

П.Н. Ескунов

ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ ПОСТИШЕМИЧЕСКИХ РЕПЕРФУЗИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МИОКАРДА КРЫС С ПОМОЩЬЮ ФИНОПТИНА

Омская государственная медицинская академия МЗ РФ

Проведено электронно-гистохимическое исследование влияния антагонистов кальция на развитие реперфузионных изменений миокарда после 10-минутной клинической смерти. Показано, что финоптин нормализует кальциевый гомеостаз и защищает кардиомиоциты от повреждения. Цитопротекторное действие финоптина связано с перераспределением избытка кальция во внутриклеточных органеллах, ограничением его поступления в клетки и улучшением микроциркуляции.

Ключевые слова: миокард, ишемия, реперфузия, кардиопротекция

Успешная реализация механизмов структурной адаптации миокарда после перенесенной тотальной ишемии в значительной степени определяется методами его защиты, которые должны базироваться на данных о патогенетических механизмах реперфузионного повреждения сердца [1, 7]. Развивающаяся недостаточность его сократительной функции после восстановления системного кровообращения обусловлена многими причинами, однако одним из главных звеньев патогенеза постишемической альтерации кардиомиоцитов является «кальциевый парадокс», т.е. нарушение клеточного транспорта и метаболизма кальция [8, 9]. Известно, что кальций участвует в регуляции важнейших физиологических процессов в миокарде: сократительной функции, поддержании целостности мембран и т.д. Дисбаланс кальция может приводить к многообразным нарушениям структуры и функции клеток.

Целью данной работы являлось изучение влияния антагониста кальция — финоптина (верапамила) на развитие ультраструктурных изменений в миокарде после реанимации.

Методика

Эксперименты проведены на 32 половозрелых белых крысах массой 200-240 г. Содержание животных, все эксперименты проведены в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Под эфирным наркозом вызывали 10-минутную тотальную ишемию путем пережатия сосудистого пучка у основания сердца [4]. Оживление осуществляли с помощью непрямого массажа сердца и искусственной вентиляции легких. В I группе (16 крыс) не использовали кардиопротекторы, во II группе (16 крыс) во время реанимационных мероприятий внутрибрюшинно вводили кальциевый блокатор финоптин в дозе 0,1 мг/кг. Отдельная группа животных (4 крысы) служила контролем на действие наркоза. Миокард левого желудочка брали для электронно-микроскопического исследования на 10-й мин клинической смерти, через 1,5 ч, 6 ч и 24 ч после восстановления сердечной деятельности. Материал фиксировали в смеси глутарового альдегида и параформа по методу Карновского (для трансмиссионной электронной микроскопии), а также в четырехокиси осмия с пироантимонатом калия (для электронно-гистохимической идентификации кальция). После обезвоживания и заливки в эпон-аралдит готовили ультратонкие срезы, которые после предварительного контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца изучали в электронном микроскопе ЭВМ—100Б. Са-аккумулирующую способность митохондрий оценивали по количеству кальциевых депозитов в 100 митохондриях каждой группы крыс. Полученные данные подвергали статистической обработке.

Результаты

В I группе животных в течение 24 ч после восстановления системного кровообращения в миокарде развивался комплекс разнообразных ультраструктурных повреждений, в значительной степени обусловленный нарушением метаболизма кальция и повышением проницаемости мембран, что описано нами ранее [2, 3]. Наибольшие изменения претерпевал сократительный аппарат: миофибриллы находились либо в состоянии контрактуры различной степени выраженности, либо

