

Л.Е. Панин, А.Р. Колпаков, В.Ф. Максимов

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ И АДРЕНАЛИНА НА РАБОТОСПОСОБНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫС

ГУ НИИ биохимии СО РАМН, Новосибирск

Изучено влияние липопротеинов плазмы крови совместно с адреналином на функциональные показатели перфузируемого по Лангендорфу изолированного сердца крыс. Установлено, что в физиологических концентрациях ЛПОНП и ЛПВП повышали работоспособность сердца, ЛПНП снижали амплитуду сердечных сокращений. Первоначально стимулирующее действие адреналина в условиях рециркуляции перфузионного раствора сменялось угнетающим действием на сердце. Плазменные ЛП всех классов при совместной перфузии с адреналином значительно повышали и частоту, и амплитуду сокращений сердца. Совместное действие адреналина и ЛП на протяжении всего срока наблюдения (30 мин) не приводило к снижению работоспособности миокарда. ЛП всех классов уменьшали потребление кислорода на единицу выполненной условной работы изолированного сердца, существенно повышали устойчивость сердца к гипоксии.

Ключевые слова: изолированное сердце крыс, адреналин, липопротеины плазмы

Важная роль плазменных липопротеинов (ЛП) в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний общепризнана. Атерогенные свойства липопротеинов очень низкой (ЛПОНП) и низкой (ЛПНП) плотностей, антиатерогенное действие липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) имеют сложную природу, затрагивают все слои сосудистой стенки, и именно на них сегодня направлено основное внимание кардиологов. Изменения в кардиомиоцитах, наблюдаемые при ишемической болезни сердца и гипертонии, принято рассматривать как вторичные.

Сообщений о непосредственном влиянии ЛП на функцию миокарда крайне мало, и эти исследования проводятся с использованием не гомологичных, а ксено-ЛП [14, 15]. В работе S. Mochizuki и соавт. [14] представлены данные о способности нативных ЛПВП, выделенных из плазмы крови человека, в отличие от ЛПНП, предотвращать аритмии, возникающие при реперфузии изолированного сердца крыс после ишемии. G.I. Harrison и соавт. [15] обнаружили угнетающий эффект ЛПНП человека на работу изолированного сердца крыс, причем у окисленных ЛП это действие было более выражено. Нам не встретились работы о влиянии ЛПОНП на миокард, хотя хорошо известно, что ткани миокарда могут поглощать ЛП всех классов [6].

В НИИ биохимии СО РАМН в течение многих лет проводятся исследования регуляторной роли сывороточных липо- и аполипопротеинов (апоЛП). Полученные данные раскрывают широ-

кий спектр свойств, присущих ЛП и их белковым компонентам. Установлена роль ЛП крови в регуляции стероидогенеза в надпочечниках [4], описан механизм участия ЛПВП, стероидных гормонов и их комплексов в регуляции биосинтеза белка и ДНК в гепатоцитах и клетках печеночного синусоида [5]. Дальнейшие исследования показали, что механизм действия сывороточных ЛП и апоЛП часто связан с их кооперативным влиянием на клетки вместе с гормонами стресса [8].

Это позволило предположить, что участие ЛП в поддержании (или нарушении) функций сердечно-сосудистой системы может проявляться в их прямом и совместном с гормонами стресса воздействии на миокард.

Целью данной работы стало изучение влияния ЛП плазмы крови в комплексе с адреналином на работоспособность изолированного сердца крыс.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на крысах-самцах Вистар массой 250-300 г в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755). За час до опыта животным внутривенно вводили гепарин (500 ЕД на крысу). После декапитации, проводимой под гексеналовым наркозом (40 мг/кг внутривенно), сердце быстро извлекали и канюлировали аорту.

