

В.Ф. Сагач, Т.В. Шиманська, С.М. Надточій

Попередження постреперфузійних порушень функції серця та неефективного використання кисню за допомогою інгібіторів відкриття мітохондріальної пори

В експериментах на ізолированих серцях морських свинок, которые перфузировали по методу Лангендорфа при постоянном давлении, изучали возможность коррекции постреперфузионных нарушений деятельности сердца с помощью ингибиторов митохондриальной поры цикло-спорина А и водорастворимого витамина Е – тролокса. Показано, что реперфузия, помимо нарушения функции сердца, тонуса коронарных сосудов и ритма сердечных сокращений, сопровождалась увеличением кислородной стоимости работы сердца, которая к 40-й минуте реперфузии увеличивалась на 83 % относительно исходной величины. Предварительное введение исследуемых веществ приводило к существенному уменьшению нарушений деятельности сердца и кислородного обмена, которые вызывались тотальной 20-минутной ишемией и последующей реперфузией. Тролокс проявлял свое протективное действие как в условиях его применения вместе с перфузионным раствором, так и при введении животным per os. При этом на 40-й минуте реперфузии давление в левом желудочке составляло 79 % от исходного против 51 % в контроле, dP/dt_{max} и dP/dt_{min} соответственно 88 и 85 % против 66 и 45 % у контрольных животных. Кислородная стоимость работы сердца достоверно не увеличивалась. Сделан вывод, что постреперфузионные нарушения сократительной функции миокарда, тонуса коронарных сосудов и сердечного ритма, а также неэффективное использование тканями сердца кислорода, обусловлены открытием митохондриальной поры.

ВСТУП

Проблема ішемії – реперфузії органів гостро стоїть перед лікарями різних напрямків, бо наслідки реперфузії суттєво обмежують можливості тромболітичної терапії, призводячи до порушень судинного тонусу, кровопостачання та функціонального стану реперфузованого органа. Дослідження останніх років показують, що природа реперфузійних пошкоджень може бути пов'язана з виключним значенням мітохондрій [6,7], які виступають не тільки як енергетичні центри синтезу АТФ, але і як джерело виходу в цитозоль клітини різних факторів [12], що

запускають як процеси розвитку реперфузійних пошкоджень, так і процеси, що призводять до апоптозу клітин [7]. Нині в провідних світових наукових виданнях ведеться дискусія навколо так званих мітохондріальних пор (МП) і їх ролі в нормі і при патології. Відомо, що МП – неселективні канали, що відкриваються в мембранах мітохондрій, крізь які можуть проходити молекули масою менше ніж 1500 Да [12]. Тригерами активації МП можуть бути іони Ca^{2+} [4], вільні радикали [6], неорганічний фосфат і різке зменшення концентрації АТФ у клітині [13]. Показано, що транзиторне відкриття мітохондріальних пор може розглядатися як

відповідь клітини на несприятливий зовнішній сигнал [12]. Проте при патологічних станах, наприклад при ішемії – реперфузії [5, 11] або впливі окремих хімічних токсинів [14], відкриття МП призводить до виходу з мітохондрій цілої низки речовин, як відомих (цитохром С; фактор індукції апоптозу, вільні радикали тощо) [12], так і тих, роль яких поки що залишається невивченою. Наголошується, що більшість реперфузійних пошкоджень серця пов'язані саме з утворенням мітохондріальної пори та дією тих токсинів і вільних радикалів, які виходять при цьому в цитозоль [16].

Відомо, що одним із найбільш ефективних блокаторів мітохондріальної пори є циклоспорин А, який зв'язує циклофілін D, що є одним із структурних елементів пори. В публікаціях останнього часу з'явилась інформація, що водорозчинний вітамін Е (тролокс) відомий як інгібітор оксидативного стресу [19], ймовірно, може виступати інгібітором відкриття мітохондріальної пори та виходу в цитозоль значної кількості вільних радикалів кисню [21]. Саме відкриття МП спостерігається при реперфузії ішемізованого серця [11], а попередження відкриття пори циклоспорином А запобігало порушенню функції ізольованого серця [10].

