

В.В. Алабовский, А.А. Винокуров, В.В. Хамбуров, О.В. Маслов
ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЫ
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА «НЕОТОН»
ПРИ «КАЛЬЦИЕВОМ ПАРАДОКСЕ»

ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, каф. биохимии

Резюме. Фосфокреатин является не только буферной энергетической системой в клетке, но и переносчиком энергии. В этой связи фосфокреатин «неотон» широко используется при энергодефицитных патологических состояниях организма. Проведенными исследованиями установлено, что использование фосфокреатина при перегрузке кардиомиоцитов Ca^{2+} усиливает повреждения в миокарде. Критериями повреждения кардиомиоцитов являлись: выход из сердца миоглобина, нарушение сопряжения процессов окисления и фосфорилирования, снижение скорости синтеза АТФ в изолированных митохондриях, уменьшение содержания в сердце АТФ, АДФ, АМФ, фосфокреатина и креатина.

Показано, что существенным защитным действием фосфокреатин обладает только в условиях высокого трансмембранного градиента Na^+ на сарколемме. Положительный эффект фосфокреатина блокируется строфантином, ингибитором Na^+, K^+ -АТФазы. Действие повышенной концентрации ионов натрия не связано с увеличением осмотической активности растворов.

Ключевые слова: фосфокреатин, кардиомиоциты, перфузия, изолированное сердце.

Актуальность. Одной из особенностей химического состава сердечной мышцы является высокая внутриклеточная концентрация фосфокреатина. Исследования последнего времени показывают, что фосфокреатин играет важную роль в переносе энергии к местам её использования в клетке [1]. Позднее появились исследования об использовании фосфокреатина в качестве лечебного средства при ишемических и гипоксических повреждениях сердца [2]. Однако, в условиях необратимого повреждения клеток, например при «кальциевом парадоксе» применение фосфокреатина оказывается неэффективным [3]. Кроме того, имеются данные свидетельствующие об увеличении величины контрактуры миокарда под действием фосфокреатина [4]. Предполагают, что фосфокреатин увеличивает Ca^{2+} – поглощающую способность митохондрий. При избыточном поступлении Ca^{2+} внутрь клеток происходит необратимое повреждение органелл и гибель кардиомиоцитов [3, 5].

Известно, что увеличение внеклеточной концентрации Na^+ ограничивает повреждения сердца при «кальциевом парадоксе» [4]. Можно предположить, что в этих условиях фосфокреатин также может обладать положительным влиянием на миокард.

Следует также отметить, что защитное действие фосфокреатина разными авторами изучалось при высоких концентрациях (10 мМ). Такое значительное содержание лекарственного препарата может быть достигнуто только в кардиоплегических растворах. При внутривенном введении препарата «Неотон» (коммерческая форма фосфокреатина фирмы «Sciapparelli», Италия) содержание фосфокреатина в крови не превышает 0,1 мМ [6, 7, 8, 9, 10]. В этой связи остаётся невыясненным влияние небольших концентраций фосфокреатина, близких к тем, которые создаются при его внутривенном введении.

При “кальциевом парадоксе” происходят изменения электрической активности в сердце: величины потенциала покоя, градиента Na^+ , активности Na^+, K^+ -АТФазы и других параметров. Оценка степени развития контрактуры миокарда при “кальциевом парадоксе” также не может являться однозначным критерием состояния миокарда [1, 4]. Поэтому для изучения состояния сердца мы использовали ряд других параметров.

Учитывая это, целью настоящего исследования явилось изучение влияния фосфокреатина (препарат «Неотон») при перегрузке сердца кальция, вызванной “кальциевым парадоксом” в условиях высокого трансмембранного градиента концентраций Na^+ .

Материал и методы исследования. Эксперименты проводились на изолированных сердцах белых беспородных крыс по методу Лангендорфа.

После декапитации и вскрытия грудной клетки под эфирным наркозом, сердце крысы извлекали и помещали в охлажденный раствор. Далее подвешивали изолированный орган на канюлю и осуществляли перфузию со скоростью 10 мл/мин на 1 грамм ткани. Исходным раствором промывали сердце в течение 15 минут для стабилизации сократительной функции и показателей энергетического состояния.

