УДК 612-008.9-074

ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ ЛИЗОСОМАЛЬНОГО АППАРАТА И НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА МИКРОЭЛЕМЕНТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МИОКАРДА

[1]Хидирова Л.Д., [2]Маянская Н.Н.

[1]ГОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ, Новосибирск, e-mail: h_ludmila73@mail.ru;

[2]ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, e-mail: nmayansk@mail.ru

Биохимические исследования гомогената из ткани миокарда и сыворотки крови показали, что развитие некротических изменений в миокарде крыс Вистар сопровождалось значительным повышением активности лизосомальных ферментов в сердечной мышце с максимумом на 1–3 сутки и в сыворотке крови. Как показали результаты, экспериментальный инфаркт миокарда (ЭИМ) у крыс сопровождался значительными, закономерными фазовыми изменениями активности лизосомальных кислых гидролаз в сердечной мышце и в сыворотке крови. В динамике ЭИМ у крыс в 1–3 сутки наблюдается повышение концентрации железа в сыворотке: на 3 сутки данный показатель вырастает в 2 раза в сравнении с контролем. Однако самое выраженное повышение отмечается к концу исследования. Обращает на себя внимание относительное постоянство уровня цинка в миокарде животных с ЭИМ. В динамике не зарегистрировано достоверных изменений данного показателя. Динамика концентрации микроэлементов в сыворотке крови при экспериментальном инфаркте миокарда имела отрицательную корреляцию с активностью лизосомальных ферментов.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, лизосомальные ферменты, железо, цинк

PECULIARITIES OF ACTIVATION LYSOSOMAL APPARATUS AND THE EXCHANGE OF TRACE ELEMENTS IN THE EXPERIMENTAL DAMAGED MYOCARDIUM

[1]Hiidirova L.D., [2]Mayanskaya N.N.

[1]Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, e-mail: h_ludmila73@mail.ru;

[2] Kazan State Medical University, Kazan, e-mail: nmayansk@mail.ru

Biochemical investigations of homogenate from the myocardium and blood serum showed that the development of necrotic changes in the myocardium of rats Vistar are followed significant increase in the activity of the lysosomal enzymes in the heart muscle (maximum at 1-e-3-day) and in the serum. The results showed that the experimental myocardial infarction (EMI) in rats was accompanied by significant, regular variations in activity of lysosomal acid hydrolases in cardiac muscle and in the serum. In the dynamics of EMI in 1-e-3-day was an increase in the concentration of iron in the serum : on the 3rd day this figure grows up in 2 times in comparison with the control. However, the most pronounced increase was observed to the end of the study. Draws the attention of the relative constancy of the level of zinc concentration in animals with EMI. No significant changes of this indicator were registered. Dynamics of concentrations of microelements in blood serum at an experimental myocardial infarction, had a negative correlation with the activity of lysosomal enzymes.

Keywords: myocardial infarction, lysosomal enzymes, iron, zinc

Особую роль в развитии повреждения миокарда при различных гормональных нарушениях играют полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ) и их лизосомы. Нейтрофилы, благодаря своей высокой чувствительности и лабильности, способны быстро и точно отражать не только разнообразные нарушения в организме, но также и процессы восстановления.

Важным компонентом кислород независимой биоцидности нейтрофильных гранулоцитов является лизосомальный аппарат клеток. Отсюда представлялось интересным и важным оценить активность лизосомального аппарата не только в миокарде, но, учитывая лейкоцитарную инфильтрацию сердечной мышцы, также и в лейкоцитах.

Цель – изучить особенности активации лизосомального аппарата и обмена микроэлементов у крыс при экспериментальном повреждении миокарда .

