

НАТРИЙ-ЗАВИСИМОЕ ПОГЛОЩЕНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ИЗОЛИРОВАННОМ СЕРДЦЕ КРЫСЫ ПРИ ГИПОКСИИ И ИШЕМИИ И СВЯЗЬ ЭТОГО ПРОЦЕССА С ВОЗНИКНОВЕНИЕМ АРИТМИЙ СЕРДЦА

В. В. Алабовский, А. А. Винокуров, О. В. Маслов

Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко

Поступила в редакцию 08.08.2009 г.

Аннотация. Наиболее опасным для жизни последствием острого инфаркта миокарда является возникновение фибрилляции желудочков сердца. Причины быстрого нарушения электрической активности в сердце при ишемии остаются пока не установленными. Предполагают, что в основе развития электрической неоднородности важная роль принадлежит ионам кальция, в результате его быстрого накопления в клетках миокарда. Учитывая известные данные о резком падении трансмембранного градиента натрия в зоне ишемии, предполагается активизация процесса $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ обмена, в результате которого резко увеличивается внутриклеточный уровень кальция. В настоящем исследовании впервые наблюдали процесс натрий-зависимого поглощения кальция изолированным сердцем крысы. Поглощение кальция сопровождалось возникновением фибрилляции желудочков сердца. Наблюдаемые явления полностью блокировались ингибитором $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ обмена. Поглощение кальция увеличивалось при гипоксии, а при реперфузии после ишемии, наоборот, резко снижалось.

Ключевые слова: фибрилляция желудочков сердца, натрий-кальцевый обмен, ишемия, гипоксия.

Abstract. Ventricular fibrillation is the most dangerous consequence of acute myocardial infarction. The reasons of rapid disorder of electrical activity of the heart are not well established. It is suggested that accumulation of Ca^{2+} within cells play a key role in development of electrical heterogeneity of the heart. Taking into consideration data on rapid and deep decreasing of Na^+ gradient in ischemic zone, the activation of $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange, the main reason of elevation of intracellular Ca^{2+} concentration, is proposed. This investigation firstly observes sodium dependent calcium uptake by isolated rat heart. Uptake of Ca^{2+} ions by the isolated heart is accompanied by development of ventricular fibrillation. The observed events were completely blocked by $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitors. Calcium uptake is accelerated at hypoxia and slowed after ischemia.

Keywords: ventricular fibrillation, sodium-calcium exchange, ischemia, hypoxia.

ВВЕДЕНИЕ

Характерной особенностью развития инфаркта миокарда является быстрое уменьшение трансмембранного градиента натрия в зоне ишемии. При этом, во внеклеточной среде наблюдается снижение, а внутри кардиомиоцитов — увеличение активной концентрации ионов натрия [1—3].

Изменения в электролитном балансе вызывают опасные для жизни аритмии сердца [4]. Полагают, что определенную роль в этих явлениях играет система $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ обмена [5, 6]. Однако, прямых доказательств взаимосвязи этой системы с возникновением аритмий в интактном, работающем сердце пока нет, поскольку опыты с регистрацией процесса $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ обмена проводятся исключительно на изолированных кардиомиоцитах, или полосках сердечной мышцы [7, 8]. Эти экспери-

ментальные приемы не позволяют учитывать межклеточные взаимодействия и электрическую активность сердца во время функционирования $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ обмена при патологии.

Целью настоящего исследования явилась разработка метода регистрации поглощения ионов кальция изолированным сердцем крысы при активировании $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ обмена, изучение влияния на этот процесс патологических факторов — гипоксии, ишемии и установление связи этого механизма с возникновением аритмии сердца.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Опыты проводились на изолированных сердцах белых крыс линии Wistar, перфузированных по методу Лангендорфа оксигенированным ($t=37^\circ\text{C}$) раствором Рингера-Локка, содержащим (мМ): NaCl — 140, NaHCO_3 — 2,0; KCl — 5,0; трис-ОН — 2 ($\text{pH}=7,4$); CaCl_2 — 0,6, глюкозу-11.

