

Влияние N-ацетил-L-цистеина на роль супероксид-анионов в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда при стрессе

Учреждение образования "Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет"

Целью работы было изучить роль супероксид-анионов в регуляции тонуса сосудов сердца, при стрессе, а также на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина. Опыты были выполнены на 72 крысах-самках линии Вистар, массой 180-320 г. Коронарный поток и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах изолированного по Лангендорфу сердца. Показано, предварительное введение N-ацетил-L-цистеина восстанавливало реактивную гиперемия сниженную при 0,5-ти часовом иммобилизационном стрессе и существенно ограничивало неблагоприятные эффекты 6-ти часовой иммобилизации, выражающиеся в появлении коронарной гипотонии, снижении сократительной функции миокарда и развитии явления гиперперфузии сердца. N-ацетил-L-цистеин увеличивал регуляторную роль супероксид-анионов в отношении тонуса коронарных сосудов при кратковременном и длительном стрессе. Коронародилататорный эффект ловушки супероксид-анионов тирона в изолированных сердцах крыс перенесших 0,5-ти и 6-ти часовой стресс на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина, также как и в контроле, был обусловлен биологической активностью монооксида азота.

Ключевые слова: N-ацетил-L-цистеин, супероксид-анионы, коронарные сосуды, изолированное сердце, монооксид азота.

A.S. Doroshenko, A.P. Solodkov, V.I. Shebeko

Influence of N-acetyl-L-cysteine on a role superoxide anions in the regulation of coronary vessel tone and contractile function at stress

The aim of this investigation was to study a role of superoxide anions in the regulation of heart's vessel tone at stress, and also on a background of preliminary introduction of N-acetyl-L-cysteine. The experiments have been performed on 72 female rats (Wistar breed 180-320 gr). Coronary blood flow and myocardial contractile function have been studied on preparations of Langendorff's isolated heart. It is shown, preliminary introduction of N-acetyl-L-cysteine restored reactive hyperemia reduced at 0,5-th hour immobilization stress and essentially limited adverse effects 6-th hour immobilization, expressing in occurrence of a coronary hypotonia, reduction of myocardial contractile function and development of the heart's hyperperfusion phenomenon. N-acetyl-L-cysteine improved regulatory role of superoxide anions concerning a tone of coronary vessels at short-term stress and essentially it increased at 6-th hour immobilization. Dilatation effect on hearts vessels of a superoxide anions trap tiron in isolated rats hearts transferred 0,5-ht and 6-ht the hour stress on a background of preliminary introduction N-ацетил-L-цистеина, as well as in the control, has been caused by biological activity of nitric oxide.

Key words: N-acetyl-L-cysteine, superoxide anions, coronary vessel, isolated heart, nitric oxide.

Важным механизмом нарушения тонуса артериальных сосудов при стрессе является дисфункция эндотелиоцитов, характеризующаяся увеличением образования монооксида азота (NO), активных форм кислорода (АФК), в частности супероксид-

анионов, и снижением антиоксидантной защиты клеток сердца. Это приводит к нарушению взаимосвязи коронарного кровотока и сократительной функции миокарда [1,3,4,5,7].

Молекула NO благодаря своей уникальной структуре и высокой активности является "скавенджером" АФК, в частности, супероксид-анионов, оказывает существенное влияние на ауторегуляцию коронарного кровотока в норме и при стрессе [1,5,7,9]. Нами было показано, что постоянно образующиеся в клетках коронарных сосудов супероксид-анионы регулируют выраженность биологического действия монооксида азота и играют важную роль в механизмах NO-опосредованной регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда. [1,3,4].

Низкомолекулярный тиолсодержащий антиоксидант N-ацетил-L-цистеин представляет собой ловушку активных форм кислорода и азота, что и обуславливает его способность предупреждать нарушение эндотелийзависимой вазодилатации у спонтанно-гипертензивных крыс [6], восстанавливать NO-зависимое расслабление сосудов при экспериментальной сердечной недостаточности [8].