Мета цієї роботи – спроба підтвердити, що постреперфузійні порушення функції серця та коронарного кровообігу зумовлені відкриттям мітохондріальної пори, а також пошук ефективних і менш токсичних інгібіторів пори, ніж класичний її блокатор - циклоспорин А.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на ізольованих серцях морських свинок масою 350 – 450 г. Перфузію коронарних судин здійснювали за методом Лангендорфа за умов постійного тиску, при температурі 37 °С розчином наступного складу (у ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 24; KH₂PO₄

– 1,2; глюкоза – 10; CaCl₂ – 2,5. Перфузійний розчин аерували карбогеном (95 % O₂ і 5 % CO₂). Тиск у порожнині лівого шлуночка – розвинутий (P_p) та кінцево-діастолічний (КДТ) – вимірювали за допомогою латексного балончика тензодатчиками 746 і реєстрували на багатоканальному полікардіографі «Мінгограф-82» («Елема», Швеція). Скорочувальну активність лівого шлуночка оцінювали за значенням dP/dt_{max} і dP/dt_{min}, розраховували індекс скоротливості Верагута. Величину коронарного потоку вимірювали за об'ємом відтікаючого від ізольованого серця перфузійного розчину за 1 хв. Діастолічну жорсткість міокарда розраховували за співвідношенням КДТ та додаткового об'єму, який вводили в балончик.

Напруження кисню у притікаючому та відтікаючому від серця перфузійному розчині вимірювали за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk 2. Розраховували об'єм споживання кисню за методом Neely [17] та кисневу вартість роботи серця за співвідношенням споживання кисню та тиску, який розвивав лівий шлуночок.

Ішемію – реперфузію моделювали за допомогою повної зупинки перфузії серця на 20 хв і наступної реперфузії впродовж 40 хв. Реєстрацію досліджуваних показників проводили через кожні 5 хв спостереження.

Для пригнічення утворення мітохондріальної пори використовували водорозчинний вітамін Е – тролокс (SIGMA) та циклоспорин А (SIGMA), які перфузували у системі ізольованого серця протягом 10 хв у дозі 5·10⁻⁵ та 10⁻⁶ моль/л відповідно після чого моделювали тотальну 20-хвилинну ішемію. Крім того, у другій серії експериментів тролокс вводили перш за все у дозі 10 мг/кг за 50 хв до виділення серця, далі ішемія – реперфузія за схемою.

Статистичну обробку результатів проводили методом різниць за допомогою критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що 20-хвилинна тотальна ішемія серця та наступна його реперфузія призводили до розвитку значних порушень кардіодинаміки та скорочувальної активності міокарда. Вже на 5-й хвилині реперфузії тиск, який розвивав лівий шлуночок, вірогідно знижувався на 28 % (до 45,7 мм рт.ст. \pm 3,8 мм рт.ст., $P < 0,001$) і на 40-й хвилині спостереження становив 48,5 % відносно вихідного значення (рис.1). Показники скорочувальної активності міокарда dP/dt_{\max} і dP/dt_{\min} на 40-й хвилині реперфузії становили відповідно 65 та 45 % від початкових величин (до ішемії вони були 1182 ± 49 та 1037 мм рт.ст./с \pm 54 мм рт.ст./с відповідно) (рис.2). Індекс скоротливості Верагута мав тенденцію до зниження, а коронарний потік вже на 15-й хвилині реперфузії вірогідно зменшувався і на 40-й хвилині спостереження становив 68 % від вихідного значення ($9,5$ мл/хв \pm 1,1 мл/хв, $P < 0,006$). Жорсткість міокарда поступово збільшувалась.

В контрольних експериментах із початком реперфузії міокарда спостерігалися суттєві порушення серцевого ритму. За перші 5 хв кількість екстрасистол становила 250 од. \pm 57 од. ($P < 0,002$), однак уже на 15-20-й хвилині ритм нормалізувався.

