

Т.Г.Сазонтова, Л.М.Белкина, А.Г.Жукова, Т.Н.Кириллина, Ю.В.Архипенко

## Сократительная функция сердца и антиоксидантная система в миокарде у крыс линий Август и Вистар при ишемии и реперфузии

*У крыс линии Август локальная ишемия миокарда, вызванная окклюзией коронарной артерии (30 мин) приводила к меньшей депрессии сократительной функции сердца, а последующая реперфузия (15 мин) – к ее более быстрому восстановлению, чем у крыс линии Вистар. Активность ферментов антиоксидантной защиты сердца в контроле у крыс линии Август ниже, чем у крыс линии Вистар. При ишемии активность этих ферментов у крыс линии Август снижалась в меньшей степени, а при реперфузии – восстанавливалась в большей степени, чем у крыс линии Вистар. Заключают, что более высокая стабильность показателей антирадикальной защиты у крыс линии Август, по сравнению с линией Вистар, является одним из механизмов, обеспечивающих повышенную резистентность сократительной функции сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям у этих животных.*

### ВВЕДЕНИЕ

Ранее было показано, что крысы линии Август более устойчивы к острому инфаркту миокарда, чем крысы популяции Вистар, что выражается в значительно меньшем нарушении сократительной функции сердца и сниженной смертности у крыс линии Август при таком повреждении [1]. Кроме того при острой кратковременной ишемии и последующей реперфузии у крыс линии Август частота и длительность тяжелых аритмий значительно меньше, чем у крыс линии Вистар [2]. Однако механизмы, определяющие разную устойчивость этих животных к ишемическим и реперфузионным повреждениям, мало изучены. Известно, что в патогенезе таких нарушений важную роль играет активация свободнорадикальных процессов, обусловленная индукцией активных форм кислорода (АФК) при ишемии и реперфузии [16]. АФК при ишемии и реперфузии вызывают повреждение клеточных мембран и систем

ионного транспорта [6, 14], вследствие чего происходит нарушение сократительной функции кардиомиоцитов и электрической стабильности сердца. В связи с этим важную роль играет поддержание антиоксидантного гомеостаза в клетке, стабильность которого необходима для ограничения избыточной активации свободнорадикальных реакций при ишемических и реперфузионных воздействиях. Действительно, антиоксиданты обладают кардиопротекторным действием при нарушениях функции сердца, вызванных ишемией и реперфузией миокарда [11, 12]. Можно полагать, что повышенная резистентность к ишемическим и реперфузионным повреждениям у крыс линии Август, по сравнению с линией Вистар, связана с различиями в состоянии антиоксидантных систем у этих животных. Между тем особенности антиоксидантной защиты и ее изменения при ишемических и реперфузионных воздействиях у крыс линий

© Т.Г. Сазонтова, Л.М. Белкина, А.Г. Жукова, Т.Н. Кириллина, Ю.В. Архипенко

Вистар и Август практически неизвестны.

В данном исследовании изучали нарушения сократительной функции сердца при локальной ишемии и последующей реперфузии и сопоставляли их с уровнем антиоксидантной защиты миокарда у крыс линий Август и Вистар.

## МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на крысах-самцах популяции Вистар ( $n=11$ ) и линии Август ( $n=9$ ) одного возраста, масса которых составляла  $373 \pm 16$  и  $231 \text{ г} \pm 9 \text{ г}$  соответственно. Сократительную функцию сердца оценивали под уретановым наркозом ( $150 \text{ мг/кг}$ ) в условиях вскрытой грудной клетки и искусственной вентиляции легких атмосферным воздухом (ВИТА-1). Локальную ишемию миокарда вызывали путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на 30 мин, а реперфузию, длившуюся 15 мин, – путем устранения лигатуры на артерии. Показатели функции сердца определяли по кривой давления, регистрировавшейся в полости левого желудочка сердца с помощью «Мингографа-34» («Siemens», Швеция) до и во время ишемии и реперфузии. Определяли следующие показатели функции сердца: частоту сердечных сокращений (ЧСС); систолическое, диастолическое и развиваемое давление; скорости развития и падения давления, отражающие скорость сокращения и расслабления миокарда соответственно; индекс Катца – произведение ЧСС на развиваемое давление (двойное произведение); интенсивность функционирования структур (ИФС) – отношение двойного произведения к единице массы левого желудочка.