В то же время, влияние N-ацетил-L-цистеина на роль супероксид-анионов в регуляции коронарного кровотока, и сократительной активности сердца при стрессе ранее не изучалось.

Цель настоящего исследования: изучить роль супероксид-анионов в регуляции тонуса сосудов сердца, при стрессе, а также на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина.

Методы

Опыты были выполнены на 72 крысах-самках линии Вистар, массой 180- 320 г. Коронарный поток и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах изолированного по Лангендорфу сердца, перфузируемого в условиях постоянного давления и сокращающегося в спонтанном ритме. Сердце перфузировали раствором Кребса - Хензелята рН - 7,3-7,4; насыщенного карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂) при температуре 37°C. Постоянную температуру поддерживали при помощи ультратермостата UTU-4 (Польша). Перфузат не рециркулировал, что позволяло поддерживать его состав постоянным на протяжении всего опыта.

Величину объемной скорости коронарного потока определяли по объему перфузионной жидкости, оттекающей через свободный правый и дренированный левый желудочки сердца за 10 секунд. Перфузия каждого изолированного сердца состояла из двух этапов. На первом этапе сердце перфузировали раствором Кребса-Хензелята, а на втором этапе - этим же раствором, но с добавлением одного из ингибиторов или их сочетания (табл. 1).

В ходе опыта перфузионное давление ступенчато повышали от 40 до 120 мм рт. ст. с шагом в 20 мм рт. ст. Коронарный расширительный резерв определяли как отношение между величиной коронарного потока, определенной после 60-ти секундного прекращения перфузии (максимальный гиперемический коронарный поток), и исходным потоком. Способность сосудов сердца суживаться в ответ на их растяжение увеличившимся внутрисосудистым давлением, оценивали по индексу ауторегуляции, предложенному Е.Б.Новиковой (1972) [2]. В полость левого желудочка сердца через разрез в ушке левого предсердия вводили латексный баллончик, который соединяли с электроманометром. Запись кривой внутрижелудочкового давления осуществляли электроманометром МХ-01 на одноканальном самописце Н 338-1. Для выявления зависимости между величиной коронарного потока и характером сократительной активности изолированного сердца рассчитывали показатель интенсивности перфузии

миокарда как отношение объемной скорости коронарного потока к произведению частоты сердечных сокращений в минуту на величину развиваемого внутрижелудочкового давления. Показатель интенсивности перфузии миокарда характеризовал количество перфузата, приходящегося на единицу функционирующего миокарда левого желудочка с массой 1 грамм. Поскольку изолированное сердце сокращалось в спонтанном ритме, для исключения влияния частоты сердечных сокращений на величину развиваемого внутрижелудочкового давления рассчитывали показатель интенсивности функционирования структур миокарда (ИФС).

$ИФС = (ЧСС \cdot РВД) / m$, где ЧСС - частота сокращений изолированного сердца крысы, РВД - развиваемое внутрижелудочковое давление, m - сухая масса левого желудочка [1].

Для выявления роли супероксид-анионов и NO в регуляции тонуса коронарных сосудов в перфузионный раствор добавляли химическую ловушку супероксид-анионов - тирон (4,5-дигидрокси-1,3-бензенидисульфоновая кислота, 10 мМ, Sigma USA) и конкурентный ингибитор NO-синтазы метиловый эфир N-?-нитро-L-аргинина (L-NAME, 60 мкМ/л, Sigma USA). Низкомолекулярный тиолсодержащий антиоксидант N-ацетил-L-цистеин (40 мг/кг, рН раствора 7,3-7,4, Sigma USA), вводили животным внутрибрюшинно, за один час до начала эксперимента.

Стресс вызывали посредством 0,5, 6-ти часовой иммобилизацией крыс на спине без фиксации головы. Исследование животных проводили через 1 час после 0,5-ти часовой и через 2 часа после окончания 6-ти часовой иммобилизации. Контролем служили крысы, содержащиеся в тех же условиях, что и опытные и получавшие одинаковый рацион.

Цифровой материал обработали общепринятыми методами вариационной статистики с использованием программы "Statistica 6.0".