Перфузию по Лангендорфу проводили модифицированным буфером Кребса-Хензеляйта [1] под давлением 60 мм ртутного столба при насы-

щении газовой смесью 95% O₂ и 5% CO₂, температуре раствора 37,5 °С и постоянном контроле рН (7,4). При необходимости рН корректировали растворами NaHCO₃ или HCl. Объем перфузируемой жидкости в режиме рециркуляции не превышал 50 мл. Регистрацию сокращений сердца проводили по методике [2]. К верхушке сердца прикреплялся крючок из платиновой проволоки, который шелковой нитью через систему блоков соединялся с устройством, преобразующим механические колебания в электрические сигналы и имеющим линейные характеристики. Запись проводилась быстродействующим самописцем Н3021-1. Амплитуда сокращений оценивалась по величине перемещения писчика самописца (в мм). Высокая скорость движения ленты самописца позволяла точно определить число сокращений в минуту. Параметры усиления прибора устанавливались в начале эксперимента и в дальнейшем уже не изменялись. Общую работоспособность сердца оценивали в условных единицах как произведение амплитуды на частоту, его величину после отмывки принимали за 100%. По смещению записи сокращений относительно нулевой линии судили об изменении тонуса и о степени расслабления сердца.

Объемная скорость коронарного потока определялась объемом оттекающей от сердца жидкости (мл/мин). В условиях наших исследований эта величина составляла 8-10 мл/мин в конце отмывки и принималась за 100%. Концентрацию кислорода в поступающем к сердцу растворе и в оттекающем от него измеряли с помощью электрода Кларка [7]. По разнице содержания O₂ с учетом объемной скорости коронарного потока судили о потреблении кислорода тканью сердца.

Выделенное сердце не менее 10 минут отмывалось от крови в режиме проточной перфузии до установления постоянных показателей амплитуды и частоты сокращений (эти величины принимались в дальнейших расчетах за 100%, t₀). Затем в раствор добавляли изучаемый компонент, и сердце работало в течение 30 мин уже в режиме рециркуляции перфузионного раствора. Контролем служили опыты с перфузией сердца раствором Кребса-Хензелята в режиме рециркуляции.

Препаративное выделение липопротеинов из плазмы крови крыс осуществляли методом изоплотностного центрифугирования в растворе KBr [13]. Выделяли следующие классы ЛП: ЛПОНП (d=0,95-1,006 г/см³), ЛПНП (d=1,006-1,063 г/см³), ЛПВП₂ и ЛПВП₃ (d=1,063-1,21 г/см³). Ультрацентрифугирование проводили в роторе 75 Ti на ультрацентрифуге L80 («Beckman», США) в течение 18-24 ч при 8 °С и ускорении 105000 g. Полученные ЛП диализовали при 4 °С в течение 24 ч против 0,15М раствора NaCl. Последний диализ проводили против раствора для перфузии, не содержащего глюкозы.

Делипидирование липопротеинов проводили охлажденной смесью эфир-этанол (1:1) и последующей многократной отмывкой эфиром.

Концентрации выделенных ЛП определяли методом малоуглового рентгеновского рассеяния [12], перед экспериментом их добавляли в перфузат до концентрации, соответствующей среднему содержанию ЛП в плазме самцов крыс Вистар: ЛПОНП — 66 мг%, ЛПНП — 16 мг%, ЛПВП — 246 мг% [10]. При таких концентрациях ЛП вспенивания перфузата не наблюдалось.

В экспериментах использовался стандартный 0,1% раствор адреналина гидрохлорида (конечная концентрация 1 мг/л). Статистическую обработку проводили с использованием t критерия Стьюдента для p<0,05.

Результаты и их обсуждение

В контроле показатели работоспособности сердца через 10 и 30 минут рециркуляции перфузионного раствора не отличались от исходных и между собой. Величина коронарного потока к 30-й минуте имела тенденцию к снижению. В *таблице 1* приведены данные, показывающие влияние различных классов ЛП на работоспособность изолированного сердца крыс. Частота сердечных сокращений в первые 10 мин перфузии в присутствии ЛПОНП несколько снижалась, однако это практически не отражалось на общей работоспособности сердца, т.к. одновременно увеличивалась амплитуда сердечных сокращений. К 30-й минуте перфузии частота сокращений не отличалась от исходной, а амплитуда была значительно выше. Увеличение работоспособности происходило на фоне снижения скорости коронарного потока.