Для биохимических исследований сердца крыс извлекали и выделяли ишемизированную зону (ИЗ), представлявшую большую часть свободной стенки левого желудочка (ЛЖ), и неишемизированную

зону (НЗ), состоявшую из остальной части миокарда. У одной группы животных сердца забирали по окончании только ишемии (I серия), а у другой – после ишемии и реперфузии (II серия). У контрольных животных сердца забирали также под наркозом в условиях острого эксперимента и выделяли те же отделы сердца (III серия). Образцы промывали физиологическим раствором и замораживали в жидком азоте до использования. Сердца измельчали гомогенизатором «Ultra-Turgha» в течение 30 с, затем фильтровали. Среда гомогенизирования содержала 20 ммоль/л трис, 100 ммоль/л NaCl, pH 7,4 (соотношение ткань/среда составляло 1 : 9). Активность каталазы определяли по начальной скорости, исходя из касательной к кривой потребления перекиси водорода [10]. Определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) [8], используя в качестве системы образования супероксидрадикала – гипоксантин (0,1 ммоль/л) и ксантиноксидазу (0,004 ед.). Активность каталазы выражали в микромолях  $\text{H}_2\text{O}_2$  за 1 мин на 1 мг белка, а СОД – в условных единицах на 1 мг ткани. Концентрацию белка измеряли по амплитуде 4-й производной спектра поглощения в области 240–320 нм [13]. Статистическую обработку результатов проводили по критерию t Стьюдента или по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни (что специально указывается в тексте).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях относительного физиологического покоя ЧСС у крыс линии Август была ниже, чем у крыс Вистар ( $350 \pm 17$  против  $396 \text{ мин}^{-1} \pm 20 \text{ мин}^{-1}$ ;  $P < 0,01$ ), а развиваемое давление было сходным ( $123 \pm 8,4$  против  $129 \text{ мм рт.ст.} \pm 6,7 \text{ мм рт.ст.}$ ). Вследствие более низкой ЧСС у крыс линии Август величина двойного произведения была на 19 % меньше ( $P < 0,05$ ), чем у крыс линии Вистар ( $43050 \pm 5133$  против

51084±4464), в то же время ИФС не отличалась в сравниваемых группах и составляла 86±7,9 и (88±6,4) мм рт.ст. · н/мг соответственно (где n=ЧСС). Несмотря на более низкую ЧСС у крыс линии Август скорость развития давления у них оказалась существенно более высокой, чем у крыс линии Вистар (на 25%) и составляла 9042±686 и 7243 мм рт.ст./с ± 850 мм рт.ст./с соответственно (P<0,05 по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни), а скорость расслабления больше на 21% (3895±225 против 3204 мм рт.ст./с ± 286 мм рт.ст./с; P<0,01).

В отношении антиоксидантной системы у этих животных следует отметить меньшую активность ее у крыс линии Август. Из рис.2 видно, что у крыс линии Вистар активность каталазы достоверно выше, чем у крыс линии Август – на 21% у контрольных животных с выделенной ИЗ и на 41% у животных этой же серии (II), но с выделенной ИЗ миокарда, т.е. у крыс линии Август поддержание физиологического уровня свободнорадикальных процессов обеспечивается меньшим содержанием ферментов антиоксидантной защиты. Ранее нами в экспериментах на мышах разных линий было показано, что исходно более низкий уровень ферментов антиоксидантной защиты коррелирует с большей устойчивостью к действию АФК-индуцирующих факторов, таких, как циклофосфан и диоксидин [4, 7]. Аналогичная зависимость выявлена и для животных одной линии, но с различной устойчивостью к действию гипоксии [15]. Это дает основание предполагать, что у крыс линии Август исходно существует больший потенциал устойчивости к АФК-опосредованным факторам. Реализуется ли он при действии ишемии и реперфузии стало ясно из экспериментов, проведенных во второй части работы.

На рис.1 представлена динамика показателей функции ЛЖ во время ишемии и

реперфузии. Видно, что степень депрессии функции сердца у крыс линии Август выражена заметно меньше, чем у крыс линии Вистар, как при ишемии, так и при реперфузии. Так, на 30-й минуте ишемии ИФС уменьшалась у крыс линий Август и