Под эфирным наркозом крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку и сердце помещали в охлажденный раствор Рингера-Локка. В аорту вводили канюлю и начинали перфузию перистальтическим насосом со скоростью 10 мл/мин на 1 г исходным раствором в течение 15 минут для стабилизации сократительной функции и энергетического обмена. Для исключения внешнего температурного воздействия, сердце перфузировали в термостатированной камере при $t = 37^\circ \text{C}$.

Инициацию Na^+ -зависимого поглощения Ca^{2+} изолированным сердцем крысы осуществляли путем замены хлорида натрия на хлорид аммония в той же концентрации или смесью хлорида аммония (10 мМ) с сахарозой (260 мМ). По окончании перфузии гипонатриевой средой через сердце пропускали исходный раствор, содержащий 140 мМ хлорида натрия.

Концентрацию кальция в оттекающем от сердца перфузионном растворе непрерывное измеряли в течение всего периода опыта. С помощью перистальтического насоса перфузионный раствор смешивали с металлоиндикатором на ионы Ca — Арсеназо-III. Образовавшийся окрашенный продукт реакции пропускали через проточную кварцевую микрокювету, помещенную в регистрационный блок спектрофотометра СФ-46. Показания спектрофотометра при длине волны 660 нм непрерывно записывали на самописце КСП-4, а полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы ANOVA.

Калибровку записей осуществляли путем добавок в перфузионный раствор 15 мкмоль/л CaCl_2 .

Гипоксию сердца создавали путем пропускания через него в течение 15 минут перфузионного раствора без насыщения его кислородом.

Ишемия миокарда возникала во время прекращения перфузии сердца в течение 15 минут. Затем через 5 минут реперфузии активировали Na^+ - Ca^{2+} обмен путем замены хлорида натрия на хлорид аммония.

Инициацию пероксидного окисления липидов осуществляли по методу [9]. При этом в перфузи-

онные растворы добавляли пероксид водорода до конечной концентрации 50 и 150 мкМ. Полученные результаты обработаны методом вариационной статистики. В работе обсуждаются результаты, в которых показатель $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что замена хлорида натрия на смесь хлорида аммония с сахарозой вызывает возникновение фибрилляции желудочков сердца (рис. 1). Использование специфического ингибитора Na^+ - Ca^{2+} обмена — хлорида никеля в концентрации 0,5 мМ предупреждало возникновение фибрилляции желудочков сердца.

В следующих экспериментах была изучена возможность регистрации убыли кальция из перфузионного раствора в период инициации Na -зависимой аккумуляции Ca^{2+} изолированным сердцем крысы.

Переключение перфузионного раствора с хлоридом натрия на раствор, содержащий вместо хлорида натрия сахарозу, вызывала оптическую турбулентность, которая мешала непрерывному спектрофотометрическому измерению концентрации кальция. Поэтому в следующих опытах хлорид натрия полностью заменяли на хлорид аммония, имеющий примерно такую же молекулярную массу и плотность раствора.

При этом удавалось четко регистрировать интенсивное поглощение ионов кальция сердцем из перфузионной среды.

Максимальная скорость поглощения составила 94 нмоль/мин.г сырого веса ткани. Максимальное количество кальция за пять минут перфузии безнатриевой средой составило 360 нмоль/г (табл. 1).

При повторных заменах Na^+ на NH_4^+ (после перфузии сердца исходным Na^+ -содержащим раствором в течение 10 минут) интенсивность поглощения Ca^{2+} изолированным сердцем каждый раз увеличивалась (рис. 2).

Добавление в растворы специфического ингибитора Na^+ - Ca^{2+} обмена — хлорида никеля (0,5 мМ)

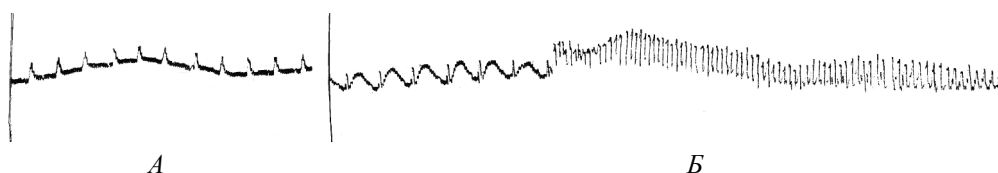


Рис. 1. Электрограмма возникновения фибрилляции желудочков сердца крысы при снижении концентрации NaCl до 2 мМ (осмотичность сохраняли смесью хлорида аммония в концентрации 10 мМ и сахарозы 260 мМ). Обозначения: А — исходное состояние; Б — электрограмма через 60 секунд с начала перфузии гипонатриевым раствором

