

УДК: 616-092.9:599.323.4:616.12-005.4-089.811:577.115

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАРДИОПРОТЕКТИВНОГО ДОЗОЗАВИСИМОГО ВЛИЯНИЯ ЭМОКСИПИНА В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ И СВОБОДНОЙ ФОРМАХ НА ИШЕМИЗИРОВАННЫЙ И РЕПЕРФУЗИРУЕМЫЙ МИОКАРД НА МОДЕЛИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫСЫ

Я. Г. ТОРОПОВА, Л. В. АНТОНОВА, Р. А. МУХАМАДИЯРОВ,
М. В. БОГДАНОВ, А. С. ГОЛОВКИН

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Кемерово, Россия*

Цель. Исследование кардиопротективного дозозависимого влияния эмоксипина в липосомальной форме и «свободного» эмоксипина на кардиомиоциты изолированного ишемизированного сердца крысы в период реперфузии.

Материалы и методы. В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крысы изучали влияние липосом, содержащих в своем составе различные концентрации (0,25 и 0,1 мг/мл) эмоксипина, на кардиомиоциты изолированного сердца, подвергнутого тотальной нормотермической ишемии и реперфузии. Оценивали уровень миокардиальных маркеров в оттекающем от сердца перфузате и морфологическую картину миокарда, окрашенного методом TUNEL.

Результаты. Полученные результаты свидетельствуют о том, что меньшие концентрации эмоксипина (0,1 мг/мл) в составе липосом обеспечивают максимальное снижение степени повреждения сарколеммы кардиомиоцитов в ишемизированном миокарде в период реперфузии.

Ключевые слова: липосомы, изолированное сердце, ишемия, реперфузия, эмоксипин.

COMPARING CARDIOPROTECTIVE DOSE-DEPENDENT EFFECT OF LIPOSOMAL AND FREE EMOXIPINE ON ISCHEMIZED AND REPERFUSED MYOCARDIUM IN A MODEL OF ISOLATED RAT HEART

Y. G. TOROPOVA, L. V. ANTONOVA, R. A. MUKHAMADIYAROV,
M. V. BOGDANOV, A. S. GOLOVKIN

*Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Complex Issues
of Cardiovascular Diseases» under the Siberian Branch of the Russian Academy
of Medical Sciences, Kemerovo, Russia*

Purpose. The purpose of the study was to compare cardioprotective dose-dependent effects of liposomal and free emoxipine on cardiomyocytes in an isolated ischemized rat heart during reperfusion.

Materials and methods. In the experiments on the isolated perfused rat heart the effects of liposomes containing different concentrations (0,25 and 0,1 mg/mL) of emoxipine on cardiomyocytes of the isolated heart after total normothermic ischemia and reperfusion were evaluated. The level of cardiac enzymes in the outflowing perfusate and the morphology of the TUNEL-stained myocardium were assessed.

Results. The obtained results showed that less liposomal emoxipine concentrations (0,1 mg/mL) led to the maximum decrease in reperfusion-induced myocyte sarcolemma injury in the ischemized myocardium during reperfusion.

Key words: liposomes, isolated heart, ischemia, reperfusion, emoxipine.

Введение

Широкое внедрение в кардиологическую практику методов трансплантации и увеличение числа оперативных вмешательств на сердце в условиях искусственного кровообращения обуславливает необходимость поиска новых кардиопротекторных препаратов, способных эффективно повышать толерантность клеток миокарда к повреждающему действию ишемии и реперфузии.

