

УДК 616—005.4+542.978:577.155.2.004.3

А. И. Кузьмин, В. С. Шульженко, О. С. Медведев, В. И. Капелько

Влияние нитробензилтиоинозина, накопленного сердцем крыс и морских свинок, на высвобождение продуктов распада адениннуклеотидов при ишемии и реперфузии

Ишемическое сердце при реперфузии теряет значительное количество продуктов распада адениннуклеотидов (ПРАН) — аденозина, инозина, гипоксантина [1, 2] — и тем самым лишается субстратов, необходимых для эффективного ресинтеза адениннуклеотидов [3]. Поэтому представляет интерес исследовать защитный эффект препаратов, которые могут блокировать выход ПРАН из клеток. К таким препаратам относится нитробензилтиоинозин (НБТИ) — эффективный и селективный ингибитор нуклеозидного транспорта [6, 15, 20]. Известно, что характеристики связывания НБТИ с переносчиком нуклеозидов на мембранах кардиомиоцитов отличаются видовой специфичностью [6, 20]. В связи с этим влияние НБТИ на высвобождение продуктов распада адениннуклеотидов при ишемии и реперфузии мы исследовали на сердце двух видов животных: морских свинок и крыс, причем была изучена также кинетика накопления НБТИ при его введении в перфузат перед созданием тотальной ишемии.

Методика

Опыты выполняли на сердце морских свинок (14 животных) и крыс (14 животных) массой 200—300 г, наркотизированных уретаном (1,0—1,5 г/кг). Изолированное сердце перфузировали по Лангендорфу (через аорту) раствором Кребса (рН 7,3—7,4; Т 37 °С, постоянная объемная скорость 14—21 мл/мин) с помощью перистальтического насоса Masterflex (США). Удельная скорость коронарного протока составляла около 13 мл·мин⁻¹·ч⁻¹ для сердца морских свинок и около 19 мл·мин⁻¹·ч⁻¹ для сердца крыс. В полость левого желудочка вводили латексный баллончик, заполненный жидкостью. В условиях постоянной электрической стимуляции сердца частотой 4 Гц (стимулятор фирмы «Grass» S44, США) регистрировали давление в полости изоволюмического левого желудочка (монитор SP 1405 и регистратор 2010 фирмы «Gould Statham», США), а также перфузионное давление в аорте (электроманометр «Gould Statham» 23 Db и регистратор 2200 фирмы «Gould Brush», США). Показателем сократительной функции сердца в этих условиях было развиваемое давление, представляющее разность между значениями систолического и диастолического давления в полости левого желудочка.

После 30-минутного периода перфузии, необходимого для стабилизации сократительной функции, производили быстрое переключение на другую перфузионную систему, с помощью которой через сердце с прежней скоростью перфузировали раствор Кребса, содержащий НБТИ (препарат фирмы «Sigma», США), либо (в контрольных сериях опытов) просто раствор Кребса. Продолжительность этого периода перфузии составляла 20 мин. Затем перекрывали на 25 мин аортальную канюлю, т. е. полностью останавливали проток через миокард, создавая таким способом тотальную ишемию сердца. Период реперфузии длился 30 мин. В сериях с введением НБТИ в течение первых 15 мин реперфузии в состав перфузата входил и препарат. Затем перфузировали только контрольным раствором.

Так как НБТИ имеет ограниченную растворимость в воде, то для приготовления перфузирующего раствора, содержавшего этот препарат, брали такую его навеску, при полном растворении которой в растворе Кребса соответствующего объема концентрация НБТИ составила бы 5 нмоль/мл. Растворение происходило при нагревании до 40 °С и перемешивании в течение 20—30 мин. Затем раствор фильтровали через мембранный фильтр (марки Nylon-66), размер пор которых составлял 0,2 мкм, и из фильтрата отбирали пробу (1 мл) для анализа концентрации НБТИ.

