

АКТИВАЦИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ КИСЛОРОДА МИТОХОНДРИЯМИ СЕРДЦА КАЛЬЦИЕМ, ПРОНИКАЮЩИМ В МИОКАРД ПОСРЕДСТВОМ Na^+ - Ca^{2+} ОБМЕНА

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

Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко

Поступила в редакцию 11.05.2010 г.

Аннотация. Установлено, что наибольшая активность потребления кислорода изолированным сердцем крысы наблюдается на 2 минуты позже того времени, когда происходит максимальный процесс аккумуляции сердцем ионов кальция вызванном активацией Na^+ - Ca^{2+} обмена. На остановленном сердце с помощью высокой концентрацией калия рутениевый красный (ингибитор транспорта Ca^{2+} в митохондриях) совмещал максимумы активности поглощения сердцем кислорода с максимумом аккумуляции Ca^{2+} , вызванным Na^+ - Ca^{2+} обменом. Полученные результаты показывают, что активация Na^+ - Ca^{2+} обмена, наблюдающаяся в острой стадии инфаркта миокарда может сопровождаться не только развитием контрактуры миофибрилл но и аккумуляцией избытка Ca^{2+} митохондриями миокарда. Предполагается, что подобная реакция кардиомиоцитов усугубляет кислородный дефицит и ускоряет развитие некротических изменений в сердечной мышце.

Ключевые слова: крысы, миокард, натрий-кальциевый обмен, дыхание митохондрий, ишемия сердца.

Abstract. It has established that the most activity of oxygen consumption by isolated rat heart is observed on 2 minutes latter of the moment when there is maximal peak of calcium accumulation by heart due to activation of Na^+ - Ca^{2+} exchange. Ruthenium red (an inhibitor of Ca^{2+} transport into mitochondria) put together the peak of oxygen consumption by heart and peak of calcium accumulation due to activation of Na^+ - Ca^{2+} exchange. The results obtained in this study have shown that activation of Na^+ - Ca^{2+} exchange, which can be observed at myocardial infarction, might be accompanied by not only contracture of myofibrils but also accumulation of excess of Ca^{2+} by mitochondria. It is suggested that this reaction aggravates oxygen deficiency and accelerates development of necrosis of heart muscle.

Keywords: rat heart, sodium-calcium exchange, mitochondria, respiration of mitochondria, ischemia.

ВВЕДЕНИЕ

Непрерывность доставки кислорода в сердечную мышцу определяет не только ее функциональные возможности, но и причину развития необратимых изменений при гипоксии или ишемии миокарда. Работа сердца целиком зависит от активного состояния митохондрий, а повреждения их мембран являются начальной фазой полной дезорганизацией и распада клеточных структур. Главными патогенетическими факторами, запускающие процесс повреждения всех мембранных структур клеток, являются активные формы кислорода, а также, кальций, концентрация которого при гипоксии и ишемии стремительно нарастает результате активации процесса Na^+ - Ca^{2+} обмена [1].

При этом следует отметить парадоксальность ситуации, обусловленной стремительным накоплением ионов кальция внутри кардиомиоцитов, а именно — в условиях дефицита кислорода акти-

визируются процессы, сопровождающиеся значительным усилением его расходования.

Во-первых, повышение внутриклеточного уровня Ca^{2+} , стимулирует сократительную активность миофибрилл. Возрастание уровня АДФ за счет гидролиза АТФ актомиозиновым комплексом усиливает потребление кислорода митохондриями. Во-вторых, можно предположить, что повышение внутриклеточного уровня кальция, в свою очередь, инициирует поглощение его митохондриями. Поскольку этот процесс носит электрогенный характер, происходит снижение мембранного потенциала митохондрий, что служит причиной еще большего усиления скорости потока электронов по дыхательной цепи и активацией поглощения митохондриями кислорода [2].

Совершенно очевидно, что подобная реакция кардиомиоцитов усугубляет кислородный дефицит и ускоряет развитие некротических изменений в сердечной мышце. О возможности подобных патологических явлениях свидетельствуют косвенные

данные, в которых показано, что блокирование различными средствами всевозможных путей проникновения Ca^{2+} внутрь клеток миокарда существенно ослабляет глубину их повреждений при сердечных патологиях.

Вместе с тем остается неизвестен вклад того количества Ca^{2+} , который поступает в кардиомиоциты через систему Na^+ - Ca^{2+} обмена, в активизации потребления митохондриями кислорода. Учитывая, что исследования последних лет, выполненные в этом направлении проведены исключительно на изолированных кардиомиоцитах, представляет большой интерес изучение связи натрий-зависимой аккумуляции ионов кальция с дыхательной активностью митохондрий в целостном, интактном миокарде животного.