Возможным подходом к решению данной проблемы является использование антиоксидантов,

способных предотвращать повреждение и деструкцию липидов в мембранных структурах кардиомиоцитов, оказывая тем самым кардиопротективный эффект [10]. Одним из представителей антиоксидантов является препарат эмоксипин (производное 3-оксипиридинол), разрешенный к использованию в кардиологической практике при остром инфаркте миокарда, для профилактики синдрома реперфузии и при нестабильной стенокардии [5]. Эмоксипин обладает широким спектром биологического действия и выраженной антиоксидантной активностью,

подтвержденной рядом научных работ [2, 7, 8]. В качестве возможного способа его использования можно рассматривать целенаправленную доставку антиоксиданта в виде липосомальной формы к очагам, пораженным в результате ишемии-реперфузии [6, 11]. Известно, что липосомальные системы доставки фармакологических агентов обуславливают фармакологическое преимущество перед свободными формами лекарств [4]. К тому же липиды, входящие в состав липосом, могут замещать поврежденные в результате ишемии и реперфузии эссенциальные фосфолипиды мембран, оказывая тем самым протективный эффект [3]. Доказано, что включение лекарственного вещества в состав липосом позволяет увеличить его биодоступность, которая способствует снижению дозы препарата с сохранением его терапевтического эффекта [4, 12].

Цель исследования

Провести сравнительное исследование кардиопротективного дозозависимого влияния эмоксипина в липосомальной форме и «свободного» эмоксипина на кардиомиоциты изолированного ишемизированного сердца крысы в период реперфузии.

Материал и методы исследования

Приготовление липосом

Липосомы получали методом экструзии (экструдер Lipex Biomembranes Inc., Канада) из лецитин-холестериновой взвеси с использованием поликарбонатных фильтров (Costar) с диаметром пор 50 нм. Молярное отношение яичного лецитина и холестерина в липосомах составило 7 : 5. Эмоксипин в виде водного раствора добавляли на этапе гидратации липидной пленки при получении мультиламелярных везикул. Перед использованием липосомы разбавляли физиологическим раствором до необходимой концентрации.

Перфузия изолированного сердца

Исследование проводили на изолированных сердцах крыс-самцов Wistar с массой тела 350 ± 20 г с учетом требований и принципов гуманного обращения с экспериментальными животными [1]. Все эксперименты проводились в осенне-зимний период с целью исключения влияния сезонных колебаний на устойчивость сердца к повреждающему действию ишемии-реперфузии.

Сердца извлекали у животных под этиминаловым наркозом (45 мг/кг) и помещали в «ледяной» (2–4 °С) раствор Кребса – Хензеляйта следующего состава (мМ): NaCl – 118,0; KCl – 4,7; MgSO₄ – 1,2; KH₂PO₄ – 1,2; CaCl₂ – 2,0; глюкоза – 5,5; NaHCO₃ – 25,0. Уровень pH раствора в ходе всего эксперимента составлял 7,4. После прекращения спонтанных сокращений выделяли аорту и отделяли соединительную ткань. Затем аорту канюлировали и производили

перфузию сердца методом Langendorff по открытому контуру в течение 20 мин раствором Кребса – Хензеляйта, насыщенным карбогеном (95 % O₂ + 5 % CO₂) при 37 °С и при давлении 80 см водного столба. Далее сердца подвергали 30-минутной нормотермической тотальной ишемии, во время которой осуществляли гипоперфузию изучаемыми фармакологическими агентами со скоростью 0,1 мл/мин. Сердца опытных групп перфузировали липосомами, содержащими 0,25 мг/мл (ЭМЛ) и 0,1 мг/мл (ЭМЛ1) эмоксипина, и эмоксипином в свободной форме (ЭМС) в концентрации 0,25 мг/мл. В контрольных группах гипоперфузию осуществляли физиологическим раствором (ФР) и «пустыми» липосомами (ПЛ). Конечная концентрация липосом в среде для гипоперфузии составила 10 мг/л в пересчете на липиды. После ишемии возобновляли перфузию по Langendorff. Реперфузионный период составлял 30 минут.

На 10-й минуте до ишемии и на 15-й минуте после производили забор оттекающего от сердца перфузата для биохимических исследований.

Степень повреждения кардиомиоцитов оценивали по содержанию в оттекающем от сердца перфузате следующих миокардиальных маркеров: аспаратаминотрансферазы (АСТ), креатинфосфокиназы МВ фракции (КФК-МВ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

Активность ферментативных маркеров в перфузате оценивали методом ферментативной кинетики и выражали в международных единицах в литре (МЕ/л). Определение активности проводили на автоматическом биохимическом анализаторе SAPHIRE-400 (Россия) с использованием реактивов фирмы Диакон-ДС, Россия (для ЛДГ и АСТ), и DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Germany (для КФК-МВ).