ЛПНП в первые минуты перфузии несколько увеличивали, а затем существенно снижали амплитуду сердечных сокращений, и к концу эксперимента достоверно снижалась общая работоспособность сердца и одновременно уменьшалась скорость коронарного потока (*Таблица 1*).

ЛПВП оказывали стимулирующее влияние на сердце в течение всего времени эксперимента. Обращает внимание, что величина коронарного потока практически не изменялась. Таким образом, можно говорить о благоприятном действии ЛПОНП, ЛПВП на работоспособность сердца и о негативном — ЛПНП.

Влияние адреналина и адреналина совместно с липопротеинами на работоспособность изолированного сердца крыс

Вначале были проведены исследования с одним адреналином, т.к. метаболическая активность

гормона и его разрушение при прохождении через миокард могли повлиять на реакцию сердца.

В таблице 2 представлены результаты, показывающие, что через 15 мин перфузии адреналином показатель работоспособности сердца почти в 2,5 раза превышал исходный (в конце периода отмывания), в значительной степени за счет увеличения частоты сердечных сокращений, что характерно для адреналина. Величина коронарного потока также возрастала, хотя и не так заметно. Если выполняемую условную работу сердца отнести к величине коронарного потока, то видно, что данное соотношение возрастало в динамике при перфузии гормона. Все это происходило на фоне повышенного потребления кислорода.

К 30-й минуте перфузии с адреналином частота сокращений сердца продолжала оставаться высокой, но за счет отчетливо наблюдаемого повышения тонуса миокарда уменьшалась диастола, снижалась амплитуда сердечных сокращений (до 60% от исходной) и, как следствие, общая работоспособность сердца. Снижался и показатель работа/коронарный поток, определяющий удель-

ную работоспособность сердца. Потребление кислорода по-прежнему оставалось высоким.

Таким образом, при рециркуляторной перфузии изолированного сердца проявилось двухфазное действие адреналина на орган. Если сравнить результаты 30 мин перфузии без адреналина (Таблица 1) с аналогичными результатами, полученными в присутствии гормона, становится видно, что одинаковые показатели общей работоспособности сердца обеспечивались в последнем случае высокой частотой сердечных сокращений. Это не является рациональным с позиции энергетики миокарда. Возможным объяснением повышения тонуса сердца при длительном поступлении адреналина является способность катехоламинов усиливать гликолиз и гликогенолиз. Гликолиз ограничивает скорость поглощения Ca^{2+} эндоплазматическим ретикуломом, а значит, и скорость расслабления сердечной мышцы [3].

Нативные сывороточные ЛП всех классов при совместной перфузии с адреналином значительно повышали и частоту, и амплитуду сокращений сердца. В первые 15 минут изменения работоспо-

Таблица 1

**Влияние различных классов плазменных липопротеинов
на функциональные показатели изолированного сердца крыс ($M \pm m$)**

| Добавки в перфузат | Длительность перфузии | Частота (Ч) | Амплитуда (А) | Работоспособность (Ч × А) | Коронарный поток | Работоспособность / коронарный поток |
|--------------------|-----------------------|-------------|---------------|---------------------------|------------------|--------------------------------------|
| Контроль | 10 мин | 102±2,3 | 114±3,6 | 117±10,8 | — | — |
| | 30 мин | 94±7,2 | 106±4,2 | 95±11,5 | 83±6,2 | 1,1 |
| ЛПОНП | 10 мин | 88*±3,6 | 109±13,2 | 94 ±14,6 | — | — |
| | 30 мин | 104±3,5 | 163*±20,2 | 168*±15,2 | 74±1,5 | 2,3 |
| ЛПНП | 10 мин | 89±12,5 | 107±5,4 | 95±11,9 | — | — |
| | 30 мин | 94±10,5 | 76±18,8 | 69*±11,2 | 65±11,4 | 1,1 |
| ЛПВП | 10 мин | 142*±8,2 | 145*±7,4 | 225*±26,6 | — | — |
| | 30 мин | 185*±25,0 | 162*±39,6 | 285*±39,6 | 97±16,5 | 2,9 |