Киснева вартість роботи серця вже на 10-й хвилині реперфузії збільшувалася на 41 % відносно вихідного рівня, $P < 0,05$, а на 40-й хвилині збільшувалася до 183 %. Таким чином, результати наших досліджень свідчать, що ішемія – реперфузія призводила до суттєвих порушень діяльності серця та кисневого обміну.

З літератури відомо, що розвиток реперфузійних порушень є наслідком активації мітохондріальних пор [11], виходу у цитозоль активних метаболітів, які призводять до порушення клітинного обміну та апоптозу. З іншого боку показано, що тролокс, відомий антиоксидант, запобігає утворенню пори [21].

З метою з'ясування питання, чи може тролокс попереджати постреперфузійні порушення серця ми провели серію експериментів, в яких моделювали ішемію – реперфузію після додавання у перфузійний розчин тролоксу.

Результати наших досліджень свідчать про те, що 20-хвилинна тотальна ішемія серця та наступна його реперфузія на тлі попереднього введення тролоксу (10 хв перфузії) не призводили до розвитку суттєвих порушень кардіодинаміки та скорочувальної активності міокарда, які спостерігались у контрольній серії. Міра зниження цих показників була значно меншою, а іноді їх зміни мали протилежний характер. Наприклад, після перфузії тролоксу на 40-й хвилині реперфузії КДТ вірогідно знижувався з $-2,2 \pm 0,43$ до $-4,4$ мм рт.ст. \pm 0,9 мм рт.ст., в той час, як у контрольній серії на 40-й хвилині він підвищувався і дорівнював $1,14$ мм рт.ст. \pm 0,67 мм рт.ст., до ішемії $-2,9$ мм рт.ст. \pm 0,4 мм рт.ст. Жорсткість міокарда після ішемії на 40-й хвилині реперфузії в контрольній серії експериментів збільшувалася на 41 %, а після перфузії тролоксу мала лише тенденцію до збільшення. Проте наші експерименти свідчать, що максимальний протекторний ефект тролоксу спостерігався після введення препарату per os. Динаміку змін тиску у лівому шлуночку та показників скорочувальної активності міокарда за умов даної моделі експерименту показано на рис.1,2.

Тиск, який розвивав лівий шлуночок, на 5-й хвилині реперфузії знижувався на 21 % (до 50,5 мм рт.ст. \pm 6,6 мм рт.ст., $P < 0,002$) відносно вихідного значення та підтримувався на цьому рівні протягом 40 хв спостереження (у контролі на 40-й хвилині він зменшувався на 51,5 % та становив 30,8 мм рт.ст. \pm 3,5 мм рт.ст., рис.1). Показники скорочувальної активності міокарда dP/dt_{\max} і dP/dt_{\min} на 40-й хвилині реперфузії були відповідно 88 % (1482 мм рт.ст./с \pm 128 мм рт.ст./с) та 85 % (1257 мм рт.ст./с \pm

