

УДК 616.127-08

ИНТРАКОРОНАРНОЕ ВВЕДЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ КАК СПОСОБ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ЗАЩИТЫ МИОКАРДА

Мухамадияров Р.А., Веремеев А.В., Журавлева И.Ю.

ФГБУ «НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН,
Кемерово, e-mail: rem57@rambler.ru

В работе изучено влияние липосомальных препаратов различного состава на сократительную активность изолированного сердца крыс при гипотермической ишемии. Липосомы готовили из смеси лецитина и холестерина в молярном отношении 7:5 методом экструзии. В состав липосом включали препараты антиоксидантов (восстановленный глутатион, супероксиддисмутазу и альфа-токоферол) и макроэргические фосфаты (АТФ и креатинфосфат). Сердца перфузировали по Langendorff, а затем по Nilley. После 15-минутной адаптации сердец к условиям перфузии воспроизводили 30-минутную гипотермическую (14°C) ишемию низкого потока (low-flow ischemia) с гипоперфузией физиологическим раствором, липосомами или свободными макроэргическими фосфатами. После ишемии проводили реперфузию. Регистрировали минутный объем сердца и активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в оттекающем перфузате. Показано, что после ишемии без применения липосом происходит полное угнетение насосной функции сердца и цитоллиз кардиомиоцитов. При введении липосом с макроэргическими фосфатами наблюдалось частичное (30%) восстановление насосной функции и снижение выхода ЛДГ. После введения липосом с антиоксидантами объем сердечного выброса восстанавливался на 66% от исходного значения, при минимальных структурных повреждениях кардиомиоцитов. Гипоперфузия макроэргическими фосфатами (2% АТФ + 2% креатинфосфата в физиологическом растворе) также приводила к частичному восстановлению насосной функции миокарда и улучшению структурной сохранности кардиомиоцитов. Однако эффект от введения липосом с макроэргическими фосфатами был хуже, чем при использовании липосом с антиоксидантами.

Ключевые слова: липосомы, миокард, ишемия, реперфузия

INTRACORONARY INJECTION LIPOSOMAL PREPARATIONS IN CONDITIONS OF HYPOTHERMIC ISCHEMIA AS A METHOD INTRAOPERATIVE MYOCARDIAL PROTECTION

Mukhamidiarov R.A., Veremeev A.V., Zhuravleva I.Y.

Scientific research institute of complex problems of cardiovascular diseases FROM the Russian Academy
of Medical Science, Kemerovo, e-mail: rem57@rambler.ru

We studied the effect of different liposomal composites on the contractile activity of isolated rat hearts under condition of hypothermic ischemia. Liposomes were prepared using the extrusion method; lecithin and cholesterol were mixed in the ratio of 7:5. The liposomes included antioxidants (reduced glutathione, superoxide dismutase and alpha-tocopherol) and macroergic phosphates (ATP and phosphocreatine). Rat hearts were perfused according to Langendorff, and thereafter, they were perfused according to Nille. After adaptation of hearts to the condition of perfusion (15 min), we created a hypothermic (14°C) low-flow ischemia in hypoperfusion with physiologic saline, liposomes and macroergic free radicals for 30 minutes. Thereafter, ischemia reperfusion was performed. We measured cardiac output and lactate dehydrogenase (LDH) activity in the perfusate effluent. Complete inhibition of the pumping function of the heart and cytolysis of cardiomyocytes were observed after ischemia without application of liposomes. Cytolysis of cardiomyocytes was evaluated by LDH activity in the perfusate effluent. We found that injection of liposomes with macroergic phosphates resulted in partial (30%) recovery of pumping function and reduction of LDH release. In addition, we indicated that introduction of liposomes with antioxidants led to 66% recovery of the volume of cardiac output at minimal structural damage to cardiomyocytes. Hypoperfusion with macroergic phosphates (2% ATP + 2% phosphocreatine in physiologic saline) also led to a partial recovery of the myocardium and improvement of cardiomyocytes structural safety. However, the effect of macroergic phosphates was less evident in comparison with liposomes containing antioxidants.