Материалы и методы исследования

Экспериментальный окклюзионный инфаркт миокарда (ЭИМ) воспроизводился у крыс-самцов Вистар, массой 180–230 г. В опытах с ЭИМ использовано 36 животных. Контролем служили ложнооперированные (ЛО) – (15 крыс) и интактные (8 крыс) животные. Операция проводилась по методу Г. Селье с доступом по А.Х. Когану с соблюдением правил асептики и антисептики, под эфирным наркозом. Выживаемость животных после операции на протяжении всего исследования (14 суток) составила 50–60 %.

Ложная операция повторяла все этапы создания ЭИМ за исключением перевязки левой коронарной артерии, вместо чего делали укол миокарда в области проекции данного сосуда. Выживаемость животных после ЛО составила 100 %.

Сердечную мышцу подвергали гомогенизации. Для приготовления гомогената из ткани сердца по-

следняя предварительно измельчалась ножницами, растиралась в ступке с истолченным стеклом и суспендировалась в 9 объемах 0,25 М раствора сахарозы с 0,001 М ЭДТА, pH 7,4. Стекло и оставшиеся неразрушенными соединительно-тканные элементы удаляли центрифугированием при охлаждении на центрифуге ЦЛР-31 (2000 об/мин×5 мин). Затем в супернатанте и в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом активности лизосомальных ферментов (ЛзФ: кислая фосфотаза, ДНК-аза, катепсин D , β-галактозидаза).

Определение микроэлементов проводилось атомно-абсорбционным методом, который обладает рядом преимуществ (незначительное влияние солевого состава, почти полное отсутствие взаимных аберраций определяемых элементов). Как правило, заметные искажения вызывают только 100–1000-кратные превышения концентраций, образующие трудно диссоциируемые окислы, что делает этот метод предпочтительным для определения ряда элементов, в том числе микроэлементов.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась по общепринятым методикам пакетом прикладных программ Statistica 6.0, Microsoft Excel 7.0 на ПК PC Pentium (III)-650 МГц MMX.

Результаты исследования и их обсуждение

Лизосомы, рано и эффективно включающиеся в реализацию адаптивных реакций организма, при окклюзионной гипоксии, равно, как и при поломе гормональной регуляции могут освобождать активные кислые гидролазы в цитозоль и далее во внеклеточное пространство и циркулирующую кровь и тем самым инициировать процессы клеточного повреждения [1]. Действительно, биохимические исследования гомогената из ткани миокарда и сыворотки крови показали, что развитие некротических изменений в миокарде сопровождалось значительным повышением активности лизосомальных ферментовв органесмаксимумомна1–3-и сутки и в сыворотке крови. Как показали результаты, экспериментальный инфаркт миокарда (ЭИМ) у крыс сопровождался значительными, закономерными фазовыми изменениями активности лизосомальных кислых гидролаз в сердечной мышце и в сыворотке крови. Так, оказалось, что ЭИМ сопровождался умеренным увеличением активности кислой фосфатазы (КФ) и β-галактозидазы в сердечной мышце в 1–3-и сутки после операции. Эти величины мало отличались от активности соответствующих ферментов в гомогенате сердечной мышцы у ложнооперированных (ЛО) крыс. Однако в противоположность ЛО у животных с ЭИМ отмечалось резкое увеличение активности кислой ДНКза (более, чем в 5 раз) и катепсина D (более, чем в 18 раз в 1-е и почти в 8 раз на 3-и сутки), по сравнению с контролем. К 14 суткам ЭИМ активность всех измеряемых ферментов возвращалась к норме (табл. 1).

Развитие ЭИМ сопровождалось также закономерными изменениями активности лизосомальных ферментов в сыворотке крови. Так, через 1–3-и сутки после операции активность КФ более, чем в 10 раз превышала уровень активности у ЛО крыс, активность кислой ДНКзы – более чем в 6 раз, β-галактозидазы – почти в 3 раза. Выявлялась высокая активность катепсина D (10,86 ± 1,01 мкмоля тирозина/л сыворотки за 1 мин). На 14 сутки ЭИМ все еще оставалась повышенной активность кислой ДНК-азы и катепсина D, уровень активности остальных ферментов не отличался от величин, измеряемых у ЛО животных (см. табл. 1).