Таблица 1

Параметры поглощения кальция изолированным сердцем крысы
при замене хлорида натрия на хлорид аммония

Показатели	контроль	хлорид никеля
Поглощение кальция за 5 мин. (нмоль/г)	360±74	40±6,7 $p < 0,01$
Средняя скорость поглощения кальция за 5 мин. (нмоль/мин·г)	72±15	10±0,8 $p < 0,01$
Максимальная скорость поглощения кальция (нмоль/мин·г)	94±17	8±1,3 $p < 0,01$

практически полностью блокировало накопление кальция изолированным сердцем крысы (табл. 1).

Таким образом, полученные результаты показали достаточную чувствительность методики для регистрации поглощения Ca^{2+} изолированным сердцем крысы, вызванном снижением уровня Na^+ в перфузионном растворе. Отсутствие реакции сердца на уменьшение трансмембранного градиента Na^+ при использовании ионов никеля указывает на участие в этом процессе системы Na^+ - Ca^{2+} обмена.

Далее моделировали состояние гипоксии в сердце путем его перфузии раствором без предварительного насыщения кислородом. При замене хлорида натрия на хлорид аммония аккумуляция Ca^{2+} сердечной мышцей значительно увеличивалась (рис. 3).

Известно, что гипоксия нарушает процесс образования энергии. При этом падает активность натрий-калиевого насоса и происходит увеличение

концентрации Na^+ внутри кардиомиоцитов. [10]. В условиях гипоксии накопление внутриклеточного уровня Na^+ обеспечивает более мощный его выход из клеток в обмен на внеклеточный Ca^{2+} .

Иная картина наблюдалась при моделировании в изолированном сердце ишемии в течение 15 минут и дальнейшей реперфузии в течение 5 минут (табл. 2). В этом случае трансмембранный обмен Na^+ на Ca^{2+} снижался в 8—10 раз. По-видимому, резкое ослабление скорости Na^+ - Ca^{2+} обмена в сердечной мышце при реперфузии после ишемии возникает в результате развития ацидоза, а также активации пероксидного окисления липидов.

Дальнейшие исследования показали, что процесс Na^+ - Ca^{2+} обмена весьма чувствителен к изменениям pH во внеклеточной среде. Уменьшение pH до 6,5 или увеличение до 8,5 резко уменьшает скорость натрий-зависимого поглощения Ca^{2+} в сердечной мышце (табл. 3).

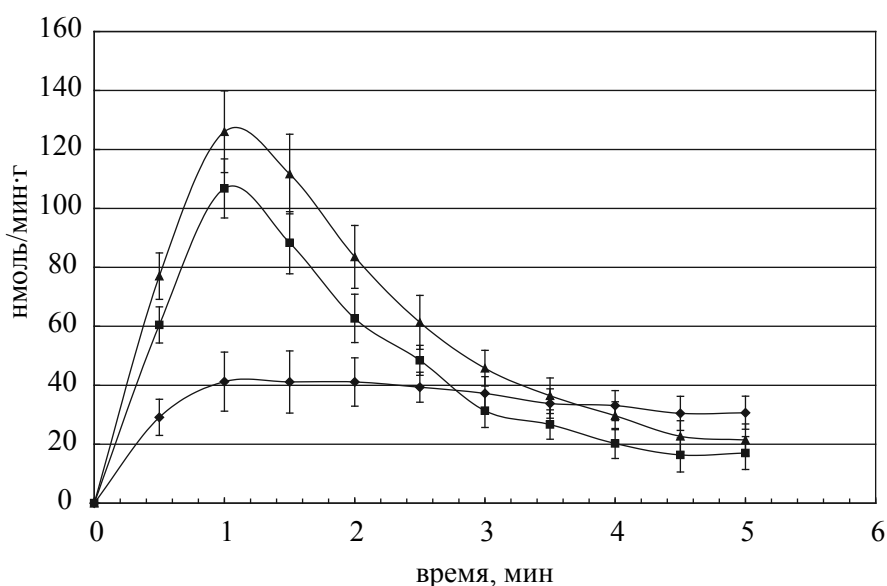


Рис. 2. Динамика поглощения ионов кальция изолированным сердцем крысы при замене хлорида натрия на хлорид аммония. Представлены результаты повторных 3-х записей. Обозначения: ♦ — запись 1; ■ — запись 2; ▲ — запись 3