Keywords: liposomes, myocardium, ischemia, reperfusion

В современной кардиохирургии широкое применение получило использование гипотермии, как наиболее доступного способа интраоперационной защиты ишемизированного миокарда. Однако данная технология является далеко не идеальной. Энергетический метаболизм после возобновления кровообращения и выхода из состояния искусственной гибернации не успевает восстановиться в полном объеме. Тем самым провоцируется энергетический сдвиг, перенасыщение кардиомиоцитов ионами кальция, что в конечном итоге приводит к функ-

циональной несостоятельности миокарда [7, 9, 10, 11, 12]. Также остается открытым вопрос о неконтролируемом выходе сердца из состояния гипотермии через фибрилляцию желудочков [12, 13, 4, 6, 10, 16]. Таким образом, является актуальным поиск новых способов интраоперационной защиты миокарда как через фармакологическое воздействие, так и в комплексе с другими методами. Перспективным способом снижения ишемических и реперфузионных повреждений является использование фармакологических препаратов, обеспечиваю-

щих восстановление энергетического пула клеток, дезактивация процессов липопероксидации и сохранность эндотелия сосудов [3, 5, 8, 13, 16]. В качестве таких препаратов могут быть использованы экзогенные макроэргические фосфаты и антиоксиданты [5, 13]. Однако эти вещества в свободной форме слабо проникают через клеточную мембрану. Решением данной проблемы может стать использование липосом, как контейнеров для адресной доставки лекарственного средства внутрь кардиомиоцитов, что обеспечивает значительное снижение действующих концентраций [2, 5]. Для целей фармакологической ишемической кардиопротекции важнейшим свойством липосом является их способность накапливаться в зоне инфаркта и осуществлять транспорт внутрь клеток [2, 5, 14, 15].

В данном исследовании была проведена оценка функциональной состоятельности миокарда после гипотермической ишемии и последующей реперфузии и возможности коррекции ишемических повреждений липосомальными препаратами антиоксидантов и макроэргических фосфатов.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводились на 40 крысах самцах популяции Вистар с массой тела 250–300 г. Под

тиопенталовым наркозом животным быстро вскрывали грудную клетку, извлекали сердце и фиксировали его на аортальной канюле перфузионной системы. Перфузионная среда представляла собой раствор Krebsa-Хензельяита, оксигенированный смесью 95% O₂ и 5% CO₂ (pO₂ = 450–550 мм рт. ст., pH = 7,4). После 15-минутной адаптирующей коронарной перфузии по методу Langendorff переходили на 15-минутную антеградную левопредсердную перфузию по Nilley в нормальном гемодинамическом режиме. При антеградной перфузии с 10 по 15 минуте из общего объема оттекающего перфузата отбирали аликвоту для определения активности лактатдегидрогеназы.

На 15 минуте антеградной перфузии измеряли величину коронарного протока и аортального выброса при сопротивлении перфузата 80 мм водного столба. После чего все исследуемые сердца были подвергнуты 60-минутной ишемии при температуре 14°C. Во время тотальной ишемии через аортальную канюлю сердца проводили гипоперфузию со скоростью 0,1 мл/мин раствором аденозинтрифосфата и креатинфосфата (2%АТФ + 2%КФ) или липосомальными препаратами антиоксидантов (супероксиддисмутазы, каталазы, альфа-токоферол (ЛП-АО)) или макроэргических фосфатов (ЛП-МЭФ). Липосомальные композиции получали по методике, описанной ранее [3], с использованием экструдера (Lipex Biomembranes, Canada). Размер пор мембран поликарбонатного фильтра составлял 50 нм, количество циклов экструзии – 20. Состав внутренней водной и липидной фаз липосом показан в таблице. Не включившиеся в липосомы препараты удаляли методом гель-фильтрации через колонку с Sepharose 4В.

Состав липосомальных композиций, использованных в эксперименте

Вид липосом	Липидная фаза		Внутренняя фаза
	Состав	Молярное соотношение	
ЛП-МЭФ	ФХ:Х	7:5	0,9%NaCl + 2%КФ + 2%АТФ
ЛП-АО	ФХ:Х:αТФ	7:5:0,5	0,9% NaCl + 2 мг/мл СОД + 2 мМ ГТ

Примечания:

ФХ – яичный фосфатидилхолин; Х – холестерин; КФ – креатинфосфат; αТФ – α-токоферол; СОД – супероксиддисмутазы; ГТ – восстановленный глутатион. ПЛ – «пустые» липосомы; ЭЛ – «энергетические» липосомы; АЛ – «антиоксидантные» липосомы.