Исследование апоптоза кардиомиоцитов проводилось путём постановки на гистологических срезах миокарда реакции TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) с использованием стандартного набора реактивов Millipore (USA), позволяющей выявлять в ядрах клеток наличие фрагментированной ДНК. Визуализацию осуществляли с помощью микроскопа AXIO Imager.A1 с программным обеспечением AXIO Vision. Изучение микропрепаратов проводили в 20 произвольных выбранных полях зрения по каждому препарату при увеличении 200^x.

Критериями оценки кардиопротективного эффекта изучаемых фармакологических агентов служили уровень ферментативных маркеров в оттекающем от сердца перфузате и морфологическая характеристика кардиомиоцитов на момент окончания реперфузии.

Статистическая обработка результатов

Анализ полученных данных производился с помощью пакетов программы Statistica 6.0. Рассчи-

Уровни миокардиальных маркеров в группах ФР, ПЛ, ЭМЛ, ЭМС и ЭМЛ1

Показатель	Группы (Ме (25–75 %))					
	ФР (n=8)	ПЛ (n=8)	ЭМЛ (n=8)	ЭМС (n=8)	ЭМЛ1 (n=8)	
ААСТ, МЕ/л	Исх.	25,0 (18,0–30,0)				
	РРП	408,0 (391,5–415,0)	221,5* (209,0–246,5)	499,0 ^{*/**/#/∧} (489,5–503,5)	280,0 ^{*/**/#} (276,0–295,5)	198,0 ^{*/**/∧} (160,0–216,0)
ККФК-МБ, МЕ/л	Исх.	95,0 (93,0–119,0)				
	РРП	740,0 (679,0–793,0)	309,0* (297,0–338,0)	693,0 ^{**/#/∧} (680,0–700,0)	409,0 ^{*/**/#} (390,0–451,0)	285,0 ^{*/**/∧} (268,0–308,0)
ЛЛДГ, МЕ/л	Исх.	254,0 (210,0–285,0)				
	РРП	1683,5 ^{**} (1592,0–1777,5)	888,5* (829,5–934,0)	1145,0 ^{*/**/#/∧} (983,5–1200,0)	934,0 ^{*/#} (834,5–982,5)	809,0 ^{*/**/∧} (759,0–851,0)

Примечания: Исх. – исходные показатели; РРП15 – 15-я минута реперфузии; * $p < 0,05$ по сравнению с ФР; ** $p < 0,05$ по сравнению с ПЛ; # $p < 0,05$ между группами ЭМЛ и ЭМС; ∧ $p < 0,05$ между группами ЭМЛ и ЭМЛ1.

тывали медиану и квартили (Ме (25–75 %)). Для проверки гипотезы о равенстве законов распределений использовали критерий Манна – Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исходно уровни определяемых индикаторов цитолиза клеток миокарда между исследуемыми группами статистически не различались ($p > 0,05$) (табл. 1). После тотальной 30-минутной нормотермической ишемии и последующего возобновления коронарной циркуляции в сердцах группы ФР отмечалось выраженное повреждение сарколеммы кардиомиоцитов. Доказательством тому служило значительное увеличение активности ЛДГ (в 6 раз) и КФК-МБ (в 7 раз) по отношению к исходным значениям.

