

Несоответствие между развитием контрактуры миокарда и повреждением сердца при «кальциевом парадоксе»

Эксперименты, проведенные на изолированном сердце белых крыс показали, что реперфузия сердца Са-содержащим раствором после 10 мин перфузии бескальциевой средой, содержащей 0,5 ммоль/л ЭДТА, приводит к развитию контрактуры миокарда, снижению более чем в 5 раз концентрации аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и фосфокреатина в сердце и разобщению окисления и фосфорилирования в митохондриях. Снижение концентрации Na^+ до 30 или 80 ммоль/л в бескальциевой среде сопровождается еще большим снижением внутриклеточного уровня АТФ и фосфокреатина при полном отсутствии контрактуры миокарда во время реперфузии Са-содержащим раствором. Увеличение содержания Na^+ в бескальциевой среде, напротив, ослабляло развитие «кальциевого парадокса» в сердце при снижении максимальной величины контрактуры миокарда всего на 10-15 %. Полученные результаты дают основание полагать, что величина развития контрактуры не соответствует глубине повреждения сердца при «кальциевом парадоксе».

Введение

Реперфузия сердца Са-содержащим раствором после непродолжительной перфузии бескальциевой средой сопровождается глубоким повреждением сарколеммы, развитием контрактуры миофибрилл, нарушением энергетического состояния кардиомиоцитов [4-7, 9, 11, 14]. Предполагают, что развивающаяся контрактура является не только следствием неконтролируемого поступления Ca^{2+} , но и способна вызвать механическое повреждение сарколеммы, приводящее к гибели клетки [9]. Однако, в литературе отсутствуют данные о соответствии развития контрактуры миокарда и повреждения кардиомиоцитов при «кальциевом парадоксе». В связи с этим целью нашего исследования было изучение соответствия между размером контрактуры миокарда и глубиной повреждения кардиомиоцитов при «кальциевом парадоксе».

Методика

Эксперименты проводили на изолированном сердце белых беспородных крыс, перфузированном по Лангендорфу оксигенированным раствором следующего состава (в ммоль/л): NaCl - 140; KCl - 3; NaH_2PO_4 - 0,5; трис - OH - 2 (pH 7,4); глюкозы - 11; NaHCO_3 - 2; CaCl_2 - 2,0. Крыс декапитировали под эфирным наркозом вскрывали грудную клетку и изолированное сердце помещали в охлажденный раствор. В аорту вводили канюлю и со скоростью 10 мл/мин на 1 г влажной

ткани подавали оксигенированный раствор. После 10 мин перфузии оксигенированным раствором (содержащим 0,5 ммоль/л ЭДТА) прекращали перфузию.

В отдельные эксперименты на сердце белых крыс после 10 мин перфузии оксигенированным раствором (содержащим 0,5 ммоль/л ЭДТА) прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 . Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

В параллельных экспериментах на сердце белых крыс после 10 мин перфузии оксигенированным раствором (содержащим 0,5 ммоль/л ЭДТА) прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

Через 5 мин после введения CaCl_2 в сердце прекращали перфузию и вносили в сердце 0,5 ммоль/л CaCl_2 и 0,5 ммоль/л NaH_2PO_4 .

ткани подавали исходный раствор (37 °C) в течение 15 мин для стабилизации сократительной функции и показателей энергетического состояния. После перфузии бескальциевой средой, содержащей 0,5 ммоль/л ЭДТА через сердце пропускали (10 мин) исходный раствор, содержащий 2,0 ммоль/л Ca^{2+} .

В отдельных сериях экспериментов изменение концентрации ионов натрия осуществляли только в период бескальциевой перфузии сердца. Для оценки глубины повреждения кардиомиоцитов при «кальциевом парадоксе» использовали следующие показатели: концентрацию в ткани сердца адениннуклеотидов, фосфокреатина и креатина, в оттекающем перфузате концентрацию миоглобина, сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях [12].

