

УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ МЕТОДИКА МИКРОДИАЛИЗНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НОРАДРЕНАЛИНА В МИОКАРДЕ КРЫСЫ.

М.А. ГИЛИНСКИЙ, А.А. ФАЙБУШЕВИЧ*, К.Е. ЛАНТЕ*,

Институт физиологии РАН, Новосибирск, Россия

*Университет Канзаса, Лоуренс, США

Уровень норадреналина (НА) рассматривается как один из значимых параметров в оценке функционирования миокарда. Длительные изменения НА, не только могут являться следствием патологических процессов в миокарде, но могут быть и фактором, ответственным за некоторые патологии.

Для исследования содержания НА *in vivo* в миокарде крысы был разработан усовершенствованный метод микродиализного сбора образцов. В работе применялись линейные пробы с полиакрилонитриловой мембраной длиной 5 мм. При калибровке *in vitro* промытой метанолом пробы концентрация НА в перфузате достигала при скорости перфузии 1 мл/мин значений $67,9 \pm 0,4$ % от концентрации в калибровочном растворе. Диализат миокарда собирали в течение 20 мин в пластиковые пробирки, содержащие 10 мкл 0,03-0,1 М хлорной кислоты. Для определения НА в пробах использована высокоэффективная микроколоночная хроматография с двухэлектродной детекцией. Сквозная чувствительность метода достигала 0,3 пикограммов НА в 20 мкл диализата.

По достижении равновесия концентрация НА в диализате миокарда составляла 54 ± 7 пкг/мл. За 20 мин до остановки сердца концентрация НА в диализате миокарда, возрастала в 4-5 раз. Через 40 мин после остановки сердца начинался дальнейший рост концентрации НА до 1-4 нг/мл диализата. Предполагается, что первичное нарастание НА связано с активацией симпатической иннервации сердца при гипоксии мозга. Вторичный рост уровня НА, повидимому обусловлен разрушением мембран симпатических нервов.

Ключевые слова: микродиализ, норадреналин, миокард, крыса, хроматография

ВВЕДЕНИЕ. Уровень норадреналина (НА) рассматривается как один из важных параметров в оценке функционирования миокарда. Значительное увеличение уровня НА отмечено после острой ишемии миокарда [1,2,3]. Длительная ишемия, кардиомиопатия и различные формы сердечной недостаточности сопровождаются существенным снижением как уровня, так и скорости высвобождения НА в миокарде [4,5,6]. Длительное снижение НА, не только может являться следствием патологических процессов в миокарде, но может представлять собой фактор, ответственный за нарастание склонности к аритмиям [5] и за отрицательный эффект на сократимость левого желудочка при сердечной недостаточности застойного характера [7]. Анализ этих данных показывает важность широкого исследования изменений миокардиального НА под влиянием различных физиологических факторов и фармакологических агентов.

Несколько экспериментальных процедур было разработано в последнем десятилетии для исследований кинетики НА *in vivo* при помощи микродиализного

приготовления образцов интерстициальной жидкости миокарда [2,6,8,9,10,11]. За исключением одного автора [11], все остальные предлагают провести исследования на относительно крупных экспериментальных животных: кошках, кроликах или свиньях. В этом случае становится возможным применение микродиализных проб большой длины с высоким процентом восстановления НА в диализате. Однако, серийные эксперименты в таких моделях очень дороги. Мы разработали усовершенствованный метод микродиализного приготовления образцов, с последующим выделением НА при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЖХВД) и малошумящим электрохимическим детектированием (ЭД) на основе двойного электрода. В этой статье описано использование разработанной методики к исследованию НА миокарда при остановке сердца в остром эксперименте. Особенности метода позволяют использовать его после минимальной модификации также и в хроническом эксперименте.

МЕТОДИКА. *Конструкция микродиализной пробы.* В настоящем исследовании использовали линейные микродиализные пробы: коммерческие (LM-5, Bioanalytical Systems Inc. (BAS), США) или приготовленные нами. В обоих случаях активное окно диализа было представлено капилляром из полиакрилонитриловой мембраны (длина 5 мм, внутренний диаметр 240 мкм, внешний 340 мкм, Критическая масса среза 29000, CGH Medical Inc., Lakewood, США). С обеих сторон к мембране приклеивали полиимидные капилляры (внутренний диаметр 160-200 мкм, внешний 200-230 мкм, HV Technologies, Inc. Trenton, США). Эти капилляры использовали для подведения и вывода перфузионной жидкости, их можно заменять самодельными полиэтиленовыми или полипропиленовыми капиллярами. Для обеспечения прочности и несминаемости пробы, а также уменьшения "мертвого объема" внутри пробы и подводящих капилляров вставляли нейлоновое волокно (леска) диаметром 100 мкм.

