

А.С. Семенцов, А.В. Крылатов

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА КАК ТРИГГЕРЫ ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА РАННЕГО ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ МИОКАРДА КРЫСЫ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии», Томск, Россия

Исследовали роль активных форм кислорода в сигнальном механизме раннего гипоксического preconditionирования (рГП) *in vivo*. Установили, что предварительное введение неселективного антиоксиданта непрямого действия N-(2-меркаптопропионил)-глицина и «ловушки» гидроксильных радикалов 1,3-диметилтиомочевина полностью устраняло инфаркт-лимитирующий эффект адаптации. Введение антиоксидантов темпол и тролокс, а также применение N-(2-меркаптопропионил)-глицина после рГП не оказывало влияния на защитный эффект адаптации.

Ключевые слова: активные формы кислорода, preconditionирование, гипоксия, ишемия, сердце

REACTIVE OXYGEN SPECIES AS A TRIGGER OF THE INFARCT-LIMITING EFFECTS OF EARLY HYPOXIC PRECONDITIONING RAT MYOCARDIUM

A.S. Sementsov, A.V. Krylatov

Research Institute for Cardiology, Tomsk, Russia

It is believed that reactive oxygen species (ROS) are involved in the performance of this adaptive hepatoprotective effect phenomenon. However, the role of ROS in the signaling mechanism of the early hypoxic preconditioning (early HP) and the contribution of individual types of oxygen radicals in the infarct-limiting effect of early HP remains uncertain to the end. Objective was to investigate the role of various types of reactive oxygen species in the signaling mechanism of the infarct-limiting effect of early hypoxic preconditioning. We investigated the role of reactive oxygen species in the signaling mechanism of early HP *in vivo*. Adaptation of animals was conducted with 6 transient hypoxia-reoxygenation sessions before prolonged ischemia (45 min) and reperfusion (120 min). Low molecular weight antioxidants were administered 15 minutes prior to the HP. We found out that pretreatment with the nonselective antioxidant indirect action of N-(2-mercapto-propionyl)-glycine and "trap" of hydroxyl radicals 1,3-dimethylthiourea completely eliminated the infarct-limiting effect of adaptation. Administration of antioxidants tempol and trolox, as well as the use of N-(2-mercapto-propionyl)-glycine after HP had no effect on the protective effect of adaptation. Consequently, reactive oxygen species, including hydroxyl radical, operate as the trigger function in the signaling mechanism of early HP.

Key words: reactive oxygen species, preconditioning, hypoxia, ischemia, heart

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из основных причин смертности населения развитых стран, поэтому разработка методов борьбы с ишемическими и реперфузионными повреждениями миокарда является важнейшей задачей современной физиологии и медицины. Раннее гипоксическое preconditionирование (рГП) позволяет уменьшить размер зоны некроза миокарда при ишемии-реперфузии у крыс. Предполагают, что активные формы кислорода (АФК) участвуют в реализации кардиопротекторного эффекта этого адаптивного феномена [2, 5, 6]. Однако роль АФК в сигнальном механизме рГП и вклад отдельных типов кислородных радикалов в инфаркт-лимитирующий эффект рГП остаются до конца неопределенными.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследование роли различных видов активных форм кислорода в сигнальном механизме инфаркт-лимитирующего эффекта раннего гипоксического preconditionирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 300–350 г. Все

болезненные процедуры осуществляли на наркотизированных животных, согласно рекомендациям о гуманном отношении к лабораторным животным, изложенным в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказами МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных».

Раннее ГП моделировали, используя оригинальный протокол, включающий 6 сеансов гипоксии (10 мин; 8%-й O_2), разделенных сеансами реоксигенации (10 мин; 21%-й O_2). Коронароокклюзию осуществляли путем наложения лигатуры на левую нисходящую коронарную артерию на 45 мин, реперфузию – ослаблением лигатуры на 120 мин. Из экспериментальных животных сформировали следующие группы: контроль (3 группы; $n = 14$) – неадаптированные крысы; группы рГП (3 группы; $n = 12$) – адаптированные животные. Подопытные группы включали крыс, которым за 15 мин перед рГП вводили низкомолекулярные водо- и жирорастворимые препараты-антиоксиданты: 1) 2-меркаптопропионилглицин (2-МПГ) в дозе 20 мг/кг ($n = 15$); 2) тролокс в дозе 2,5 мг/кг ($n = 12$); темпол в дозе

