

21. Хоменко А.Г., Дума З.В. Моделирование ЭАА деревообработчиков // Врачеб. дело. — 1992. — № 2. — С. 66—68.
22. Bessey O.A., Lowry O.H. The determining of alpha-hydroxybutiraldihydrogenase activity in blood plasma // J. Biol. Chem. — 1964. — 164, № 12. — P. 321—322.
23. Mancini G., Carbonac A. Heremans of Antigens by single radial immunodiffusion // Immunochemistry. — 1965. — 2, № 4. — P. 235—254.
24. Oliver I.T. The methodics of determining of KFK-activity in blood plasma // Biochem. J. — 1955. — 61, № 10. — P. 116—118.
25. Shore A., Dosch A. The investigation of T-lymphocytes subpopulations content in blood // Nature. — 1978. — 274, № 9. — P. 586—587.
26. Wacker W., Ulmer D. The method of LDG activity determining in blood plasma // N. Engl. J. Med. — 1956. — 255, № 2. — P. 499—500.
27. Wroblewski F., La Due J. Serum glutamine Pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. — 1956. — 91, № 4. — P. 569—574.

Дрогоб. вільн. мед. ін-т
ім. Ю.Котермака М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 31.12.93

УДК 612.172+612.017.11/12

Г.І.Марченко, В.М.Коцюрба, І.А.Бутович,
А.Е.Сорочинський, В.К.Зражевська, Л.В.Тумановська

Корекція порушень метаболізму арахідонової кислоти при коронароспазмі імунного генезу*

Развитие реакции антиген — антитело в коронарном сосудистом русле приводит к прогрессирующему локальному нарушению ультраструктуры (необратимые повреждения эндотелиоцитов) и тонуса коронарных сосудов (длительное повышение сопротивления и снижение скорости развития иммунной реакции в сердце в ответ на биологически активные вещества), коррелирующие с изменениями метаболизма арахидоновой кислоты (повышение содержания эйкозаноидов в оттекающей от сердца крови). Поскольку коронарострикция и нарушения ультраструктуры эндотелия в значительной мере опосредованы активацией липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты, для коррекции этих нарушений предварительно, до введения антител в коронарный кровоток, внутривенно вводился ингибитор липоксигеназы — гидроксаматлинолеат или мембраностабилизатор — фосфокреатин (неотон). Введение этих препаратов не только устраняло длительную вазоконстрикцию, но и приводило к дилатации сосудов сердца, сохранению их ультраструктуры и способности реагировать на биологически активные вещества, смещению метаболизма арахидоновой кислоты в сторону образования простаноидов. Полученные результаты свидетельствуют о возможности устранения коронароспазма иммунного генеза коррекцией нарушений метаболизма арахидоновой кислоты, в частности стабилизацией фосфолипидного бислоя мембран неотоном и блокадой биосинтеза лейкотриенов гидроксаматлинолеатом.

* Підтримується ДКНТ України.

Вступ

Розвиток реакції антиген — антитіло у коронарному судинному руслі призводить до прогресуючого локального порушення ультраструктури коронарних судин та їх тонусу, до зміни реактивності у відповідь на біологічно активні речовини [2, 4], а також до тривалого підвищення опору кровотоку у цих судинах, що корелює зі змінами метаболізму арахідонової кислоти [1]. При цьому особливе значення має співвідношення кількості метаболітів арахідонової кислоти — лейкотриєнів та кількості простагландинів — речовин, які, з одного боку, беруть участь у регуляції тонусу судин, а з другого — активно впливають на зсідання крові та тромбоутворення.

Серед різноманітних кардіопротекторів особливу увагу привертає неотон (фосфокреотин) — природний метаболіт енергетичного обміну, який використовується для захисту міокарда та коронарного судинного русла. У експерименті та клініці показано, що неотон сприяє більш швидкому постішемичному відновленню діяльності серця [8], зменшенню некротичної зони [19], має виразну антиаритмічну дію [16, 17]. Ці ефекти зумовлені, можливо, мембраностабілізуючою та антиагрегантною дією фосфокреатину [19], разом із тим дуже мало є відомостей про протекторну дію неотону по відношенню до структури та функції коронарних судин.

Метою наших досліджень було виявлення можливості корекції порушень структури та функції коронарних судин інгібуванням неотоном активності ліпоксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти та утворення лейкотриєнів на моделі імунного пошкодження серця антикардіальною цитотоксичною сироваткою.