Через 5 мин реперфузии сердца исходным раствором его замораживали при температуре жидкого азота с помощью щипцов Волленбергера и приготавливали тканевые экстракты с 6-й % раствором трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования при 3 000 об/мин супернатант нейтрализовали 2 моль/л КОН при 0-4 °C и определяли концентрацию адениннуклеотидов стандартными ферментативными методами [3]. Содержание креатина оценивали спектрофотометрически с помощью α -нафтола. Концентрацию фосфокреатина вычисляли как разность содержания в ткани креатина и тотального креатина (креатин и фосфокреатин) [8]. В отдельных экспериментах, проведенных по той же схеме производили выделение митохондрий и изучение параметров их дыхания с помощью полярографа «ПУ-1» как описано ранее [1]. Содержание миоглобина в оттекающем перфузате оценивали непрерывно спектрофотометрическим методом с помощью проточной кюветы [5]. Содержание белка определяли биуретовым методом. Концентрацию ионов кальция в растворах контролировали с помощью ионоселективного электрода ЭИ-Са-01 и электронного потенциометра ВЛ-750.

В параллельной серии экспериментов изучали сократительную активность миокарда и диастолическое давление в изоволюмическом режиме с помощью латексного баллончика, введенного в полость левого желудочка. Начало контрактуры миокарда определяли как повышение диастолического давления более чем на 2 мм рт.ст. без восстановления сокращений [2]. В работе был использован электроманометр фирмы «Bentley lab. Europe» и аналого-цифровой преобразователь для IBM PC, а также пакет прикладных программ «AWPE».

Полученные результаты обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия t Стьюдента и непараметрических критериев статистики.

Результаты и их обсуждение

Проведенные эксперименты показали, что перфузия сердца бескальциевой средой с последующим восстановлением прежнего уровня Ca^{2+} в растворе сопровождается значительным изменением энергетического состояния кардиомиоцитов (табл. 1, 2), развитием контрактуры миофибрилл (рисунок), выходом во внеклеточную среду миоглобина (табл. 3).

Таблица 1. Влияние концентрации Na^+ на содержание (мкмоль/г сухой массы) аденин-нуклеотидов, фосфокреатина и креатина в сердце при «кальциевом парадоксе» ($\text{M} \pm \text{m}$)

Условия эксперимента	АТФ	АДФ	АМФ	Фосфокреатин	Креатин
До «кальциевого парадокса» (контроль)	23,5±0,7	8,5±0,3	1,1±0,02	34,3±4,70	51,7±1,7
«Кальциевый парадокс»:					
[Na^+] - 140 ммоль/л	4,9±0,1*	3,5±0,1*	2,8±0,10*	0,7±0,03*	35,2±1,1*
[Na^+] - 80 ммоль/л	0±0*	2,5±0,3*	2,5±0,10	0±0*	24,6±1,4*
[Na^+] - 30 ммоль/л	0±0*	2,4±0,3*	2,2±0,10*	0±0*	17,4±0,4*
[Na^+] - 170 ммоль/л	8,9±0,8*	2,8±0,2	2,4±0,20	5,6±0,80*	54,8±1,8
[Na^+] - 200 ммоль/л	12,6±0,3*	2,7±0,2*	1,4±0,10	8,8±1,60*	69,9±3,8*
[Na^+] - 220 ммоль/л	14,8±1,2*	3,1±0,2	1,1±1,04	19,8±1,40*	69,8±4,2*

* $P < 0,05$.

Таблица 2. Параметры дыхания митохондрий сердца, изолированных после перфузии сердца бескальциевой средой и реперфузии Са-содержащим раствором

Условия эксперимента	Дыхательный контроль по Ларди	АДФ/О	АДФ/Т
До «кальциевого парадокса» (контроль)	4,1±0,21	3,08±0,05	7,03±0,07
«Кальциевый парадокс»:			
[Na^+] - 140 ммоль/л	1,2±0,04**	1,16±0,40**	0,48±0,2**
[Na^+] - 80 ммоль/л	0,99±0,01**	-	-
[Na^+] - 30 ммоль/л	0,98±0,02**	-	-
[Na^+] - 170 ммоль/л	1,8±0,10**	2,23±0,2*	2,05±0,12**
[Na^+] - 200 ммоль/л	3,18±0,10*	3,29±0,05	3,73±0,14**
[Na^+] - 220 ммоль/л	3,45±0,12*	3,16±0,06	4,52±0,18**

Примечание. Здесь и в табл. 3 * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Таблица 3. Р...