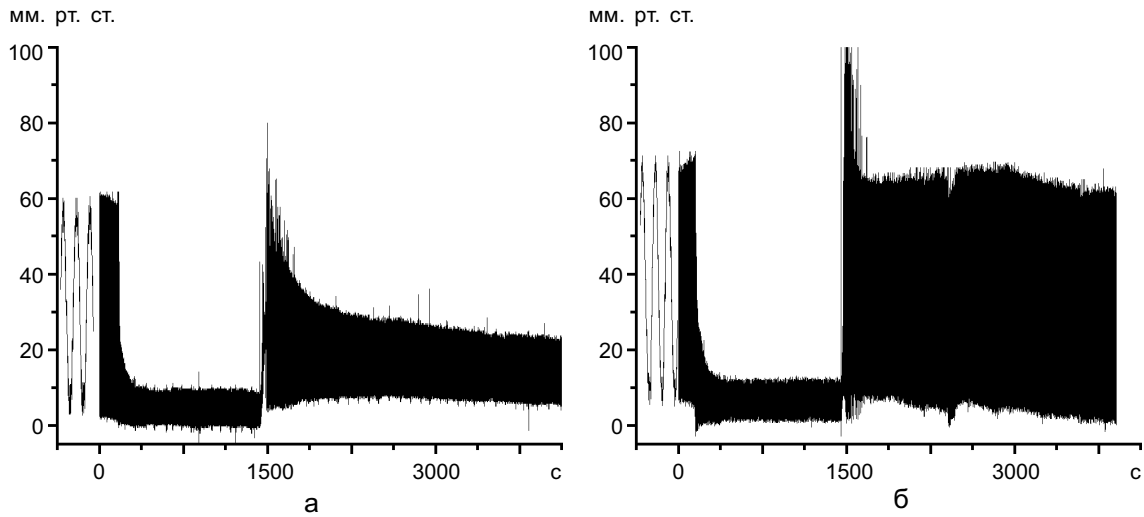


Рис.1. Зміни тиску у лівому шлуночку протягом ішемії – реперфузії у контрольних тварин (а) та після попереднього введення тролоксу per os (б).

93 мм рт.ст./с) від вихідного рівня (рис.2) проти 66 та 45% у контролі. Індекс скоротливості Верагута вірогідно збільшувався з $65,6 \pm 3,4$ до $75,6 \text{ с}^{-1} \pm 4,0 \text{ с}^{-1}$ ($P < 0,005$), а в контрольній серії мав тенденцію до зниження. Коронарний потік упродовж реперфузії поступово зменшувався, але лише на 30-й хвилині реперфузії ці зміни ставали достовірними (у контрольній серії на

15-й хвилині) і на 40-й хвилині спостереження коронарний потік становив $14,9 \text{ мл/хв} \pm 1,8 \text{ мл/хв}$ – 75% порівняно з $20,2 \text{ мл/хв} \pm 1,5 \text{ мл/хв}$ до ішемії ($P < 0,03$).

При попередньому введенні тролоксу кількість екстрасистол за 5 хв реперфузії була у 5 разів менша, ніж у контрольних експериментах та становила 40,5 од. $\pm 6,3$ од. ($P < 0,001$).