Параллельное исследование микропрепаратов миокарда этой группы, окрашенных методом TUNEL, подтвердило выраженное повреждение клеток. TUNEL-позитивными считали клетки с окрашенным флуоресцентным красителем ядром. Для дифференцировки некротизированных клеток от клеток в состоянии апоптоза руководствовались следующими критериями: за признаки некроза принимали карипикноз (сморщивание и конденсация хроматина), карiorексис (распад на глыбки) и кариолизис (растворение), тогда как к критериям апоптоза относили неоднородность структуры хроматина и четкость контуров ядра. Так, на микрофотоснимках миокарда группы ФР во всех полях зрения структура кардиомиоцитов не визуализировалась, отмечалась фрагментация клеток и деградация их ядер (рис. 1А). Миокард выглядел разволокненным за счет выраженной дисконкомплексации миофибрилл и значительного расширения межклеточных пространств. По-видимому, тотальная нормотермическая 30-минутная ишемия и

последующая реперфузия оказали значительное повреждающее действие на миокард, не позволявшее визуализировать гистологическую структуру миокарда с помощью TUNEL-метода.

В то же время гипоперфузия ПЛ, ЭМЛ и ЭМС обеспечивала существенное снижение повреждающих влияний ишемии и реперфузии на кардиомиоциты. Об этом свидетельствовали более низкие показатели активности ферментов-маркеров повреждения миокарда в этих группах по сравнению с ФР ($p < 0,05$) (табл. 1).

В группе ЭМЛ уровень миокардиальных маркеров в реперфузионный период был достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в группе ФР, однако достоверно выше ($p < 0,05$), чем в группах ПЛ и ЭМС. Так, в группе ЭМЛ в реперфузионный период уровень КФК МБ составил 693,0 (680,0–700,0) МЕ/л, в то время как в группах ПЛ и ЭМС этот показатель оказался 309,0 (297,0–338,0) МЕ/л и 409,0 (390,0–451,0) МЕ/л соответственно. Аналогичная тенденция отмечалась и в отношении остальных исследуемых маркеров (показатели ЛДГ и АСТ в группе ЭМЛ были выше в 1,2 и 1,8 раз соответственно по сравнению с ЭМС) ($p < 0,05$).

Результаты TUNEL-анализа миокарда групп ПЛ, ЭМЛ и ЭМС также свидетельствовали о меньшей степени повреждения кардиомиоцитов этих групп по сравнению с группой ФР. На микропрепаратах группы ПЛ в каждом поле зрения детектировались только единичные апоптотически измененные ядра кардиомиоцитов (рис. 1В). Признаков некроза в препаратах этой группы не отмечено. В то же время в группах ЭМЛ и ЭМС наблюдались как признаки некроза, так и признаки апоптотической гибели кардиомиоцитов. Однако между этими группами были выявлены существенные различия в количестве и структуре ядер TUNEL-позитивных клеток. Так, в группе ЭМС по сравнению с ЭМЛ апоптотически измененные кар-