Таблица 1

Активность Лз ферментов в гомогенате сердечной мышцы у животных с ЭИМ (мкмоль/г белка/мин; n = 10; M ± m)

Ферменты	Контроль	1-е сут. после операции	3-и сут. после операции	14-е сут. после операции
В β-галактозидаза	3,3 ± 0,09	8,6 ± 0,89*	5,5 ± 0,43*	2,2 ± 0,03
кДНКза	3,9,0 ± 0,07	3,0 ± 0,02	2,8 ± 0,05	3,6 ± 0,07
КФ	7,7 ± 0,26	1,3 ± 1,91*	9,7 ± 1,37*	3,0 ± 0,32
Кат.D	0,64 ± 0,03	0,5 ± 0,03	0,4 ± 0,07	0,9 ± 0,11

Примечание. * достоверные отличия от уровня активности у ЛО животных (P < 0,05).

Микроэлементы являются коферментами самых различных ферментных систем, включая гидролазы, а также про- и антиоксидантные ферменты и, более того, активность данных ферментов напрямую зависит от содержания микроэлементов [2].

В динамике ЭИМ у крыс в 1–3-и сутки наблюдается повышение концентрации железа в сыворотке: на 3-и сутки данный показатель вырастает в 2 раза в сравнении с контролем. Однако самое выраженное повышение отмечается на 14-е сутки – практически в 5 раз! (табл. 2).

Таблица 2

Содержание железа и цинка в сыворотке крови у крыс с ЭИМ † (M ± m)

Сроки исследования	Fe	Zn
Контроль	0,42 ± 0,01	1,91 ± 0,01
1-е сутки	0,80 ± 0,01*#	1,0 ± 0,01*#
3-и сутки	0,91 ± 0,01#	0,80 ± 0,04*#
14-е сутки	1,90 ± 0,05*#	0,21+0,02*#
	$p_{3-1} < 0,05$ $p_{14-1} < 0,01$ $p_{14-3} < 0,05$	$p_{3-1} < 0,05$ $p_{14-1} < 0,05$ $p_{14-3} < 0,05$

Примечания: † – содержание МЭ в плазме выражается в мг/л; * – достоверность различий между группами; * – достоверность различий с контролем ($p < 0,05$).

Нарушения обмена микроэлементов при повреждении сердца (табл. 3) коррелируют с активацией лизосомального аппарата.

Таблица 3

Корреляционная зависимость содержания МЭ и лизосомальных ферментов в сердечной мышце и в сыворотке крови при ЭИМ

	β-галактозидаза	кДНКза	КФ	Кат.D
Fe A	–0,5	–0,6	–0,7	–0,7
B	–0,6	–0,7	– 0,8	+0,4
Zn A	+0,2	+0,3	+0,2	+0,3
B	+0,5	+0, 5	– 0,6	+0,5

Примечания: (+) положительная корреляция микроэлемента и лизосомального фермента в миокарде, ($r = 0,42$, $p < 0,05$). А – содержание МЭ в сердечной мышце; В – содержание МЭ в сыворотке крови.

Известны многочисленные клинические и экспериментальные данные о повышенном содержании железа как факторе риска развития ИБС. Установлено, что существует прямая связь между высоким уровнем сывороточного железа и риском фатального исхода инфаркта миокарда [4]. Этот отрицательный эффект ионов железа связывается с его активным влиянием на процессы ПОЛ. Так, при повышении концентрации железа в плазме резко интенсифицируются процессы ПОЛ в самых различных тканях: сердце, печени, селезёнке, самой плазме и т.д., что может приводить к повреждению лизосомальных мембран и утечке ЛзФ в плазму. Показано, что присутствие Fe^{2+} обязательно во всех системах образования активных радикалов кислорода из O_2 (митохондриальной, микросомальной, ксантиноксидазной и др).