циевом парадоксе

Условия экспери...

[Na^+] - 140 ммоль/л (контроль)
 [Na^+] - 80 ммоль/л
 [Na^+] - 30 ммоль/л
 [Na^+] - 170 ммоль/л
 [Na^+] - 200 ммоль/л
 [Na^+] - 220 ммоль/л

Снижение вне...
 ливает более...
 перфузионный...
 Одновременно...
 нозинтрифосфо...
 актура миокар...
 кусственное п...
 170-220 ммоль...
 циевом парадок...
 концентрации аде...
 процессов окисл...
 Отмечено, что...
 проводится (в...
 нок) на 30 %...
 фузат в 4-6 р...
 - Таким образом...
 что глубина по...
 развития контр...
 Известно, что...
 вызвано некон...
 щим истощени...
 ции Ca^{2+} мит...
 удаления Ca^{2+} ...
 матического ре...
 недостатка АТФ

массы) аденин-
се» ($M \pm m$)

Креатин

51,7±1,7

35,2±1,1*

24,6±1,4*

17,4±0,4*

54,8±1,8

69,9±3,8*

69,8±4,2*

осле перфузии

АДФ/Т

0,03±0,07

48±0,2**

0,05±0,12**

73±0,14**

52±0,18**

8. Т. 44, № 1-2

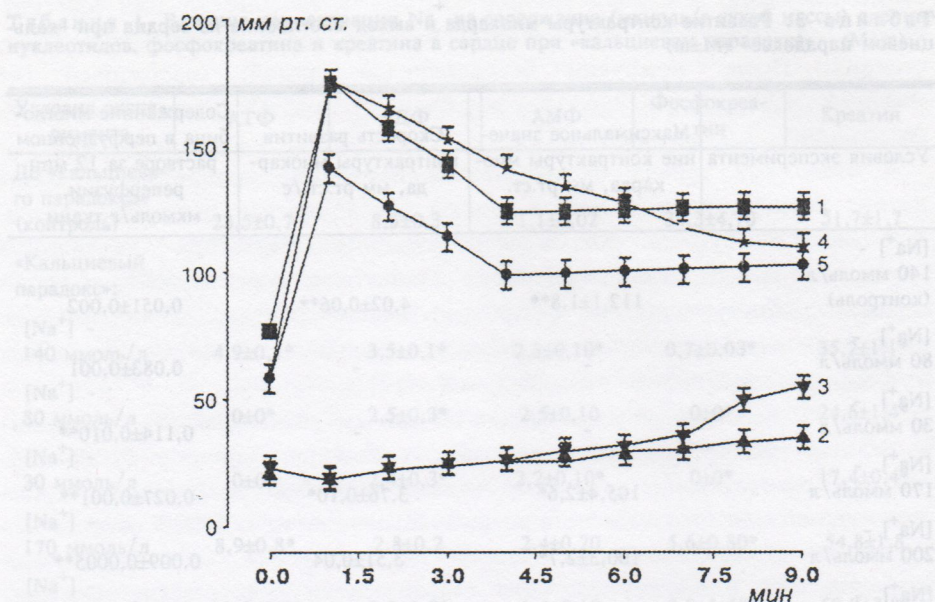
Таблица 3. Развитие контрактуры миокарда и выход миоглобина из сердца при «кальциевом парадоксе» ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Максимальное значение контрактуры миокарда, мм рт.ст.	Скорость развития контрактуры миокарда, мм рт.ст./с	Содержание миоглобина в перфузионном растворе за 12 мин реперфузии, мкмоль/г ткани
[Na ⁺] - 140 ммоль/л (контроль)	112,1±1,8**	4,02±0,06**	0,051±0,002
[Na ⁺] - 80 ммоль/л	-	-	0,083±0,001
[Na ⁺] - 30 ммоль/л	-	-	0,114±0,010**
[Na ⁺] - 170 ммоль/л	105,4±2,6*	3,76±0,10*	0,027±0,001**
[Na ⁺] - 200 ммоль/л	100,3±2,7*	3,51±0,04	0,009±0,0005**
[Na ⁺] - 220 ммоль/л	89,5±3,5**	3,35±0,12	0,004±0,0007**