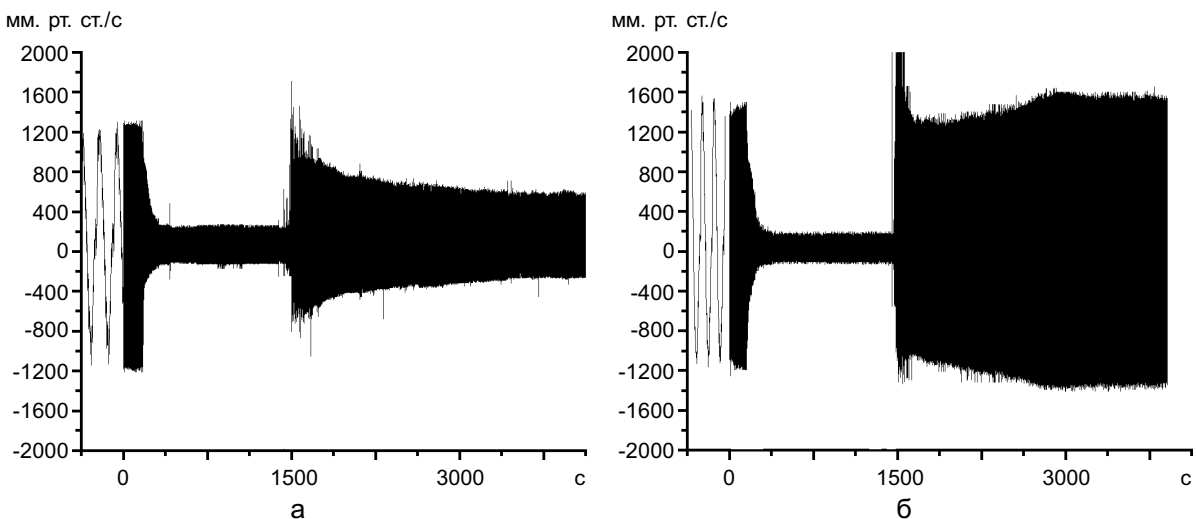


Рис.2. Зміни показників скорочувальної активності міокарда протягом ішемії – реперфузії у контрольних тварин (а) та після попереднього введення тролоксу per os (б).

На відміну від контрольної серії, де вже на 10-й хвилині реперфузії киснева вартість роботи серця збільшувалася на 41 % відносно вихідного рівня ($P < 0,05$), при використанні тролоксу остання вірогідно не змінювалася відносно вихідних її значень. Таким чином, введення тролоксу попереджувало розвиток постреперфузійних порушень діяльності серця та кисневого обміну.

Аналогічний характер постреперфузійних змін кардіодинаміки та кисневого обміну ізольованого серця морської свинки ми спостерігали на фоні попереднього введення циклоспорину А – одного з найбільш відомих інгібіторів утворювання мітохондріальної пори.

Треба відмітити, що перфузія ізольованого серця розчином Кребса – Хензелейта з циклоспорином А у дозі 10^{-6} моль/л протягом 10 хв призводила до вірогідних змін кардіодинаміки, скорочувальної активності міокарда та споживання кисню. Тиск у лівому шлуночку знижувався на 25 %, а показники скорочувальної активності міокарда dP/dt_{\max} і dP/dt_{\min} були відповідно 84 % (1441 ± 136) та 78 % (1034 мм рт.ст./с ± 83 мм рт.ст./с) щодо вихідного значення. Киснева вартість роботи мала тенденцію до збільшення. Відомо, що циклоспорин А є не тільки блокатормітохондріальної пори, зокрема він може зв'язувати у цитозолі клітини циклофілін А, який крізь ланцюг реакцій стимулює нейрональну NO-синтазу [9]. Вірогідно, що зміни кардіодинаміки та скорочувальної функції міокарда, які ми спостерігали при перфузії циклоспорину А, зумовлені саме блокадою NO-синтази. Це підтверджується і збільшенням кисневої вартості роботи серця за цих умов, яка, згідно з нашими попередніми дослідженнями [1], вірогідно зростала при блокаді NO-синтази.

Проте 20-хвилинна ішемія та наступна реперфузія серця після введення циклоспорину А не супроводжувалися значними змінами кардіодинаміки та кис-

невого обміну порівняно з контрольними експериментами без циклоспорину А (рис. 3).

Кількість аритмій в перші 5 хв реперфузії в експериментах з попереднім введенням циклоспорину А становила 38 ± 16 , тоді як при ішемії – реперфузії ця величина була 250 ± 57 . Тиск у лівому шлуночку та показники скорочувальної активності міокарда dP/dt_{\max} і dP/dt_{\min} на 40-й хвилині реперфузії серця становили відповідно 74, 81 та 68 % від їх значень до ішемії, а зниження коронарного кровотоку відбувалося при цьому на одну четверту частину. Перфузія циклоспорину А попереджала значне збільшення кисневої вартості роботи серця, і на 40-й хвилині реперфузії вона зростала лише на 15 % замість 58 % у контролі, $P < 0,05$ (рис. 4).

