

Короткі повідомлення

УДК 616.127—008.9

В.В.Алабовский, А.А.Винокуров

Амилорид уменьшает чувствительность сердца к «кальциевому парадоксу» после тотальной ишемии*

Показана можливість значно зменшити реперфузійне ураження ізолюваного серця щурів гіпокальцієвим розчином у поєднанні з відомим інгібітором $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ -обміну амилоридом. Встановлено, що додавання амилориду до перфизійного розчину (35 ммоль/л) за 5 хв до ішемії та протягом всього періоду гіпокальцієвої реперфузії значно знижується чутливість серця до «кальцієвого парадоксу»: у 8—20 разів зменшується вихід міоглобіну з серця, якісніше відновлюється скоротлива функція серця, менш змінюється діастолічний тиск.

Введение

Восстановление кровотока в сердечной мышце после ишемии может сопровождаться повреждением кардиомиоцитов, связанным с массивным потоком Ca^{2+} внутрь клеток [5, 7, 11]. Снижением концентрации Ca^{2+} во внеклеточной среде удастся существенно ослабить повреждение миокарда [9, 10]. Последующее восстановление концентрации Ca^{2+} до его физиологических значений приводит к разрушению кардиомиоцитов по механизму «кальциевого парадокса» [9]. Известно, что глубина повреждения кардиомиоцитов при «кальциевом парадоксе» зависит от интенсивности накопления ионов натрия, наблюдаемого при перфузии сердца бескальциевой средой [2, 8]. Можно предположить, что в механизме высокой чувствительности сердца к «кальциевому парадоксу» важная роль принадлежит ионам натрия, которые поступают внутрь клеток при реперфузии через систему $\text{Na} - \text{H}$ -обмена [3, 4, 10]. Сведений о значении $\text{Na} - \text{H}$ -обменной системы в увеличении чувствительности сердца после ишемии к «кальциевому парадоксу» в литературе нет. В связи с этим целью наших исследований стал поиск механизмов уменьшения чувствительности сердца к «кальциевому парадоксу» после тотальной ишемии.

Методика

Эксперименты проводили на изолированном сердце белых крыс массой 200—220 г, перфузированном оксигенированным при 37 °С раствором по методу Лангендорфа. В течение первых 15 мин сердце перфузировали раствором следующего состава (ммоль/л): NaCl — 140; NaHCO_3 — 2; KCl — 3;

© В.В.АЛАБОВСКИЙ, А.А.ВИНОКУРОВ, 1994

* Авторы благодарят директора Института молекулярной и клеточной фармакологии (Франция) профессора M.Lazdunski и руководителя кафедры кардиологии Токийского женского медицинского колледжа профессора S.Hosoda (Япония) за предоставленные препараты, без которых данная работа была бы невозможна.

NaH_2PO_4 — 0,5; трис-ОН—2 (рН 7,4); глюкозы — 11; MgCl_2 — 1,2; CaCl_2 — 2,0. Затем перфузию сердца, осуществляемую со скоростью 10 мл/мин, прекращали на 30 мин (тотальная ишемия). Реперфузию сердца в течение первых 10 мин осуществляли гипокальциевым раствором, содержащим 0,05; 0,075; 0,10; 0,15; 0,25 ммоль/л Ca^{2+} . Последующие 10 мин сердце перфузировали исходным раствором, содержащим 2,0 ммоль/л Ca^{2+} .

Сократительную функцию миокарда измеряли в изоволюмическом режиме с помощью электроманометра и потенциометра Н3030/4 (СНГ). Для этого латексный баллончик, заполненный перфузионной средой, вводили в полость левого желудочка, а исходное диастолическое давление устанавливали на уровне 12—15 мм рт.ст. (1,6—1,9 кПа). Содержание миоглобина в оттекающем от сердца перфузате определяли спектрофотометрически [1]. Статистическую обработку результатов производили методом вариационной статистики с применением критерия t Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Реперфузия сердца после 30 мин ишемии гипокальциевым раствором, а затем раствором, содержащим 2,0 ммоль/л Ca^{2+} , сопровождалась развитием контрактуры миокарда, выходом миоглобина во внеклеточную среду (рис. 1, 2). Несмотря на низкую концентрацию Ca^{2+} в начальный период реперфузии, восстановление содержания Ca^{2+} в среде до его физиологических значений приводило к повреждению кардиомиоцитов. Проведенные эксперименты показали, что для предупреждения развития таких нарушений необходимо сохранение не менее 0,25 ммоль/л Ca^{2+} в реперфузионном растворе (см. рис. 1, 2; таблица), но указанная концентрация Ca^{2+} не защищала миокард от реперфузионного повреждения после ишемии.

Не исключено, что в механизме повреждения сердечных клеток после замены гипокальциевого раствора исходным важную роль играет система Na — H -обмена. Для проверки этого предположения была предпринята попытка ослабить Na — H -обмен с помощью амилорида, специфического блокатора Na — H -антипорта.

