

Защитное действие аденозина при развитии «кальциевого парадокса» в изолированном сердце

Эксперименты, проведенные на изолированных сердцах белых крыс показали, что реперфузия Са-содержащим раствором после 10 мин перфузии бескальциевой средой сопровождается выходом миоглобина из сердца, снижением уровня макроэргических соединений («кальциевый парадокс»). Добавление аденозина (50-1000 ммоль/л) в бескальциевую среду в зависимости от концентрации ослабляло развитие «кальциевого парадокса». Дипиридамол, блокатор транспорта аденозина, уменьшал выход миоглобина из сердца с $EC_{50} = 0,5$ мкмоль/л и одновременно ослаблял защитное влияние высоких концентраций аденозина при «кальциевом парадоксе». Аминофиллин (25-250 мкмоль/л), неселективный блокатор аденозиновых рецепторов, не влиял ни на развитие «кальциевого парадокса», ни на защитное действие аденозина. Полученные результаты свидетельствуют о более важной роли транспорта аденозина внутрь клеток, чем его взаимодействия с рецепторами для осуществления защитного действия при «кальциевом парадоксе».

Введение

Из всех известных естественных метаболитов, оказывающих влияние на обмен веществ в сердечной мышце, наибольший интерес вызывают аденозин и его аналоги [3, 8, 10, 11]. Молекулярный механизм его действия на миокард остается до конца не изученным [10]. Неизвестен в частности механизм ослабления аденозином потока Ca^{2+} в кардиомиоциты после непродолжительного удаления Ca^{2+} из внеклеточной среды («кальциевый парадокс») [1]. Полагают, что в основе защитного действия аденозина лежит его взаимодействие с A_1 -аденозиновыми рецепторами сарколеммы кардиомиоцитов [10]. Не исключают участие внутриклеточного аденозина в ослаблении повреждений миокарда [8, 10, 11]. В литературе нет сведений о механизме защитного действия аденозина на сердца при «кальциевом парадоксе». В связи с этим целью нашего исследования было выяснение механизмов положительного влияния аденозина при «кальциевом парадоксе».

Методика

Эксперименты проводили на изолированном сердце белых беспородных крыс, перфузируемом по Лангендорфу оксигенированным (100 % O_2 , 37 °C) раствором следующего состава (ммоль/л): NaCl - 140; $NaHCO_3$ - 2; KCl - 3; NaH_2PO_4 - 0,5; трис-ОН-2 (pH 7,4); глюкозы - 11; $CaCl_2$ - 2,0. Через 15 мин перфузии данным раствором, необходимой

для стабилизации сократительной функции и метаболизма миокарда, сердце перфузировали бескальциевой средой, содержащей 0,5 ммоль/л ЭДТА (10 мин). Скорость перфузии на протяжении всего эксперимента сохраняли постоянной - 10 мл/мин на 1 г ткани. Глубину повреждения кардиомиоцитов оценивали по концентрации миоглобина в оттекающем от сердца перфузионном растворе [1, 7]. Содержание миоглобина определяли непрерывно, спектрофотометрически на длине волны 410 нм на спектрофотометре типа СФ46. В ткани энзиматически определяли содержание адениннуклеотидов - АТФ, АДФ, АМФ. Для блокирования трансмембранного транспорта аденозина мы использовали дипиридабол (2,6- Бис-/бис-(оксиэтил)-амино/4,8-ди-11-пиперидин (4,5-д) пиримидин) [5, 10]. Для блокирования A_1 -рецепторов в растворы добавляли теofilлин (5-50 мкмоль/л), неспецифический блокатор аденозиновых A_1 и A_2 рецепторов [5, 10]. Более высокие концентрации теofilлина ингибируют фосфодиэстеразу 3', 5'-ц-АМФ [10] поэтому мы их не применяли. В работе использовали коферменты и ферменты фирмы «Boehringer Mannheim GmbH», трис- ОН и субстраты - «Sigma» (США), остальные реактивы - отечественного производства классификации «х. ч.».