Через изолированное сердце пропускали оксигенированный раствор (100% O_2) следующего состава (в мМ): NaCl -140; NaH_2PO_4 - 0,1; KCl - 3; трис-ОН- 2 (рН=7,4); глюкозы-11; CaCl_2 – 2.

При моделировании “кальциевого парадокса” сердце перфузировали бескальциевой средой, содержащей 0,5 мМ ЭДТА в течение 10 минут. Затем осуществляли реперфузию сердца исходным раствором, содержащим 2,0 мМ Ca^{2+} . Изменение концентрации Na^+ , добавление фосфокреатина, сахарозы или строфантина осуществляли только в период бескальциевой перфузии сердца.

Через 15 минут реперфузии сердца, сердца замораживали при температуре жидкого азота с помощью щипцов Волленбергера и приготавливали тканевые экстракты с помощью 6% трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования при 3000 г супернатант нейтрализовывали 2 М КОН при 0° – 4° С и определяли содержание адениннуклеотидов стандартными ферментативными методами.

Содержание креатина оценивали спектрофотометрически с помощью альфа-нафтола. Концентрацию фосфокреатина вычисляли по разности содержания в ткани креатина и суммарного креатина (креатин + фосфокреатин). Концентрацию неорганического фосфата определяли методом Лоури и Лопеца.

Сухую массу ткани сердца измеряли после высушивания в течение 24 часов при 100° С измельченного в жидком азоте порошка сердца.

Выделение митохондрий методом дифференциального центрифугирования производили в среде следующего состава (в М): сахарозы- 0,3; триса- 0,005 (рН= 7,5). Изучение параметров дыхания производили с помощью полярографа "ПУ-1" в среде следующего состава (в М): сахарозы - 0,20; ЭДТА- 0,01; трис-ОН - 0,01 (рН= 7,45), KH_2PO_4 - 0,010; KCl - 0,010. Белок определяли биуретовым методом, принимая в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Содержание миоглобина в оттекающем перфузионном растворе оценивали спектрофотометрически.

Концентрацию Ca^{2+} в растворах контролировали с помощью ионоселективного электрода ЭИ-Са-01 и электронного потенциометра ВЛ-750.

Для оценки глубины повреждения кардиомиоцитов при "кальциевом парадоксе" использовали следующие показатели: содержание в ткани сердца адениннуклеотидов, фосфокреатина и креатина, концентрацию в оттекающем перфузионном растворе миоглобина, сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях.

В работе использованы - миоглобин лошади, бычий сывороточный альбумин и трисамин "Sigma" (США), стандартные наборы для определения АТФ, АДФ и АМФ "Boehringer Mannheim GmbH" (Германия). Остальные реактивы - отечественного производства квалификации "х.ч."

Результаты лабораторных испытаний обработаны методом вариационной статистики.

Полученные результаты и их обсуждение. Установлено, что реперфузия сердца Ca^{2+} - содержащим раствором после 10 минут перфузии бескальциевой средой приводит к снижению скорости свободного (V_0 и V_4) и фосфорилирующего дыхания (V_3), скорости фосфорилирования (АДФ/т), разобщению процессов окисления и фосфорилирования митохондрий. Одновременно более чем в 4 раза снижалось содержание адениннуклеотидов, креатина и фосфокреатина в ткани сердца. Наблюдался интенсивный выход миоглобина в оттекающий раствор.

Добавление фосфокреатина (100 мкМ) усиливало выход миоглобина из сердца более чем в 1,5 раза. Митохондрии, выделенные из сердечной мышцы, отличались полным разобщением окисления и фосфорилирования.

Растворы, содержащие 80 мМ хлорида натрия (осмотичность сохраняли добавлением соответствующего количества сахарозы) усиливали выход миоглобина из сердца более чем в 5 раз по сравнению контролем. Одновременно отмечалось ещё большее снижение скорости свободного дыхания. Наблюдалось полное разобщение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях, уменьшение до нуля концентраций АТФ и фосфокреатина в сердце.