Таким чином, наведені результати дослідження свідчать, що попереднє введення інгібіторів мітохондріальної пори – тролоксу та циклоспорину А – призводило до суттєвого зменшення порушень діяльності серця та кисневого обміну, які викликала тотальна 20-хвилинна ішемія та наступна реперфузія міокарда. Це збігається з результатами, отриманими в експериментах на ізольованому серці щурів [10,19]. З іншого боку, наведені дані свідчать, що ішемія – реперфузія серця, що, як відомо, супроводжується відкриттям мітохондріальної пори, призводить поряд із порушенням скоротливої активності міокарда і тонуусу коронарних судин до значного підвищення кисневої вартості роботи серцевого м'яза, тобто до зменшення ефективності використання кисню тканинами серця. Відомо, що відкриття МП, яке характерне для постреперфузійного серця, супроводжується значним виходом із мітохондрій вільних радикалів кисню [21], які легко зв'язуються з внутрішньоклітинним оксидом азоту й інактивують його, утворюючи токсичну речовину пероксинітрил. Така інактивація оксиду азоту може бути підґрунтям для спостережуваного нами збільшення споживання кисню міокардом

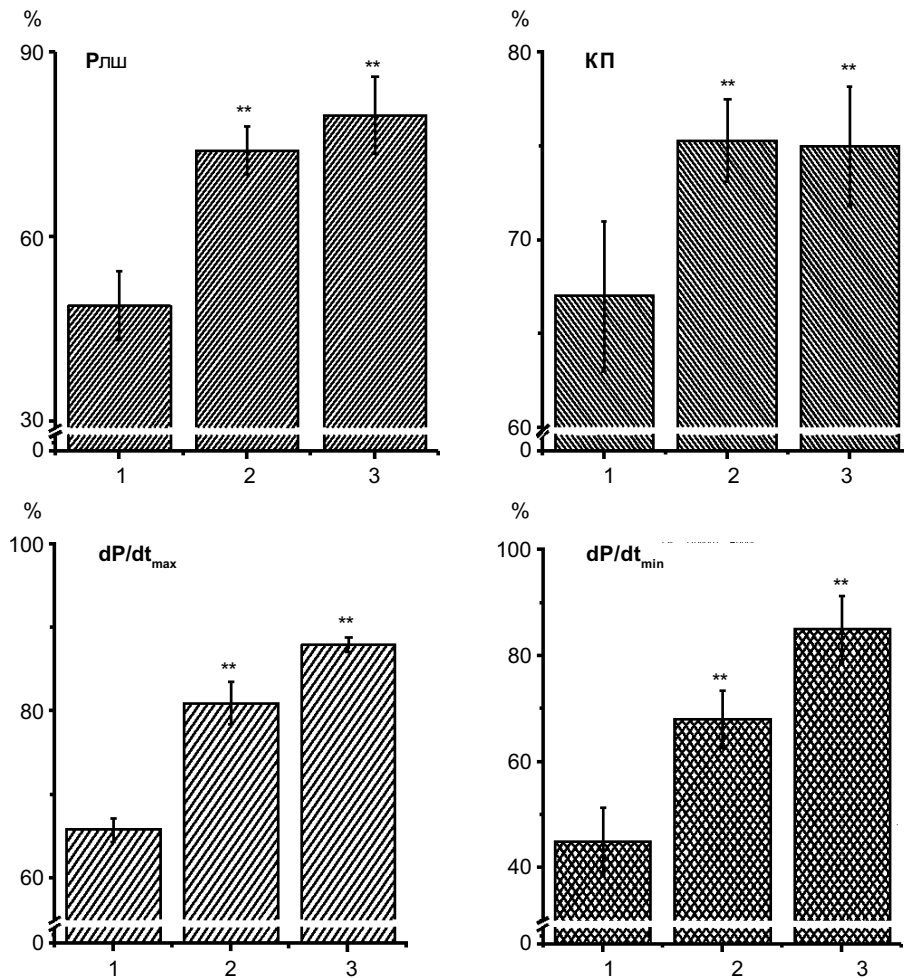


Рис.3. Величина показників кардіодинаміки та скорочувальної активності міокарда через 40 хв реперфузії у контрольних тварин (1) та після попереднього введення циклоспорину А (2) і тролоксу (3).