Полученные результаты обработаны статистически с использованием пакета прикладных программ «STX». Достоверность различий оценивали с помощью критерия t Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Реперфузия сердца Са-содержащим раствором после 10 мин перфузии бескальциевой средой приводит к выходу миоглобина из сердца, снижению содержания в ткани адениннуклеотидов. Добавление в бескальциевую среду аденозина (50-500 мкмоль/л) вызывало зависимое от концентрации уменьшение выхода миоглобина в перфузионный раствор (рис. 1). Одновременно отмечалось сохранение на высоком уровне концентрации АТФ, АДФ и АМФ в миокарде (таблица). Таким образом, аденозин в концентрации 50-500 мкмоль/л способен эффективно защищать сердце от «кальциевого парадокса». Можно предположить, что существуют два механизма действия аденозина на миокард. Первый включает его взаимодействие с A_1 -аденозиновыми рецепторами, находящимися на сарколемме кардиомиоцитов. Второй - предполагает поступление аденозина внутрь клеток, пополнение внутриклеточного пула адениннуклеотидов [10].

Как показали проведенные нами исследования, неселективный антагонист A_1 -рецепторов - теofilлин в концентрациях 5-50 мкмоль/л не влиял на развитие «кальциевого парадокса» и на проявление защитного действия аденозина (см. рис. 1). Это свидетельствует о непричастности A_1 -рецепторов в осуществлении аденозином защитного влияния на сердце при «кальциевом парадоксе».

В последующих экспериментах было установлено, что блокатор трансмембранного транспорта аденозина - дипиридабол в концентрациях 0,5-500 мкмоль/л более чем в 4-15 раз уменьшал выход миогло-

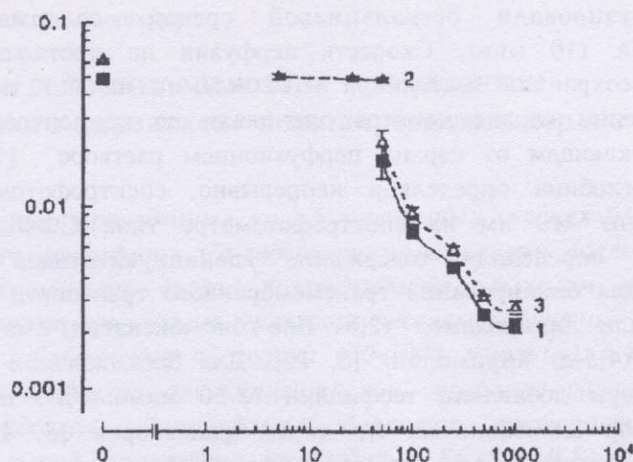


Рис. 1. Влияние аденозина и теофиллина на выход миоглобина (мкмоль/г) из сердца при «кальциевом парадоксе» за 5 мин реперфузии: 1 - аденозин; 2 - теофиллин; 3 - аденозин и 100 мкмоль/л теофиллина.

бина из сердца при «кальциевом парадоксе» (рис. 2). Дипиридамо́л препятствовал защитному действию высоких концентраций аденозина. В этих условиях количество миоглобина, теряемого сердцем при «кальциевом парадоксе» (рис. 3) не уменьшалось по сравнению с экспериментами, в которых в среду перфузии был добавлен дипиридамо́л без аденозина. Следовательно, поступление последнего внутрь клеток является необходимым условием для реализации его защитного действия на миокард при «кальциевом парадоксе». Вероятно, дипиридамо́л блокировал транспорт аденозина, что не давало возможности ему высвободиться во внеклеточную среду при развитии «кальциевого парадок-

Влияние аденозина (100 мкмоль/л) на показатели энергетического состояния сердца при «кальциевом парадоксе» ($M \pm m$)

Показатель	Исходное состояние	«Кальциевый парадокс»	«Кальциевый парадокс» и введение аденозина
Концентрация, мкмоль/г			
АТФ	$23,5 \pm 0,7$	$3,9 \pm 0,1^{**}$	$16,80 \pm 0,8^*$
АДФ	$8,7 \pm 0,7$	$4,7 \pm 0,02^{**}$	$11,80 \pm 0,9$
АМФ	$1,1 \pm 0,03$	$1,8 \pm 0,1^*$	$0,95 \pm 0,05$
АДНК	$32,2 \pm 2,4$	$12,2 \pm 1,8^{**}$	$28,60 \pm 1,6$
АТФ/АДФ	$2,7 \pm 0,1$	$0,86 \pm 0,06^{**}$	$1,50 \pm 0,2^*$
АТФ/АМФ	$21,3 \pm 1,8$	$2,10 \pm 0,4^{**}$	$17,10 \pm 0,9^*$