Процедура промывки пробы была модифицирована нами по сравнению с рекомендованной фирмами BAS (США) и СМА (Швеция). Для удаления глицерина из пор мембраны мы погружали пробу в сосуд с циркулирующей дистиллированной водой и прокачивали через пробу метанол в течение 20 мин при скорости 5 мкл/мин. После метанола в течение 1-2 мин прокачивали воду. Трансмембранный градиент концентрации в системе вода-метанол был максимальным, поэтому высокая интенсивность движения жидкостей через мембрану обеспечивала быструю и полную промывку пробы. Использование этого способа промывки после 1 ч промывки в воде, как рекомендует BAS, дополнительно увеличивало концентрацию НА в диализате на 10-30 %.

Аналитическая процедура. ЖХВД система состояла из насоса Shimadzu LC-6A с контроллером SCL-6A (Shimadzu, Япония), инжектора Rheodyne 9125 с петлей 20 мкл и системы проводящих капилляров, выполненных из материала PEEK. Образцы хроматографировались при помощи колонки UniJet PEEK (100 мм x 2 мм) упакованной 3 мкм обращеннофазовым сорбентом ODS (BAS). Электрохимическое детектирование осуществлялось двойным электродом с диаметром рабочих, стеклоуглеродных пластин 3 мм в последовательном включении по отношению к потоку элюента. Потенциалы верхнего и нижнего по течению элюента электродов устанавливались соответственно +0,6 В и +0,02 В относительно референтного электрода Ag/AgCl. В качестве потенциостатов и усилителей тока использовали контроллеры LC-4B (BAS).

Подвижная фаза состояла из 0,04 моль одноосновного фосфата натрия, 0,04 моль лимонной кислоты (оба Fisher Scientific, США), 80 мг EDTA (Aldrich, США) и 500 мг октилсульфоната натрия (Sigma, США) на 1 литр pH подвижной фазы доводили до 4,8 при помощи 6М NaOH. Метанол (Fisher), дополнительно дистиллированный, добавлялся до концентрации 9-10 % (v/v). Подвижную фазу фильтровали через нейлоновые фильтры 0,2 мкм и дегазировали вакуумом. Скорость прокачивания элюента составляла 0,15-0,20 мл/мин. Чувствительность электрохимического детектора удалось

увеличить почти вдвое, путем использования тонких электродных прокладок (16 мкм, BAS). Пульсации, связанные с обратным движением поршня насоса, в этой электродной системе существенно возрастали. Оказалось возможным уменьшить их, понижая фоновый ток электрода. С этой целью дистиллированная, деионизованная вода для подготовки подвижной фазы использовалась после дополнительной дистилляции из раствора марганцевокислого калия (1-2 г/л). Эта процедура, позволяла уменьшить фоновый ток второго по течению (измерительного) электрода, до значений 0,3-0,7 наноампер. Сквозная чувствительность системы была определена на уровне 0,3 пикограмма НА в 20 мкл образце (отношение сигнал/шум 2:1).

Калибровка микродиализных проб.

Для выполнения процедуры калибровки микродиализные пробы помещались в цилиндрический тест-сосуд с раствором Рингера, перемешиваемый при 37° С, и содержащий 2 нг/мл НА. Проба перфузировалась раствором Рингера со скоростью 1 мкл/мин. Диализат собирался в течение 20 мин в полипропиленовые (полиэтиленовые) пробирки емкостью 200 мкл, содержащие 10 мкл раствора 0,03-0,1М хлорной кислоты. Хлорная кислота использовалась для предотвращения деградации НА. С этой же целью раствор стандарта в тест-сосуде непрерывно продувался гелием. Эффективность работы микродиализной пробы выражалась как отношение в процентах концентрации НА в собранном диализате к содержанию его в тест-сосуде (recovery).

Измерения показали, что после 20 мин промывки метанолом пробы с длиной полиакрилонитриловой мембраны 5 мм эффективность (recovery) ее достигает 55-70% (67.9 ± 0.4 %, $n=4$). При тестировании *in vitro* пробы после 8-10 ч ее работы в миокарде мы не выявили снижения эффективности пробы по норэпинефрину. Этот факт позволил повторно использовать одну и ту же пробу.

Процедура вживления микродиализной пробы.