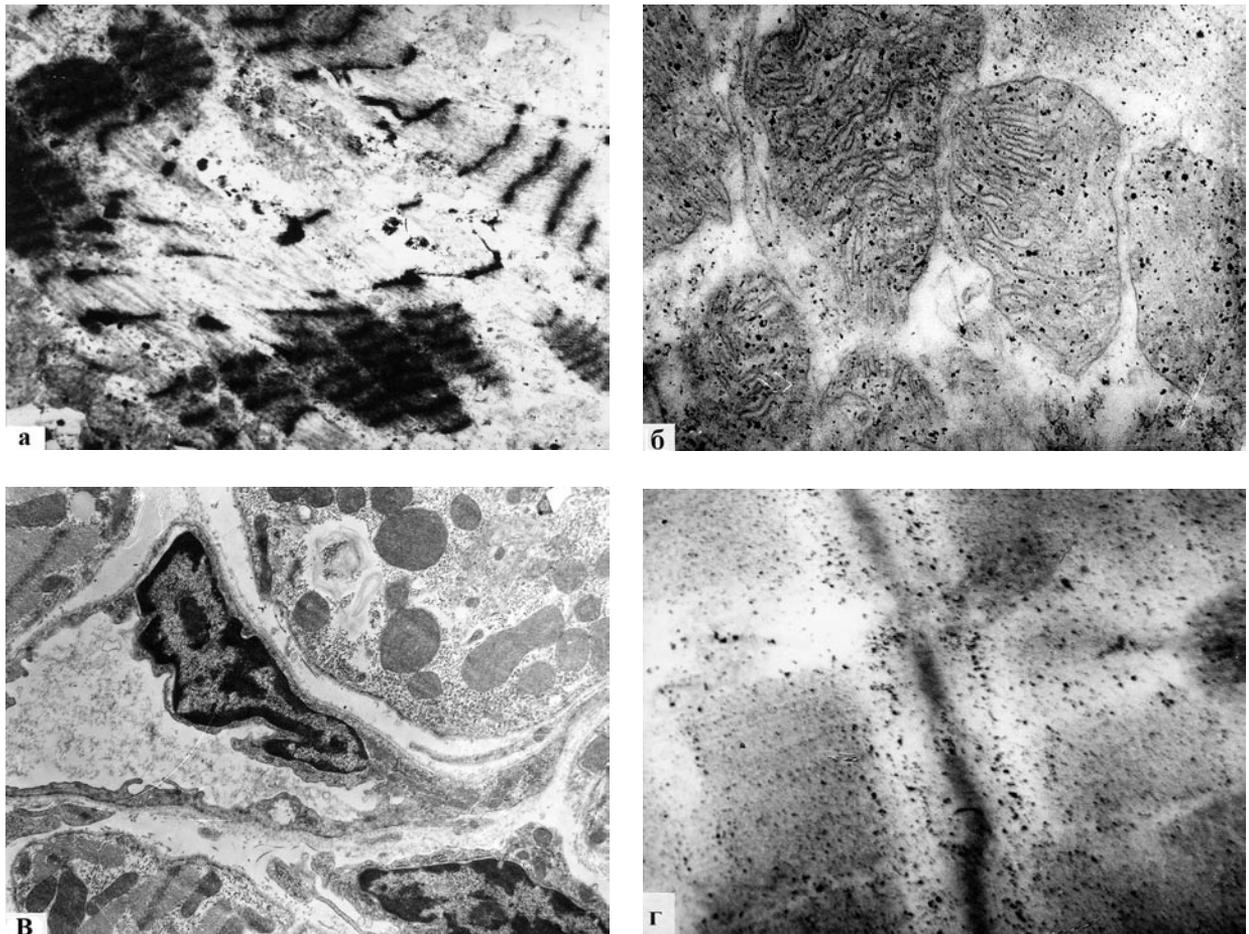


Рис. 1. Ультраструктура миокарда и локализация кальция в кардиомиоцитах после тотальной ишемии:
а — субсегментарные контрактуры миофибрилл; 1,5 часа после реанимации. I группа. Ув. $\times 10000$;
б — аккумуляция кальция в митохондриях; 6 часов после реанимации. I группа. Ув. $\times 38000$;
в — сохранение проходимости сосудов микроциркуляторного русла и явления внутриклеточной регенерации;
24 часа после реанимации. II группа. Ув. $\times 8000$;
г — локализация кальциевых депозитов преимущественно в области I-дисков миофибрилл;
6 часов после реанимации. II группа. Ув. $\times 38000$

истончались и фрагментировались вследствие лизиса (Рис. 1а). Дискинетические расстройства сократительного аппарата приводили к нарушению межклеточных контактов: щели многих вставочных дисков были расширены. Обращал на себя внимание выраженный внутриклеточный отек и очаговое исчезновение гранул гликогена.

Структура митохондрий менялась в меньшей степени, однако в некоторых из них наблюдали умеренное набухание, кристы теряли упорядоченность и гомогенизировались. Многие каналцы саркотубулярной системы были расширены. Часть сосудов микроциркуляторного русла имела суженный просвет за счет отека эндотелиоцитов и появления бухтообразных выпячиваний на люминальной поверхности. Отмечено появление

гемолизированных эритроцитов и интерстициального отека, свидетельствующего о повышенной сосудистой проницаемости.

По данным электронно-гистохимического анализа, к концу периода тотальной ишемии выявлена тенденция к снижению содержания кальция в митохондриях. Однако это снижение носило непостоянный, очаговый характер и не было статистически значимым ($P > 0,05$). Кроме того, уменьшалось количество кальциевых депозитов, связанных с сарколеммой.