Фосфокреатин (100 мкМ), в условиях низкого уровня натрия в перфузионной среде, ещё больше усиливал выход миоглобина в оттекающий раствор. Как и в предыдущей серии, наблюдалось полное угнетение дыхания и фосфорилирования в митохондриях. Содержание адениннуклеотидов также находилось на низком уровне.

Следовательно, в условиях низкой внеклеточной концентрации Na^+ фосфокреатин не обладает защитным действием при "кальциевом парадоксе".

В дальнейших экспериментах нами было изучено влияние фосфокреатина на развитие "кальциевого парадокса" в условиях высокого трансмембранного градиента натрия. Для этого в бескальциевый раствор добавляли хлорид натрия до конечной концентрации 200 мМ.

Эксперименты показали, что в условиях высокого градиента натрия фосфокреатин способствовал сохранению более чем 60% запасов макроэргических соединений в ткани сердца, уменьшал выход миоглобина из сердца, способствовал сохранению на высоком уровне сопряжения окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Таким образом, фосфокреатин эффективно защищает сердце в условиях высокого трансмембранного градиента Na^+ . Оставалось, однако, неясным, связано ли потенцирующее действие гипернатриевой среды с повышенной осмотичностью растворов. Возможно данный эффект наблюдался в результате увеличения осмотического давления внеклеточной среды.

Для проверки этого предположения были проведены эксперименты, в которых осмотическое давление бескальциевой среды было увеличено путем добавления сахарозы, сопоставимое с увеличением осмотичности за счет 200 мМ хлорида натрия. Использование сахарозы, но не хлорида холина или солей лития было связано со способностью последних ослаблять развитие кальциевого парадокса влиянием на соответствующие ионообменные системы.

Установлено, что растворы, содержащие сахарозу и имеющие осмотическое давление, равное с гипернатриевой средой, не ослабляли повреждающее свойство фосфокреатина. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о незначимой роли осмотического давления гипернатриевой среды в положительном действии фосфокреатина при "кальциевом парадоксе" [2,3,4].

Не исключено, что положительное влияние высокой внеклеточной концентрации Na^+ связано с её способностью активировать Na^+, K^+ -АТФазу, и поддерживать низкий уровень натрия внутри кардиомиоцитов. Этот прием позволял ослабить $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ обмен при возврате прежнего уровня кальция во внеклеточной среде, предупреждая тем самым, перегрузку сердца кальцием при моделировании "кальциевого парадокса".

Для решения данного вопроса были проведены эксперименты, в которых изучалось влияние повышенной концентрации хлорида натрия и фосфокреатина в условиях сниженной активности Na^+, K^+ -АТФазы. С этой целью, в бескальциевую среду добавляли строфантин (50 мкМ). Реперфузию сердца осуществляли исходным раствором, содержащим физиологические концентрации $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$.

Эксперименты показали, что фосфокреатин (100 мкМ) в этих опытах не обладал защитным действием даже в гипернатриевой среде ($\text{Na}^+ = 200$ мМ), Интенсивность выхода миоглобина из сердца при "кальциевом парадоксе" в данных сериях экспериментов существенно превышала контрольные значения.

Таким образом, защитное влияние фосфокреатина в сочетании с гипернатриевой внеклеточной средой не проявляется в присутствии строфантина - условиях, когда активность Na^+ -насоса кардиомиоцитов снижена т. е. в отсутствии способности этой транспортной системы сохранять высокую трансмембранную разность для ионов натрия.

Выводы. Установлено, что искусственно меняя концентрацию Na^+ во внеклеточной среде, влияющей на его трансмембранный градиент, можно наблюдать благоприятные условия или их отсутствие для защитного действия фосфокреатина при "кальциевом парадоксе".

Снижение уровня натрия во внеклеточном пространстве значительно ухудшает энергетические процессы в сердце, при перегрузке его ионами кальция, несмотря на наличие фосфокреатина в перфузионной среде.