В этой связи, нами было изучено влияние ионов кальция, поступающего в кардиомиоциты во время Na^+ - Ca^{2+} обмена, на интенсивность поглощения изолированным сердцем кислорода.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Эксперименты проводились на изолированных сердцах белых крыс линии Wistar, перфузированных по методу Лангендорфа оксигенированным ($t=37^\circ\text{C}$) раствором Рингера-Локка (мМ): NaCl —140, NaHCO_3 —2,0; KCl —5,0; трис-ОН ($\text{pH}=7,4$); CaCl_2 —0,6, глюкозы-11. Под эфирным наркозом крыс декапитуировали, вскрывали грудную клетку и сердце помещали в охлажденный раствор Рингера-Локка. В аорту вводили канюлю и начинали перфузию со скоростью 10 мл/мин на 1 г исходным раствором в течение 15 минут для стабилизации сократительной функции и показателей энергетического состояния.

Инициацию натрий-зависимого поглощения кальция осуществляли путем снижения уровня натрия в перфузионном растворе. При этом сердце перфузировали средой, в которой хлорид натрия заменяли на хлорид аммония в той же концентрации. По окончании перфузии гипонатриевой средой через сердце пропускали исходный раствор, содержащий 140 мМ хлорида натрия.

Концентрацию кальция в оттекающем от сердца перфузионном растворе непрерывно измеряли в течение всего периода опыта. С помощью перистальтического насоса перфузионный раствор смешивали с металлоиндикатором на ионы Ca^{2+} —Арсеназо-III. Образовавшийся окрашенный продукт реакции пропускали через проточную кварцевую микрокювету, помещенную в регистрационный блок спектрофотометра СФ-46. Интен-

сивность окраски измеряли при длине волны 660 нм. Данная методика позволяла регистрировать изменения концентрации кальция в перфузионной среде от 1 до 20 мкмоль/л CaCl_2 .

Скорость поглощения изолированным сердцем кислорода регистрировали полярографическим методом с помощью проточной кюветы со встроеным стационарным платиновым электродом. Расчет производили по разнице содержания кислорода в притекающем и оттекающем от сердца перфузионном растворе [3].

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики. В работе обсуждаются результаты, в которых показатель $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали, что при замене хлорида натрия на хлорид аммония наблюдается активация интенсивности поглощения сердечной мышцей кислорода. Максимум активности наблюдался через 2,5 минуты от начала снижения концентрации натрия во внеклеточной среде.

Сопоставление динамики поглощения сердцем ионов кальция с динамикой поглощения сердцем кислорода показало, что наибольшая активность потребления кислорода возникает на 2 минуты позже того времени, когда наблюдается максимальный процесс аккумуляции сердцем ионов кальция.

Не исключено, что активация дыхания в митохондриях миокарда обусловлено, по крайней мере, двумя факторами—стимулированием сокращений миофибрилл, входящим потоком кальция, и поглощением избытка кальция митохондриями (рис. 1).

С целью оценки вклада Са-зависимого поглощения кислорода митохондриями в общий показатель поглощаемого кислорода сердца, дальнейшие эксперименты выполнялись в условиях остановки сердечной активности. Предполагалось, что трата кислорода непрерывно работающим сердцем нивелирует вклад той доли кислорода, которая расходуется во время активной аккумуляции ионов Ca^{2+} митохондриями.

Прекращение сердечных сокращений осуществлялась высокой деполяризующей концентрацией ионов калия. Это достигалось путем добавления в перфузионные растворы хлорида калия до концентрации 30 ммоль/л [4].

Проведенные опыты в этих условиях продемонстрировали различие между максимумами активности поглощения кальция и поглощением кислорода сердцами крыс. При этом поглощение кислорода продолжало активироваться спустя