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

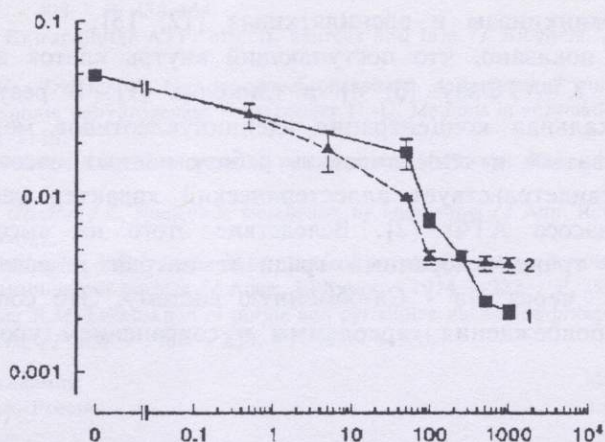


Рис. 2. Влияние различных концентраций (мкмоль/л) дипиридамола и аденозина на выход миоглобина (мкмоль/г) из сердца при «кальциевом парадоксе» за 5 мин реперфузии: 1 - аденозин; 2 - дипиридапол.

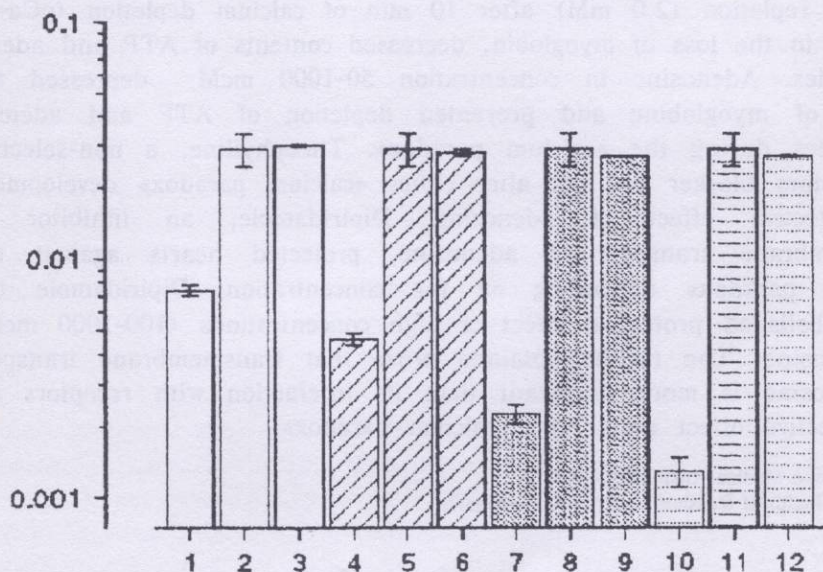


Рис. 3. Влияние дипиридамола (0,5 мкмоль/л), аденозина или их совместного применения на выход миоглобина из сердца при «кальциевом парадоксе» за 5 мин реперфузии: 1, 3 - 100 мкмоль/л аденозина; 4, 6 - 250 мкмоль/л аденозина; 7, 9 - 500 мкмоль/л аденозина; 10, 12 - 1 мкмоль/л аденозина; 2, 5, 8, 11 - дипиридапол; 3, 6, 9, 12 - аденозин в соответствующей концентрации и дипиридапол.

са». Сохранение внутриклеточного пула адениннуклеотидов препятствовало нарушению проницаемости сарколеммы и повреждению кардиомиоцитов.

Известно, что аденозин, проникая внутрь клеток, фосфорилируется в нуклеотиды с помощью специфических киназ [10]. Установлено также, что образующиеся из аденозина нуклеотиды избирательно локали-

зуются в субсарколеммальном пространстве вследствие компартаментализации аденозинкиназы и аденилаткиназ [12, 13].