Увеличение концентрации натрия в перфузионном растворе от 142 до 200 мМ значительно стимулирует положительное воздействие фосфокреатина на биоэнергетические процессы в миокарде в условиях моделирования “кальциевого парадокса”.

Литература.

1. Cardiac protection with phosphocreatine: a meta-analysis / G. Landoni [et al.] // *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* – 2016. – P. 637-646.
2. Contractile Function of Isolated Hearts With Preserved and Reduced Ejection Fraction In Vivo / V.L. Lakomkin [et al.] // *Kardiologiya.* – 2018. – P. 36-44.
3. Гришин С.Н. Мионевральная передача в отсутствие кальция во внеклеточной среде / Гришин С.Н. // *Биологические мембраны.* 2016. Т. 33. № 2. С. 87-97.
4. Громова О.А. Кальций и биосинтез коллагена: систематический анализ молекулярных механизмов воздействия / Громова О.А., Торшин И.Ю., Томилова И.К., Гилельс А.В., Демидов В.И. // *РМЖ. Мать и дитя.* 2016. Т. 24. № 15. С. 1009-1017.
5. Степанова И.В. Взаимное влияние структур плазматической мембраны и внутриклеточных кальциевых депо в формировании кальциевых сигналов в первичных сенсорных нейронах / Степанова И.В., Костюк Е.П., Костюк П.Г. // *Биологические мембраны.* 2007. Т. 24. № 1. С. 79-86.
6. Почаев В.А. Поступление Ca^{2+} через кальциевые каналы *cav1.3* в сателлитных клетках мышечных волокон крысы / Почаев В.А., Красный А.М., Озернюк Н.Д. // *Известия Российской академии наук. Серия биологическая.* 2013. № 5. С. 522..
7. Маслов О.В. Активация интенсивности поглощения кислорода митохондриями сердца кальцием, проникающим в миокард посредством $Na^{+}-Ca^{2+}$ обмена / Маслов О.В., Винокуров А.А., Алабовский В.В. // *Вестник Воронежского государственного университета.* Серия: Химия. Биология. Фармация. 2010. № 1. С. 94-98..
8. Афанасьев С.А. Возрастные особенности внутриклеточного гомеостаза кальция в кардиомиоцитах крыс при постинфарктном remodelировании сердца / Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С., Путрова О.Д., Перчаткин В.А., Репин А.Н. // *Успехи геронтологии.* 2010. Т. 23. № 1. С. 59-63.
9. Афанасьев С.А. Изменение внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} в миокарде предсердий человека при хронической коронарной недостаточности под воздействием амиодарона / Афанасьев С.А., Нарыжная Н.В., Попов С.В., Антонченко И.В., Лукавская И.А., Ахмедов Ш.Д., Козлов Б.Н., Шипулин В.М. // *Физиология человека.* 2003. Т. 29. № 3. С. 84-88.
10. Резник А.Г. Морфологические предпосылки возникновения фибрилляции желудочков сердца при внезапной коронарной смерти / Резник А.Г. // *Кардиология.* 2009. Т. 49. № 5. С. 22-25.

Abstract.

V.V. Alabovsky, A.A. Vinokurov, V.V. Khamburov, O.V. Maslov
INFLUENCE OF COMPOSITION OF EXTRACELLULAR MEDIUM ON EFFECTIVITY OF “NEOTON” AT CALCIUM PARADOX

Voronezh State Medical University, Dep. of Biochemistry

Phosphocreatine is not only energy buffer, but energy shuttle in some kind of cells. Because of it, is based use of phosphocreatine at energy- deficient pathological states. However, use of phosphocreatine at states related with Ca^{2+} overload exacerbates cellular damage. Criteria of cell injury were: coupling of respiration and phosphorylation in mitochondria, rate of ADP phosphorylation by isolated mitochondria, release of myoglobin from heart, tissue level of ATP, ADP, AMP, phosphocreatine and creatine. It has been established that only maintenance of high transmembrane Na^{+} gradient on sarcolemma causes highly specific unique positive protective effect of phosphocreatine. Combination of phosphocreatine with elevated transmembrane gradient has been blocked with strophantine, an inhibitor of Na^{+}, K^{+} -ATPase. Action of elevated concentration of Na^{+} has not been related with increased osmotic pressure of the solution.