Методика

На безпородних собаках (32 тварини) масою 17—21 кг під хлоралозно-уретановим наркозом (0,07 г/кг та 0,3 г/кг відповідно) при збереженні власного дихання тварини провадили гострі досліді, які складалися з трьох серій. I серія — відтворення локального імунного пошкодження серця шляхом введення у судинне русло однієї з гілок лівої коронарної артерії антикардіальної цитотоксичної сироватки (АКС), II серія — відтворення імунного впливу на фоні попереднього введення фосфокреатину (неотону) внутрішньовенно одноразово за 10—15 хв до відтворення у дозі 500 мг/кг, III серія — відтворення імунного впливу на фоні попередньо введенного гідроксаматлінолеату (блокатору ліпоксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти) у дозі 3 мк/кг внутрішньовенно. АКС отримували шляхом імунізації кроликів надсадковою фракцією гомогенату серця собаки. В експериментах використовували АКС із титром, який у реакції зв'язування комплементу становив 1:640.

У дослідях реєстрували системний артеріальний тиск (САТ); тиск у лівому шлуночку (ТЛШ) за допомогою катетера, введенного ретроградно через ліву сонну артерію та його першу похідну (dp/dt); за ударами розраховували індекс скорочуваності міокарда ($dp/dt:Ip$) за допомогою спеціалізованого обчислювального пристрою «Індекс» [6]. Електрокардіограму знімали у класичних та підсилених відведеннях від кінцівок. Огинаючи або нисхідну гілку лівої коронарної артерії перфузували власною кров'ю тварини насосом-резистографом із постійною витратою крові через спеціально виготовлений тонкостінний металевий катетер з обтуратором на кінці, який вводили у коронарну судину ретроградно через розріз у правій сонній артерії. Безперервна реєстрація перфузійного тиску на виході

насосу дозволяє оцінювати зміни коронарного судинного опору під час дослідів. Реєстрацію здійснювали на апараті «Мінгографі-82» фірми «Siemen-Elema». Визначення концентрації похідних арахідонової кислоти (лейкотриєн C_4) у сироватці крові, яка відтікає від серця, провадили радіоімунним методом. Венозну кров забирали з правого передсердя на фоні короткочасного (15—20 с) розриву кровотоку у передній та задній полих венах, у той час як перфузія коронарної артерії та, отже, відток венозної крові від серця повністю зберігалися [1]. Лейкотриєн C_4 (ЛТС₄) вимірювали в станольних екстрактах сироватки крові ($1/4$; $1/8$). В експериментах використовували такі препарати: неотон фірми «Schiapparelli» (Італія); ацетилхолін фірми «Мосмедпрепараты» (Росія); гідроксаматлінолеву кислоту, синтезовану в Інституті біоорганічної хімії НАН України; [3H -LTC₄ Ria kit] (як готовий набір для визначення ЛТС₄) фірми «Dupont» (Німеччина). Результати обробляли статистично з використанням критеріїв Стюдента для парних величин.

Результати та їх обговорення

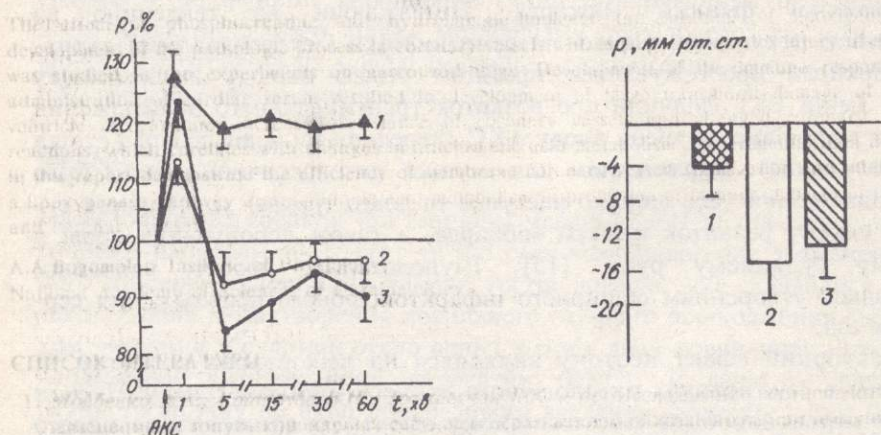
Як показали проведені раніше дослідження, у контрольних експериментах внутрішньокоронарне введення 0,1 мл/кг АКС супроводжувалося розвитком типових ознак кардіоцитотоксичного шоку: гіпотензія та зниження скорочувальної функції міокарда. Незважаючи на тенденцію до відновлення, порушення кардіо- та гемодинаміки і скорочувальної активності міокарда простежувалися протягом усього періоду експерименту (1 год). Зміни ЕКГ свідчили про розвиток трансмурального пошкодження міокарда відповідно до місця вводу АКС (передня чи задньобокова стінка лівого шлуночка). Характерним для імунної цитотоксичної реакції було також підвищення (яке швидко настає та довго триває) коронарного судинного опору, розвиток гіпоксії міокарда, а також депонування крові в ємкісному судинному руслі [15]. Імунологічний процес, звичайно, закінчувався утворенням обширного інфарктоподібного пошкодження серцевого м'яза.