Снижение внеклеточной концентрации натрия до 30-80 ммоль/л усиливает более чем в 3 раза выход миоглобина в оттекающий от сердца перфузионный раствор при восстановлении прежнего содержания Ca²⁺. Одновременно происходит полное снижение концентрации в ткани аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и фосфокреатина до нуля. Контрактура миокарда в данной серии экспериментов не развивалась. Искусственное повышение внеклеточной концентрации ионов натрия до 170-220 ммоль/л ослабляет развитие повреждений сердца при «кальциевом парадоксе». Об этом свидетельствует сохранение высокой концентрации адениннуклеотидов и фосфокреатина в ткани, сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях (см. табл. 1,3). Отмечено, что увеличение градиента натрия в бескальциевой среде сопровождается ослаблением развития контрактуры миокарда (см. рисунок) на 30 % и снижением выхода миоглобина в оттекающий перфузат в 4-6 раз по сравнению с контролем (см. табл. 3).

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что глубина повреждения сердечной мышцы не соответствует величине развития контрактуры миокарда.

Известно, что развитие «кальциевого парадокса» в сердечной мышце вызвано неконтролируемым потоком Ca²⁺ внутрь клеток и последующим истощением запасов АТФ и фосфокреатина вследствие аккумуляции Ca²⁺ митохондриями [6, 7, 9, 12]. Другие системы активного удаления Ca²⁺ из миоплазмы (Ca²⁺-АТФаза сарколеммы и саркоплазматического ретикулума) в этот период малоэффективны вследствие недостатка АТФ, ацидоза и накопления неорганического фосфата [6].



Влияние концентрации ионов натрия в бескальциевой среде на развитие контрактуры миокарда при восстановлении в растворе физиологической концентрации Ca^{2+} (2,0 ммоль/л). По оси абсцисс - время реперфузии Ca^{2+} -содержащим раствором, минуты, по оси ординат - давление, мм.рт.ст.: 1 - контроль (Na^+ - 140 ммоль/л); 2 - Na^+ - 30 ммоль/л; 3 - Na^+ - 80 ммоль/л; 4 - Na^+ - 170 ммоль/л; 5 - Na^+ - 200 ммоль/л.

Существует мнение, согласно которому при «кальциевом парадоксе» поступление Ca^{2+} в цитоплазму происходит через дефекты в сарколемме, образовавшиеся в результате воздействия контрактуры миофибрилл [7, 9]. Для развития контрактуры миофибрилл необходимо не только существенное увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, но и уменьшение миофибриллярного пула АТФ [2, 11, 13]. Как показали проведенные нами исследования, развитие контрактуры миофибрилл при «кальциевом парадоксе» в контрольной серии экспериментов происходит при существенном снижении концентрации АТФ в ткани.

Однако, моделирование более глубоких повреждений кардиомиоцитов снижением градиента натрия сопровождается полным истощением запасов АТФ без развития контрактуры. Этот факт хорошо согласуется с данными других исследований на изолированных кардиомиоцитах или скинированных волокнах [11, 13], показавших, что даже при значительных концентрациях Ca^{2+} развития контрактуры не происходит, если в цитоплазме не имеется необходимой концентрации АТФ.

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты показали полное несоответствие глубины повреждения кардиомиоцитов и контрактуры миокарда при «кальциевом парадоксе». Это дает основание предполагать, что контрактура миокарда не является причиной повреждения клеток сердца при «кальциевом парадоксе».