та зменшення ефективності його використання. Як показано раніше, саме нестача оксиду азоту в тканинах призводить до збільшення як споживання кисню тканинами, так і кисневої вартості роботи серця [1, 8, 20]. Крім того, збільшення споживання кисню та зменшення ефективності його використання в разі відкриття МП можливо пояснити тим, що більша частина спожитого кисню витрачається на утворення його вільних радикалів. З іншого боку, було доведено, що саме оксид азоту, який у разі відкриття МП може бути значною мірою інактивованим, попереджає розвиток оксидативного стресу та робить клітини резис-

тентними до ушкодження [18]. Цей ефект оксиду азоту може бути зумовлений і прямим його інгібуючим впливом на відкриття МП [3]. Опосередкованим підтвердженням цих поглядів є дані про підвищення активації МП у старих тварин [15], у яких, як відомо, спостерігається розвиток дисфункції ендотелію та недостатність оксиду азоту [2]. Але які б механізми не брали участі у відкритті мітохондріальної пори при ішемії – реперфузії, сам факт її утворення не викликає сумніву [5, 11]. І те, що інгібітори утворення МП - циклоспорин А та тролокс, як показано вище, суттєво зменшують постреперфузійні порушення скоротливої функції та

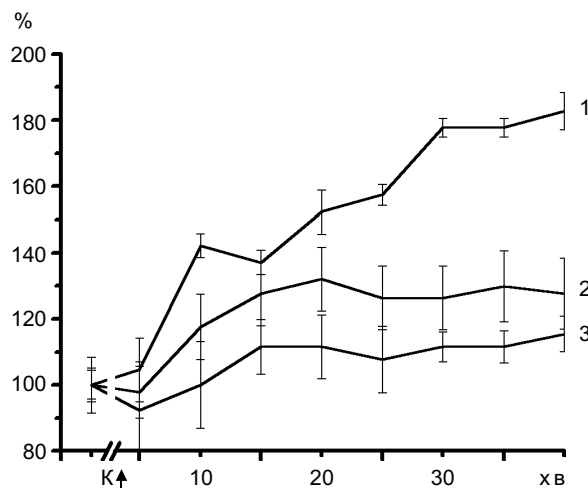


Рис.4. Зміни кисневої вартості роботи серця протягом реперфузії у контрольних тварин (1) та після попереднього введення тролоксу per os (2) і циклоспорину А (3).

кисневого обміну міокарда, тону су коронарних судин і ритму серцевих скорочень підтверджує висновок, що згадані порушення зумовлені відкриттям МП. Отримані результати також свідчать, що для пригнічення відкриття МП і попередження подальших порушень діяльності серця можливо використовувати як класичний інгібітор МП - циклоспорин А, так і водорозчинний вітамін Е - тролокс, який проявляє свою дію як при застосуванні його разом з перфузійним розчином, так і при введенні тваринам per os.

Sagach V.F., Shymanskaya T.V., Nadtochiy S.M.

PROTECTION OF HEART FROM REPERFUSION INJURY AND INEFFECTIVE OXYGEN USING BY INHIBITORS OF THE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE

In experiments on isolated hearts of guinea-pig, perfused under Langendorff preparation, possible protection of hearts from reperfusion injury by the known inhibitors of mitochondrial permeability transition pore - cyclosporin A, and trolox - water-soluble vitamin E was studied. It has been shown that cardiac reperfusion was followed with an increase in an oxygen cost of myocardial work (by 83% from control level in 40 min of reperfusion), in addition to the disturbances of cardiac contractility, tone of the coro-