Крыс-самцов Sprague-Dawley ($n=7$) весом 350-400 г. анестезировали ингаляцией 1 % изофлурана, а затем переводили на внутримышечный кетамин/зилазиновый хирургический наркоз (150 мг/кг/10 мг/кг). Анестезию поддерживали периодическим введением 50 мг/кг кетамина по мере надобности. Искусственное дыхание осуществлялось окружающим воздухом при помощи аппарата (Model 683 Rodent Respirator, Harvard Apparatus).

Были сопоставлены два возможных подхода к сердцу для вживления пробы. Для первой процедуры у животного, лежащего на спине, делался центральный разрез, и грудная полость открывалась с помощью ретрактора. Линейная микродиализная проба вживлялась в ткань миокарда в районе левой нисходящей коронарной артерии. Направляющей канюлей служила инъекционная игла калибра 25 (наружный диаметр 0,6 мм, внутренний 0,4 мм). Во второй процедуре животное находилось в боковой позиции. Разрез выполняли между пятым и шестым ребрами левой стороны тела. После обнажения сердца микродиализную пробу вживляли в ту же область, что и в первой процедуре. Для предотвращения свертывания крови внутривенно вводили гепарин (200 U/кг). После вживления пробы подводящий и отводящий капилляры приклеивались к ткани миокарда медицинским клеем. Сбор образцов диализата для определения временных характеристик выделения НА в интерстициальное пространство начинали немедленно после вживления и продолжали с частотой 1 раз в 20 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ. *Норэпинефрин миокарда при остановке сердца.* Начальная концентрация НА в диализате овала была в относительно широком диапазоне 0,2-0,8 нг/мл (среднее $0,52 \pm 0,16$). Резкое снижение концентрации НА начиналось сразу после вживления. Устойчивые значения концентрации НА отмечали через 1,0-1,5 часа регистрации. Среднее значение базового уровня НА составило 54 ± 7 пкг/мл (рис.1). После стабилизации базового уровня НА выполняли эксперименты продолжительностью до 11 ч.

Остановка сердца вызывалась рециркуляцией выдыхаемого воздуха и следовала за началом рециркуляции с задержкой 40-120 мин. За 40-60 мин до остановки сердца в 5 случаях из 7 регистрировалось увеличение концентрации НА в диализате миокарда. Немедленно после остановки сердца проявлялся дальнейший существенный рост концентрации НА в диализате миокарда вплоть до значений 1-4 нанограммов/мл (рис. 2). Динамика изменения концентрации НА в течение эксперимента приведена на рис. 3.

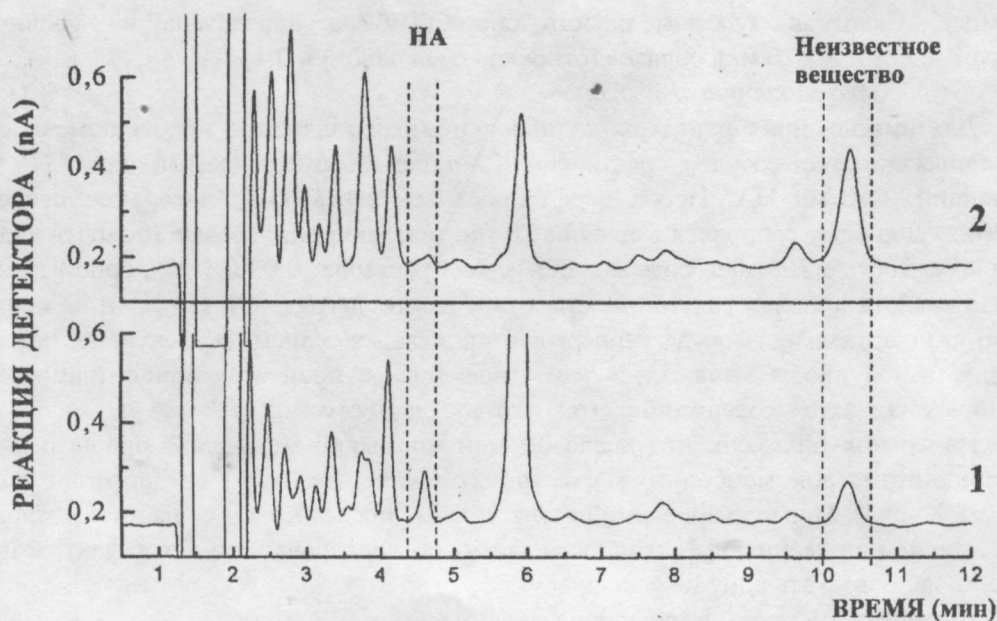


Рисунок 1.