U.U. Alabovsky,

DISSOCIATION
AND HEART

The interrela
during the
Cafree medi
that calcium
intensive me
had not fou
myocardial a
intracellular
close correlat
and degree
calcium read

N.N. Burdenko Me
Ministry of Public

СПИСОК ЛИТЕ

1. Алабовский И. Влияние концентрации на развитие контрактуры миокарда. 1986. - 46 с.
2. Капелько В. И. Изображение. 1986. - 46 с.
3. Bergmeyer H. U. 1977-1979; 21.
4. Bhojani I. H., et al. 1986. - P. 507-522.
5. Busselen P. E. Arch. - 1987.
6. Chapman R. A. 1987. - 50. - 1.
7. Daly M. J., et al. Res. - 1987. - 4.
8. Eggleton P., et al. 37. - P. 526-5.
9. Ganote C. E., N. - 17. - P. 733.
10. Goshima K., W. myocardial cell. - P. 1135-1157.
11. Haworth R. A., 1981. - 49. - P.
12. Nayler W. G., I. of the heart. -
13. Nickols C. G., rat ventricular r
14. Ruano-Arroyo by cell sodium P. 783-793.

Воронеж. мед. ака
Россия

U.U. Alabovsky, A.A. Uinokurov

DISSOCIATION BETWEEN CONTRACTURE DEVELOPMENT AND HEART DAMAGE IN THE CALCIUM PARADOX

The interrelationship between contracture development and heart damage during the calcium paradox under different sodium concentration in Cafree media was studied on isolated rat hearts. It had been shown that calcium paradox development accompanied contracture development, intensive membrane disruption and alteration of tissue energy state. We had not found relation between contracture magnitude and degree of myocardial alterations in calcium paradox. Our dates confirm so-called intracellular hypothesis of calcium paradox. The experiments had shown close correlation between transmembrane sodium gradient in Cafree media and degree of cellular damage and energy state alterations during calcium readmission in solution.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алабовский В.В. Энергозависимые процессы миокарда при изменении внеклеточной концентрации натрия и активировании Na-Ca обмена: Автореф. ... дисс. д-ра мед. наук. - М., 1986. - 46 с.
2. Капелько В.И., Векслер В.И., Новикова Н.А. Контрактура миокарда при нарушениях энергообразования: механизм и значение. - М.: Наука, 1988. - С. 105-118.
3. Bergmeyer H.U. Methods in enzymatic analysis. - New York, Acad. Press, 1963. - P. 1464-1468; 1777-1779; 2101-2110; 2129-2131.
4. Bhojani I.H., Chapman R.A. The effect of bathing sodium ions upon intracellular sodium activity in calcium-free media and the calcium paradox // J. Mol. Cell. Cardiol. - 1990. - 22. - P. 507-522.
5. Busselen P. Effect of sodium on calcium paradox in rat hearts // Eur. J. Physiol. (Pfluger's Arch.) - 1987. - 408. - P. 458-464.
6. Chapman R.A., Tunstall J. The calcium paradox of the heart // Prog. Biophys. Mol. Biol. - 1987. - 50. - P. 67-96.
7. Daly M.J., Elz J.S., Nayler W.G. Contracture and the calcium paradox in the heart // Circ. Res. - 1987. - 61. - P. 560-569.
8. Eggleton P., Elsdon S., Gough N. Estimation of creatine by diacetyl // Biochem. J. - 1943. - 37. - P. 526-529.
9. Ganote C.E., Nayler W.G. Contracture and the calcium paradox // J. Mol. Cell. Cardiol. - 1985. - 17. - P. 733-745.
10. Goshima K., Wakabayashi S., Masuda A. Ionic mechanisms of morphological changes of cultured myocardial cells on successive incubation with media without and with Ca // Ibid. - 1980. - 12. - P. 1135-1157.
11. Haworth R.A., Hunter D.R., Brkoff H.A. Contracture of isolated rat heart cells // Circ. Res. - 1981. - 49. - P. 1119-1128.
12. Nayler W.G., Daly M.J. Calcium and injured cardiomyocytes. Physiology and pathophysiology of the heart. - Boston.: Martin Nijiff, 1984. - 00 p.
13. Nickols C.G., Lederer W.J. The role of ATP in energy - deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes // Canad. J. Physiol. Pharmacol. - 1990. - 68. - P. 183-194.
14. Ruano-Arroyo G., Gerstenblith G., Lakatta E.G. «Calcium paradox» in the heart is modulated by cell sodium during the calcium-free period // J. Mol. Cell. Cardiol. - 1984. - 16. - P. 783-793.

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

Поступила
в редакцию 28.03.93