

В. В. Алабовский, Е. J. Cragoe, А. А. Винокуров

**Влияние блокаторов
некоторых ионотранспортных систем сарколеммы
на интенсивность повреждений сердца
при «кальциевом парадоксе»**

Предполагается, что механический разрыв сарколеммы, приводящий к выходу миоглобина из кардиомиоцитов при «кальциевом парадоксе» развивается вследствие изменения трансмембранного осмотического градиента. Обнаружена тесная корреляционная зависимость между содержанием воды в миокарде и миоглобина, теряемого сердцем при «кальциевом парадоксе». Блокатор хлорных каналов DIOA повышал содержание воды в миокарде и увеличивал выход миоглобином, из кардиомиоцитов. Увеличенный выход миоглобина, вызванный добавлением 20 ммоль/л гидрокарбоната натрия предотвращался блокатором $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ -обмена L-644, 711. Ингибитор липофильной карбоангидразы ацетозаломид (0,1 ммоль/л) ослаблял выход миоглобина из сердца более чем на 90 % по сравнению с контролем. Полученные результаты подтверждают так называемую «натриевую» гипотезу развития «кальциевого парадокса».

Массивный поток Ca^{2+} внутрь клеток является одним из факторов гибели кардиомиоцита при различных патологических состояниях миокарда. В условиях эксперимента его моделируют путем реперфузии сердца кальций-содержащим раствором после непродолжительной перфузии бескальциевой средой. Данное явление было названо «кальциевым парадоксом» [3, 5, 14, 16]. Несмотря на интенсивные исследования, механизм его развития все еще остается неясным. Предполагается, что причиной разрушения сарколеммы при «кальциевом парадоксе» является накопление в кардиомиоцитах осмотически активных веществ и воды. Последующее поступление в клетки воды приводит к механическому разрыву сарколеммы и гибели кардиомиоцитов [10]. Подобно другим клеткам, кардиомиоциты имеют собственную систему регуляции количества воды. При ее накоплении внутри клеток активируются механизмы, выводящие избыток осмотически активных веществ (осмолитов) во внеклеточную среду (Na-H обмен, $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ обмен, хлорные каналы). Одновременно изменяется активность и котранспорта K-Na-2Cl [7, 13, 15, 17]. Значение данных механизмов в набухании кардиомиоцитов и развитии повреждений при «кальциевом парадоксе» не установлено. Учитывая это, целью настоящего исследования явилось изучение роли некоторых механизмов транспорта HCO_3^- , Cl^- , Na^+ , K^+ в накоплении воды и разрушении кардиомиоцитов при «кальциевом парадоксе».

Методика

Эксперименты проводили на изолированных сердцах белых беспородных крыс, перфузированных по методу Лангендорфа оксигенированным (37 °C)

© В. В. Алабовский и др.

раствором Рингера—Локка (в ммоль/л): NaCl — 140; NaH_2PO_4 — 0,5; KCl — 5,0; трис-ОН (рН 7,4); CaCl — 2; глюкозы — 11. Под эфирным наркозом крыс декапитировали. После вскрытия грудной клетки сердце помещали в охлажденный раствор Рингера—Локка. В аорту вводили канюлю и со скоростью 10 мл/мин на 1 г влажной ткани подавали исходный раствор в течение 15 мин для стабилизации сократительной функции и показателей энергетического состояния. Затем сердце перфузировали бескальциевой средой, содержащей 0,5 ммоль/л ЭДТА в течение 10 мин. По окончании перфузии бескальциевой средой через сердце пропускали исходный раствор, содержащий 2,0 ммоль/л CaCl_2 .