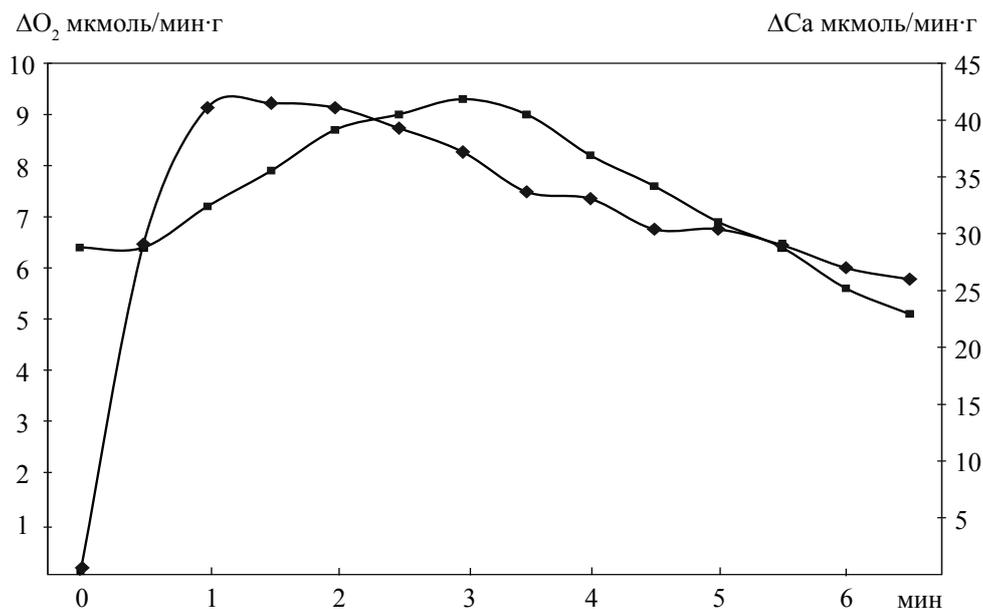


Рис. 1. Соотношение интенсивностей поглощения ионов Ca и поглощения сердцем кислорода при снижении внеклеточной концентрации натрия: \blacklozenge — динамика поглощения изолированным сердцем ионов кальция при замене хлорида натрия (140 ммоль/л) на хлорид аммония (140 ммоль/л); \blacksquare — динамика интенсивности поглощения изолированным сердцем кислорода при замене хлорида натрия (140 ммоль/л) на хлорид аммония (140 ммоль/л)

1,5 минуты после прекращения процесса аккумуляции ионов Ca^{2+} миокардом (рис. 2).

По-видимому, несмотря на снижение скорости потока кальция в кардиомиоциты, митохондрии продолжали испытывать продолжительную стимуляцию, приводящую к усилению их дыхательной активности.

Причиной этого могут быть два процесса — ресинтез АТФ из АДФ, концентрация которого продолжает оставаться некоторое время после гидролиза АТФ актомиозиновым комплексом, либо в результате активации дыхания обусловленной аккумуляцией митохондриями ионов кальция, поступившего в кардиомиоциты в избыточном количестве.

С целью решения этого вопроса, следующие эксперименты проводили в условиях ингибирования Ca-транспортной системы митохондрий. Известно, что таким селективным свойством обладает рутениевый красный.

Проведенные исследования показали, в присутствии рутениевого красного максимум активности поглощения сердцем кислорода полностью совпал с максимумом аккумуляции Ca^{2+} , вызванным Na^+ - Ca^{2+} обменом.

Из этого наблюдения следует, что активация Na^+ - Ca^{2+} обмена, сопровождающаяся интенсивным поступлением Ca^{2+} внутрь клеток миокарда влияет не только на миофибриллярный аппарат сердечной мышца, а также и на способность митохондрий поглощать избыток ионов кальция. В этих опытах

проявляется четкая взаимосвязь между механизмом обмена кальция на натрий и способностью митохондрий поддерживать оптимальный уровень кальция внутри кардиомиоцитов.

О такой зависимости предполагалось в ряде научных исследований. Иницирующим фактором активации Na^+ - Ca^{2+} обмена при острой коронарной недостаточности, по-видимому, является ацидоз. Показано, что накопление внеклеточного H^+ регистрируется уже спустя 5—15 секунд с момента окклюзии коронарной артерии у собак [5].

Увеличение концентрации водородных ионов внутри клеток активирует его обмен на внеклеточный натрий — Na^+ - H^+ обмен [6]. При этом выход протонов из ишемизированных клеток сопровождается снижением концентрации натрия во внеклеточной среде [7], а также возрастанием активной концентрации Na^+ внутри кардиомиоцитов [8].

Таким образом, снижение трансмембранного градиента натрия при ишемии в кардиомиоцитах обусловлено активированием Na^+ - H^+ обмена.

В ответ на быстрое изменение трансмембранного градиента натрия активируется другой ионообменный процесс Na^+ - Ca^{2+} обмен. Эта система реагирует на повышение или снижение концентрации натрия снаружи или внутри клеток. В нормальных условиях, данная система осуществляет контроль за концентрацией Ca^{2+} внутри клеток [9].