В постреанимационном периоде (1,5 ч после реперфузии) наблюдали восстановление способности митохондрий удерживать ионы кальция с параллельным увеличением их концентрации в околomitохондриальном пространстве. В после-

дующем в течение первых суток продолжалось перераспределение кальция в кардиомиоцитах, причем к 6 ч после реанимации отмечено усиление Са-аккумулирующей способности митохондрий, значительно превышающее исходный уровень ($24,5 \pm 2,5$ против $4,6 \pm 0,6$ в контроле, $P < 0,01$). Мелкие кальциевые депозиты выявлялись в большом количестве в межклеточном пространстве, однако, как правило, они не приобретали форму хлопьевидных осадков, свойственных необратимому повреждению митохондрий (Рис. 1б). Накопление в матриксе этих органелл ионов кальция свидетельствовало об активации процессов удаления его избытка из цитозоля, поскольку митохондрии обладают потенциально высокой кальциевой емкостью и могут эффективно регулировать распределение кальция в клетке [8]. Несмотря на это, общее содержание внутриклеточного кальция несколько увеличивалось, что было обусловлено, по-видимому, частичным проникновением его через поврежденную сарколемму. Кроме того, наблюдали исчезновение кальция из субсарколеммального пространства в связи с нарушением способности сарколеммы удерживать эти ионы и снижение содержания кальция в саркоплазматическом ретикулуме, вызванное патологическим повышением проницаемости его мембран после ишемии и реперфузии [6]. При этом в зоне расположения миофибрилл кальциевые депозиты распределялись диффузно и равномерно, а количество их существенно увеличивалось. Сходные изменения кальциевого метаболизма кардиомиоцитов отмечали и через 24 ч после оживления, причем сохранялось повышенное количество кальция в митохондриях ($16,3 \pm 1,7$; $P < 0,01$).

Во II группе животных при использовании финоптина наблюдали изменение характера и выраженности реперфузионных повреждений миокарда. Контрактуры выявляли только в первые часы после восстановления сердечной деятельности, причем преобладали контрактуры с незначительным укорочением саркомеров, т.е. I-II степени. Явления внутриклеточного миоцитолитического были ограничены и, как правило, не приводили к нарушению целостности миофибрилл. Содержание гранул гликогена несколько уменьшалось через 1,5 ч после реперфузии, а в последующем мало отличалось от исходного уровня. Внутриклеточный отек был умеренным и не вызывал разобщения органелл. Отсутствовала дезинтеграция клеток в области вставочных дисков. Поскольку антагонисты кальция улучшают эндотелийзависимую вазодилатацию (за счет стимуляции синтеза NO) и способствуют удалению перекисных соединений из эндотелиоцитов [11],

значительно быстрее происходила нормализация пропускной способности сосудов микроциркуляторного русла. Это выражалось в снижении интенсивности отека эндотелиоцитов и ликвидации вазоконстрикции через 6-24 ч после восстановления кровотока (Рис. 1в). Улучшению транскапиллярного обмена способствовало уменьшение интерстициального отека и ослабление гемолиза эритроцитов, что также являлось результатом действия антагонистов кальция [10].

Положительное влияние финоптина при реперфузии безусловно указывало на участие в этом процессе кальция. Действительно, его распределение в кардиомиоцитах отличалось от наблюдаемого у крыс I группы. Увеличивалось количество кальция в канальцах саркоплазматического ретикулума и в подсарколеммальной области, приближаясь к исходному уровню. В миофибриллах кальций распределялся не диффузно, а преимущественно в области изотропных дисков, что соответствовало контролю (Рис. 1з). Накопление ионов кальция митохондриями значительно снижалось и не было статистически значимым ($P > 0,05$), что, во-первых, свидетельствовало о его меньшей концентрации в саркоплазме после реперфузии и, во-вторых, косвенно указывало на сохранение энергообразующей функции органелл. Известно, что при активном поглощении и удержании ионов кальция митохондриями окислительного фосфорилирования не происходит, поскольку энергия переноса электронов используется только для накопления кальция, но не для синтеза АТФ [9]. Отсутствие признаков кальциевой перегрузки кардиомиоцитов при использовании финоптина объяснялось его способностью ограничивать поступление кальция в клетки по медленным каналам и снижать активность кальциевых насосов сарколеммы [5].