Протекторний ефект неотону виявлявся на всіх етапах розвитку та практично в усіх проявах патологічного процесу імунного генезу. Неотон значною мірою запобігав гіпотензивному ефекту та зниженню серцевого викиду, зокрема, у 2 рази зменшувалося максимальне падіння САТ та хвилинного об'єму серця. Значно зменшувалися імуногенні порушення скорочувальної функції серця [14]. Важливим є значно менш виразне збільшення коронарного судинного опору при розвитку імунної реакції на фоні неотону (мал. 1,а). Якщо у контрольних дослідах коронарний судинний опір різко збільшувався (в середньому на $28,0 \pm 3,6 \%$; $P < 0,01$) і залишався підвищеним до кінця експерименту в середньому на $10,1 \pm 5,5 \%$ ($P < 0,05$), то на фоні неотону після майже такого ж короткочасного підвищення у середньому на $24,2 \pm 2,0 \%$ ($P < 0,01$) коронарний судинний опір знижувався і вже на 5-й хвилині експерименту був нижче початкового на $16,1 \pm 3,2 \%$ ($P < 0,02$), залишаючись і надалі нижче початкового.

Як було показано раніше [15], ріст коронарного судинного опору при імунному ураженні серця зумовлений тромбозом та вазоконстрикцією судин серця, що викликається в значній мірі ліпоксигеназними продуктами метаболізму арахідонової кислоти. Дезактивація ліпоксигенази за допомогою гідроксаматлінолеату істотно змінювала коронарний судинний тиск при

значній мірі усуває ці патологічні ефекти у коронарному судинному руслі. Імуногенні коронароконстрикція та агрегація формених елементів крові могли бути пов'язані з виділенням біологічно активних речовин, таких як метаболіти арахідонової кислоти, зокрема лейкотриєнів [1, 5, 18], а також із порушенням реактивності коронарних судин, яким є гальмуванням коронародилататорних реакцій, зумовлених швидким пошкодженням ендотелію при імунній цитотоксичній реакції, у відповідь на біологічно активні речовини. Обидва ці можливі варіанти дії неотону були досліджені у наших експериментах.

Безперервна аутоперфузія коронарних судин протягом всього періоду дослідження дозволяла шляхом введення подразників безпосередньо у коронарний кровотік даної судинної ділянки тестувати після імунного пошкодження зміни коронарного судинного опору у відповідь на ці біологічно активні речовини, які реалізують свою вазомоторну дію повністю або частково за участю ендотелію коронарних судин. При імунному ураженні серця відзначено гальмування коронародилататорних реакцій у відповідь на ацетилхолін (2 мкг), який реалізує вазомоторну дію за участю ендотелію. Також майже повне зберігання цих реакцій при попередньому введенні неотону або гідроксаматлінолеату (мал. 2).



Мал. 1. Відносний коронарний судинний тиск (p , % від вихідного тиску) в залежності від часу (t , хв) розвитку імунної реакції у міокарді собак після введення у русло лівої коронарної артерії саме антикардіальної сироватки — АКС (1) та АКС на фоні гідроксаматлінолеату (2) і неотону (3).

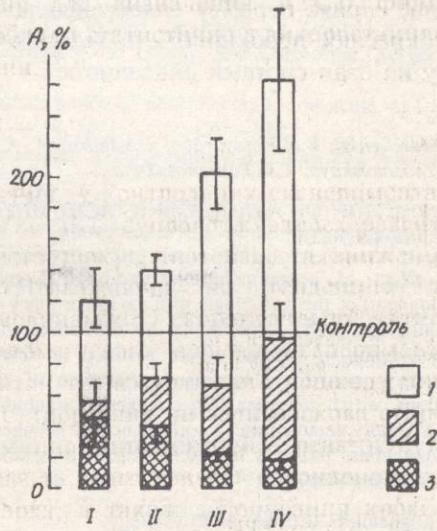
Мал. 2. Відповідь коронарного судинного тиску (p , мм рт.ст.) на біологічно активний подразник ацетилхолін (2 мкг), введений безпосередньо у русло лівої коронарної артерії після імунного пошкодження серця саме антикардіальною сироваткою — АКС (1) та АКС на фоні гідроксаматлінолеату (2) і неотону (3).