Для оценки глубины повреждения сарколеммы кардиомиоцитов в оттекающем от сердца перфузионном растворе непрерывно определяли содержание миоглобина с помощью проточной кюветы [3]. Затем рассчитывали суммарное его количество, потерянное сердцем при реперфузии кальцийсодержащим раствором. Сухую массу ткани определяли после предварительного высушивания образцов при 100° в течение 24 ч. Ингибиторы $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ обмена (L-644,711), Na-H-обмена (НМА) и хлорных каналов (DIOA) были синтезированы в лаборатории (табл. 1) [8]. В работе были

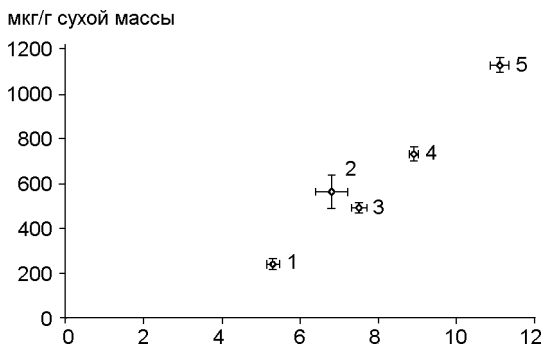
Таблица 1. Характеристика некоторых блокаторов ионотранспортных систем сарколеммы кардиомиоцитов

Ингибитор	K_i , мкмоль/л				
	Натриевые каналы	Na^+/H^+ -обмен	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмен	$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обмен	хлорные каналы
НМА	>300	0,16	100	—	—
R(+) DIOA	—	—	—	10	1
L-644, 711	—	—	—	0,8	1

использованы миоглобин лошади и трисамин (фирмы «Sigma», США). Остальные реактивы — отечественного производства квалификации «х.ч.». Полученные результаты обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Эксперименты показали, что реперфузия сердца кальцийсодержащим раствором после 10 мин перфузии бескальциевой средой сопровождается высвобождением миоглобина в оттекающий перфузионный раствор. Блокатор Na-K-2Cl котранспорта фуросемид (100 мкмоль/л) ослаблял накопление воды кардиомиоцитами и уменьшал выход миоглобина из сердца при «кальциевом парадоксе» (табл.2). Ингибитор Na-H-обмена, НМА (1 мкмоль/л) не влиял на развитие «кальциевого парадокса» в сердце. Блокатор хлорных каналов DIOA (5 мкмоль/л) увеличивал содержание воды в ткани и усиливал высвобождение миоглобина из сердца (рисунок, см. табл. 2). Добавление NaHCO_3 (20 ммоль/л) в перфузионные среды (концентрацию ионов натрия поддерживали на постоянном уровне 140 ммоль/л) усиливало набухание кардиомиоцитов и выход миоглобина из сердца более чем в 1,5—2,5 раза по сравнению с контролем. Данный эффект бикарбонатсодержащих растворов, вероятно, не связан с их повышенной буферной емкости



Соотношение между содержанием воды в миокарде и выходом миоглобина из сердца при «кальциевом парадоксе». Представлены значения среднего и доверительные интервалы для $P < 0,05$. По оси абсцисс — содержание воды. По оси ординат — суммарное количество миоглобина, потерянного сердцем за 12 мин реперфузии. 1 — фуросемид 100 мкмоль/л, 2 — контроль, 3 — $[\text{HCO}_3^-]$ 20 ммоль/л, L-644,711 — 10 мкмоль/л, 4 — DIOA 5 мкмоль/л, 5 — $[\text{HCO}_3^-]$ 20 ммоль/л, $r = 0,977$; $P < 0,005$; $Y = 146,7x - 531,6$.

мостью. Как показали дополнительно проведенные эксперименты, увеличение буферной емкости растворов добавлением трисамина до конечной концентрации 25 ммоль/л не влияло на глубину разрушения кардиомиоцитов при «кальциевом парадоксе» (см. рисунок). Блокатор $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обмена L-644,711 (10 мкмоль/л) полностью предотвращал данные изменения, Исходя из этого нами было предположено, что активирование $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -антипорта может приводить к увеличению внутриклеточного содержания бикарбонат ионов и смещению равновесия реакции, катализируемой карбоангидразой в сторону образования угольной кислоты и ее диссоциации на воду и углекислый газ. В этой связи нами было исследовано влияние на развитие «кальциевого парадокса» ингибитора липофильной карбоангидразы ацетазоламида. Эксперименты показали, что ацетазоламид значительно ослабляет выход миоглобина из сердца при «кальциевом парадоксе» вне зависимости