С целью исследования кинетики захвата НБТИ миокардом крыс (5 животных) или морских свинок (6 животных) его концентрацию определяли также в пробах перфузата, прошедшего через коронарные сосуды, за 0,5; 1, 2, 3, 5, 10, 15 и 20 мин перед созданием ишемии (после начала введения препарата). Продолжительность отбора проб перфузата составляла 10 с. Концентрацию НБТИ определяли с помощью ВЭЖХ по методике, практически идентичной методике определения продуктов распада адениннуклеотидов [1] за исключением состава подвижной фазы: в ней содержание метанола было увеличено до 50 %. В таких хроматографических условиях время удерживания НБТИ составляло 4,5 мин. При введении в хроматографическую систему 100 мкл пробы перфузата предел определения концентрации НБТИ составлял около 80 пмоль/мл.

Зависимость концентрации НБТИ в перфузате, прошедшем коронарные сосуды (С), от продолжительности перфузии с этим препаратом (t) описывалась уравнением, приведенным в работе Gillis и Kates [9], но в следующей модификации:

$$C = (C_0 - B) [1 - \exp(-K_d \cdot t)] + B, \quad (1)$$

где C_0 — концентрация НБТИ в перфузате, притекающем к миокарду. В — константа, имеющая размерность концентрации, K_d — константа скорости захвата миокардом НБТИ.

Количество препарата, накопленного миокардом по достижении стационарного состояния (A_{ss}), рассчитывалось по следующей формуле:

$$A_{ss} = Q/P (C_0 \cdot t_{ss} - S), \quad (2)$$

где a — скорость перфузии, P — масса влажного сердца, t_{ss} — 20 мин, S — площадь под кинетической кривой $C=f(t)$, найденная по методу трапеций.

В реперфузионный период собирали следующие три фракции перфузата: 1-ую — в течение первых 7 мин, 2-ую — с 8-й по 15-ю минуту и 3-ю — с 16-й по 20-ю минуту реперфузии. Последняя фракция собиралась только в опытах с введением НБТИ. Во всех этих фракциях, а также в образцах перфузата, собиравшихся непосредственно перед ишемией, определяли содержание продуктов распада адениннуклеотидов: аденозина (АДЗ), инозина (ИНЗ) и гипоксантина (ГПКС), используя метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при УФ-детектировании [1]. В опытах на сердце морских свинок в предишемической и первой реперфузионной фракциях методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием определяли также уровень норадреналина (НА) [1, 2].

Количественные результаты в работе приведены в следующем виде: «среднее значение плюс-минус стандартная ошибка среднего». Выброс НА (за 7 мин реперфузии) и катоболитов адениннуклеотидов (за 15 мин реперфузии) рассчитывали на 1 г массы влажного сердца. Сравнение результатов проводили на основании критерия t Стьюдента.

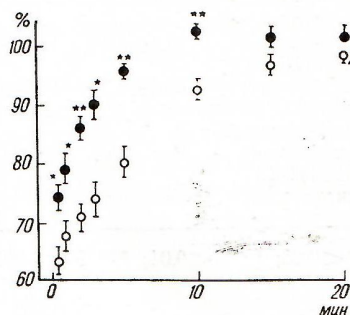
Результаты

При перфузии изолированного сердца раствором Кребса, содержавшем НБТИ, во всех экспериментах достигалось стационарное состояние, соответствующее равенству значений концентрации препарата в перфузате до и после его прохождения через коронарные сосуды. Однако такое состояние у крыс достигалось примерно через 10 мин перфузии, а у морских свинок — почти через 20 мин (рисунок).

В состав уравнения (1), описывавшего кинетику накопления НБТИ сердцем крыс и морских свинок, в отличие от приведенного в работе Gillis и Kates [9] для кинетики захвата антиаритмического препарата пропафенона изолированным сердцем кроликов, входил дополнительный параметр В, не имевший видовых различий (табл. 1). Его появление, по-видимому, означает, что часть НБТИ просто «проскакивала»

миокард, не успевая или не имея возможности войти в контакт с местами связывания. Следует ожидать, что значение концентрации «проскочившего» НБТИ(В) должно существенно зависеть от кинетических условий перфузии, т. е. от создаваемой удельной скорости коронарного протока Q/P . И если бы проток был в 4—6 раз ниже, как в случае с пропafenоном [9], то значение концентрации «проскочившего» НБТИ, возможно, так же было бы равным нулю, т. е. «проскока» бы не было.