При розвитку реакції антиген — антитіло у коронарному судинному руслі вже на перших хвилинах реакції спостерігали збільшення на 20 % вмісту ЛТС₄ у венозній крові, яка відтікає від серця, і наступне зростання значення цього показника майже до 60-ї хвилини реакції, коли вміст ЛТС₄ стає більшим, ніж у 2,5 рази, за такий у контролі (мал. 3). Попередня дезактивація ліпоксигенази за допомогою гідроксаматлінолеату призводила до зниження концентрації ЛТС₄ у крові з 139 ± 24 до $56 \text{ пг/мл} \pm 14 \text{ пг/мл}$ (на мал. 3 не показано). Введення на цьому фоні АКС не викликало збільшення вмісту ЛТС₄ у венозній крові вище за його вміст у крові контрольних тварин. Неотон також знижував вміст ЛТС₄ з 140 ± 17 до

100 пг/мл $\pm$ 24 пг/мл (на мал. 3 не показано). Разом із тим, ефект неотону виявився навіть більш вираженим та довготривалим порівняно з дією специфічного інгібітору ліпоксигенази зменшуючи до 25 пг/мл $\pm$ 5 пг/мл вміст ЛТС₄ у венозній крові до 60-ї хвилини розвитку імунної реакції. Таким чином, неотон має здатність в значній мірі запобігати утворенню такого сильного коронароконстриктора та проагреганта, як ЛТС₄. Поряд із цим достатньо виразною була захисна дія неотону за відношенням до ендотелію коронарних судин: зберігалася цілістність ендотеліального шару, не відбувалося десквамації ендотелію, структура ендотеліальних клітин в основному зберігалася. Водночас з'являлися субендотеліальні вакуолі і відбувалася маргинація ядерного хроматину [2, 12], тобто ультраструктурні зміни були незначними.

Отримані функціональні, морфологічні та біохімічні результати свідчать про виразну протекторну дію фосфокреатину на структуру та функцію коронарних судин при імунному (цитотоксичному) впливі на серце. Механізми цієї захисної дії складні та взаємозалежні. Стабілізуючи мембрани ендотеліоцитів та зберігаючи їх структуру і функцію (зокрема, можливо, утворення ендотеліозалежного розслаблюючого фактора — ЕЗРФ [7], неотон сприяє збереженню ендотеліозалежних вазодилататорних реакцій, які здійснюються через ЕЗРФ, і таким чином запобігає розвиткові коронароконстрикторних ефектів. Поряд із цим, можливо, зберігається здатність ендотеліоцитів до утворення такого міцного коротчародилатора та антиагреганту, як простагліклін.

Ендотеліоцити коронарних артерій є достатньо інтенсивним джерелом простаглікліну, який виділяється за нормальних умов [9] та, ймовірно, має постійний вплив на коронарний судинний опір [11]. Блокада циклооксигенази — ферменту, який бере участь в утворенні простаглідинів, призводить до збільшення коронарного судинного опору. В той же час неотон має досить виразну інгібіторну дію на вихід іншого ейкозаноїду — лейкотриєну С₄, який виробляється більшою мірою у формених елементах крові (лейкоцитах, моноцитах) [10] та меншою мірою у тканинах серця, зокрема в стінці коронарних судин [13]. Інтенсивність утворення ЛТС₄ та інших лейкотриєнів за нормальних умов відносно слабка та вона значно посилюється при патологічних, пов'язаних із активацією фосфоліпази А₂, умовах (при постішемичній реперфузії тканин, імунній реакції антиген — антитіло тощо). Можна вважати, що неотон запобігає реалізації активованій при імунній реакції фосфоліпази А₂ або інактивує її. Як відомо, неотон інактивує ряд мембранних ферментів (фосфатази, 5-нуклеотидазу) [3]. Не менш імовірним є припущення про інактивацію ферментів, які безпосередньо беруть участь в утворенні лей-



Мал. 3. Відносний вміст (А, % від контрольного вмісту) лейкотриєну С₄ у крові, яка відтікає від серця, на 3-ю (I), 5-у (II), 30-у (III), 60-у (IV) хвилини розвитку імунної реакції у міокарді собак після введення у русло лівої коронарної артерії саме антикардіальної сироватки — АКС (1) та АКС на фоні гідроксаматліолеату (2) і неотону (3).