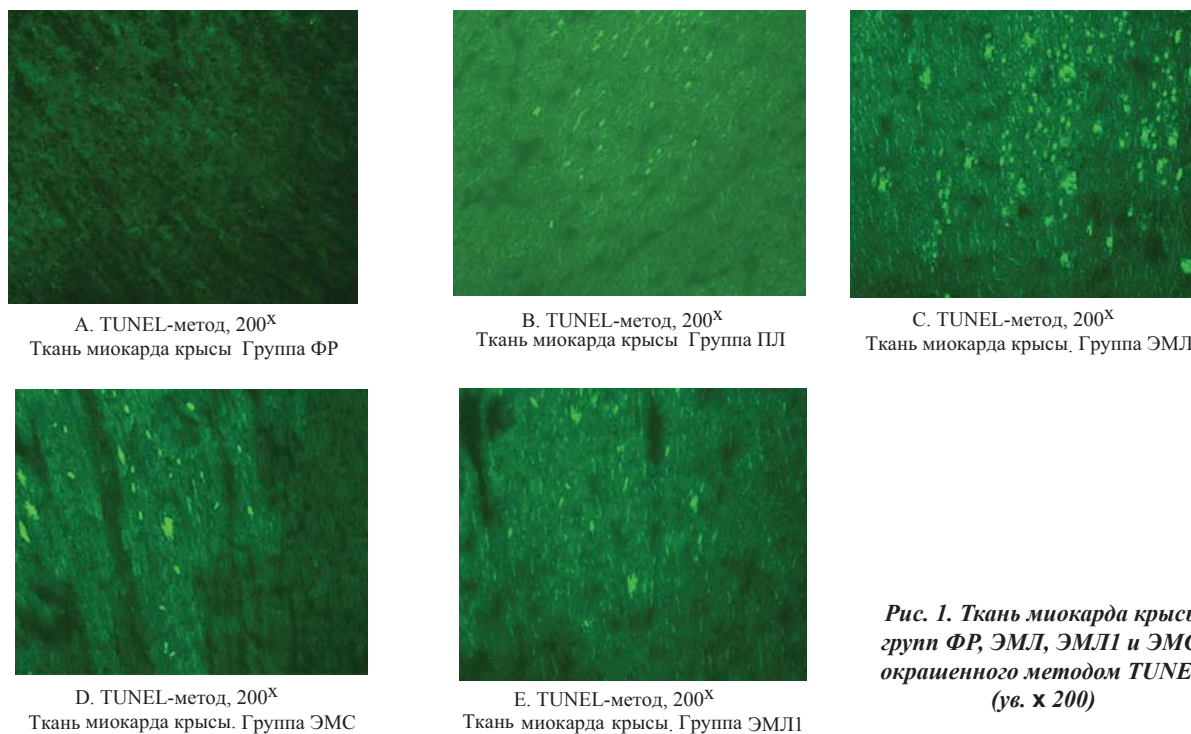


Рис. 1. Ткань миокарда крысы групп ФР, ЭМЛ, ЭМЛ1 и ЭМС, окрашенного методом TUNEL (ув. x 200)

диомиоциты преобладали над клетками, подвергшимися некротической гибели (рис. 1С, D).

Таким образом, по данным морфологического и биохимического исследования, гипоперфузия ЭМЛ и ЭМС способствовала снижению степени повреждения кардиомиоцитов в условиях глобальной нормотермической ишемии и последующей реперфузии. При этом ЭМС проявлял более выраженный «защитный» эффект при условии равных дозировок антиоксиданта.

Менее выраженное кардиопротективное действие ЭМЛ по сравнению с ЭМС можно объяснить следующим образом. Включение эмоксипина в состав липосом способствовало увеличению биодоступности антиоксиданта за счет его направленного транспорта к поврежденным в результате ишемии и реперфузии участкам миокарда [6]. Это привело к увеличению концентрации эмоксипина в кардиомиоцитах, что, в свою очередь, могло создать условия для проявления им прооксидантного эффекта, подробно описанного в литературе [2].

На наличие незначительного прооксидантного эффекта ЭМЛ в отношении постишемического миокарда указывает более высокий реперфузионный выброс миокардиальных маркеров по сравнению с ПЛ и ЭМС. Возможной причиной этого может являться инверсия антиоксидантного действия эмоксипина при увеличении его дозировки [9]. По данным литературы, эмоксипин, подобно большинству антиоксидантов, в высоких концентрациях может являться дополнительным источником свободных радикалов, оказывая парадоксальный прооксидантный эффект [2].

На следующем этапе исследования была проведена серия экспериментов, в которой в качестве исследуемого фармакологического агента использовались липосомы с меньшей концентрацией эмоксипина (0,1 мг/мл) (ЭМЛ1).

Было отмечено, что при снижении концентрации эмоксипина в составе липосом (ЭМЛ1) наблюдалось статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение реперфузионного выброса ЛДГ, КФК-МБ и АСТ по сравнению с группами ЭМЛ, ЭМС и ПЛ (табл. 1).

Так, активность ЛДГ в группе ЭМЛ1 составила 809,0 (759,0–851,0) МЕ/л, в то время как в группе ЭМЛ этот показатель оказался в 1,4 раза выше (1145,0 (983,5–1200,0) МЕ/л). Аналогичная тенденция в этих группах наблюдалась и в отношении АСТ и КФК-МБ (эти показатели в группе ЭМЛ были выше в 2,5 раза по сравнению с ЭМЛ1). Кроме того, в группе ЭМЛ1 наблюдался более низкий реперфузионный выброс КФК-МБ, ЛДГ и АСТ по сравнению с группой ЭМС ($p < 0,05$).