Исследования показали, что добавление амилорида в перфузионный раствор (35 ммоль/л) за 5 мин до ишемии и в течение всего периода гипокальциевой реперфузии существенно уменьшает чувствительность сердца к «кальциевому парадоксу»: в 8—20 раз уменьшается выход миоглобина из сердца, последовательно реперфузируемого гипокальциевым и стандартным растворами, быстрее восстанавливается сократительная функция сердца и меньше изменяется диастолическое давление (см. рис. 1, 2 и таблицу).

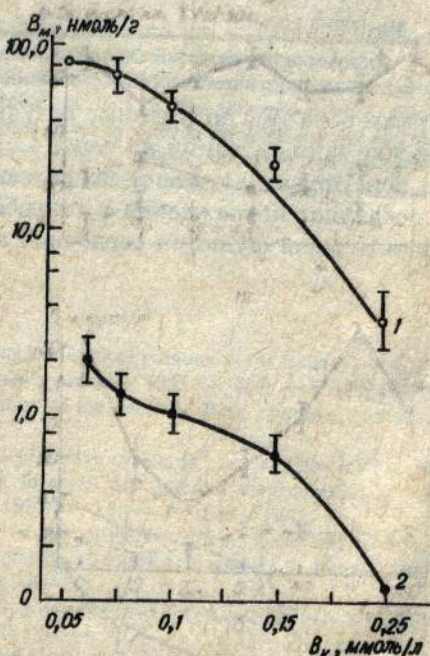


Рис. 1. Выход миоглобина из сердца крыс (B_m , нмоль/г) за 5 мин перфузии исходным раствором после кратковременной постишемической реперфузии гипокальциевым раствором (B_k , ммоль/л): 1 — без амилорида; 2 — с амилоридом в перфузионном растворе (35 мкмоль/л).

Восстановление пульсового давления в левом желудочке изолированного сердца крысы после тотальной ишемии в зависимости от концентрации Ca^{2+} и содержания амилорида в реперфузионном растворе

Условие реперфузии	Давление, % исходного	
	$M \pm m$	P
Концентрация Ca^{2+} в растворе в первые 10 мин реперфузии:		
0,05 ммоль/л	0	—
амилорида нет	0	—
амилорид есть	0	—
0,075 ммоль/л	0	—
амилорида нет	0	—
амилорид есть	0	—
0,10 ммоль/л	0	—
амилорида нет	0	—
амилорид есть	$27,0 \pm 3,2$	* $P_K < 0,01$
0,15 ммоль/л	$15,8 \pm 2,4$	$P_K < 0,01$
амилорида нет	$48,6 \pm 3,6$	** $P_K < 0,01$
амилорид есть	$31,6 \pm 2,8$	$P_K < 0,01$
0,25 ммоль/л	$56,7 \pm 3,3$	$P < 0,01$
амилорида нет		
амилорид есть		
Концентрация Ca^{2+} в растворе в последующие 10 мин реперфузии:		
2,0 ммоль/л		$P_K < 0,01$
(исходное значение; контроль)		
амилорида нет	$24,9 \pm 3,5$	...
амилорид есть	$34,9 \pm 2,3$	$P < 0,01$

* P_K — достоверность отличий по сравнению со значениями в контроле.

** P — достоверность отличий по сравнению со значениями в опыте без амилорида.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что временное снижение концентрации кальция до 0,05 — 0,1 ммоль/л в начальный период реперфузии вызывает повреждение миокарда, а добавленный амилорид ослабляет повреждения и способствует более полному восстановлению сократительной функции сердечной мышцы.

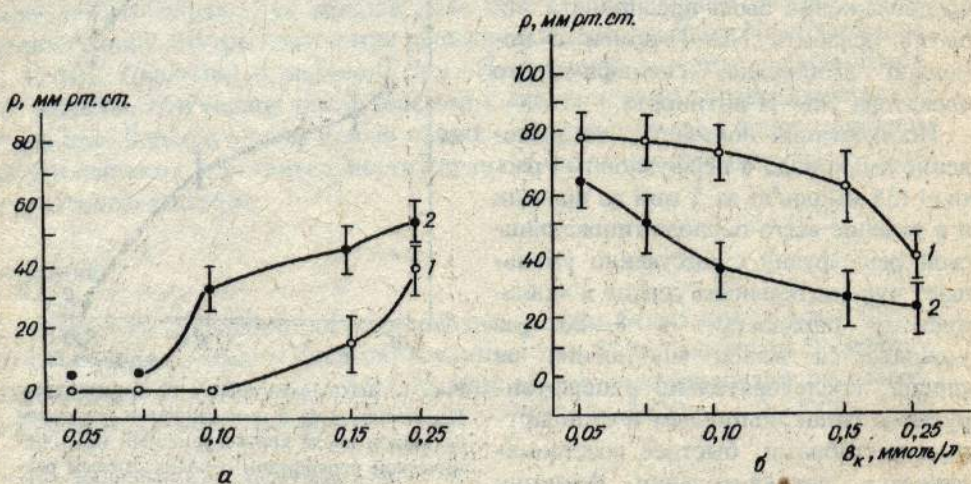


Рис. 2. Систолическое (а) и диастолическое (б) давление (p, мм рт.ст.) в левом желудочке сердца крыс после кратковременной постишемической реперфузии гипокальциевым раствором; 1; 2 — то же, что и на рис. 1.