Примечание. * — статистически значимые различия с контролем при $p < 0,05$. Показатели (за исключением отношения работоспособность / коронарный поток) даны в процентах (%) по отношению к исходным (t_0)

Таблица 2

**Изменения функциональных показателей изолированного сердца крыс при добавлении в перфузат
адреналина и различных классов липопротеинов ($M \pm m$)**

| Добавки в перфузат | Длительность перфузии | Частота (Ч) | Амплитуда (А) | Работоспособность (Ч × А) | Коронарный поток | Работоспособность / коронарный поток | Потребление кислорода |
|--------------------|-----------------------|-------------|---------------|---------------------------|------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Адреналин | 15 мин | 174±18,3 | 124±31,2 | 233±47,7 | 124±29,8 | 1,6±0,39 | 140±8,7 |
| | 30 мин | 164±8,7 | 61±26,7 | 96±38,2 | 112±27,7 | 0,8±0,15 | 155±16,3 |
| Адреналин и ЛПОНП | 15 мин | 189±45,6 | 181±15,5 | 414*±74,5 | 90±4,5 | 4,7*±1,0 | 140±15,0 |
| | 30 мин | 192±45,8 | 182*±17,4 | 424*±54,5 | 94±18,5 | 4,8*±1,61 | 188±2,0 |
| Адреналин и ЛПНП | 15 мин | 168±42,4 | 173±35,6 | 324±48,0 | 108±4,0 | 3,1*±0,41 | 184±23,0 |
| | 30 мин | 149±22,6 | 162*±38,3 | 273*±19,2 | 107±3,9 | 2,5*±0,08 | 114±20,5 |
| Адреналин и ЛПВП | 15 мин | 147±33,9 | 230*±48,4 | 339*±52,7 | 103±3,8 | 3,4*±0,21 | 125±15,2 |
| | 30 мин | 149±24,7 | 251*±16,1 | 367*±41,1 | 114±4,4 | 3,2*±0,15 | 142±23,1 |

Примечание. * — статистически значимые различия с адреналином при $p < 0,05$. Показатели (за исключением отношения работоспособность / коронарный поток) даны в % по отношению к исходным (t_0)

способности сердца напоминали «адреналиновые», но превосходили их по интенсивности. При неизменном или даже несколько сниженном коронарном потоке резко возрастало отношение условная работа / коронарный поток. В отличие от одного адреналина, совместное действие его с ЛП на протяжении всего срока наблюдения не приводило к снижению работоспособности миокарда, показатели на 15-й и 30-й минутах перфузии мало различались между собой.

Влияние адреналина и плазменных липопротеинов на потребление кислорода изолированным сердцем

В ходе экспериментов полярографически определялось содержание кислорода в притекающем и оттекающем от сердца растворе. Разница концентраций O_2 с учетом скорости коронарного потока позволила более объективно судить об изменениях в потреблении кислорода сердцем.

В *таблице 2* приведены данные об относительном (по сравнению с исходным фоном) изменении потребления кислорода сердцем. Адреналин один и в сочетании с ЛП повышал потребление O_2 миокардом. Обращает внимание, что через 30 мин. перфузии с адреналином значительное увеличение потребления кислорода (154,7%) происходило на фоне уменьшения амплитуды сокращений (60,7%) и относительно невысокой работоспособности (95,7%), в то время как рост потребления O_2 при совместной перфузии адреналина с ЛП всегда совпадал с более значительным увеличением сократительной способности миокарда. Это говорит об увеличении производимой сердцем работы в присутствии ЛП на условную единицу поглощенного кислорода (повышении коэффициента полезного использования кислорода).