Однако в условиях неконтролируемого падения трансмембранного градиента натрия создаются

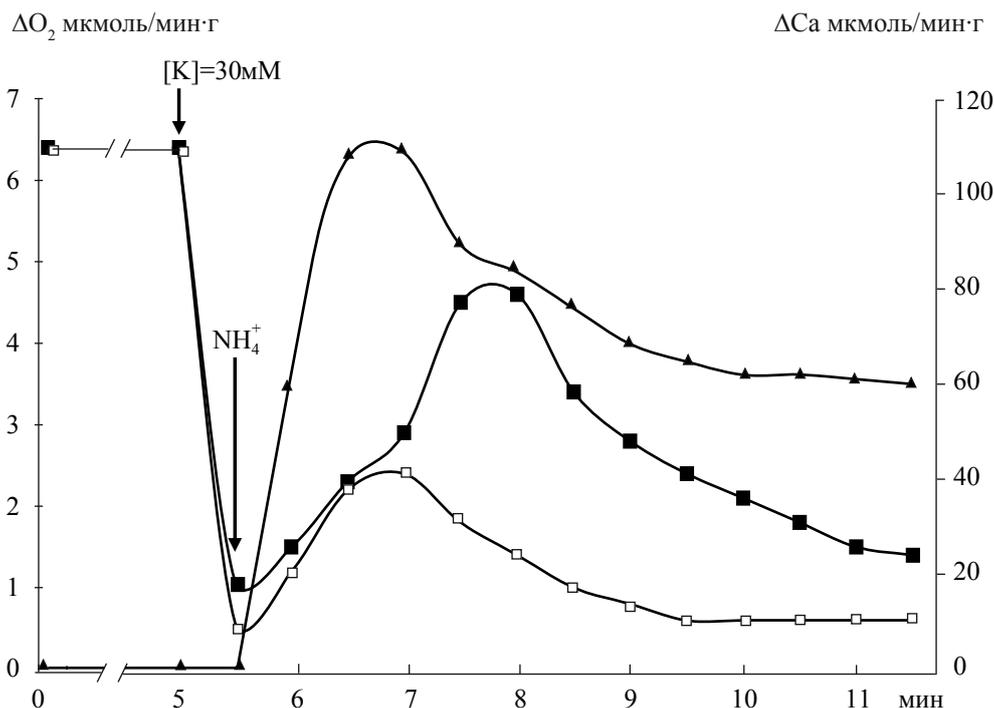


Рис. 2. Влияние ингибитора транспорта кальция в митохондриях (рутениевого красного 0.002 мМ) на соотношение интенсивностей поглощения ионов Ca и поглощения сердцем кислорода при снижении внеклеточной концентрации натрия (заменой на NH_4Cl) в условиях ингибирования сокращений сердца высокой внеклеточной концентрацией калия (30 мМ): ▲ — динамика поглощения изолированным сердцем ионов кальция при замене хлорида натрия (140 ммоль/л) на хлорид аммония (140 ммоль/л); ■ — динамика интенсивности поглощения изолированным сердцем кислорода при замене хлорида натрия (140 ммоль/л) на хлорид аммония (140 ммоль/л); □ — влияние рутениевого красного на динамику интенсивности поглощения изолированным сердцем кислорода при замене хлорида натрия (140 ммоль/л) на хлорид аммония (140 ммоль/л)

условия для избыточной аккумуляции сердечной мышцей ионов кальция. Важно отметить, что в условиях снижения градиента натрия и активирования процесса Na^+-Ca^{2+} обмена резко снижается поступление Ca^{2+} через медленные Ca-каналы [10]. Следовательно, роль Na^+-Ca^{2+} обменной системы в неконтролируемом накоплении Ca^{2+} в сердце становится более значимой в условиях ишемии.

Как показывают полученные нами данные избыточное поступление ионов кальция, вследствие резкого изменения трансмембранного градиента натрия, сопровождается поглощением Ca^{2+} митохондриями. Хорошо известно, что во время поглощения кальция митохондриями происходит значительное снижение потенциала на их внутренней мембране. Это стимулирует перенос электронов по дыхательной цепи и расходование кислорода. [11].

Совершенно очевидно, что такая реакция энергетического состояния кардиомиоцитов в условиях нарастающего дефицита кислорода в зоне ишемии является усугубляющим фактором для миокарда в целом. Это может усугублять кислородный дефи-

цит и ускорять развитие некротических изменений в сердечной мышце.

Следует отметить, что в ряде работ отмечается неоднородность нарушений метаболизма в толще миокарда при ишемии вызванная гетерогенностью распределения Ca [12].