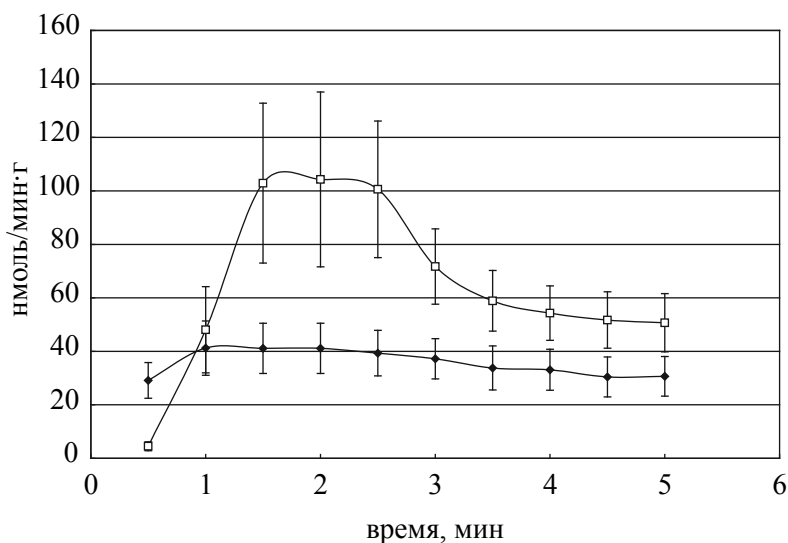


Рис. 3. Активация натрий-зависимого поглощения ионов кальция изолированным сердцем при гипоксии. Обозначения: ♦ — контроль; □ — гипоксия

Таблица 2

Влияние ишемии на процесс Na^+ - Ca^{2+} обмена в изолированном сердце крысы

показатели	контроль	ишемия
количество поглощенного Ca^{2+} за 5 мин. (нмоль/г)	360 ± 74	$44,2 \pm 7,8$ $p < 0,05$
максимальная скорость поглощения Ca^{2+} (нмоль/мин·г)	94 ± 17	$14,1 \pm 2,4$ $p < 0,05$
средняя скорость поглощения Ca^{2+} в течение 5 мин. (нмоль/мин·г)	72 ± 15	$8,8 \pm 1,5$ $p < 0,05$

Таблица 3

Влияние pH на процесс Na^+ - Ca^{2+} обмена в сердце крысы

Показатели	контроль	pH 6,5	pH 8,5
количество поглощенного кальция за 5 мин. (нмоль/г)	360 ± 74	$36,3 \pm 12,2$ $p < 0,01$	$82,2 \pm 24,6$ $p < 0,05$
максимальная скорость поглощения кальция (нмоль/мин·г)	94 ± 17	$9 \pm 2,7$ $p < 0,01$	$25,6 \pm 5,0$ $p < 0,01$
средняя скорость поглощения кальция в течение 5 мин. (нмоль/мин·г)	72 ± 15	$6,5 \pm 2,3$ $p < 0,01$	$16,4 \pm 4,9$ $p < 0,01$

Также значительно снижается активность Na^+ - Ca^{2+} обмена в условиях инициации в сердце пероксидного окисления липидов, путем добавления в перфузионные растворы H_2O_2 в разных концентрациях (рис. 4).