Результаты и обсуждение

В изолированном сердце крысы, перенесшей 0,5-ти часовую иммобилизацию ОСКП (рис. 1А) и индекс ауторегуляции, не изменялись по отношению к контролю.

Коронарный расширительный резерв снижался на 13%, при перфузионном давлении 80 мм рт. Это снижение было обусловлено уменьшением максимального гиперемического коронарного потока у крыс, перенесших 0,5-ти часовой стресс на 26%. Развиваемое внутрижелудочковое давление не изменялось. Следовательно, получасовая иммобилизация не оказывала влияния на тонус коронарных сосудов, но сопровождалась нарушением развития реактивной гиперемии.

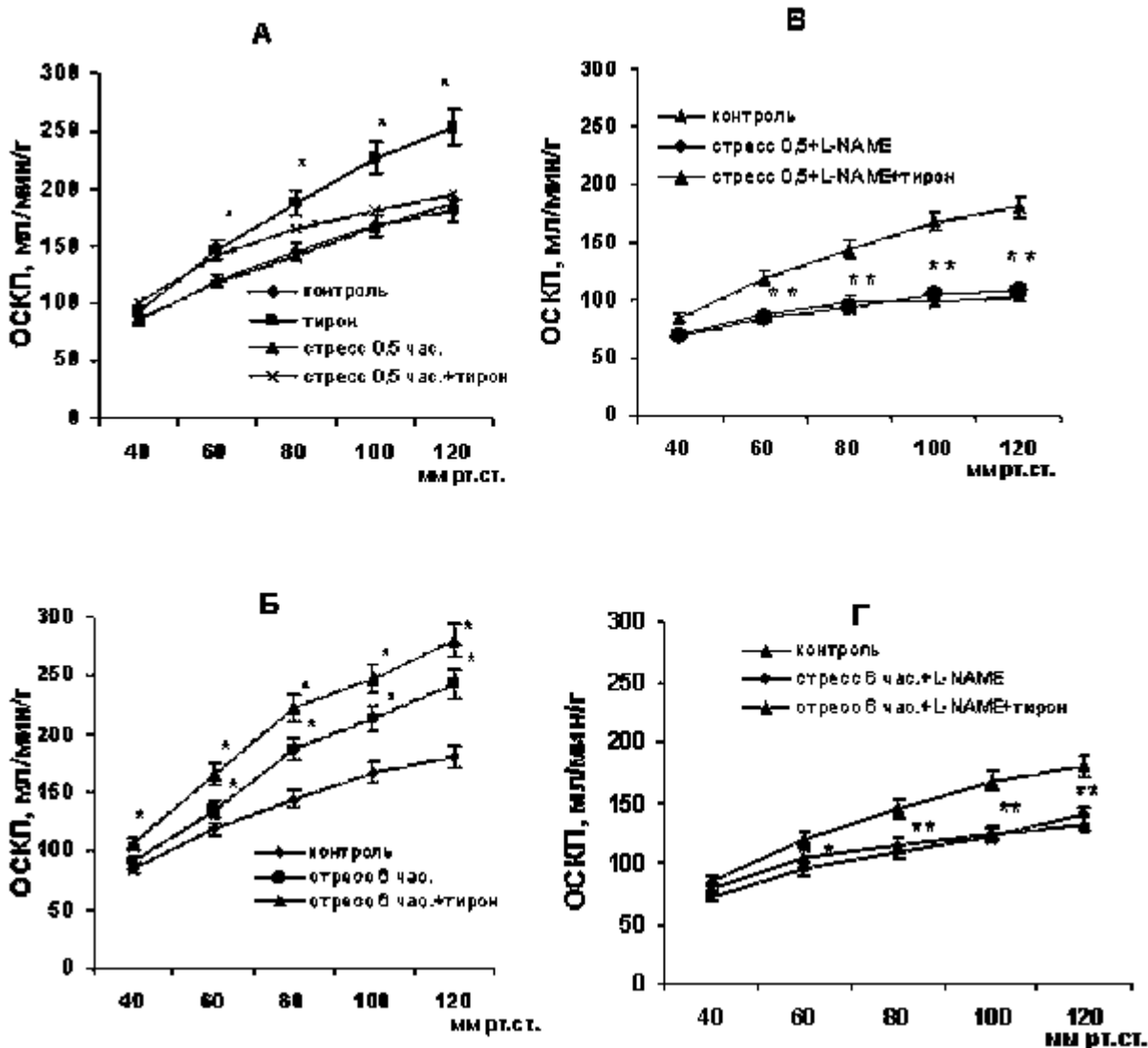


Рис 1 Изменение объемной скорости коронарного потока в контроле при 0,5-ти (А и В), 6-ти часовом иммобилизационном стрессе (Б и Г), до и после добавления тирона, а также его сочетания с L-NAME. По оси абсцисс перфузионное давление, мм рт.ст., по оси ординат объемная скорость коронарного потока, мл/мин/г. * - $p < 0,05$, по сравнению с контролем.

Шестичасовой иммобилизационный стресс приводил к описанному ранее [3,4] увеличению ОСКП (рис. 1Б), на фоне снижения развиваемого внутрижелудочкового давления, что свидетельствует о развитии, при этом состоянии, явления гиперперфузии миокарда и нарушении, существующей в норме, тесной взаимосвязи величины коронарного потока и сократительной функции миокарда.

Внутрибрюшинное введение N-ацетил-L-цистеина контрольным животным не сопровождалось достоверным изменением значений ОСКП, но при этом отмечалось уменьшение индекса ауторегуляции в среднем на 34% и снижению коронарного расширительного резерва на 15-17%, обусловленного некоторым уменьшением максимального гиперемического коронарного потока [4].

Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина, крысам, перенесшим 0,5-ти часовую иммобилизацию не оказало влияния на ОСКП (рис. 2А) и коронарный расширительный резерв, а индекс ауторегуляции возрастал на 32% и 44% при ПД 60-80 и 100-120 мм рт. ст. Максимальный гиперемический коронарный поток достоверно не отличался от контроля, что свидетельствовало о том, что N-ацетил-L-цистеин полностью предупреждал характерное для 0,5-ти часового иммобилизационного стресса снижение максимального гиперемического коронарного потока.