Контрольной группой служили сердца, в которые вместо препаратов вводили физиологический раствор. Скорость гипоперфузии во время ишемии во всех группах составляла 0,1 мл/мин при концентрации липидов в липосомальных композициях 10 мг/мл. После этого сердца реперфузировали 15 мин по Langendorff, регистрируя каждые 5 мин показатели коронарного потока. Из общего объема оттекающего от сердца перфузата отбирали аликвоту для определения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (DiaSys, Германия). Затем переходили на 15 мин антеградную перфузию по Neelley для изучения минутного объема.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. В качестве критерия сравнения выбирали дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали достоверными при уровне значимости менее 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования насосной функции изолированного сердца в до- и постишемическом периоде позволили выявить следующие закономерности. Исходный минутный объем сердца был одинаковым во всех четырех группах и составил 53–60 мл/мин (рис. 1). Однако постишемическая реперфузия продемонстрировала существенные различия между исследованными группами. Так, насосная функция полностью отсутствовала у сердец контрольной группы. При реперфузии по Langendorff коронарный проток у этих сердец крыс был сохранен, хотя и снижен на 30% по сравнению с дру-

гими группами. Однако при переводе на антеградную перфузию сократимость миокарда была недостаточной для преодоления периферического сопротивления и насосная функция отсутствовала. При этом необходимо учитывать, что ишемический режим, избранный в данном эксперименте, не был слишком жестким – гипотермия при 14°C является оптимальной для сохранения структурной и функциональной активности миокарда [1, 8]. С другой стороны, оптимальное сохранение функции наблюдали в сердцах, защищаемых в ишемическом периоде липосомами, содержащими в мембранной фазе α -токоферол, а в водной – супероксиддисмутазу и восстановленный глутатион. Эти сердца при переходе на антеградную реперфузию по Neelley

восстанавливали показатели МОС на 70% от исходных значений и сохраняли стабильные значения на протяжении всего периода реперфузии.

В сердцах, защищаемых во время ишемии свободными макроэргическими фосфатами, а также их липосомальной формой, наблюдали восстановление насосной функции на 48 и 31% соответственно. Однако эти показатели имели в дальнейшем тенденцию к снижению и к 15-й минуте реперфузии по Neelley составили 33 и 20% от исходного соответственно. Необходимо отметить, что сердца, защищаемые липосомальной формой АТФ и КФ, демонстрировали достоверно ($p < 0,05$) худшую насосную функцию, чем при использовании свободной формы макроэргических фосфатов.

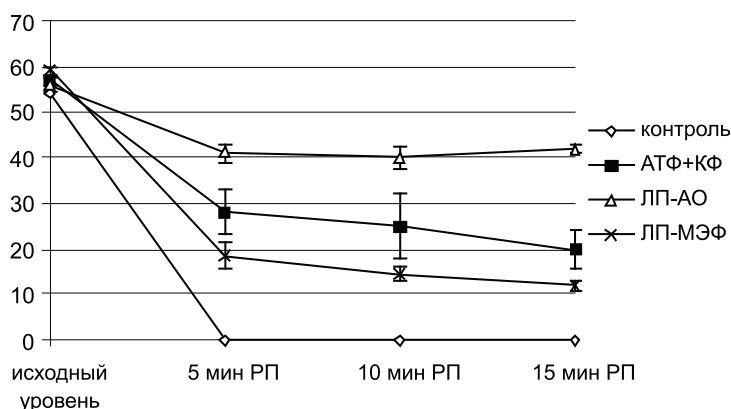


Рис. 1. Изменение минутного объема сердца в реперфузионном периоде после 60-минутной тотальной ишемии при 14°C. В течение ишемии проводилась гипоперфузия исследуемыми препаратами. Скорость гипоперфузии 0,1 мл/мин.

Условные обозначения: контроль – гипоперфузия 0,9% раствором NaCl, АТФ + КФ гипоперфузия раствором, содержащим 2% АТФ и 2% КФ, ЛП-МЭФ – гипоперфузия липосомальной композицией, содержащей внутри липосом 2% АТФ и 2% КФ, ЛП-АО – гипоперфузия липосомальной композицией, содержащей в составе липосом антиоксиданты – α -токоферол, супероксиддисмутазу и восстановленный глутатион

Этот феномен в значительной мере согласуется с данными, полученными при изучении активности ЛДГ в перфузате.