Таким образом, исследования показали, что на изолированном, функционирующем сердце можно

регистрировать трансмембранный поток кальция. При этом удастся измерить убыль кальция из внеклеточной среды во время активации натрий-кальциевого обмена. Важно отметить, что наблюдаемое нами поглощение ионов Ca одновременно сопровождается нарушением ритма сердца — развитием фибрилляции желудочков. Эти результаты

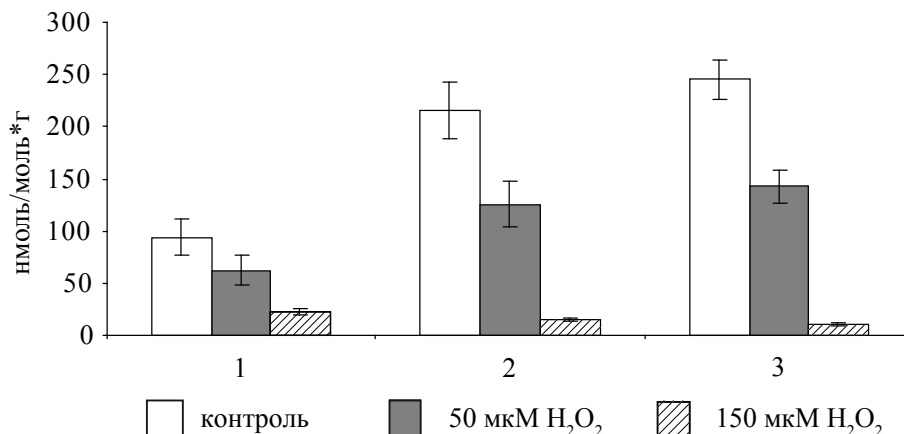


Рис. 4. Влияние пероксида водорода на скорость поглощения кальция при Na⁺-Ca²⁺ обмене. Обозначения: 1 — первая запись; 2 — вторая запись; 3 — третья запись

доказывают непосредственное участие Na⁺-Ca²⁺ обмена в нарушении электрофизиологического состояния миокарда.

Известно, что ишемия миокарда очень часто сопровождается возникновением фибрилляции желудочков сердца [11, 12]. В том, что непосредственной причиной фибрилляции являются ионы Ca, бесконтрольно поступающие внутрь кардиомиоцитов, уже ни у кого не вызывает сомнений. Однако путь, по которому кальций быстро проникает в миоциты, пока точно не установлен.

Полученные нами результаты опытов наглядно демонстрируют роль системы Na⁺-Ca²⁺ обмена в пусковом механизме дестабилизации электрической синхронности кардиомиоцитов миокарда. Основа для такого заключения базируется на следующих известных научных данных.

Исследования динамики в секундном интервале времени изменений активной концентрации электролитов, предшествующие возникновению аритмий сердца, демонстрируют процесс быстрого уменьшения во внеклеточной среде [2] и увеличение внутри кардиомиоцитов активной концентрации Na⁺ [3].

Известно, что уменьшение внеклеточного уровня Na⁺ сопровождается снижением его трансмембранного градиента, которое инициирует поступление ионов Ca²⁺ внутрь кардиомиоцитов [4]. Быстрое возрастание внутриклеточного уровня Ca²⁺ стимулирует выход K⁺ [13]. Этот процесс протекает гетерогенно в массе миокардиальных клеток [14]. Резкое нарастание неоднородности электрофизиологических характеристик кардиомиоцитов способствует развитию электрической нестабильности миокарда, завершающейся возникновением фибрилляции желудочков сердца.

В этой связи можно считать, что первостепенной причиной возникновения фибрилляции желудочков, при патологиях сердца, является резкое увеличение внутриклеточного Ca²⁺ посредством Na⁺-Ca²⁺ обмена.