котриєнів, зокрема ліпоксигенази, ЛТС₄-синтетази тощо. У всякому разі, як показують результати наших досліджень (виходячи з концентрації лейкотриєну С₄ у крові, яка відтікає від серця; див. мал. 3), неотон за інтенсивністю блокади утворення ЛТС₄ не поступається гідроксамату лінолевої кислоти — специфічному інгібіторові ліпоксигенази (у середніх дозах). Блокуючи утворення ЛТС₄, неотон поряд із пригніченням коронарореконстрикторної дії може різко гальмувати агрегацію та тромбоутворення, тому що ЛТС₄ є одним із самих сильних агрегантів.

Відомо, що інактивація ліпоксигенази призводить до гальмування утворення ЕЗРФ та, очевидно, до гальмування ендотелійзалежних реакцій [7]. Разом із тим, як впливає з результатів наших досліджень, неотон поряд із запобіганням утворенню таких продуктів ліпоксигеназної реакції, як лейкотриєни, сприяє перебігу ендотелійзалежних реакцій та, можливо, активує їх. Це окреслює необхідність подальшого детального дослідження впливу неотону на стан системи ейкозаноїдів і характер ендотелійзалежних реакцій.

*G.I. Marchenko, V.N. Kotsyuruba, I.A. Butovich, A.E. Sorochinsky,
V.K. Zrazhevskaya, L.V. Tumanovskaya*

CORRECTION OF ARACHIDONIC ACID METABOLISM IN CORONARY VESSEL SPASM OF IMMUNE GENESIS

The effect of phosphocreatine and hydroxamate-linoleate (an inhibitor of lipoxigenase) on development of the pathologic process in coronary vessels with immune (cytotoxic) injury of the heart was studied in the experiments on narcotized dogs. Development of the immune response after administration of cardiac serum resulted in development of large transmural damage of the left ventricle myocardium, increased resistance of coronary vessels and changed coronary vascular reactions, which correlates with changes in arachidonic acid metabolism. Experimental data described in this report demonstrate the efficiency of membrane coronary vessels stabilization and inhibition of a lipoxigenase pathway in arachidonic acid metabolism in protection of immune damage of the heart and coronary vessels.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мойбенко А.А., Коцюруба В.Н., Зражевская В.К. и др. Исследование соотношений между изменениями тонуса коронарных сосудов и образованием эйкозаноидов при иммунном воздействии на сердце // Физиол. журн. СССР. — 1992. — 77, № 9. — С. 42—47.
2. Мойбенко А.А., Марченко Г.И., Попович Л.Ф. Функциональные и морфологические исследования протекторного влияния неотона на иммуноповрежденное сердце // Физиол. журн. — 1987. — 35, № 5. — С. 54—63.
3. Преображенский А.Н., Джавадов С.А., Сакс В.А. Исследование возможного механизма действия фосфокреатина на ишемический миокард // Биохимия. — 1986. — 51, № 4. — С. 675—683.
4. Сагач В.Ф. О механизмах депонирования крови у собак при цитотоксическом повреждении сердца // Бюлл. эксперим. биологии. — 1979. — 87, № 6. — С. 533—536.
5. Сагач В.Ф. О роли лейкотриенов при шоке иммунного генеза // Там же. — 1986. — 94, № 2. — С. 151—154.
6. Синьков М.В., Закидальский А.И., Мойбенко А.А. и др. Автоматизированная оценка показателей сократимости миокарда в эксперименте и клинике с помощью специализированного вычислительного устройства «Индекс» // Бюлл. ВКНЦ АМН СССР. — 1978. — № 1. — С. 101—114.
7. Furchgott R.F., Martin W. Interactions of endothelial cells and smooth muscle cells // Chest. — 1985. — 88, № 1. — P. 210—213.
8. Hearse P.J., Stewart D.A., Brainbridge M.W. Cellular protection during myocardial ischemia: the development and characterization of a procedure to the induction of reversible ischemic arrest // Circulation. — 1976. — 54, № 1. — P. 193—202.
9. Lagarde M., Guâlde N., Rigaud M. Metabolic interactions between eicosanoids in blood and vascular cells // Biochem. J. — 1989. — 257, № 2. — P. 313—320.