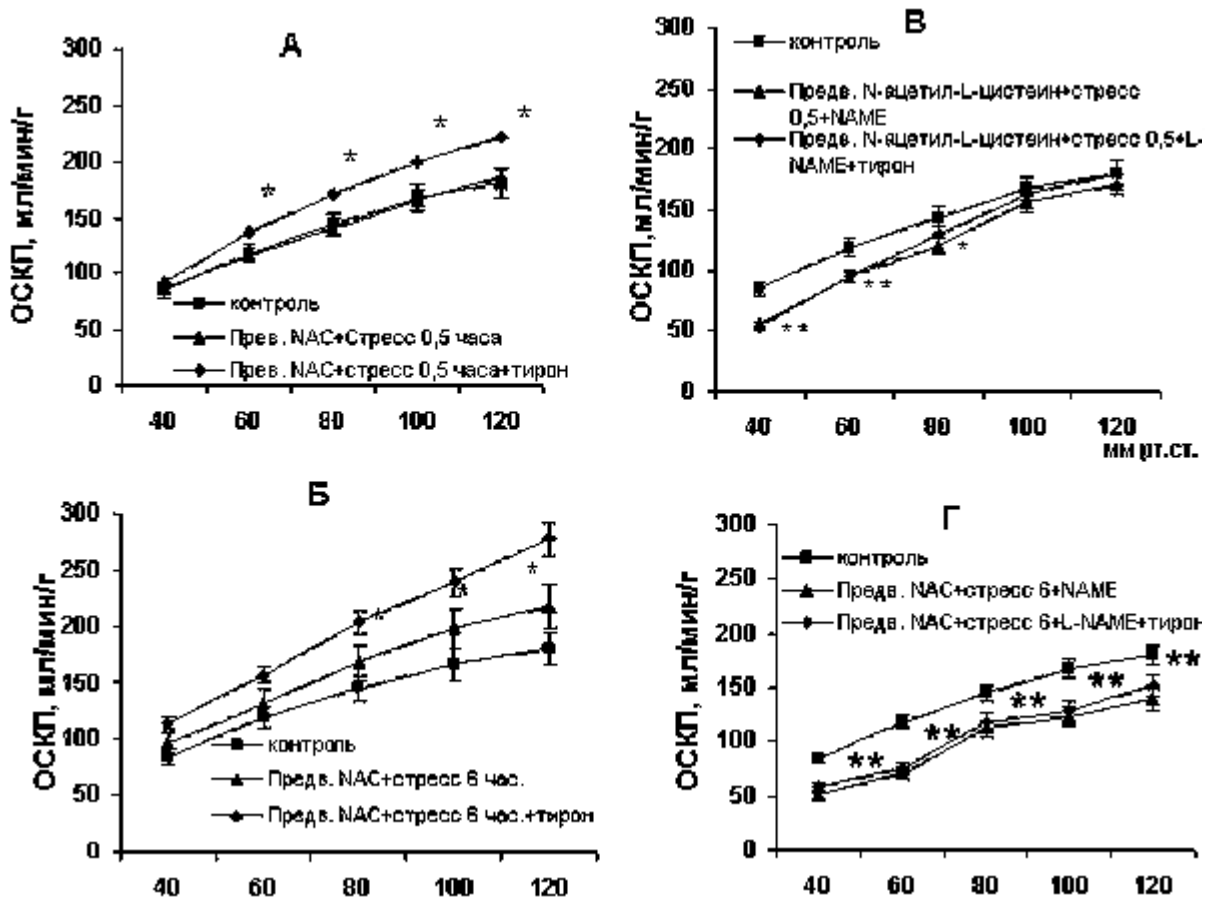


Рис 2 Влияние тирона на объемную скорость коронарного кровотока на фоне предварительного интраперитонеального введения N-ацетил-L-цистеина, после 0,5-ти, 6-ти часового иммобилизационного стресса, после 6-ти часового иммобилизационного стресса, на фоне предварительного интраперитонеального введения N-ацетил-L-цистеина (Б). По оси абсцисс перфузионное давление, мм рт.ст., по оси ординат объемная скорость коронарного потока, мл/мин/г. * - $p < 0,05$, по сравнению с первым этапом перфузии.

В сердцах крыс, перенесших 6-ти часовую иммобилизацию на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина, ОСКП достоверно не изменилась (рис. 2Б), по сравнению с контрольными животными, получавшими N-ацетил-L-цистеин, но предупредило увеличение ОСКП характерное для 6-ти часового иммобилизационного стресса. Индекс ауторегуляции, коронарный расширительный резерв снизились в меньшей степени, чем у животных, перенесших стресс без введения препарата. Введение N-ацетил-L-цистеина предупредило характерные для 6-ти часового иммобилизационного стресса падение развиваемого внутрижелудочкового давления, а, следовательно, и возрастание интенсивности перфузии миокарда.

Перфузия изолированного сердца крыс, перенесших 0,5-ти часовой иммобилизационный стресс, на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина, раствором, содержащим тирон, сопровождалась таким же, как у крыс без N-ацетил-L-цистеина возрастанием ОСКП (рис. 2В) на 17-22%, но при всех уровнях ПД (без введения N-ацетил-L-цистеина возрастал на 17-19% только при ПД 60-80 мм. рт. ст.) и незначительным снижением индекса ауторегуляции. Максимальный гиперемический коронарный поток достоверно не изменялся. Развиваемое внутрижелудочковое давление, частота сердечных сокращений, интенсивность

функционирования структур, в отличие от введения тирона животным без N-ацетил-L-цистеина, не изменялись.