В контрольной группе без применения защиты на 5-й минуте реперфузии по Langendorff активность данного фермента в перфузате была в 3 раза выше исходной ($p < 0,01$), а к 15-й минуте – в 6 раз выше ($p < 0,01$) (рис. 2). Повышение активности фермента в перфузате обусловлено его выходом из клеток и указывает на значительные повреждения мембран кардиомиоцитов.

Минимальный выход ЛДГ наблюдали в группе с антиишемической защитой антиоксидантными липосомами: до 10-й минуты реперфузии активность фермента достоверно ($p > 0,05$) не отличалась от исходной, и лишь к 15-й минуте появилась тенденция к повышению активности.

В группах, защищаемых от ишемии свободной и липосомальной формами макроэргическими фосфатами, выход ЛДГ высок уже на 5-й минуте ретроградной реперфузии, хотя и достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем в контрольной группе. В дальнейшем активность фермента имеет тенденцию к повышению, причем показатели выше в группе, где использовали свободную форму макроэргических фосфатов.

Так как ЛДГ в норме является внутриклеточным ферментом и отсутствует во внеклеточных жидкостях, данные результаты можно интерпретировать следующим образом. Максимальное клеточное повреждение проявляется в контрольной точке сразу же по окончании периода ишемии. Последующая реперфузия, как известно, усиливает отрицательные эффекты ишемии за счет свободно-

го кислорода, поступающего в миокард при реоксигенации и не утилизируемого миокардиоцитами в связи с глубоким нарушением

метаболических циклов. Соответственно, возрастает и выход внутриклеточного фермента во внеклеточное пространство.

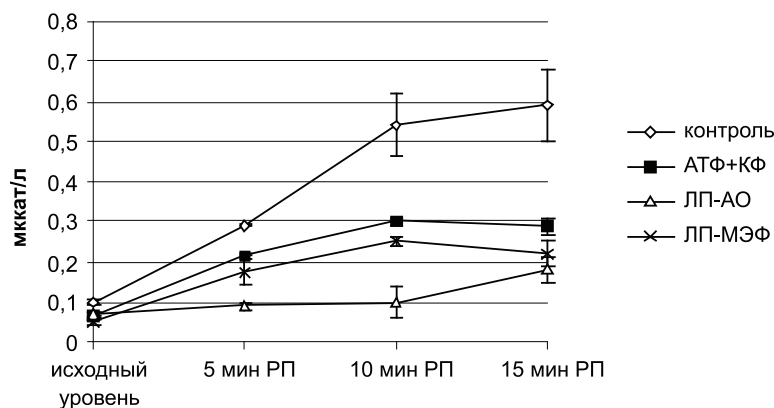


Рис. 2. Динамика активности ЛДГ в реперфузионном периоде после 60-минутной тотальной ишемии при 14 °С. В течение ишемии проводилась гипоперфузия исследуемыми препаратами. Скорость гипоперфузии 0,1 мл/мин. Условные обозначения: контроль – гипоперфузия 0,9% раствором NaCl, АТФ + КФ гипоперфузия раствором, содержащим 2% АТФ и 2% КФ, ЛП-МЭФ – гипоперфузия липосомальной композицией, содержащей внутри липосом 2% АТФ и 2% КФ, ЛП-АО – гипоперфузия липосомальной композицией, содержащей в составе липосом антиоксиданты – α -токоферол, супероксиддисмутазу и восстановленный глутатион

Минимальное клеточное повреждение, и, соответственно, лучшую сохранность насосной функции при ишемии и реперфузии обнаруживают сердца, защищаемые антиоксидантными липосомами.

Меньшее повреждение мембранных структур клетки, но при этом худшая функция выявлены в группе сердец крыс, защищаемых липосомами с макроэргическими фосфатами (в сравнении со свободной формой АТФ и КФ). По-видимому, это связано с прямым липосомальным транспортом АТФ в клетку и быстрым включением ее в катаболические процессы при достаточной сохранности мембран. Вероятно, что мембрана кардиомиоцитов, поврежденная во время ишемии, становится проницаемой для свободной формы АТФ и КФ, в связи с чем в этой группе наблюдали лучшее восстановление насосной функции, по сравнению с группой ЛП-МЭФ.