Таблица 2. Влияние DIOA, L-644, 711, фуросемида, HCO_3^- и ацетазоламида на содержание воды в миокарде (мл/мг сухой массы) и выход миоглобина из сердца (мкг/г сухой массы) при «кальциевом парадоксе», $M \pm m$

Серия экспериментов	Количество воды	Выход миоглобина
$[\text{HCO}_3^-] = 0$ ммоль/л		
контроль 1	7,54±0,20	492,0±22,8
$[\text{HCO}_3^-] = 20$ ммоль/л		
контроль 2	11,09±0,82 P1<0,05	1113,1±66,9 P1<0,01
DIOA 5 мкмоль/л	6,01±0,24 P1<0,05	732,2±33,2 P1<0,01
L-644,711 10 мкмоль/л	6,80±0,41 P1>0,1	564,1±76,0 P1>0,1
20 ммоль/л HCO_3^-	P2<0,01	P2<0,001
фуросемид 100 мкмоль/л	5,30±0,17 P1<0,05	240,1±25,0 P1<0,05
ацетазоламид 0,1 мкмоль/л	3,02±0,11 P1<0,05	73,1±1,1 P1<0,001
$[\text{HCO}_3^-] = 20$ ммоль/л	3,94±0,15	38,0±7,0
ацетазоламид 0,1 мкмоль/л	P1<0,05 P2<0,01	P1<0,005 P2<0,001

Примечание. Достоверность различий: P1 — по сравнению с растворами без HCO_3^- (контроль 1) и P2 — по сравнению с растворами, содержащими 20 ммоль/л HCO_3^- .

от содержания бикарбоната в растворах. Ингибирование ионотранспортных механизмов, выводящих осмотически активные ионы из клеток увеличивает содержание воды в миокарде и усиливает развитие «кальциевого парадокса». Блокирование котранспорта ионов внутрь клеток ослабляет эти процессы (см. табл. 2).

Корреляционный анализ показал наличие линейной корреляции между содержанием воды в миокарде и выходом миоглобина из клеток при «кальциевом парадоксе» (см. рисунок).

Таким образом, повреждение сарколеммы при «кальциевом парадоксе» находится в прямой зависимости от величины набухания кардиомиоцитов. На данный процесс влияет не только анионный состав реперфузионного раствора, но и активность карбоангидразы.

Механизмы развития «кальциевого парадокса» остаются до конца не изученными. Предполагают, что при реперфузии сердца кальцийсодержащей средой в кардиомиоцитах накапливается Na^+ и Cl^- , что может приводить к быстрому и значительному увеличению внутриклеточного осмотического давления и разрушению сарколеммы [10].

Предполагая механический разрыв сарколеммы, как причину гибели кардиомиоцитов при «кальциевом парадоксе», нами было предположено, что интенсивность повреждения мембран сарколеммы можно существенно уменьшить путем блокирования поступления в кардиомиоциты осмотически активных веществ — K^+ , Na^+ , Cl^- через систему K-Na-2Cl -котранспорта или анионов $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ антипорта [1, 9, 12, 13, 15, 17]. Эксперименты подтвердили это предположение. Фуросемид или L-644, 711 не только ослабляли накопление воды в миокарде, но и уменьшали интенсивность выхода миоглобина при «кальциевом парадоксе».

Как известно, накопление Na^+ , Cl^- и воды внутри кардиомиоцитов вызывает не только их набухание, но и активирование механизмов сохранения клеточного обмена, в частности — выход Cl^- из клеток через хлорные каналы [7, 15, 17]. В свою очередь, это существенно ослабляет отек клеток и уменьшает внутриклеточное осмотическое давление. Блокирование данного механизма, как было показано нами выше, с помощью DIOA увеличивало содержание воды в миокарде и выход миоглобина из сердца более чем на 40 % по сравнению с контролем. Данный эффект блокатора хлорных каналов наблюдался только во время перфузии сердца бескальциевой средой, но не в момент его реперфузии кальцийсодержащим раствором. Все это указывает на то, что увеличение осмотического давления в кардиомиоцитах происходит преимущественно во время удаления Ca^{2+} из внеклеточной среды. Другой механизм сохранения клеточного обмена — Na-H -обмен, вероятно, не играет существенной роли при «кальциевом парадоксе». Селективный блокатор Na-H -обмена НМА не влиял на развитие «кальциевого парадокса».