Добавление тирона в раствор, которым перфузировали сердца крыс, перенесших 6-ти часовую иммобилизацию после предварительного введения N-ацетил-L-цистеина, сопровождалось приростом ОСКП (рис. 2Б) на 18-27% (рис., у животных не получавших N-ацетил-L-цистеин, на 18%). При этом индекс ауторегуляции снижался на 32% при ПД 100 и 120 мм рт.ст. Максимальный гиперемический коронарный поток достоверно не изменялся, а коронарный расширительный резерв уменьшался как и у животных, не получавших N-ацетил-L-цистеин на 24-32% в связи с увеличением исходного уровня ОСКП. Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина, ограничивало вызываемое тироном снижение развиваемого внутрижелудочкового давления и увеличение под влиянием тирона интенсивности перфузии миокарда. Улавливание супероксид-анионов при блокаде синтеза монооксида азота после 0,5-ти, 6-ти часового иммобилизационного стресса, перенесенного на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина, как и у крыс без внутрибрюшинного введения препарата, не сопровождалась какими либо изменениями ОСКП (рис. 1В,Г, 2В,Г). Индекс ауторегуляции остался таким же как у животных без введения N-ацетил-L-цистеина. Максимальный гиперемический коронарный поток и коронарный расширительный резерв снижались, развиваемое внутрижелудочковое давление уменьшалось при всех уровнях ПД, в той же степени, как и под влиянием одного тирона.

Таким образом, предварительное введение N-ацетил-L-цистеина восстанавливало характерную для контроля регуляторную роль супероксид-анионов при 0,5-ти часовом иммобилизационном стрессе и существенно ее увеличивало после 6-ти часового иммобилизационного стресса по сравнению с животными перенесшими стресс, но не получавшими N-ацетил-L-цистеин. Следовательно, способность супероксид-анионов оказывать влияние на объемную скорость коронарного потока при 0,5-ти и 6-ти часовом стрессе практически полностью зависит от биологического действия монооксида азота. Об этом свидетельствует тот факт, что подавление образования NO устраняет способность тирона снижать тонус коронарных сосудов. Значит, постоянно образующиеся в эндотелии супероксид-анионы регулируют выраженность биологического действия NO. Такая регуляция обеспечивается, через уменьшение его содержания в эндотелиоцитах вследствие взаимодействия супероксид-анионов с монооксидом азота, с образованием пероксинитрита. Можно предположить, что наибольшее значение в регуляции тонуса сосудов имеют супероксид-анионы, образующиеся в эндотелиальных клетках коронарных сосудов, так как именно там имеется значительное напряжение активности синтеза монооксида азота.

Подавление сократительной функции миокарда под действием тирона в какой-то мере можно объяснить усилением ингибирующего действия NO на ферменты дыхательной цепи митохондрий кардиомиоцитов. Однако ингибитор NO-синтазы также снижал развиваемое внутрижелудочковое давление, хотя и в меньшей степени, чем тирон. Следовательно, влияние супероксид-анионов и NO на сократительную активность миокарда, вероятно, зависит не столько от скорости образования каждого в отдельности из этих веществ, сколько от относительного их содержания в клетках и клеточных компартментах, в частности в митохондриях. Можно предположить, что уменьшение взаимодействия супероксид-анионов с NO вследствие снижения образования NO может повышать доступность супероксид-анионов для

супероксиддисмутазы. Образующийся под действием супероксиддисмутазы пероксид водорода способен далее оказывать влияние, как на тонус коронарных сосудов, так и на сократительную функцию миокарда.

Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина существенно ограничивало неблагоприятные эффекты 6-ти часовой иммобилизации, выражающиеся в появлении коронарной гипотонии, снижении сократительной функции миокарда и развитии явления гиперперфузии сердца.