В свою очередь, гетерогенность энергетического метаболизма может являться основой быстро нарастающей электрофизиологической неоднородности сердечной мышцы. Зачастую такие нарушения приводят к изменению фронта проведения электрического возбуждения по миокарду и возникновению опасных для жизни нарушений ритма сердца. Косвенным подтверждением этого предположения являются факты об антиаритмической способности ингибиторов Na^+-H^+ и Na^+-Ca^{2+} обменных систем [13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Murphy E.* Steenberg Clon transport and energetics during cell death and protection / E. Murphy // *Physiology* (Bethesda). — 2008. — Apr; V.23. — P. 115—123.
2. *Nguyen M. H.* Effect of Ca^{2+} on cardiac mitochondrial energy production is modulated by Na^+ and H^+ dynam-

ics / M.H. Nguyen, S.J. Dudycha, M.S. Jafri // *Am J Physiol Cell Physiol.* — 2007. — V.292, №6. — P. 2004—2020.

3. *Nishiki K.* Energy relationships between cytosolic metabolism and mitochondrial respiration in rat heart / K. Nishiki, M. Erecinska, D.F. Wilson // *Amer. J. Physiol.* — 1978. — V. 234, №3. — P. 73—81.

4. *Michal M.* Improved Neonatal Heart Preservation with an Intracellular Cardioplegia and Storage Solution / M. Michal, A. Breda, D. C. Drinkwater // *J. of surgical research.* — 1989. — V. 47. — P.212—219.

5. *Abike V.* Attenuation of myocardial metabolic and pH responses to coronary ligation by beta-adrenergic blocking agents / V. Abike, K. Ichihara, K. Sakai // *J. Mol. Cell Cardiol.* — 1979. — V.11, Suppl. №3. — P. 24.

6. *Poole-Wilson P. A.* Regulation of intracellular pH in the myocardium; relevance to pathology / P.A. Poole-Wilson // *Mol. Cell Biochem.* 1989. — Sep.7. — V.89, №2. — P. 151—155.

7. О фазных изменениях pH и рNa миокарда при остром нарушении коронарного кровообращения / А. Н. Онищенко [и др] // *Биофизика.* — 1966. — Т.11, № 5. — С. 855—860.

8. Measurements of myocardial extracellular Na,K,Ca and H using ion-selective electrodes during ischemia /

H. Hirche [et al] // *Progr. Enzyme and Ion-Selective Electrodes*, Berlin e.a. 1981. — P.164—170.

9. *Reuter H.* Na⁺-Ca²⁺-exchange in the regulation of cardiac excitation-contraction coupling / H. Reuter, C. Pott, I. Joshua // *Cardiovascular Research.* — 2005. — V. 67, № 2. — P.198—207;

10. *Meme W.* Low sodium inotropy is accompanied by diastolic Ca²⁺ gain and systolic loss in isolated guinea-pig ventricular myocytes / W. Meme, S. O'Neill, D. Eisner // *J. Physiol.* — 2001. — Feb1. — V.530(Pt 3). — P.487—495.

11. *Nguyen M. H.* Effect of Ca²⁺ on cardiac mitochondrial energy production is modulated by Na⁺ and H⁺ dynamics / M. H. Nguyen, S. J. Dudycha, M. S. Jafri // *Am. J Physiol Cell Physiol.* — 2007. — Jun. — V.292, № 6. — P. 2004—2020.

12. Intracellular Calcium and Vulnerability to Fibrillation and Defibrillation in Langendorff-Perfused Rabbit Ventricles / H. Gyo-Seung [et al]. // *Circulation.* — 2006. — V. 114. — P.2595—2603.

13. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger: involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchange system in cardiac triggered activity / N. Homma [et al] // *J Pharmacol Sci.* — 2006. — Sep. — V. 102, №.1. — P. 17—21.

Алабовский В. В. — заведующий кафедрой биохимии Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко; тел.: (4732) 530375

Винокуров А. А. — ассистент кафедры биохимии Воронежской государственной медицинской академии; тел.: (4732) 530338

Маслов О. В. — аспирант кафедры биохимии Воронежской государственной медицинской академии; тел.: (4732) 530338, e-mail: maslov1205@mail.ru

Alabovsky V. V. — Head of Department of Biochemistry, Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy; tel.: (4732) 530375

Vinokurov A. A. — Assistant of Department of Biochemistry, Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy; tel.: (4732) 530375

Maslov O. V. — Post graduate student of Department of Biochemistry, Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy; tel.: (4732) 530375, e-mail: maslov1205@mail.ru