Остальные параметры кинетики захвата НБТИ сердцем имели четкие видовые отличия: более высокая степень накопления НБТИ в сердце крыс соче-



Кинетика накопления нитробензилтиоинозина (НБТИ) сердцем морских свинок (1) и крыс (2). По оси ординат — относительная концентрация НБТИ в перфузате после его прохождения через коронарные сосуды; по оси абсцисс — время перфузии с НБТИ. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$ по отношению к соответствующим значениям для морских свинок.

талась с меньшим накоплением препарата (см. табл. 1). Хотя концентрация НБТИ в перфузате, притекавшем к сердцу (C_0), в серии опытов на морских свинках (7 животных) была несколько выше, чем в серии опытов на крысах (7 животных) — $3,162 \pm 0,011$ и $2,435$ нмоль/мл $\pm 0,311$ нмоль/мл соответственно, степень накопления препарата миокардом (A_{ss}/C_0) у морских свинок была, как и абсолютное накопление, значительно больше, чем у крыс.

Введение НБТИ не влияло на скорость высвобождения продуктов распада адениннуклеотидов (ПРАН) и норадреналина (НА) в пред-ишемический период перфузии: значения скорости высвобождения были незначительными, почти одинаковыми для сердца крыс и сердца морских свинок, и соответствовали имеющимся в литературе данным [1, 2]. Однако у морских свинок под действием НБТИ при реперфузии после ишемии значительно снижался выброс сердцем НА, ИНЗ, ГПКС и ПРАН (в сумме). У крыс этот эффект был менее отчетливо выражен (табл. 2). Выброс же АДЗ сердцем морских свинок имел тенденцию к увеличению, а сердцем крыс — достоверно увеличивался. Нуклеозиды (АДЗ и ИНЗ в сумме) составляли около 90 % общего выброса ПРАН во всех сериях опытов (см. табл. 2).

В серии опытов с введением НБТИ концентрация ПРАН во фракции перфузата, собиравшегося с 16-й по 20-ю минуту реперфузии (т. е. после переключения на перфузию контрольным раствором) была, как и в серии опытов без препарата [2], достоверно ($P < 0,05$) меньше, чем во фракции перфузата, собиравшегося с 8-й по 15-ю минуту реперфузии. Таким образом, НБТИ, обладающий блокирующим действием на ну-

Таблица 1. Кинетика накопления нитробензилтиоинозина (НБТИ) изолированным сердцем морских свинок и крыс

Параметр кинетики накопления	Морские свинки (6 животных)	Крысы (5 животных)
Константа скорости захвата НБТИ, мин ⁻¹	$0,154 \pm 0,018$	$0,520 \pm 0,124^*$
Концентрация НБТИ: «проскочившего», нмоль/мл	$1,90 \pm 0,10$	$1,56 \pm 0,21$
накопленного по достижении стационарного состояния, нмоль/г	$90,8 \pm 6,9$	$39,7 \pm 8,5^{**}$
Степень накопления НБТИ, мл/г	$28,7 \pm 2,3$	$16,0 \pm 2,1^{**}$

* $P < 0,02$; ** $P < 0,01$ относительно значения соответствующего параметра для сердца морских свинок.