Как известно, образующиеся в кардиомиоцитах H^+ активно удаляются через систему сопряженного $\text{Na}^+ + \text{HCO}_3^-/\text{H}^+ + \text{Cl}^-$ обмена, приводящего к увеличению внутриклеточной концентрации Na^+ [2,4,6,9,12]. В результате снижения трансмембранного градиента натрия усиливается поступление Ca^{2+} через систему Na-Ca -обмена, что приводит к разрушению клеток. Селектив-

ный блокатор $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -антипорта L-644, 711, ограничивал накопление воды миокардом и предотвращал выход миоглобина. Нами было предположено, что поступление HCO_3^- могло способствовать еще большему повышению содержания воды в клетках в ходе реакции, катализируемой карбоангидразой: $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$. Ингибирование липофильной карбоангидразы ацетазоламидом (0,1 мкмоль/л) уменьшает не только накопление воды миокардом, но и разрушение кардиомиоцитов при «кальциевом парадоксе», что служит дополнительным аргументом в пользу предполагаемого механизма повреждения кардиомиоцитов при «кальциевом парадоксе».

Важность накопления воды в миокарде для разрушения сарколеммы и высвобождения миоглобина из кардиомиоцитов подтверждает и тесная корреляционная зависимость между этими показателями (см. рисунок).

Таким образом, полученные нами результаты дают основание подтвердить основные положения так называемой «натриевой гипотезы» развития «кальциевого парадокса», существенно уточнив некоторые ее положения. Известно, что перфузия сердца бескальциевой средой сопровождается накоплением в клетке различных осмолитов, и прежде всего, Na^+ и Cl^- . Этому способствует не только потеря селективности кальциевых каналов сарколеммы, но и снижение активности Na^+ , K^+ -АТФазы. Однако наряду с механизмами поступления осмотически активных веществ внутрь клеток активируются сарколеммальные механизмы выведения воды из клеток: хлорные каналы, $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -антипорт. Вероятно, мощность данных систем значительно меньше механизмов увеличения внутриклеточного Na^+ , Cl^- и воды. Последующая реперфузия сердца кальцийсодержащим раствором приводит к активированию фосфолипаз и протеаз, что может сопровождаться образованием большого количества молекул средней и низкой массы, неспособных проникать через сарколемму. Накопление амфифильных молекул и жирных кислот существенно изменяет текучесть липидного бислоя сарколеммы, прочность мембраны. Возможно, в результате этих изменений развивается значительный осмотический градиент и механическое разрушение кардиомиоцитов.

Авторы выражают глубокую признательность профессору Michel Baum (Texas, США) за любезно предоставленный ингибитор липофильной карбоангидразы ацетазоламид.

V. V. Alabovsky, Cragoe E. J., Jr., A. A. Winokurov

EFFECT OF BLOCKERS OF SARCOLEMMA IONTRANSPORTING SYSTEMS ON INTENSIVITY OF HEART DAMAGE DURING CALCIUM PARADOX

The aim of present study was to investigate a role of different anions in calcium paradox development. It is accepted point of view that development of calcium paradox is depend on cation composition and activity of Na/Ca exchange. However, role of anion composition remain unknown. It is not studied role of some aniontransporting systems in development of calcium paradox. Experiments were carried out on isolated Langendorff perfused rat hearts. Hearts were perfused with calcium – containing solution for 15 minutes, calcium – free medium for 10 minutes and reperfused by initial calcium- containing solution with $[\text{Ca}^{2+} = 2 \text{ mM}]$. Release of myoglobin was

used as a marker of membrane damage. It has been shown that addition of 5–20 mM HCO_3^- exacerbated calcium paradox of the heart, elevated myoglobin release from $4,92 \pm 0,57$ mcg/g dry weight to $11,3 \pm 1,6$ mcg/g dry weight. An inhibitor of $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchange, 10 mcM L-644,711 depressed elevation of myoglobin release to $4,8 \pm 1,05$ mcg/g dry weight. An inhibitor of Cl^- channels, 5 mcM DIOA caused raising of myoglobin loss to $7,3 \pm 0,8$ mcg/g dry weight during calcium paradox. These data show dependence of calcium paradox on anion composition. A possible reason for exacerbation of calcium paradox by HCO_3^- rich medium could be consistence of $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. The results discover new perspectives in myocardial protection of calcium overload.