Норадреналин диализата миокарда крысы.

1 - 20 мин. после вживления пробы в миокард; 2 - 80 мин после вживления пробы.

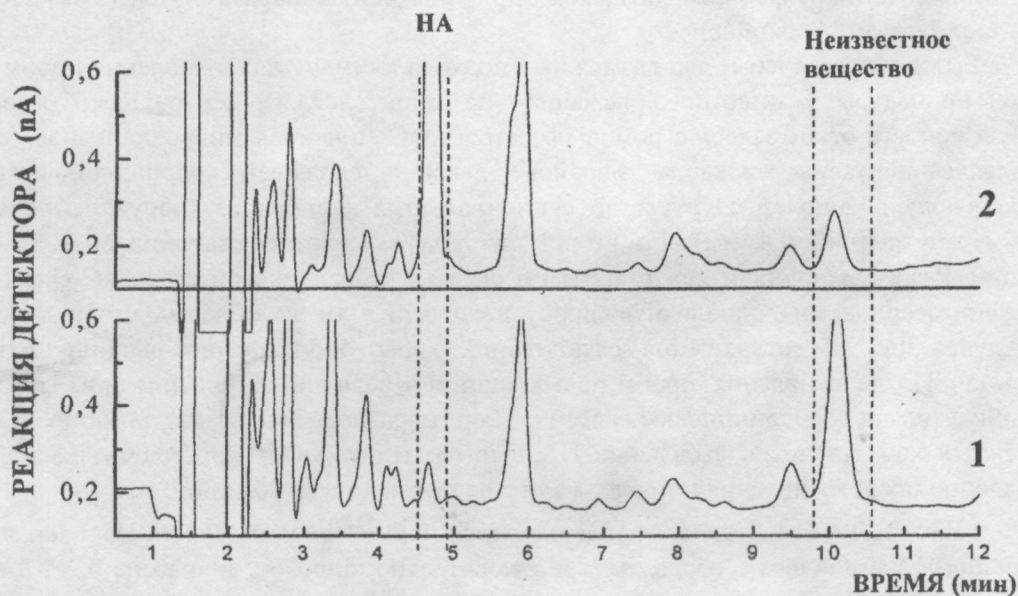


Рисунок 2

Хроматограммы диализата миокарда крысы

1 - 20 мин. до остановки сердца; 2 - 40 мин. до остановки сердца.



Рисунок 3.

Динамика изменения концентрации норадреналина в диализате миокарда крысы в эксперименте с остановкой сердца

Драматические изменения концентрации как функция остановки сердца обнаружены для неидентифицированного компонента интерстициальной жидкости миокарда (рис.2, рис.3). Концентрация этого вещества возрастала перед остановкой сердца подобно концентрации НА. Однако, после остановки содержание этого вещества снижалось до прежних величин. Нами были протестированы хроматографически метаболиты НА: 4-гидрокси-3-метоксифенилгликоль и 3,4-диоксифенилгликоль, а также такие вещества как допамин, гомованилиновая и 5-оксииндолуксусная кислоты. Время удерживания этих стандартов на колонке отличалось от такового для эндогенного вещества, обнаруженного в диализате миокарда.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проведенные эксперименты показывают что модификация процедур промывки пробы и ЖХВД ЭД определения НА ведет к увеличению чувствительности метода. Усовершенствования методики позволили использовать в работе микро-диализные пробы малого размера и выполнить работу на миокарде крысы. Среди методических проблем, возникавших при отработке методики, наиболее трудной была проблема устранения паразитного пика, время от времени появлявшегося во временном интервале НА. Этот пик проявлялся после инъекции в хроматограф растворителя для стандартов (2 части раствора Рингера, 1 часть - 30 мМ хлорной кислоты), а также 0,1 М хлорной кислоты, но не воды. Этот пик можно было удалить или заметно уменьшить, промывая колонку в последовательности: вода-метанол-хлороформ-метанол-вода, по 5-10 мл каждого.

Базовый уровень НА не отличался значимо от зарегистрированного ранее в миокарде кошек [8,12]. Мертес и соавторы [10] наблюдали несколько более высокие уровни внесклеточного НА в миокарде свиней, но в том же субнанограммовом диапазоне. В литературе описаны и концентрации в диапазоне нмоль/мл [11]. В этом случае различие концентраций на три порядка скорее всего результат различий либо в записи концентраций, либо в процедуре калибровки.