Выводы

Липосомальные препараты могут быть эффективно использованы для интраоперационной защиты изолированного сердца в условиях гипотермии. Свободные и липосомальные формы макроэргических фосфатов не оказывают ожидаемый защитный эффект. Напротив, при интракоронарном введении наиболее выраженное протективное действие оказывает липосомальная форма комплекса антиоксидантов, что проявляется в сохран-

ности минутного объема и достоверно более низком значении активности ЛДГ в оттекающем от сердца перфузате.

Список литературы

1. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
2. Включение и субклеточное распределение липосом в изолированном Л.С. ишемизированном миокард / И.Ю. Журавлева, Р.А. Мухамадияров, Н.Е. Марцияш, Л.С. Барбараш // Биосовместимость (Biomaterial-living system interactions). – 1995. – Т. 3, № 1–2. – С. 11–19.
3. Приготовление липосом сложного состава методами ультразвуковой сонификации и экструзии и их сравнительные характеристики / Р.А. Мухамадияров, А.В. Веремеев, И.Ю. Журавлева, И.А. Радионов, Н.Е. Марцияш // Медицинский вестник Башкортостана. – 2006. – № 1. – С. 259–263.
4. Allen D.G., Morris P.G., Orchard C.H. A Nuclear Magnetic Resonance Study of Metabolism in the Ferret Heart During Hypoxia and Inhibition of Glycolysis // J. Physiol. – 1985. – Vol. 361. – P. 185–204.
5. Caride V.J., Zaret B.L., Liposome accumulation in regions of experimental myocardial infarction // Science. – 1977. – Nov 18. – № 198 (4318). – P. 735–738.
6. Gordon J.L. Extracellular ATP: effects, sources and fate // Biochem. J. – 1986. – Vol. 233. – P. 309–319.
7. Ferrari R., Cutello S., Bofa G.M., Condorelli E., Rasini E., Guarneri G., Albertini A. Oxygen Free radical-mediated heart injury in animal models and during bypass surgery in human. Vitamin E. Biochemistry and health implications Annals of the New York Academy of Science / Eds: Diplock A.T., Machlin L.J., Parker L., Pryor W.A. – New York, 1989. – Vol. 750. – P. 237–253.
8. Kelly F.E., Nolan J.P. The effects of mild induced hypothermia on the myocardium: a systematic review // Anaesthesia. – 2010. – Vol. 65, № 5. – P. 505–515.
9. Kuzmin A.I., Lakomkin V.L., Kapelko V.I., Vassort G. Interstitial ATP level and degradation in control and postmyo-

cardial infarcted rats // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1998. – Vol. 275. – P. 766–771.

10. Nagami H., Yoshimoto N., Umakoshi H. Liposome-Assisted Activiti of Superoxide Dismutase under Oxidative Stress // *J. of Bioscience and Bioengineering.* – 2005. – Vol. 99, № 4. – P. 423–428.

11. Omoi N., Arai M., Saito M. Influence of Oxidative Stress on Fusion of Pre-Synaptic Plasma membranes of the Rat Brain with Phosphatidyl Choline Liposomes, and Protective Effect of Vitamin E // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 2006. – Vol. 52. – P. 248–255.

12. O'Rourke B. Myocardial KATP Channels in Preconditioning // *Circulation Research.* – 2000. – Vol. 10. – P. 845–855.

13. Verma D.D., Levchenko T.S., Torchilin V.P. et al. ATP-loaded Liposomes Effectively Protect Mechanical Functions of the Myocardium from Global Ischemia in an Isolated Rat Heart Model // *J. Control Release.* – 2005. – Vol. 108, № (2–3), – P. 460–471.

14. Tang C.S., Su J.Y., Li Z.P., Zhang L.Z., Yang J., Qi M., Liu F.A., Tang J. Possibility of targeting treatment for ischemic heart disease with liposome (I) // *Sci. china B.* – 1993. – Vol. 36, № 5. – P. 590–598.

15. Tang C.S., Su J.Y., Li Z.P., Zhang L.Z., Yang J., Qi M., Liu F.A., Tang J. Possibility of targeting treatment for ischemic heart disease with liposome (II) // *Sci china B.* – 1993. – Vol. 36, № 7. – P. 809–816.

16. Wiclund L. Heart preservation for transplantation. Experimental studies with special reference to coronary endothelial function and the role of antioxidants. – Goteborg, 1994. – 42 p.