Department of Biochemistry of Medical Academy, Voronezh, Russia

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baumgarten C. M., Duncan S. W. N. Heart: function and metabolism / Ed. N. S. Dhalla, G. Pierce, R. Beamish. - N.-Y. - 1987. - P. 117-131.
2. Boron W. F., McCormick W. C., Roos A. pH regulation in barnacle muscle muscle fibres: dependence on extracellular sodium and bicarbonate // Amer. J. Physiol. - 1981. - **240**. - P. C80-C89.
3. Busselen P. Effect of sodium on calcium paradox in rat hearts // Europ. J. Physiol. (Pflüger's Arch.) - 1987. - **408**. - P. 458-464.
4. Cala P. M., Grinstein S. Na^+/H^+ exchange / Ed. S. Grinstein. - Fl.: CRC, 1988. - P. 201-208.
5. Chapman R. A., Tunstall J. The calcium paradox of the heart // Prog. Biophys. Mol. Biol. - 1987. - **50**. - P. 67-96.
6. Davis B. A., Hogan E. M., Boron W. F. Role of G- proteins in the stimulation of Na^+/H^+ exchange by cell shrinkage // Amer. J. Physiol. - 1992. - **262**. - P. C533-C536.
7. Hoffman E. K., Simonsen L. O. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells // Physiol. Rev. - 1989. - **69**. - P. 315-382.
8. Kleyman T. R., Cragoe E. J. Methods in Enzymol. Biomembranes: Biological transport cellular and subcellular. - N.-Y., 1990. - **191**. - P. 739-755.
9. Liu S., Piwnicka-Worms D., Lieberman M. Intracellular pH regulation in cultured embryonic chick heart cells. Na^+ -dependent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange // J. Gen. Physiol. - 1990. - **96**. - P. 1247-1269.
10. Omachi A., Kleps R., Henderson T. O., Labotka R. J. Inhibition of calcium paradox in isolated rat hearts by high perfusate sucrose concentrations // Amer. J. Physiol. - 1994. - **266**. - P. H1729-H1737.
11. Pena-Rasgado C., McGruder K. D., Summers J. C., Rasgado-Flores H. Effect of isosmotic removal of extracellular Ca^{2+} and membrane potential on cell volume in muscle cells // Amer. J. Physiol. - 1994. - **267**. - P. C768-C775.
12. Russel J. M., Boron W. F., Brodwick M. S. Intracellular pH and Na^+ fluxes in barnacle muscle with evidence for reversal of the ionic mechanism of intracellular pH regulation // J. Gen. Physiol. - 1983. - **82**. - P. 47-78.
13. Sarkadi B., Parker J. C. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume // Biochim. Biophys. Acta. - 1991. - **1071**. - P. 407-427.
14. Sheu S.-S., Blaustein M. P. The Heart and Cardiovascular System / Ed. H. A. Fozzard. - N.-Y., 1992. - P. 903-943.
15. Sorota S. Swelling- induced chloride - sensitive current in canine atrial cells revealed by whole-cell patch- clamp method // Circulet. Res. - 1992. - **70**. - P. 679-687.
16. Tunstall J., Busselen P., Rodrigo G. C., Chapman R. A. Pathways for movements of ions during calcium - free perfusion and the induction of calcium paradox // J. Mol. Cell. Cardiol. - 1986. - **18**. - P. 241-254.
17. Zhang J., Rasmusson R. L., Hall S., Lieberman M. A chloride current associated with swelling of cultured chick heart cells // J. Physiol. - 1993. - **472**. - P. 801-820.

*Воронеж. мед. академия им. Н. Н. Бутенко
МЗ и мед. промышленности РФ*

*Материал поступил
в редакцию 29.02.98*