Таблица 2. Влияние нитробензилтиоинозина (НБТИ) на выброс при реперфузии ишемизированного сердца морских свинок и крыс норадреналина (НА), аденозина (АДЗ), инозина (ИНЗ), гипоксантина (ГПКС) и суммы продуктов распада адениннуклеотидов (ПРАН)

Условие опыта	НА, пмоль/г	АДЗ, нмоль/г	ИНЗ, нмоль/г	ГПКС, нмоль/г	ПРАН, нмоль/г
Морские свинки					
контроль (7 животных)	52,4±13,6	11,9±8,1	602,6±107,6	131,3±16,2	745,9±124,8
НБТИ (7 животных)	18,5±4,3*	17,5±5,4	165,4±16,2***	35,7±4,8***	216,2±19,2***
Крысы					
контроль (7 животных)	Нет свед.	18,3±11,7	932,0±118,2	112,8±15,5	1063,1±125,8
НБТИ (7 животных)	Нет свед.	59,0±6,8**	552,5±52,5*	49,6±8,6**	665,6±63,8*

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ относительно соответствующего значения в контрольной серии.

клеозидный транспорт, к 16-й минуте реперфузии не «удерживал» в миокарде дополнительно сколько-либо значительного количества ПРАН, которое могло бы перейти в перфузат при дальнейшей отмывке от препарата контрольным раствором.

Введение НБТИ не вызывало на всем протяжении эксперимента изменений диастолического и развиваемого давления (по сравнению с соответствующей контрольной серией опытов). В сердце морских свинок в ответ на введение препарата отмечалось уменьшение перфузионного давления на 18 мм рт. ст. ± 3 мм рт. ст. В начале реперфузии действие НБТИ проявлялось, когда не было прироста перфузионного давления, который наблюдался в контрольных опытах. Указанных эффектов НБТИ не наблюдалось в опытах, проведенных на сердце крыс.

Обсуждение

В исследовании взаимодействия НБТИ, меченного ^3H , с местами переноса нуклеозидов на мембранах кардиомиоцитов были обнаружены [6, 20] видовые различия характеристик специфического насыщаемого связывания препарата: аффинность НБТИ к местам связывания у крыс была выше, а максимальная емкость связывания — меньше, чем у морских свинок. К такому же выводу можно прийти и на основании результатов анализа кинетики накопления НБТИ изолированным сердцем крыс и морских свинок (см. табл. 1): более высокие значения K_d у крыс указывают на более высокую аффинность НБТИ к местам связывания, а меньшие значения A_{ss} и A_{ss}/C_0 — на пониженную плотностью связывающих мест у этих животных.

Накопленный сердцем НБТИ, как и ожидалось, оказывал ингибирующее действие на общий выброс продуктов распада адениннуклеотидов (ПРАН) при реперфузии после тотальной ишемии, причем эффект препарата более четко проявлялся у морских свинок, количество накопленного НБТИ у которых было значительнее, чем у крыс (см. табл. 1, 2). Хорошо известно, что эффективное замедление катаболизма адениннуклеотидов при ишемии под действием большинства известных защитных агентов достигается лишь в результате существенного снижения ими предишемической сократительной функции сердца [1, 12, 19] и значит — интенсивности энергозапроса. НБТИ не обладал отрицательным инотропным действием, поэтому его влияние на выброс ПРАН, по-видимому, непосредственно обусловлено его свойством блокировать транспорт нуклеозидов.

Использование в работе относительно большой концентрации НБТИ [6] и достижение в ходе введения препарата стационарного состояния

(см. рисунок) дают основание предположить, что к моменту начала ишемии (и далее) связывание НБТИ с переносчиками нуклеозидов на мембранах кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток было насыщено. Поэтому при ишемии и реперфузии основным механизмом транспорта ПРАН из кардиомиоцитов во внеклеточное пространство, а из него — в коронарный отток должна была являться, по-видимому, пассивная диффузия, обусловленная градиентом концентрации. Тогда отношение общего выброса ПРАН в серии с введением НБТИ к общему выбросу в контрольной серии может дать оценку вклада механизма пассивной диффузии в выброс ПРАН при реперфузии ишемизированного миокарда. По этой оценке он составил 29 % для сердца морских свинок и 63 % — крыс. В исследовании захвата АДЗ тканью желудочка при инкубации в нормоксических условиях с $[^3\text{H}]$ -АДЗ без добавления и при добавлении блокатора нуклеозидного транспорта были получены очень близкие к найденным значения доли неингибируемого захвата: 28 % — для морских свинок и 67 % — для крыс [20]. Отношение найденных долей ингибируемого НБТИ выброса ПРАН для сердца крыс и свинок (0,52) не отличалось заметно от отношения степеней накопления препарата (0,56), что указывает на близкую в обоих случаях эффективность ингибирования НБТИ нуклеозидного транспорта. Таким образом, видовое различие в ингибировании НБТИ выброса ПРАН при тотальной ишемии и реперфузии сердца обусловлено, по-видимому, лишь различием в отношении емкостей НБТИ-зависимой и НБТИ-независимой систем транспорта нуклеозидов.