30 мг/кг ($n = 15$); диметилтиомочевину (DMTU) в дозе 300 мг/кг ($n = 12$). Одной группе подопытных 2-МПП в дозе 20 мг/кг вводили через 30 мин после рГП ($n = 14$). Все препараты вводили внутривенно, за исключением DMTU, который вводили подкожно. После ишемии-реперфузии определяли размеры зоны некроза миокарда. С этой целью готовили поперечные срезы левого желудочка сердца, которые окрашивали 5%-м раствором перманганата калия (струйно, ретроградно через аорту) и 1%-м раствором 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (инкубация в течение 30 мин при 37 °С). Инфаркт-лимитирующий эффект оценивали по соотношению размеров зоны некроза к области риска, используя компьютеризированный планиметрический метод.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что при моделировании коронаро-окклюзии (45 мин) и реперфузии (120 мин), адаптация животных с помощью рГП уменьшала зону некроза миокарда на 34 %, по сравнению с контролем. Введение за 15 мин до рГП антиоксиданта непрямого действия N-(2-меркаптопропионил)-глицина (2-МПП; 20 мг/кг) [7] полностью устраняло инфаркт-лимитирующий эффект preconditionирования (рис. 1).

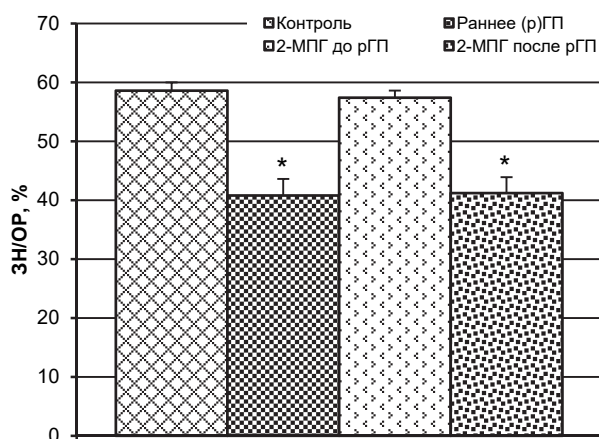


Рис. 1. Влияние антиоксиданта непрямого действия 2-МППГ на инфаркт-лимитирующий эффект раннего гипоксического preconditionирования: ЗН/ОР – отношение зоны некроза к области риска; контроль ($n = 14$) – ишемия и реперфузия (ИР); раннее ГП ($n = 12$) – гипоксическое preconditionирование + ИР; 2-МППГ ($n = 14$) до ГП – 2-меркаптопропионилглицин (20 мг/кг) за 15 мин до ГП + ИР; 2-МППГ ($n = 14$) после ГП – 2-меркаптопропионилглицин (20 мг/кг) после preconditionирования, за 10 мин до ИР; * – различия, по сравнению с контролем, статистически значимы при $p < 0,05$.

Применение 2-МППГ после рГП не влияло на размер некроза миокарда у адаптированных животных (рис. 1). Аналогично не оказывало значимого влияния на защитный эффект рГП применение «ловушки» гидропериксных радикалов жирных кислот тролокса (2,5 мг/кг) [1] и «ловушки» супероксидных и гидроксильных радикалов темпола (30 мг/кг) [3] за 15 мин до адаптации (рис. 2). Однако предварительное введение препарата N,N'-диметилтиомочевины (DMTU; 300 мг/кг) – антиоксиданта, действующего

избирательно в отношении гидроксильного радикала [4], – полностью устраняло адаптивный эффект preconditionирования (рис. 2). Ни один из вышеперечисленных антиоксидантов в указанных дозировках не обладал собственным кардиопротекторным эффектом (данные не представлены).