Рост концентрации НА в диализате происходил в две стадии. Во время первой стадии, до остановки сердца, содержание НА возрастало в 2-4 раза. В качестве

возможного источника НА может быть интенсивный выброс медиатора из симпатических нервных окончаний при развитии гипоксии мозга. Природа этого увеличения концентрации главным образом экзоцитотическая. Вторая стадия выброса НА развивалась после остановки сердца и приводила к увеличению концентрации НА на 2-3 порядка.

Нам представляется, что вторая стадия имеет неэкзоцитотическую природу и не связана с симпатической иннервацией [10]. Концентрация НА в интерстициуме миокарда после остановки сердца близка к концентрации в гомогенате миокарда, измеренной нами при помощи ВЖХ-ЭД [13]. Этот второй подъем концентрации НА вероятно отражает разрушение мембран симпатических нервов.

Работа финансировалась частично: 1) Грантом Национального Исследовательского Совета США по программе Cooperation in Applied Science and Technology (CAST) за 1996 г.; 2) Грантом фирмы Procter & Gamble.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Carlsson L., Abrahamsson T. and Almgren O. (1985) J. Cardiovasc. Pharmacol. 7, 791-798.
2. Shindo T., AkiJama T., Yamazaki T., and Ninomiya T. (1994) J. Auton. Nerv. Syst. 48, 91-96.
3. De Jong J.W., Cargnoni A., Bradamante S., Curello S., Janssen M., Pasini E., Ceconi C., Bunger R., Ferrari R. (1995) Journ. Mol. Cell. Cardiol. 27, N.1, 659-671.
4. Regitz V., Leuchs B., Bossaller C., Sehested, M., Rappolder, E. Fleck (1991) Eur. Heart J. 12, Suppl. D.P. 171-174.
5. Zipes D.P. (1992). G. Ital. Cardiol. 22, N.5, 615-621.
6. Shindo T., AkiJama T., Yamazaki T. and Ninomiya I. (1996). Am. J. Physiol. 270, (heart Circ. Physiol, 39). H245-H251.
7. Ikeda J., Haneda T., Kanda H., Hiramoto T., Furuyama M., Sakuma T., Shirato K., Takishima T. (1991) J. Auton. Nerv. Syst. 34, N.2-3, 231-238.
8. AkiJama T., Yamazaki T., and Ninomiya I. (1991). Am. J. Physiol. 261, H1643-H1647.
9. Mertes P.M., Carteaux J.P., Jaboin Y., Pinelli G., El Abassi K., Dopff C., Atkinson J., Villemot J.P., Burlet C., Boulange M. (1994). Transplantation. 57, 371-377.
10. Kuzmin A.T., Tskitishvili O.V., Serebryakova L.T., Saprygina T.V., Kapelko V.T., Medvedev O.S. (1992). J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, N. 6, 961-968.

**AN IMPROVED TECHNIQUE OF MICRODIALYSIS SAMPLING
AND HPLC-ED ANALYSIS OF THE RAT
MYOCARDIAL NOREPINEPHRINE**

M. A. GILINSKY, A. A. FAIBUSHEVISH,* C. E. LUNTE*

Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

*University of Kansas, Lawrence KS, USA

A level of myocardial norepinephrine (NE) is considered as one of the meaningful parameters in the estimation of myocardium functioning. Long lasting changes of myocardial NE appear to be not only a sequence of pathologic processes in myocardium, but could also be a factor responsible for some diseases. An improved microdialysis sampling technique with HPLC-ED analysis was developed to measure *in vivo* NE content in a rat myocardial interstitium. Linear polvacrylonitril 5 mm probes were flushed with methanol while being immersed in water. *In vitro* NE recovery with the flow rate of perfusate was found at the level $67.9 \pm 0.4\%$. Probes were implanted into the rat myocardium under the general anaesthesia. Myocardial dialysate was collected during 20 min into plastic vials, containing 10 μ l of 0.1 M perchloric acid. Low noise, high sensitivity dual electrochemical detection was used for the determination of NE amount in the samples. Overall sensitivity threshold was found about 0.3 pg of NE in 20 μ l. Steady state concentration of NE in myocardial dialysate was found 54 ± 7 pg/ml. 20 min before cardiac arrest the concentration of NE in myocardial dialysate was found to be increased 4-5 times. 40 min after cardiac arrest further increase in NE content was registered up to 1-4 ng per ml of perfusate. It is suggested that the method will be useful for routine study of myocardial NE.

Key Words: microdialysis, noradrenaline, myocardium, rat, chromatography.