введение препарата гистохром способствует сохранению запасов макроэргических соединений в сердце и предотвращает нарушение процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях, уменьшает разрушение клеток (выход миоглобина), вызываемое «кальциевым парадоксом».

Известно, что повреждение кардиомиоцитов при «кальциевом парадоксе» сопровождается активированием липаз и фосфолипаз, накоплением свободных жирных кислот и продуктов перекисного окисления липидов [5, 6]. Это приводит к повреждению мембран, разобщению окисления и фосфорилирования, нарушению процессов выработки энергии в митохондриях.

Действие гистохрома как антиоксидантного препарата может быть связано с предотвращением роста внутриклеточной концентрации свободных жирных кислот и продуктов перекисного окисления липидов. Нельзя исключить, что действие гистохрома связано не только с его антиоксидантными свойствами, но и со способностью оказывать влияние на обменные процессы в кардиомиоцитах.

Ишемия и реперфузия. Результаты, приведенные в таблицах 4 и 5, показывают, что предварительное введение гистохрома крысам увеличивало время от начала ишемии до начала развития ишемической контрактуры в изолированном сердце, снижало абсолютные значения ишемической контрактуры и уменьшало количество реперфузионных аритмий. Таким образом, предварительное введение гистохрома животным приводит к большей устойчивости изолированного сердца к ишемии, что способствует лучшему восстановлению сократительной способности миокарда на стадии реперфузии. Возможно, что большей эффективности препарата можно добиться, вводя гистохром непосредственно во время ишемии (гипоперфузии) или реперфузии миокарда. Это позволило бы увеличить концентрацию антиоксиданта в зоне повреждения миокарда и снизить гибель кардиомиоцитов вследствие окислительного стресса.

Таблица 4. Влияние препарата гистохром на сократительную функцию изолированного сердца крысы при ишемии-реперфузии.

	Исходное состояние (21)	15 мин реперфузии после 30 мин ишемии	
		Контрольные (12)	Гистохром (9)
Диастолическое давление, мм рт.ст.	14±1	59±4*	57±4
Развиваемое давление, мм рт.ст.	120±10	16±4*	45±4***
Частота сокращений сердца, мин ⁻¹	245±20	91±5*	130±13**
Показатель сократительной функции, мм рт.ст./мин	28890±550	1460±30*	5990±50***
Частота реперфузионных аритмий, %		40	10***

Примечания: *) $p < 0,001$ – сравнение с исходным состоянием; **) $p < 0,05$, ***) $p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой без гистохрома. В скобках – число опытов

Таблица 5. Влияние препарата гистохром на развитие контрактуры при 30 мин ишемии изолированного сердца крысы.

	Контроль (12)	Гистохром (9)
Начало развития ишемической контрактуры, мин	8±1	16±1 $p < 0,001$
Максимальная ишемическая контрактура, мм рт.ст.	61±4	44±3 $p < 0,01$

Ишемическое и реперфузионное повреждение миокарда является сложным процессом, включающим разрушение клеточных и субклеточных мембран кардиомиоцитов в результате действия «кислородного парадокса» и «кальциевого парадокса». Сравнивая результаты, полученные на модели «кальциевого парадокса»

и модели «ишемии-реперфузии», можно сделать вывод, что введение гистохрома предупреждает повреждение кардиомиоцитов, связанные с нарушением кальциевого обмена, и в меньшей степени влияет на последствия гипоксии-реоксигенации во время ишемии и последующей реперфузии.

Работа поддержана грантом 98-04-48661 Российского фонда фундаментальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dhalla N.S., Golfman L., Takeda S., Takeda N, and Nagano M.* (1999) *Can. J. Cardiol.* **15**, 587-93.
2. *Rojstaczer, N. and Triggle, D.J.* (1994) *Cardiovasc. Drugs Ther.* **12**, 70-84.
3. *Zimmerman A. N. E., Hulsmann W.C.* (1996) *Nature* **211**, 646—647.
4. *Chapman R. A., Tunsiall J.* (1987) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **50**, 67—96.
5. Новиков В.Л., Ануфриев В.Ф., Левицкий Д.О., Лебедев А.В., Садретдинов С.М., Швилкин А.В., Афонская Н.И., Руда М.Я., Черпаченко Н.М., Максимов О.Б., Еляков Г.В. (1996) Полигидроксн-1,4-нафтахиноны, обладающие свойством протектора миокарда при его ишемии и реперфузии. Бюлл. «Открытия. Изобретения», № 23.
6. *Anufriev, V.P., Novikov, V.L., Maximov, O.B., Elyakov, G.B., Levitsky, D.O., Lebedev, A.V., Sadretdinov, S.M., Shvilkin, A.V., Afonskaya, N.I., Ruda, M.Y., and Cherpachenko, N.M.* (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 587-592.
7. Богуславская Л.В., Храпова Н.Г., Максимов О.Б. (1985) Изв. АН СССР. Сер. хим., № 7, 1471-1476.
8. Лебедев А.В., Богуславская Л.В., Левицкий Д.О., Максимов О.Б. (1988) Биохимия **53**, 598-603.
9. Закирова А.Н., Иванова М.В., Голубятников В.Б., Мищенко Н.П., Кольцова Е.А., Федореев С.А., Красновид Н.И., Лебедев А.В. (1997) Эксперим. клинич. фармакол. **60**, 21-24.
10. *Busselen P.* (1987) *Eur. J. Physiol. (Pfluger's Arch.)* **406**(2), 458-464.
11. *Bergmeyer H.U.* (1974) *Methods in enzymological analysis*, London-N.Y., Acad. Press, pp. 1464-1468, 1777-1779, 2101-2110, 2129-2131.
12. *Eggleton P., Elsdon S.R., and Gough N.* (1943) *Biochem. J.* **37**, 526-529.
13. Алабовский В. В., Винокуров А.А. (1992) Биохимия **57**, 1540-1547.
14. *Gornal A.G., Bardawi C.S., and David M.M.* (1949) *J. Biol. Chem.* **177**, 751-755.

Поступила 27.12.99.

**EFFECT OF HISTOCHROME, AN ANTIOXIDANT DRUG, ON CONTRACTILITY AND
METABOLISM OF ISOLATED RAT HEART IN "CALCIUM PARADOX",
ISCHEMIA AND REPERFUSION**

**A.A. VINOKUROV, V.V. ALABOVSKY, V.S. SHULZHENKO, M.V. IVANOVA,
A.V. LEBEDEV.**

Voronezh State Medical Academy, Studencheskaya Street 10, Voronezh 394622 (Russia);
Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center,
121552 Moscow, 3rd Cherepkovskaya Street 15a;
fax (7-095) 414-6699,
E-mail: avleb@mail.ru

A comparative study of protective effect of a new antioxidant histochrome on isolated rat heart at calcium paradox and ischemia-reperfusion was carried out. Perfusion with Ca-containing solution after 10-min perfusion with Ca-free medium caused depletion of high energy phosphates, loss of myoglobin, uncoupling of mitochondria, increase of left ventricular diastolic pressure. Pretreatment with histochrome led to decrease of cardiomyocyte damage evaluated by myoglobin efflux in perfused solution, attenuation of decrease ATP and phosphocreatine, and coupling of mitochondria. This resulted in a decrease of left ventricular diastolic pressure at calcium paradox. Less effect of histochrome treatment was noted in the case of ischemia-reperfusion model. It was concluded that histochrome effectively prevents heart from abnormalities caused by calcium imbalance in heart.

Key words: isolated rat heart, total ischemia, reperfusion, calcium paradox, antioxidants, polyhydroxy-1,4-naphthoquinones, cardioprotection, histochrome.