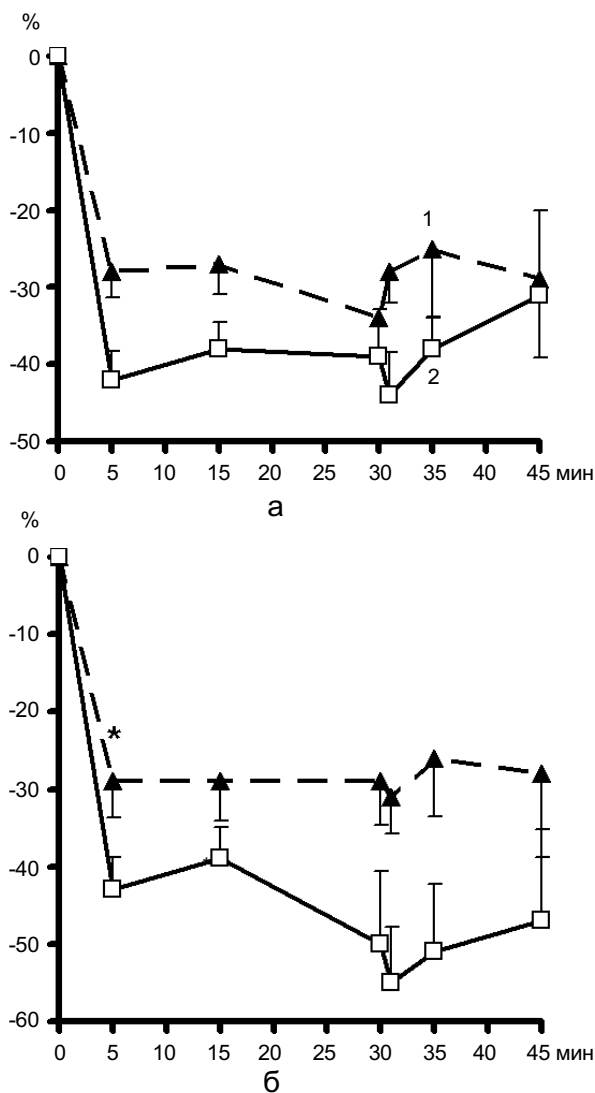


Рис 1. Динамика показателей функции сердца во время ишемии и последующей реперфузии у крыс линий Август (1) и Вистар (2): а – развиваемое давление, б – интенсивность функционирования структур. По оси ординат – изменение показателей в процентах к исходному уровню, принятому за 100% (точка «0»), по оси абсцисс – время в минутах. Точка «0» на оси абсцисс соответствует началу ишемии, а «30» – началу реперфузии

Вистар на 31 и 50 % ( $P < 0,05$ ) соответственно. Причем, если развиваемое давление по абсолютной величине не отличалось в этот период, то ИФС у крыс линии Август была выше, чем у крыс линии Вистар на 32 % ( $58 \pm 4,5$  против  $44$  мм рт.ст.  $\cdot$  н/мг  $\pm 3,6$  мм рт.ст.  $\cdot$  н/мг;  $P < 0,05$ ). При этом важно отметить разную динамику ЧСС во время ишемии и реперфузии в сравниваемых группах: если у крыс линии Вистар ЧСС постепенно к 30-й минуте ишемии уменьшалась с  $396 \pm 20$  до  $364$  мин $^{-1} \pm 17$  мин $^{-1}$ , то у крыс линии Август значение этого показателя, наоборот, не снижалось и сохраняло на исходном уровне.

Таким образом, у крыс линии Август устойчивость к ишемии миокарда больше, чем у крыс линии Вистар. При констатации этого факта следует учесть, что у крыс линии Август абсолютная масса ЛЖ на 21 % меньше, чем у крыс линии Вистар и, следовательно, более высокое значение ИФС у крыс линии Август при наличии ишемического повреждения свидетельствует о более высокой эффективности сократительной функции сердца у этих животных по сравнению с крысами линии Вистар. Последнее обстоятельство, а также отсутствие во время ишемии брадикардии у крыс линии Август, по-видимому, и способствуют сохранению функции сердца у этих животных на более высоком уровне, чем у крыс линии Вистар.