Морфологическая картина миокарда группы ЭМЛ1, окрашенного методом TUNEL, существенно не отличалась от группы ЭМС. На микропрепаратах этой группы регистрировались как признаки некроза, так и признаки апоптоза кардиомиоцитов (рис. 1Е). При этом в группе ЭМЛ1 по сравнению с ЭМЛ кардиомиоциты, подвергшиеся апоптозу, также преобладали над клетками, подвергшимися некротической гибели (рис. 1С, Е).

Таким образом, результаты биохимического и морфологического исследований ишемизированного и реперфузируемого миокарда группы ЭМЛ1 указывают на выраженный протективный эффект

низких концентраций «липосомального» эмоксипина (0,1 мг/мл) в отношении кардиомиоцитов.

На основании полученных в ходе эксперимента результатов можно предполагать, что снижение концентрации эмоксипина в липосомах до 0,1 мг/мл способствовало проявлению им выраженного антиоксидантного эффекта в отношении кардиомиоцитов. При этом эффект, вероятно, обусловлен суммацией антиоксидантного влияния низких концентраций эмоксипина, включенного в состав липосом, и защитного эффекта их липидной фазы.

Выводы

1. Гипоперфузия в период ишемии липосомами, содержащими эмоксипин, и эмоксипином в свободной форме обеспечивает снижение ишемического и реперфузионного повреждения кардиомиоцитов.

2. Меньшие концентрации эмоксипина в липосомах (0,1 мг/мл) способствуют более выраженному снижению степени повреждения кардиомиоцитов по сравнению с 0,25 мг/мл эмоксипина в свободной форме и в составе липосом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдрашитова Э. Х., Зайцев Т. И., Комаровская Т. П. Стандартизация лабораторных животных по состоянию здоровья // Ланималогия. 1993. № 1. С. 7–12.

2. Влияние изменения метаболического и антиоксидантного статуса миокарда на выраженность его ишемического и реперфузионного повреждения / А. В. Сыренский [и др.] // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2008. Т. 94, № 10. С. 1171–1180.

3. Ипатова О. М. Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике / под ред. А. И. Арчакова. М.: Изд. ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН, 2005. 318 с.

4. Липосомы в биологических системах: пер. с англ. / под ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. М.: Медицина, 1983. 384 с.

5. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Изд-во «Новая Волна», 2000. 608 с.

6. Сейфулла Р. Д. Фармакология липосомальных препаратов (в эксперименте и клинике). М.: Глобус Континенталь, 2010. 241 с.

7. Смирнов Л. Д., Дюмаев К. М. Молекулярные механизмы действия и актуальные направления медико-биологического применения эмоксипина и мексидола // Бюл. ВНИЦБАВ. 1992. С. 9–13.

8. Сравнительная эффективность эмоксипина и оксибутирата натрия при экспериментальной ишемии миокарда / С. А. Афанасьев [и др.] // Эксперим. и клиническая фармакология. 1994. Т. 57, № 4. С. 26–29.

9. Эмоксипин при реперфузии ишемического миокарда у собак: влияние на размер инфаркта и креатинкиназную активность плазмы крови / Е. А. Конорев [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1990. Т. 110, № 9. С. 252–254.

10. Antioxidant treatment prevents cardiac protein oxidation after ischemia-reperfusion and improves myocardial function and coronary perfusion in senescent hearts / S. Besse [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. 2006. Dec. 57(4). P. 541–52.

11. In vitro evaluation of the antioxidant activity of liposomal flavonols by the HRP-H₂O₂-luminol system / A. P. Landi-Librandi [et al.] // J. Microencapsul. 2011. Vol. 28, № 4. P. 258–67.

12. Zacharias E. Suntres. Liposomal Antioxidants for Protection against Oxidant-Induced Damage // J. Toxicol. 2011. Vol. 2011. P. 16.