Несмотря на ингибирование НБТИ и другими препаратами аналогичного механизма действия общего выброса ПРАН, выброс АДЗ сердцем морских свинок при этом не уменьшался, а сердцем других видов животных — даже значительно возрастал (см. табл. 2) [16, 17]. В тканях же сердца к концу ишемии наблюдался существенный прирост (но не у морских свинок [11]) уровня АДЗ, который доминировал над накоплением ИНЗ [4, 11, 17, 18]. Чтобы объяснить эти парадоксальные результаты, необходимо учесть, что основным местом дезаминирования АДЗ в сердце является, вероятно, эндотелий сосудов [13]. Вследствие этого ограничение доступа АДЗ в эндотелий под действием ингибиторов нуклеозидного транспорта при ишемии должно привести к замедлению метаболизма АДЗ и таким образом к преимущественному (по сравнению с ИНЗ) накоплению в кардиомиоцитах и внеклеточном пространстве. При реперфузии АДЗ имеет возможность попасть в коронарный отток, минуя эндотелиальные клетки посредством пассивной диффузии [16], поэтому отношение выбросов АДЗ и ИНЗ в перфузат не должно заметно отличаться от отношения тканевого содержания этих нуклеозидов при ишемии, т. е. должно оставаться повышенным. В сердце морских свинок более предпочтительным путем катаболизма адениннуклеотидов, по-видимому, является путь $\text{АМФ} \rightarrow \text{ИМФ} \rightarrow \text{ИНЗ} \rightarrow \text{ГПКС}$ [17], что и определяет наблюдавшиеся «аномалии» результатов, полученных в опытах на животных этого вида, по сравнению с результатами опытов на животных других видов.

ПРАН, удерживаемые кардиомиоцитами в результате блокирования нуклеозидного транспорта, при реперфузии могут быть использованы, с одной стороны, для ресинтеза адениннуклеотидов (наиболее эффективно — АДЗ [3]), что являлось, вероятно, причиной наблюдавшегося повышения уровня АТФ в сердце к концу реперфузии по сравнению с контролем [8, 11, 21]; с другой стороны, эти продукты (точнее, АДЗ) при их избытке могут превращаться в миокарде в неметаболизируемые формы [7, 10], что также обуславливает уменьшение вымывания ПРАН при реперфузии после ишемии. Замедление катаболизма адениннуклеотидов при ишемии под действием НБТИ может являться также одной из причин снижения выброса ПРАН при последующей реперфузии сердца. Предполагается, что 5'-нуклеотидаза, которая катализирует дефосфорилирование АМФ и ИМФ, и переносчик нуклеозидов функционируют в виде единого комплекса, локализованного на мембра-

не кардиомиоцита [5]. Поэтому представляется возможным, что блокирование переносчика может в определенной мере угнетать активность 5'-нуклеотидазы. Именно защитой НБТИ энергетических ресурсов миокарда (и, соответственно, симпатических терминалей) при ишемии можно тогда объяснить [1] наблюдаемое в настоящей работе уменьшение выброса НА сердцем морских свинок при реперфузии.

Несмотря на существенное ингибирование НБТИ выброса ПРАН сердцем морских свинок и крыс, улучшения восстановления их сократительной функции при реперфузии после ишемии мы не обнаружили, что согласуется с данными, полученными Humphrey и соавт. [11] для сердца крыс. Эти результаты являются еще одним примером того, что потеря миокардом его энергетических запасов и восстановление сократительной функции после ишемии не всегда бывают тесно связаны между собой [1, 14, 19].