При реперфузии динамика восстановления функции сердца в сравниваемых группах животных существенно различалась. Через 1 мин реперфузии у крыс линии Август наблюдалась тенденция к восстановлению функции сердца, в то время как у крыс линии Вистар – к дальнейшему ее ухудшению, по сравнению с дореперфузионным уровнем. Через 5 мин после начала реперфузии наблюдалось восстановление функции сердца и у крыс линии Вистар, но медленнее, чем у крыс линии Август: развиваемое давление

восстанавливалось у крыс обеих линий до 75 и 62 % соответственно от исходного уровня ( $P < 0,05$ ), индекс Катца до 74 и 52 % ( $P < 0,02$ ), ИФС – до 74 и 46 % ( $P < 0,02$ ). Также и по абсолютной величине у крыс линии Август ИФС к 5 мин реперфузии значительно превышала данный показатель у крыс линии Вистар ( $64 \pm 4,2$  против  $41$  мм рт.ст.  $\cdot$  н/мг  $\pm 6,6$  мм рт.ст.  $\cdot$  н/мг;  $P < 0,05$ ). Через 15 мин реперфузии указанные различия между группами сглаживались. Таким образом, у крыс линии Август при реперфузии происходит более быстрое восстановление функции сердца, чем у крыс линии Вистар.

При оценке стабильности поддержания уровня антиоксидантной защиты при ишемии и реперфузии оказалось, что крысы линии Август более устойчивы по этому показателю к ишемическому повреждению (см. рис. 2). После 30 мин ишемии у крыс линии Вистар значительно снижается, по сравнению с контролем, активность каталазы в миокарде (после ишемии на 44 и 41% в ИЗ и НЗ соответственно), в то время, как у крыс линии Август снижение меньше (на 31 % в НЗ от контроля) и не происходит в ИЗ миокарда. Важно, что, несмотря на исходную, более низкую активность ферментов антиоксидантной защиты у крыс линии Август, по сравнению с крысами линии Вистар, снижение активности каталазы после ишемии от контрольного уровня происходит у этих крыс в значительно меньшей степени. В результате абсолютные значения активности ферментов антиоксидантной защиты после ишемии становятся близкими у этих животных.

При реперфузии восстанавливается уровень антирадикальной защиты миокарда. У крыс обеих линий активность каталазы растет по сравнению с их уровнем при ишемии, однако у крыс линии Август активность фермента достигает контрольных значений, а у крыс линии Вистар

она остается значительно ниже контрольного уровня (см. рис. 2). При этом, после ишемии и реперфузии активность СОД в миокарде крыс линии Вистар не увеличивается, а еще больше снижается по сравнению с собственно ишемией. Таким образом, после ишемии и реперфузии

активность каталазы у крыс линии Вистар остается ниже контрольной на 42 % в обеих зонах миокарда, а активность СОД снижена на 38 % в НЗ, в то время, как у крыс линии Август активность ферментов антиоксидантной защиты не снижается. В результате при реперфузии мы наблюдаем обратное, по сравнению с контролем, соотношение антиоксидантной защиты у крыс обеих линий. Если в контроле активность ферментов антирадикальной защиты была выше у крыс линии Вистар, то после ишемии и реперфузии – у крыс линии Август.

При анализе механизмов повышенной резистентности к острой ишемии следует учесть, что адренореактивность миокарда у крыс линии Август ниже, чем у крыс линии Вистар [1]. Учитывая этот факт, а также то, что ишемия миокарда в острой стадии сопровождается адренергическими повреждениями не только ИЗ, но и НЗ миокарда [9], есть основание полагать, что пониженная адренореактивность миокарда у крыс линии Август является одной из причин повышенной устойчивости сократительной функции сердца у этих животных к ишемии. Кроме того, не исключено, что у крыс линии Август понижена реактивность стресс-реализующих систем. Действительно, при инфаркте миокарда у крыс этой линии активация адренерги-