Обращает на себя внимание относительное постоянство уровня цинка в миокарде у животных с ЭИМ. В динамике не зарегистрировано достоверных изменений данного показателя. По-видимому, этот факт связан с исключительной значимостью данного микроэлемента в защите кардиомиоцитов от повреждения. Значимость цинка связана с тем, что он является активным центром цитозольного фермента супероксиддисмутазы, цинк принимает участие в реакции дисмутации O_2^- в H_2O_2, выступая, таким образом, в качестве мощного антиоксиданта [5, 6]. Цинк улучшает восстановление функций миокарда после его искусственной остановки. Кроме этого, цинк, тормозя инактивацию оксида азота продуктами ПОЛ, косвенно выступает в качестве вазодилятатора. [8, 9]. Цинк индуцирует экспрессию в клетках белков-металлотионеинов и белков-иммунофиллинов (класса hsp – 70 (heat stress protein). Последние являются частью универсального механизма защиты клетки от стрессорных повреждений [7].

Список литературы

1. Панин Л.Е., Маянская Н.Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении.– Новосибирск: Наука, 1991. – С. 198.
2. Маянский Д.Н. Лекции по клинической патологии. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008.
3. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1994.
4. Антонов А.Р., Маянская Н.Н. Системные микроэлементозы. – Новосибирск: ЭКОР-КНИГА, 2006. – 72 с.
5. Белялов Ф.И. Инфаркт миокарда. – Иркутск, 2009. – 28 с.
6. Ольбинская Л.И., Литвицкий П.Ф. Коронарная и миокардиальная недостаточность. – М.: Медицина; 1986.
7. Куимов А.Д., Якобсон Г.С. Инфаркт миокарда. Клинические и патофизиологические аспекты. – Новосибирск, 1992.
8. Лабораторные методы исследования в клинике; под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1997.
9. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening / G. Petrosillo, G. Colantuono, N. Moro, F.M. Ruggiero, E. Tiravanti, N. Di Venosa, T. Fiore, G. Paradies // J Physiol Heart Circ Physiol. – 2009 Oct; 297(4):H1487–93. Epub 2009 Aug 14.

References

1. Panin L.E., Mayanskaya N.N., *Lizosomy: rol' v adaptacii i vosstanovlenii*. Novosibirsk; Nauka 1991. pp. 198.
2. Majanskij D.N. *Lekcii po klinicheskoj patologii*. M.: GJeOTAR-Media: 2008
3. Meerson F.Z. *Patogenez i preduprezhdenie ishemicheskih povrezhdenij serdca.* Medicina; 1994
4. Antonov A.R., Majanskaja N.N., *Sistemnye mikroelementozy*. Novosibirsk: «JeKOR-KNIGA», 2006. 72 p.
5. Beljalov F.I. *Infarkt miokarda*. Irkutsk; 2009. 28 p.
6. Ol'binskaja L.I., Litvickij P.F. *Koronarnaja i miokardial'naja nedostatochnost'*. M.: Medicina; 1986
7. Kuimov A.D., Jakobson G.S. *Infarkt miokarda. Klinicheskie i patofiziologicheskie aspekty*. Novosibirsk; 1992.
8. *Laboratornye metody issledovanija v klinike* (pod red. V.V.Men'shikova). M.: Medicina: 1997.
9. Petrosillo G., Colantuono G., Moro N., Ruggiero F.M., Tiravanti E., Di Venosa N., Fiore T., Paradies G. *J Physiol Heart Circ Physiol. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening*. 2009 Oct;297(4):H1487–93. Epub 2009 Aug 14.

Рецензенты:

Чурляев Ю.А., д.м.н., профессор, директор филиала, который сотрудничает с ГОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей Росздрава», ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия», с Кузбасским научным центром СО РАМН (г. Кемерово), ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет», г. Томск.

Ломиворотов В.Н., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФГУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Росмедтехнологий, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 11.04.2012.