INFLUENCE OF NITROBENZYL THIONOSINE, ACCUMULATED BY HEARTS OF RATS AND GUINEA-PIGS ON RELEASE OF ADENINE NUCLEOTIDE DEGRADATION PRODUCTS DURING ISCHEMIA AND REPERFUSION

A. I. Kuzmin, V. S. Shulzhenko, O. S. Medvedev, V. I. Kapelko

The uptake kinetics of nitrobenzyl thioinosine (NBTI), a nucleoside transport inhibitor, was studied in the isolated Langendorff perfused guinea-pig and rat hearts. In rats the rate constant of NBTI uptake was higher and the extent of NBTI accumulation was less than in guinea pig hearts. Heart-accumulated NBTI inhibited the total release of adenine nucleotide degradation products (ANDP) during reperfusion 25 min after global ischemia. The effect was more pronounced in guinea-pig hearts — in accordance with observed higher myocardial concentration of NBTI. Unlike other ANDP, the release of adenosine by guinea-pig hearts was unchanged and that by rat hearts increased. In spite of significant NBTI-induced decrease of ANDP losses recovery of myocardial contractile function during reperfusion was not observed to improve.

Institute of Experimental Cardiology,
Cardiology Research Center of the USSR, Moscow

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузьмин А. И., Шульженко В. С., Медведев О. С., Капелько В. И. Связь между распадом адениннуклеотидов, потерей катехоламинов при ишемии миокарда и восстановлением сократительной функции при реперфузии // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра. — 1987. — № 1. — С. 75—82.
2. Кузьмин А. И., Шульженко В. С., Медведев О. С., Капелько В. И. Влияние длительности тотальной ишемии на высвобождение миокардом катехоламинов и продуктов распада адениннуклеотидов при реперфузии // Физиол. журн. — 1988. — 34, № 3. — С. 9—17.
3. Bowditch J., Brown A. K., Dow J. W. Accumulation and salvage of adenosine by isolated mature cardiac myocytes // Biochim. et biophys. acta. — 1985. — 844, N 2. — P. 119—128.
4. Buchwald A., Ito B. R., Schaper W. Influence of miflozine on canine coronary blood flow and on adenine nucleotide and nucleoside content under normal and ischemic conditions // J. Cardiol., Pharmacol. — 1987. — 10, N 2. — P. 213—221.
5. Bukoski R. D., Sparks H. V. Adenosine production and release by adult rat cardiocytes // J. Mol. and Cell. Cardiol. — 1986. — 18, N 6. — P. 595—605.
6. Clanachan A. S. Drug interactions with the nucleoside transport system // Pflügers. Arch. — 1986. — 407, Suppl. Abstr. 12. — P. S6.
7. Fitt P. S., Korecky B., Sharma N. A possible adenine nucleotide storage form in normal and ischemic rat heart // Biosci. Rep. — 1985. — 5, N 1. — P. 7—12.
8. Flameng W., Khonneux R., Van Belle H. et al. Cardioprotective effects of miflozine during 1 h. normothermic global ischemia in the canine heart // Cardiovasc. Res. — 1984. — 18, N 9. — P. 528—537.
9. Gillis A. M., Kates R. E. Myocardial uptake kinetics and pharmacodynamics of propafenone in the isolated perfused rabbit heart // J. Pharmacol. and Exp. Therap. — 1986. — 237, N 3. — P. 708—712.
10. Henrichs K. J., Matsuoka H., Schaper W. Intracellular trapping of adenosine during myocardial ischemia by L-homocysteine // Basic Res. Cardiol. — 1986. — 81, N 3. — P. 267—275.
11. Humphrey S. M., Hollis D. G., Cartner L. A. The influence of inhibitors of the ATP degradative pathway on recovery of function and high energy phosphate after