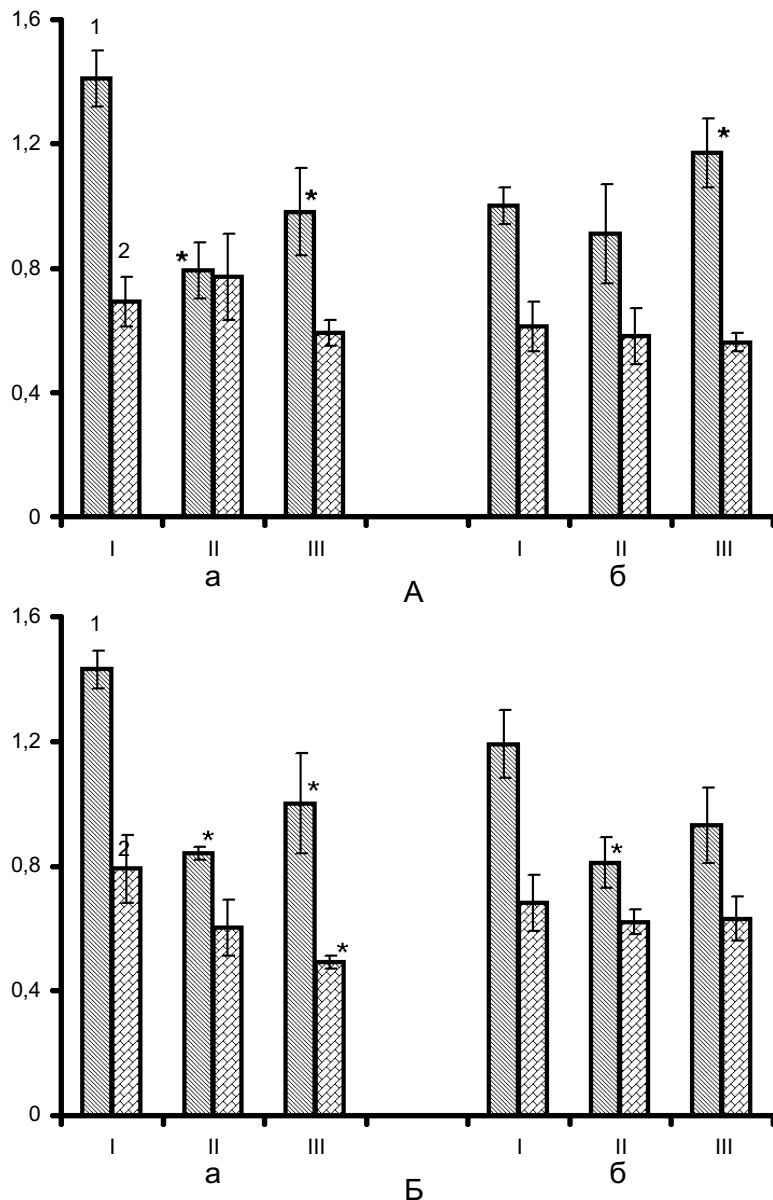


Рис. 2. Активность ферментов антиоксидантной защиты – каталазы (1) и супероксиддисмутазы (2) в сердце крыс линий Вистар (а) и Август (б): А – ишемизированная зона, Б – неишемизированная зона; I – контроль, II – после ишемии, III – после ишемии с последующей реперфузией миокарда.

\*  $P < 0,05$  по отношению к контролю

ческих структур в гипоталамусе и выход норадреналина из симпатических терминалей в сердце выражены в меньшей степени, чем у крыс линии Вистар [5].

В данной работе получены результаты, свидетельствующие о более высокой стабильности антиоксидантной защиты у крыс линии Август, чем у крыс линии Вистар. Это может быть связано со значительной степенью адаптации крыс линии Август к более высокой интенсивности АФК-опосредованных процессов, постоянно протекающих в организме. Учитывая увеличенное содержание катехоламинов для плазмы крови и отдельных структур мозга крыс линии Август, по сравнению с крысами линии Вистар [3], можно полагать, что первые адаптированы к более высокому содержанию катехоламинов, автоокисление которых приводит к индукции АФК.

Важно, что в нашем исследовании показано снижение антирадикальной защиты сердца, в частности уменьшение активности каталазы не только при реперфузии, но и при ишемии миокарда, причем степень ее ингибирования коррелировала с эффективностью функционирования сердца – как при ишемических, так и при реперфузионных повреждениях. Кроме того, продемонстрировано снижение активности каталазы и СОД при ишемии миокарда в обеих его зонах – подвергавшихся и не подвергавшихся ишемии, что может быть связано с прямым ингибирующим действием АФК, образующихся не только в ИЗ, но и в НЗ [9] при ишемии и реперфузии.

Таким образом, полученные результаты дают основание предположить, что более высокая стабильность показателей антирадикальной защиты у крыс линии Август, по сравнению с крысами линии Вистар, является одним из механизмов, обеспечивающих повышенную резистентность сократительной функции сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям у этих животных.

**T.G. Sazontova, L.M. Belkina, A.G. Zhukova,  
T.N. Kirillina, Yu.V. Arkhipenko**

#### **CONTRACTILE FUNCTION OF THE HEART AND ANTIOXIDANT SYSTEM IN AUGUST AND WISTAR RATS DURING ISCHEMIA AND REPERFUSION**

In August rats, local myocardial ischemia caused by 30-min occlusion of the coronary artery induced a slight depression of the contractile function of the heart; the latter was restored after 15-min reperfusion more rapidly than in Wistar rats. In August rats, the activities of antioxidant protection enzymes were lower than in Wistar rats. In comparison with Wistar rats, these enzyme activities were decreased in a lesser degree under ischemia and were restored in a greater degree under reperfusion. It may thus be concluded that the higher stability of antioxidant protection parameters in August rats is one of the mechanisms responsible for the enhanced resistance of the heart to ischemia- and reperfusion-induced injuries.