Ранее было показано, что поступающий внутрь клеток аденозин активирует Na^+ , K^+ -АТФазу [3, 4] и гликолиз [1]. В результате этих изменений локальная концентрация адениннуклеотидов может существенно увеличиваться и стимулировать работу ионных насосов. О такой возможности свидетельствует аллостерический характер регуляции активности Na -насоса АТФ [2]. Вследствие этого на высоком уровне поддерживался транс-мембранный градиент натрия и ослаблялось поступление Ca^{2+} через Na - Ca -обменную систему. Это сопровождалось уменьшением повреждения сарколеммы и сохранением уровня адениннуклеотидов.

V.V. Alabovsky, A.A. Vinokurov

PROTECTIVE EFFECT OF ADENOSINE DURING «CALCIUM PARADOX» IN ISOLATED RAT HEART

Calcium repletion (2,0 mM) after 10 min of calcium depletion ($\text{pCa}=7$) resulted in the loss of myoglobin, decreased contents of ATP and adenine nucleotides. Adenosine in concentration 50-1000 μM depressed the release of myoglobine and prevented depletion of ATP and adenine nucleotides during the «calcium paradox». Theophylline, a non-selective A_1 -receptors blocker did not alter either «calcium paradox» development or protective effect of adenosine. Dipyridamole, an inhibitor of transmembrane transport of adenosine, protected hearts against the «calcium paradox» depending on the concentration. Dipyridamole (50 μM) abolished protective effect of high concentrations (100-1000 μM) of adenosine. The results obtained prove that transmembrane transport of adenosine is more important than its interaction with receptors for its protective effect under the «calcium paradox».

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Винокуров А.А. Значение трансмембранного градиента натрия в осуществлении защитного действия макроэргических соединений при повреждении сердца ионами кальция: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Смоленск, 1992. - 24 с.
2. Болдырев А.А., Смирнова Н.Н., Скворцевич Е.Г., Пантелеева Н.С. 180 - обмен в ходе гидролиза АТФ и п-нитрофенилфосфата Na , K -АТФазой из мозга быка // Биохимия. - 1977. - 4. - С. 2035-2038.
3. Кужман М.И., Алабовский В.В., Олейников О.Д. Предупреждение фибрилляции желудочков сердца путем активирования Na , K -АТФазы в эксперименте // Вестн. АМН СССР. - 1984. - № 4. - С. 35-41.
4. Олейников О.Д. Предупреждение фибрилляции желудочков сердца крысы во время пост-ишемической реперфузии. - В кн.: Биохимия фибриллирующего миокарда. - Воронеж, 1983. - С. 49-55.
5. Сергеев П.В., Шимановский Л.М. Рецепторы биологически активных веществ. - М.: Медицина, 1987. - 00 с.
6. Bergmeyer H.-U. Methods in enzymatic analysis. - New-York: Acad. Press, 1963. - P. 1464-1468; 1777-1779; 2101-2110; 2129-2131.

7. *Busselen P.* Effect of sodium on calcium paradox in rat hearts // *Eur. J.Physiol. (Pfluger's Arch.)* - 1987. - 408. - P. 458-464.
8. *Gordon J.L.* Extracellular ATP: effects, sources and fate // *Biochem. J.* - 1986. - 233. - P. 309-319.
9. *Lamprecht W., Transchold I.* Adenosine-5-phosphate: determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase / *Bergmeyer H.-U. Methods in enzymatic analysis.* - 1974. - 4. - P. 2101-2110.
10. *Ollson R.A., Pearson J.D.* Cardiovascular purinoceptors // *Physiol. Rev.* - 1990. - 70, № 3. - P. 761-845.
11. *Pearson J.D., Gordon J.L.* Nucleotide metabolism by endothelium // *Ann. Rev. Physiol.* - 1985. - 47. - P. 617-627.
12. *Rubio R., Weidmeier V.T., Berne R.M.* Nucleoside phosphorylase: localisation and role in myocardial distribution of purines // *Amer. J.Physiol.* - 1974. - 222. - P. C550-C555.
13. *Rubio R., Berne R.M.* Localisation of purine and pyrimidine nucleoside-phosphorylases in heart, kidney, and liver // *Ibid.* - 1980. - 239. - P. H721-H730.

Воронеж. мед. академия
им. Н.Н.Бурденко, Россия

Материал поступил
в редакцию 14.12.92