Полученные данные свидетельствуют о том, что 10-минутная тотальная ишемия и последующая реанимация вызывают перераспределение кальция в клетках и — в меньшей степени — общее увеличение его содержания. Развивающийся во время остановки сердца дефицит макроэргических соединений является одной из причин нарушения митохондриального транспорта кальция, который по градиенту концентрации начинает диффундировать из митохондрий в гиалоплазму [9]. Однако после реперфузии избыточный приток кальция в клетки приводит к повышению Са-аккумулирующей способности митохондрий, являющихся внутриклеточными депо кальция. При этом снижается энергетический потенциал кардиомиоцитов, что нарушает их адекватную сократительную функцию.

Повышение концентрации кальция в цитозоле при отсутствии дополнительной кардиопротекции имеет ряд важных последствий для клетки. Прежде всего следует немедленная реакция миофибрилл, выражающаяся в снижении степени их расслабления и появлении контрактур. Активация Са-зависимых протеаз и липаз является одной из вероятных причин наблюдаемого нами литического расплавления миофибрилл. Кроме того, под влиянием избытка кальция активизируется фосфолипазный механизм деструкции мембран, приводящий к нарушению их барьерной функции и повышению проницаемости [12]. Это способствует поступлению в клетки гидрофильных катионов — натрия и кальция, с последующим развитием внутриклеточного отека.

Заключение

Использование финоптина при реперфузии показало, что антагонисты кальция не только блокируют его излишнее поступление в кардиомиоциты, но и корректируют распределение во внутриклеточных органеллах — митохондриях, саркоплазматическом ретикулуме, миофибриллах. Эти процессы отражают стимуляцию механизмов поддержания клеткой кальциевого гомеостаза. Нормализация содержания и распределения кальция в миокардиальных клетках в значительной степени препятствует развитию контрактур, лизиса, отека и других изменений, наблюдавшихся в постшемическом периоде. Этому способствует также противоишемическое действие финоптина и его благоприятное влияние на микрососудистое русло.

Таким образом, модуляция транспорта кальция с использованием кальциевых блокаторов оказывает цитопротекторное действие, увеличивая толерантность сердца к реперфузионным повреждениям, что связано с активным включением всех стереотипных звеньев реакций клеточной адаптации.

Correction of postischemic reperfusion changes in rat myocardium by finoptin

P.N. Eskunov

The influence of calcium antagonists on the development of myocardial reperfusion changes after 10 min clinical death was studied with electron-histochemical analysis. It was established that finoptin normalized calcium homeostasis and protected cardiomyocytes from lesion. Cytoprotective influence of finoptin is connected with the redistribution of calcium redundancy inside the intracellular organelles, the restriction of its entering into the cells and the improving of microcirculation.

Литература

1. *Биленко М.В.* Ишемические и реперфузионные повреждения органов / М.В. Биленко. — М., 1989.
2. *Ескунов П.Н.* Роль клеточной проницаемости и метаболизма кальция в развитии реперфузионных изменений кардиомиоцитов у крыс разного возраста / П.Н. Ескунов // Бюл. СО РАМН. — 2002. — № 3. — С. 54-56.
3. *Ескунов П.Н., Семченко В.В.* // Морфология. — 2003. — № 2. — С. 60-64.
4. *Корпачев В.Г., Лысенков С.П., Тель Л.З.* // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 1982. — № 3. — С. 78-80.
5. *Литвицкий П.Ф.* Адаптивные и патогенные эффекты реперфузии и реоксигенации миокарда / П.Ф. Литвицкий, В.А. Сандриков, Е.А. Демуров. — М., 1994.
6. *Сазонова Т.Г., Белкина Л.М., Фу Сянцзюнь и др.* // Бюл. exper. биол. — 1994. — № 2. — С. 130-135.
7. *Bolli R.* // Circulation. — 1990. — Vol. 82. — № 3. — P. 723-738.
8. *Borgers M., Shu L.G., Xhonneux R., et al.* // Amer. J. Pathol. — 1987. — Vol. 126. — № 1. — P. 92-102.
9. *Dhalla N., Wang X., Beamish R.* // Exp. Clin. Cardiol. — 1996. — Vol. 1. — № 1. — P. 7-20.
10. *Peters S.M., Jong M.D., Bindels R.J. et al.* // Life Sci. — 1998. — Vol. 63. — P. 975-983.
11. *Triggle D.J.* // Cleve. Clin. J. Med. — 1992. — Vol. 59. — P. 617-627.
12. *Vusse G., Bilsen M., Reneman R.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1994. — № 723. — P. 1-14.