nary vessels and heart rate. The heart function and myocardial oxygen metabolism disturbances, due to global 20 min ischaemia and reperfusion, were essentially decreased by a preliminary application of investigated agents. Trolox improved cardiac recovery both when it was perfused in vitro and after its administration per os. In 40 min of heart reperfusion LV developed pressure was 79% as compared to 51% in that at control; dP/dt_{max} and dP/dt_{min} were 88% and 85% accordingly against 66% and 45% in control; oxygen cost of myocardial work didn't change reliably). Conclusion: postreperfusion disturbances of cardiac contractility, tone of the coronary vessels and heart rate, as well as noneffective oxygen utilization by the heart tissue were due to an opening of mitochondrial permeability transition pore.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology NAS Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Вивчення ролі оксиду азоту у змінах споживання кисню та кисневої вартості роботи серцевого м'язу // Фізіол. журн. – 2000. – **46**, №2. – С.33 – 40.
2. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Коцюруба А.В. та ін. Ендотеліязалежні скорочувальні реакції судинних гладеньких м'язів і вміст вільних радикалів кисню у шурів за умов старіння // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, №4. – С.3 – 13.
3. Brookes P.S., Salinas E.P., Usmar K.D. et al. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome C release // J.Biol.Chemistry. – 2000. – **275**, N 27. – P. 20474 – 20478.
4. Crompton M., Costi A. A heart mitochondrial Ca induced pore of possible relevance to reperfusion injury // Biochem.J. – 1990. – **266**. – P.33 – 39.
5. Crompton M., Andreeva L. On the involvement of a mitochondrial pore in reperfusion injury // Bas. Res. Cardiol. – 1993. – **88**. – P.513 – 523.
6. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // Biochem.J. – 1999. – **341**. – P.233 – 249.
7. Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death // J. Physiol. – 2000. – **529**, N1. – P.11 – 21.
8. Chen Y., Traverse J.H., Du R. et al. Nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in failing heart // Circulation. – 2002. – **106**, N2. – P.273 – 279.
9. Duchon M. Mitochondrial and calcium: from cell signalling to cell death // J.Physiol. – 2000. – **529**, N1. – P.57 – 68.
10. Griffiths E., Halestrap A. Protection by cyclosporin A of ischaemia/reperfusion induced damage in isolated heart // J.Mol.Cell.Cardiol. – 1993. – **25**. – P.1461–1469.
11. Griffiths E., Halestrap A. Mitochondrial non specific pores remain closed during cardiac ischaemia but open upon reperfusion // Biochem.J. – 1995. – **307**. – P.93 – 98.

12. Halestrap A. Mitochondria and cell death // The Biochemist. – 2000. – P.19 – 24.
13. Hunter P., Haworth R. The Ca induced membrane transition in mitochondria // Arch. And Biochem.Biophys. – 1979.– **195**. – P.468 – 477.
14. Korge P., Goldhaber J., Weiss J. Phenylarsine oxide induces mitochondrial permeability transition, hypercontracture, and cardiac cell death // Amer. J.Physiol. –2001. – **280**. – P.H2203 – H2213.
15. Mather M., Rottenberg H. Aging enhances the activation of permeability transition pore in mitochondria // Biochem. and Biophys.Res.Com. – 2000. – **273**. – P.603 – 608.
16. Nazareth W., Yafei N., Crompton M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A // J.Mol.Cell.Cardiol. – 1991. – **23**. – P.1351 – 1354.
17. Neely J.R., Liebermeister H., Battersby E.J. et al. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated heart // Amer. J. Physiol.– 1967. – **221**. – P.804 – 813.
18. Paxinou E., Weisse M., Chen O. et al. Dynamic regulation of metabolism and respiration by endogenously produced nitric oxide protects against oxidative stress// Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 2001. – **98**, N20. – P.11575 – 11580.
19. Sagach V., Scrosati M., Fielding J. et al. The water-soluble vitamin E analogue trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E // Pharmacol.Res. – 2002. – **45**. – P.435 – 439.
20. Shen W., Xu X., Ochoa M. et al. Role of nitric oxide in the regulation of oxygen consumption in conscious dogs // Circulat. Res. – 1994. – **75**, N 6. – P.1086 – 1095.
21. Zorov D.B., Filburn C.R., Klotz L-O. et al. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes // J. Exp. Med. – 2000. – **192**, N7. – P.1001 – 1014.

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 08.11.2002*