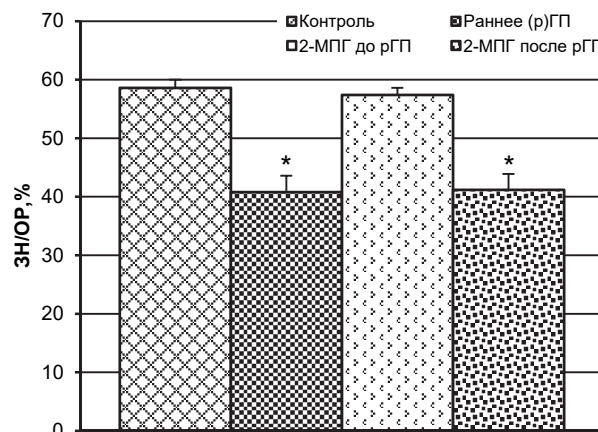


Рис. 2. Влияние антиоксидантов прямого действия на инфаркт-лимитирующий эффект раннего гипоксического preconditionирования: ЗН/ОР – отношение зоны некроза к области риска; контроль ($n = 14$) – ишемия и реперфузия (ИР); раннее ГП ($n = 12$) – гипоксическое preconditionирование + ИР; тролокс ($n = 12$) – тролокс (2,5 мг/кг); темпол ($n = 15$) – темпол (30 мг/кг); DMTU ($n = 12$) – диметилтиомочевина (300 мг/кг); все препараты вводили за 15 мин до рГП; * различия, по сравнению с контролем, статистически значимы при $p < 0,05$.

Таким образом, в сигнальном механизме инфаркт-лимитирующего эффекта раннего гипоксического preconditionирования *in vivo* принимают участие активные формы кислорода, что полностью согласуется с данными исследований, проведенных на изолированных кардиомиоцитах [2, 6]. Наши результаты позволяют предположить, что гидропериксные радикалы жирных кислот и супероксиданион не играют значимой роли в формировании феномена рГП. В качестве триггера сигнального механизма рГП может выступать гидроксильный радикал, однако этот вопрос требует дополнительных исследований.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Eum HA, Lee SM (2004). Effects of Trolox on the activity and gene expression of cytochrome P450 in hepatic ischemia/reperfusion. *Br. J. Pharmacol.*, 142 (1), 35-42.
2. Gong KZ, Zhang ZG, Li AH, Huang YF, Bu P, Dong F, Liu J (2004). ROS-mediated ERK activation in delayed protection from anoxic preconditioning in neonatal rat cardiomyocytes. *Chin. Med. J.*, 117 (3), 395-400.
3. Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Suzuki T, Maeta H, Abe Y (2005). Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension*, 45 (5), 860-866.

4. Puisieux F, Deplanque D, Bulckaen H, Maboudou P, Gele P, Lhermitte M, Lebuffe G, Bordet R (2004). Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase. *Brain Res.*, 1027 (1-2), 30-37.

5. Tanaka M, Fujiwara H, Yamasaki K, Sasayama S (1994). Superoxide dismutase and N-2-mercaptopyrionyl glycine attenuate infarct size limitation effect of ischaemic preconditioning in the rabbit. *Cardiovasc. Res.*, 28 (7), 980-986.

6. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT (1998). Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, 273 (29), 18092-18098.

7. Venturini CM, Flickinger AG, Womack CR, Smith ME, McMahon EG (1998). The antioxidant, N-(2-mercaptopyrionyl)-glycine (MPG), does not reduce myocardial infarct size in an acute canine model of myocardial ischemia and reperfusion. *J. Thromb. Thrombol.*, 5 (2), 135-141.

Сведения об авторах
Information about the authors

Семенцов Андрей Сергеевич – аспирант, лаборант лаборатории экспериментальной кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии» (634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а, e-mail: hamkot@sibmail.com)

Sementsov Andrey Sergeevich – Postgraduate, Laboratory Assistant of the Laboratory of Experimental Cardiology of Research Institute of Cardiology (634012, Tomsk, Kievskaya str., 111a; e-mail: hamkot@sibmail.com)

Крылатов Андрей Владимирович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии» (тел.: 8 (3822) 26-21-74)

Krylatov Andrey Vladimirovich – Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer the of Laboratory of Experimental Cardiology of Research Institute of Cardiology (tel.: +7 (3822) 26-21-74)