References

1. Bilenko M.V. *Ishemicheskie I reperfuzionnie povredeniya organov.* Moskva, Meditsina, 1989. 368 p.

2. Zhuravleva I.Yu., Mukhamadiyarov R.A., Martsiyash N.E., Barbarash L.S. *Vklyuchenie i subkletnochnoe raspredelenie liposom v izolirovanniy ishemizirovanniy miokard. Biosovmestimost (Biomaterial-living system interactions, Russia).* 1995. Vol. 3. no. 1–2. pp. 11–19.

3. Mukhamadiyarov R.A. Veremeev A.V., Zhuravleva I.Yu., Radionov I.A., Martsiyash N.E. *Prigotovlenie liposom slozhnogo sostava metodami ultrazvukovoy sonifikatsii I ekstruzii I ikh sravnitelnie kharakteristiki.* *Meditsinskii vestnik Baskortostana.* 2006. no. 1. pp. 259–263.

4. Allen D.G., Morris P.G., Orchard C.H. A Nuclear Magnetic Resonance Study of Metabolism in the Ferret Heart During Hypoxia and Inhibition of Glycolysis. *J. Physiol.* 1985. Vol. 361. pp. 185–204.

5. Caride V.J., Zaret B.L., Liposome accumulation in regions of experimental myocardial infarction. *Science.* 1977. Nov 18. 198 (4318). pp. 735–738.

6. Gordon J.L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* 1986. Vol. 233. pp. 309–319.

7. Ferrari R., Cutello S., Bofa G.M., Condorelli E., Rasi-ni E., Guarneri G., Albertini A. Oxygen Free radical-mediated

heart injury in animal models and during bypass surgery in human. Vitamin E. *Biochemistry and health implications Annals of the New York Academy of Science.* / Eds: Diplock A.T., Machlin L.J., Parker L., Pryor W.A. New York, 1989. Vol. 750. pp. 237–253.

8. Kelly F.E., Nolan J.P. The effects of mild induced hypothermia on the myocardium: a systematic review. *Anaesthesia.* 2010. Vol. 65, no. 5. pp. 505–515.

9. Kuzmin A.I., Lakomkin V.L., Kapelko V.I., Vassort G. Interstitial ATP level and degradation in control and post-myocardial infarcted rats. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 1998. Vol. 275. pp. 766–771.

10. Nagami H., Yoshimoto N., Umakoshi H. Liposome-Assisted Activiti of Superoxide Dismutase under Oxidative Stress. *J. of Bioscience and Bioengineering.* 2005. Vol. 99, no. 4. pp. 423–428

11. Omoi N., Arai M., Saito M. Influence of Oxidative Stress on Fusion of Pre-Synaptic Plasma membranes of the Rat Brain with Phosphatidyl Choline Liposomes, and Protective Effect of Vitamin E. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2006. Vol. 52. pp. 248–255.

12. O'Rourke B. Myocardial KATP Channels in Preconditioning. *Circulation Research.* 2000. Vol. 10. pp. 845–855.

13. Verma D.D., Levchenko T.S., Torchilin V.P. et al. ATP-loaded Liposomes Effectively Protect Mechanical Functions of the Myocardium from Global Ischemia in an Isolated Rat Heart Model. *J. Control Release.* 2005. Vol. 108, no. (2–3), pp. 460–471.

14. Tang C.S., Su J.Y., Li Z.P., Zhang L.Z., Yang J., Qi M., Liu F.A., Tang J. Possibility of targeting treatment for ischemic heart disease with liposome (I). *Sci. china B.* 1993. Vol. 36. no. 5. pp. 590–598.

15. Tang C.S., Su J.Y., Li Z.P., Zhang L.Z., Yang J., Qi M., Liu F.A., Tang J. Possibility of targeting treatment for ischemic heart disease with liposome (II). *Sci china B.* 1993. Vol. 36, no. 7. pp. 809v816.

16. Wiclund L. Heart preservation for transplantation. Experimental studies with special reference to coronary endothelial function and the role of antioxidants. Goteborg, 1994. 42 p.

Рецензенты:

Будаев А.В., д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Кемерово;

Кувшинов Д.Ю., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия», г. Кемерово.

Работа поступила в редакцию 16.10.2012