Известно, что при «кальциевом парадоксе» в интактном сердце поступление Ca^{2+} в клетки определяется размером трансмембранного градиента натрия [2, 8]. Снижение внеклеточной концентрации Ca^{2+} до 0,05 — 0,1 ммоль/л приводит лишь к незначительному накоплению Na^+ в клетках через систему Na—H-обмена и ослабляет развитие «кальциевого парадокса» в интактном сердце. Однако, этого количества Na^+ оказывается недостаточным для предотвращения «кальциевого парадокса» в сердце после ишемии. Реперфузия ишемизированного сердца гипокальциевым раствором приводит к поступлению Na^+ в клетки не только через систему Na—H-обмена, но и через его обмен на H^+ , накопленные миокардом во время ишемии [3, 4, 10, 11]. Блокируя Na—H-обмен амилоридом, удается ослабить удаление H^+ из кардиомиоцитов [3]. В свою очередь, закисление внутриклеточной среды является одним из механизмов инактивации Na—H-обмена и защиты сердца от «кальциевого парадокса» [6]. Кроме того, амилорид препятствует накоплению Na^+ в кардиомиоцитах во время ишемии и реперфузии [4, 10]. Поэтому смена гипокальциевого раствора на раствор, содержащий физиологически необходимое количество Ca^{2+} , не вызвала интенсивного потока Ca^{2+} через систему Na—Ca-обмена и, следовательно, повреждения кардиомиоцитов. Эти наблюдения могут служить основой для совершенствования защиты сердца во время кардиоплегии и гипокальциевой реперфузии.

V.V. Alabovsky, A.A. Vinokurov

AMILORIDE DECREASES THE HEART SUSCEPTIBILITY TO «CALCIUM PARADOX» AFTER TOTAL ISCHEMIA

It is shown that reperfusion of the postischemic heart by low-calcium solution and standard media was accompanied by a massive release of myoglobine, contracture development without cardiac contractions. Addition of amiloride (35 mmol/l) 5 min before ischemia and during low-calcium reperfusion prevents the heart damage after reintroduction of the standard-calcium media. We consider that high susceptibility of the postischemic heart to calcium paradox can be explained by activation of Na/H exchange and a decrease in the sodium gradient during low-calcium reperfusion. These findings confirm the so-called «intracellular sodium» hypothesis of the calcium paradox.

N.N. Burdeyko Medical Institute of Voronezh,
Ministry of Public Health of Russian Federation

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Busselen P. Suppression of cellular injury during the calcium paradox in rat heart by factors which reduce calcium uptake by mitochondria // *Pflugers Arch.* — 1985. — 404. — P. 166—171.
2. Chapman R.A., Tunstall J. The calcium paradox of the heart // *Prog. Biophys. and Mol. biol.* — 1987. — 50. — P. 67-96.
3. Lazdunski M., Frelin C., Vigne P. The Na/H exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulation internal concentration of Na and internal pH // *J. Mol. and Cell. Cardiol.* — 1985. — 17. — P. 1029—1042.
4. Meng P., Pierce G. Involvement of sodium in the protective effect of 5- (N, N-dimethyl)-amiloride on ischemia-reperfusion injury in isolated rat ventricular wall // *J. Pharm. and Exp. Therap.* — 1991. — 256, № 3. — P. 1094—1099.
5. Jennifer E.S., Panagiotopoulos S., Nayler W.G. Reperfusion-induced calcium gain after ischemia // *Amer. J. Cardiol.* — 1989. — 63. — P. 70-130.
6. Philipson K.D., Berson M.M., Nishimoto A.Y. Effect of pH on Na—Ca exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles // *Circ. Res.* — 1982. — 50. — P. 287—293.
7. Poole-Wilson P.A., Harding D.P., Bourdillon P.D.V., Tones M.A. Calcium out control // *J. Mol. and Cell. Cardiol.* — 1984. — 16. — P. 175—187.
8. Ruano-Arroyo G., Gerstenblith G., Lakatta E.G. «Calcium paradox» in the heart is modulated by cell sodium during the calcium-free period // *Ibid.* — 1984. — 16. — P. 783—793.