Фибрилляция желудочков сердца возникает в первые минуты острой коронарной недостаточности, то есть в тот момент, пока сердечная мышца испытывает состояние гипоксии [1]. В более поздние сроки (часы) в результате глубокой ишемии может наступить остановка сердца [12]. Все эти клинические наблюдения объясняются разным состоянием системы Na⁺-Ca²⁺ обмена — вначале активацией (гипоксия), затем резким ослаблением Na⁺-Ca²⁺ обменного процесса вследствие глубокой ишемии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Н.А. О фазных изменениях pH и pNa миокарда при остром нарушении коронарного кровообращения / Н.А. Онищенко, М.Е. Райкина, Б.П. Распортуев, В.А. Долидзе // Биофизика. — 1966. — №5. — С. 855—860.
2. Hirche Hj. Measurements of myocardial extracellular Na, K, Ca and H using ion-selective electrodes during ischemia / Hj. Hirche, R. Bissing, R. Friedrich // Progr. Enzyme and Ion-Selective Electrodes, Berlin e.a. — 1981. — P. 164—170.
3. Kleber A.G. Resting membrane potential, extracellular potassium activity and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts / A.G. Kleber // Circulat. Res. — 1983. — Vol. 52. — №4. — P. 442—450.
4. Homma N. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger: involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchange system in cardiac triggered activity / N. Homma, M.S. Amran, Y. Nagasawa, K. Hashimoto // J. Pharmacol. Sci. — 2006. — Sep. — Vol. 102. — №1. — P. 17—21.

5. Bers D.M. Upregulated Na/Ca exchange is involved in both contractile dysfunction and arrhythmogenesis in heart failure / D.M. Bers, S.M. Pogwizd, K. Schlotthauer // *Basic Res. Cardiol.* — 2002. — Suppl. 1. — P. 136—142.
6. Niu C.F. Characterization of SN-6, a novel Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor in guinea pig cardiac ventricular myocytes / C.F. Niu, Y. Watanabe, K. Ono, T. Iwamoto, et al. // *Eur. J. Pharmacol.* 2007. — Nov. 14. — Vol. 573. — №.1—3. — P.161—169.
7. Gofman Y. Effects of purified endogenous inhibitor of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger on ouabain-induced arrhythmias in the atria and ventricle strips of guinea pig / Y. Gofman, C. Shpak, R. Hiller, et al. // *Eur. J. Pharmacol.* — 2006. — Dec 28. — Vol.553. — №.1—3. — P. 196—204.
8. Pogwizd S.M. Na/Ca exchange in heart failure: contractile dysfunction and arrhythmogenesis // S.M. Pogwizd, D.M. Bers // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2002. — Nov. 976. — P. 454—465.
9. Song Y. Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction / Y. Song, J.C. Shryock, S. Wagner // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2006. — Jul. — Vol.318. — №.1. — P. 214—222.
10. Despa S. Intracellular Na⁺ concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged / S. Despa, M.A. Islam, C.R. Weber, S.M. Pogwizd, D.M. Bers // *Circulation.* — 2002. — May 28. — Vol.105. — №.21. — P. 2543—2548.
11. Flear C.T.G. Changes in myocardial water and solutes after ischemia / C.T.G. Flear, R.A. Riemersma, A. Nandra. et al. // *Recent Advances in studies on cardiac structure and metabolism.* — 1976. — Vol.7. — P. 297—305.
12. Мандела В.Дж. Аритмии сердца. Механизмы, диагностика, лечение. Под ред. В. Дж. Мандела, М., «Медицина», 1996, Том 2. С. 373—405.
13. Isenberg G. Cardiac Purkinje Fibres, [Ca] controls the potassium permeability via the conductance components gK₁ and gK₂, *Pflugers Arch.* 1977. — Vol.71. — №1—2. — P. 77—85.
14. Antzelevitch C. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. / C. Antzelevitch, J. Fish // *Basic Res Cardiol.* 2001. — Nov.96. — №6. — P. 517—527.

Алабовский В.В. — профессор, заведующий кафедрой биохимии ВГМА им. Н. Н. Бурденко, тел.: (4732) 530-375

Винокуров Алексей Анатольевич — ассистент кафедры биохимии ВГМА им. Н. Н. Бурденко, тел. (4732) 530-338

Маслов Олег Владимирович — аспирант кафедры биохимии ВГМА им. Н. Н. Бурденко, тел.: (4732) 530-338

Alabovsky V. V. — professor, Head of Department of Biochemistry, N. N. Burdenko VSMA, tel.: (4732) 530-375

Vinokurov A. A. — assistant of Department of Biochemistry, N. N. Burdenko VSMA, phone: (4732) 530-338

Maslov O. V. — post graduate student of Department of Biochemistry, N. N. Burdenko VSMA, tel.: (4732) 530-338