Кардиотоксическое действие катехоламинов, по мнению некоторых исследователей, обусловлено увеличением образования свободных радикалов [16]. Одним из объяснений кардиопротекторного эффекта ЛП, установленного в наших исследованиях, может быть присущая ЛП способность связывать свободные радикалы [9, 11].

Влияние нативных ЛП на работу изолированного сердца крыс в условиях гипоксии

Обнаружение снижения потребления кислорода на условную единицу выполненной работы послужило поводом для изучения влияния ЛП на устойчивость миокарда к гипоксии. Эксперименты проведены при замене карбогена в перфузионном растворе на воздух. В связи с уменьшением буферной емкости перфузата в ходе эксперимента периодически проводилась коррекция pH раствором $NaHCO_3$. В контроле гипоксия быстро при-

водила к угнетению работы сердца. Через 5 мин амплитуда сокращений составляла $43,3 \pm 0,5\%$ от исходной, частота — $82,5 \pm 1,8\%$. К 10 мин гипоксии амплитуда снижалась почти до нуля, и замена воздуха на карбоген уже не восстанавливала работу сердца. При перфузии сердца со всеми классами ЛП крови к 5 мин гипоксии амплитуда сокращений снижалась на $21 \pm 3,4\%$, частота уменьшалась, как и в контроле, и составляла $81 \pm 2,3\%$. Через 10 мин перфузии с ЛП амплитуда составляла 60% от исходной, частота сокращений на фоне ЛПОНП — 75%, а на фоне ЛПНП и ЛПВП — 56% от исходных показателей. Переход на раствор, насыщенный O_2 , восстанавливал функциональные показатели работы сердца. Эти эксперименты позволяют говорить о защитном действии нативных ЛП на сердце в условиях гипоксии.

Таким образом, проведенные исследования обнаружили различное влияние ЛП плазмы крови на функциональные показатели изолированного сердца. ЛПВП оказывали выраженное стимулирующее действие на орган, при этом скорость коронарного потока оставалась неизменной. Это говорит о прямом влиянии ЛПВП на кардиомиоциты сокращающегося сердца, не зависящем от состояния сосудистой системы. ЛПОНП повышали работоспособность сердца главным образом за счет увеличения амплитуды сердечных сокращений, при этом отмечалась тенденция к снижению скорости коронарного потока. ЛПНП значительно снижали амплитуду сердечных сокращений и работоспособность сердца. Это происходило на фоне достоверного снижения скорости коронарного потока, что указывает на важную роль сосудистого компонента в механизме отрицательного действия ЛПНП на сердце.

Гормон стресса — адреналин оказывал двухфазное действие на изолированное сердце: усиливал работоспособность в первые 15 мин и приводил к ее снижению к 30 мин перфузии. Потребление O_2 сердцем все это время оставалось повышенным. Это говорит о том, что в механизме снижения работоспособности (особенно амплитуды сердечных сокращений) важную роль играет не подавление окислительных процессов, а повышение тонуса мышечных волокон с тенденцией к развитию контрактурных изменений.

Липопротеины всех классов снимали отрицательное действие адреналина на работу сердца, а ЛПОНП и ЛПВП даже потенцировали его стимулирующий эффект. Однако ЛПНП в динамике перфузии снижали скорость коронарного потока и потребление O_2 . Протекторная роль ЛП наглядно проявилась в условиях гипоксии.

INFLUENCE OF PLASMA LIPOPROTEINS AND ADRENALINE ON WORKING CAPACITY OF ISOLATED RAT HEART

L.E. Panin, A.R. Kolpakov, V.F. Maksimov

The purpose of the work was to study the influence of rat plasma lipoproteins in combination with adrenaline on working capacity of isolated heart of Wistar rats. The hearts were perfused by Langendorf method with recirculation of Krebs-Henseleit solution for 30 min, the physiological concentrations of lipoproteins were used. VLDL and HDL increased the heart working capacity. LDL reduced the amplitude of heart beats. In the conditions of the recirculation of the perfusion solution adrenaline caused the double-phase effect on heart work capacity: the initial stimulation reversed. All LP classes in combination with adrenaline induced the cardiotonic effect, the decrease of working capacity over the time of experiment didn't observed. Lipoproteins diminished the oxygen consumption by myocardium and increased the heart resistance to hypoxia.