Коронародилататорный эффект ловушки супероксид-анионов тирона в изолированных сердцах крыс перенесших длительный стресс на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина, также как и в контроле, был обусловлен биологической активностью монооксида азота. Защитное действие N-ацетил-L-цистеина на тонус коронарных сосудов при стрессе является, вероятно, комплексным. Какая-то часть его положительных эффектов при стрессе может быть опосредована оксидом азота. Результаты проведенных нами ранее экспериментов показали, что предварительное введение N-ацетил-L-цистеина при стрессе повышает содержание в крови продуктов деградации монооксида азота [4], а внутрикоронарное введение сопровождается коронародилатацией, обусловленной высвобождением эндотелиального NO. Следовательно, защитный эффект N-ацетил-L-цистеина может быть связан с высвобождением монооксида азота из его депонированных форм. Хотя не исключено, что N-ацетил-L-цистеин способен повышать активность эндотелиальной NO-синтазы при стрессе через редокс-чувствительные механизмы регуляции функций этого фермента. Реализация этих двух механизмов действия N-ацетил-L-цистеина могла обеспечить уменьшение базального тонуса коронарных сосудов в контроле и после стресса при внутрикоронарном введении N-ацетил-L-цистеина. Еще один механизм защитного действия N-ацетил-L-цистеина на тонус коронарных сосудов при стрессе заключается, вероятно, в его прямом влиянии на редокс-состояние клеток, по крайней мере, через стимуляцию синтеза глутатиона и последующее изменение баланса между окисленным и восстановленным глутатионом.

Выводы

1. Коронародилататорный эффект ловушки супероксид-анионов тирона в изолированных сердцах крыс перенесших кратковременный и длительный стресс на фоне предварительного введения N-ацетил-L-цистеина, также как и в контроле, был обусловлен биологической активностью монооксида азота. Можно предположить, что наибольшее значение в регуляции тонуса сосудов имеют супероксид-анионы, образующиеся в эндотелиальных клетках коронарных сосудов, так как именно там имеется значительное напряжение активности синтеза монооксида азота.

2. Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина восстанавливало максимальный гиперемический коронарный поток сниженный при 0,5-ти часовом иммобилизационном стрессе и существенно ограничивало неблагоприятные эффекты 6-ти часовой иммобилизации, выражающиеся в появлении коронарной гипотонии, снижении сократительной функции миокарда и развитии явления гиперперфузии сердца.

3. N-ацетил-L-цистеин восстанавливал регуляторную роль супероксид-анионов в отношении тонуса коронарных сосудов при кратковременном стрессе и долговременном стрессе.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, договор Б03-240.

Литература

1. Дорошенко А.С. Вклад супероксид-аниона в регуляцию коронарного кровообращения и сократительной функции миокарда при иммобилизационном стрессе различной продолжительности // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования. Труды III международной научно-практической конференции. - Витебск, 2004. - С.82-88.
2. Новикова Е.Б. Об ауторегуляции в коронарной системе // Физиол. журнал. - 1972. - № 1. - С.61-74.
3. Солодков А.П., Божко А.П. Изменение активности эндотелиоцитов коронарных сосудов под влиянием стресса // Физиол. журн. им. И.М.Сеченова. - 1994. - Т.80, N 4. - С.65-72.
4. Солодков А.П., Дорошенко А.С., Шебеко В.И., Щербинин И.Ю. Эндотелий, ауторегуляция коронарных сосудов и стресс // Вестник Фонда фундаментальных исследований. - Минск, 2005. -№1. - С.84-99.
5. Шебеко В.И., Редокс-регуляция динамического характера фенотипа эндотелиоцитов кровеносных сосудов // Дисфункция эндотелия: экпер. и клин. исследования. Труды республик. научно-практ. конф., Витебск, 16-17 ноября 2000 г. / МЗРБ. Витебский гос. мед. университет. Белорус. обществ.
6. Girouard H, Chulak C, Wu L, Lejossec M, de Champlain J. N-acetylcysteine improves nitric oxide and alpha-adrenergic pathways in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats. // Am J Hypertens.-2003.-Jul, Vol.16, №7.-P.577-84.
7. Kamata H., Hirata H. Redox regulation of cellular function // Cell Signall.-1999.-Vol.11, №1.-P.1-14.
8. Kostic M.M., Schrader J. Role of nitric oxide in reactive hyperemia in the guinea pig heart // Circul. Res.-1992.-Vol.70, № 1.-P.208-212.
9. Price D.T., Vita J.A., Keaney J.F.Jr. Redox control of vascular nitric oxide bioavailability // Antioxid. Redox Signal.-2000.-Vol.2, №4.-P.919-935.