Keywords: phosphocreatine, cardiomyocytes, heart perfusion.

References.

1. Cardiac protection with phosphocreatine: a meta-analysis / G. Landoni [et al.] // *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* - 2016. - P. 637-646.

2. Contractile Function of Isolated Hearts With Preserved and Reduced Ejection Fraction in Vivo / V. L. Lakomkin [et al.] // Kardiologiia. – 2018. - P. 36-44.
3. Grishin S. N. Myoneural transmission in the absence of calcium in the extracellular environment / Grishin S. N. // Biological membranes. 2016. Vol. 33. No. 2. Pp. 87-97.
4. Gromova O. A. Calcium and collagen biosynthesis: systematic analysis of molecular mechanisms of action / Gromova O. A., Torshin I. Yu., Tomilova I. K., Gilels A.V., Demidov V. I. // rmzh. The mother and child. 2016. Vol. 24. No. 15. Pp. 1009-1017.
5. Stepanova I. V. Mutual influence of plasma membrane structures and intracellular calcium depots in the formation of calcium signals in primary sensory neurons / Stepanova I. V., Kostyuk E. P., Kostyuk P. G. // Biological membranes. 2007. Vol. 24. No. 1. Pp. 79-86.
6. PochaeV. A. Intake of Ca²⁺ through calcium channels cav1. 3 in rat muscle fiber satellite cells / PochaeV. A., Krasny a.m., ozernyuk N. D. // proceedings of the Russian Academy of Sciences. The biology series. 2013. No. 5. Pp. 522..
7. Maslov O. V. Activation of the intensity of oxygen absorption by the mitochondria of the heart by calcium penetrating into the myocardium through Na⁺ - Ca²⁺ + exchange / Maslov O. V., Vinokurov A. A., Alabovskiy V. V. // Bulletin of the Voronezh state University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy. 2010. No. 1. Pp. 94-98..
8. Afanasiev S. A. Age-related features of intracellular calcium homeostasis in rat cardiomyocytes during postinfarction heart remodeling / Afanasiev S. A., Kondratyeva D. S., Putrova O. D., Perchatkin V. A., Repin A. N. // Advances in gerontology. 2010. Vol. 23. No. 1. Pp. 59-63.
9. Afanasiev S. A. Changes in intracellular homeostasis Ca²⁺ in human atrial myocardium in chronic coronary insufficiency under the influence of amiodarone / Afanasiev S. A., Naryzhnaya N. V., Popov S. V., Antonchenko I. V., Lukavskaya I. A., Akhmedov sh. D., Kozlov B. N., Shipulin V. M. // human Physiology. 2003. Vol. 29. No. 3. Pp. 84-88.
10. Resnik A. G. Morphological background of ventricular fibrillation in sudden coronary death / Resnik A. G. // Cardiology. 2009. Vol. 49. No. 5. Pp. 22-25.

Сведения об авторах: Алабовский Владимир Владимирович – д.м.н профессор заведующий кафедрой биохимии ВГМУ им.Н.Н. Бурденко uexpert77@yandex.ru, Винокуров Алексей Анатольевич – к.м.н ассистент ВГМУ им.Н.Н. Бурденко alwin66@rambler.ru; Хамбуров Владимир Викторович – к.м.н доцент каф. биохимии ВГМУ им.Н.Н. Бурденко Commaster13@mail.ru; Маслов Олег Владимирович – к.б.н, асс. каф. биохимии ВГМУ им.Н.Н. Бурденко.

Цитировать:

Влияние состава внеклеточной среды на эффективность действия препарата «неотон» при «кальциевом парадоксе» / В. В. Алабовский, А. А. Винокуров, В. В. Хамбуров, О. В. Маслов // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2019. – Т. 22, № 3. – С. 121-126.