Moscow State University, Russia

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Белкина Л.М., Салтыкова В.А., Пшенникова М.Г. Генетически обусловленные различия в устойчивости к инфаркту миокарда у крыс Вистар и линии Август // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2001. – **131**, №6. – С. 529–532.
2. Белкина Л.М., Кириллина Т.Н., Пшенникова М.Г., Архипенко Ю.В. Крысы линии Август более устойчивы к аритмогенному действию ишемии и реперфузии миокарда, чем крысы популяции Вистар // Там же. – 2002. – **133**, №6. – С. 625–628.
3. Белова Т.И., Кветнанский Р. Роль катехоламинов отдельных ядер мозга в поддержании устойчивости физиологических функций при эмоциональном стрессе // Кардиология. – 1987. – **27**, № 10. – С. 109–111.
4. Дурнев А.Д., Сазонтова Т.Г., Гусева Н.В., Середенин С.Б. Влияние диоксида и циклофосфана на перекисное окисление липидов и активность супероксиддисмутазы и каталазы у мышей линии C54B1/6 и BALB/c // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1996. – **121**, №5. – С. 528–532.
5. Пшенникова М.Г., Белкина Л.М., Бахтина Л.Ю. и др. Роль стресс-белков HSP 70 и адренергической системы в различной устойчивости к инфаркту миокарда крыс генетических линий Август и Вистар // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2001. – **87**, №9. – С.1171–1177.
6. Сазонтова Т.Г., Белкина Л.М., Фу Сяньцюнь, Меерсон Ф.З. Са-транспортующая система и повреждение мембраны саркоплазматического ретикулума левого желудочка сердца крысы при ишемии и реперфузии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1994. – **118**, №1. – С. 130–135.

7. Сазонтова Т.Г., Дурнев А.Д., Гусева Н.В. и др. Антиоксидантные ферменты и перекисное окисление липидов у мышей C57Bl/6 и BALB/c // Там же. – 1995. – **120**, №12. – С.580–583.
8. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal.Biochem.* – 1971. – **44**. – P.276–287.
9. Herbaczinska C.K., Gordon M.W. Evidence for increased lipid peroxidation in the nonischemic portion of the heart with coronary occlusion // *Acta Physiol.Pol.* – 1988. – **39**, №2. – P. 151–155.
10. Luck H. Catalase. – In: *Methods of enzymatic analysis.* – New York, Verlag-Chemie Acad. press, 1963. – P.885–888.
11. Meerson F.Z., Kagan V.E., Kozlov Yu.P. et al. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damages and the antioxidant protection of the heart // *Basic Res. Cardiol.* – 1982. – **77**, №4. – P.465–485.
12. Meerson F.Z., Belkina L.M., Sazontova T.G. et al. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of arrhythmias and prevention of cardiac fibrillation with antioxidants // *Ibid.* – 1987. – **82**, №3. – P.123–137.
13. Padros E., Dunach M., Morros A. et al. 4-th-derivative spectrophotometry of proteins // *Trends in Biochem. Sci.* – 1984. – **9**, №12. – P.508–510.
14. Rehr R.B., Fuhs B.E., Hirsch J.I., Feher J.J. Effect of brief regional ischemia followed by reperfusion with or without superoxide dismutase and catalase administration on myocardial sarcoplasmic reticulum and contractile function // *Amer. Heart J.* – 1991. – **122**, №5. – P.1257–1269.
15. Sazontova T.G., Arkhipenko Yu.V., Lukyanova L.D. Comparative study of the effect of adaptation to intermittent hypoxia on active oxygen related systems in brain and liver of rats with different resistance to oxygen deficiency. In: *Adaptation Biology and Medicine* / Ed. B.K.Sharma. – New Delhi: Narosa Publishing House, 1997. – P.260–266.
16. Zhang W. Mechanism of the protective effects of berbamine on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart // *Chung.Hua.Hsin.Hsueh.Kuan. Ping. Tsa.Chih.* – 1993. – **21**. – part1, №5. – P.316–317.

*Москов. ун-т им. М.В.Ломоносова*

*Материал поступил в редакцию 24.10.2003*