Литература

1. Алюхин Ю.С. Энергетика сердца и температурная адаптация организма / Ю.С.Алюхин // Физиол. ж. СССР. — 1975. — № 16 (5). — С. 749-757.
2. Коган А.Б. Техника физиологического эксперимента. /А.Б. Коган, С.И. Щитов. — М. — 1967. — С. 331-360.
3. Опи Л.Х. Обмен веществ и энергии в миокарде // Физиология и патофизиология сердца / Под ред. Н. Сперелакиса. Пер. с англ. — М., 1990. — Т. 2. — С. 7-63.
4. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. / Л.Е. Панин. — Новосибирск, 1983. — 234 с.
5. Панин Л.Е. Роль аполипопротеина А-I, стероидных гормонов и их комплексов в регуляции биосинтеза белка и ДНК в лимфоцитах селезенки / Л.Е. Панин, Е.Ю. Клейменова // Иммунология. — 2002. — № 4. — С. 206-208.
6. Поляков Л.М. Поглощение липопротеидов плазмы крови стероидпродуцирующими органами у крыс / Л.М. Поляков, Л.Е. Панин // Пробл. эндокринол. — 1985. — Т. 31. — № 4. — С. 72-75.
7. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. — М., 1973. — 224 с.
8. Ahotupa M. Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins / M. Ahotupa, M. Ruutu, E. Mantyla // Clin. Biochem. — 1996. — Vol. 29. — № 2. — P. 139-144.
9. Chapman M.J. Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects / M.J. Chapman // J. Lipid Res. — 1980. — Vol. 21. — P. 789-853.
10. Low-density lipoproteins inhibit histamine and NaNO_2 relaxations of the coronary vasculature and reduce contractile function in isolated rat hearts / G.J. Harrison, L.R. Jordan, M.L. Selley, R.J. Willis // Heart and Vessels. — 1995. — № 10. — P. 249-257.
11. Havel R.J. The distribution and composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. / R.J. Havel, H.H. Eder, J.N. Bragdan // J. Clin. Invest. — 1955. — Vol. 34. — № 7. — P. 1345-1353.
12. Cloning and characterization of HB2, a candidate high density lipoprotein receptor. Sequence homology with members of the immunoglobulin superfamily of membrane proteins / A. Matsumoto, A. Mitchell, H. Kurata et al. // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272. — № 27. — P. 16778-16782.
13. Ischemia-reperfusion arrhythmias and lipids: effect of human high- and low-density lipoproteins on reperfusion arrhythmias / S. Mochizuki, M. Okumura, F. Tanaka et al. // Cardiovasc. Drugs Ther. — 1991. — Mar 5. — Suppl. 2. — P. 269-276.
14. Noronha-Dutra A.A. An antioxidant role for calcium antagonists in the prevention of adrenaline mediated myocardial and endothelial damage / A.A. Noronha-Dutra, E.M. Steen-Dutra, N. Woolf // Br. Heart J. — 1991. — Vol. 65. — № 6. — P. 322-325.
15. Activation of nuclear DNA expression in hepatocytes by glucocorticoids and high density lipoproteins. / L.E. Panin, V.F. Maksimow, I.F. Usynin et al. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 2002. — Vol. 81. — P. 69-76.
16. General model to describe the structure and dynamic balance between different human serum lipoproteins and its practical application / F.V. Tuzikov, N.A. Tuzikova, R.V. Galimov, L.E. Panin // Med. Sci. Monit. — 2002. — Vol. 8. — № 6. — P. 79-88.