

DOI: 10.26693/jmbs06.06.230

УДК 612.014.4; 591.044

Бесчасний С. П., Лисенко Є. М.

ВПЛИВ НИЗЬКИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ МОНООКСИДУ ВУГЛЕЦЮ НА МЕТАБОЛІЗМ ІЗОЛЬОВАНОГО СЕРЦЯ В УМОВАХ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

Херсонський державний університет, Україна

Мета дослідження – визначити вплив різних концентрацій СО на метаболізм ізольованих сердець мишей.

Матеріал та методи. Для з'ясування впливу низьких концентрацій монооксиду вуглецю на серцевий м'яз було проведено ретроградну перфузію ізольованих сердець лабораторних мишей розчинами Кребса-Хензелейта які насичували СО протягом 5, 10 та 30 хвилин. Після цього визначали, яким чином різні концентрації СО впливають на об'ємну швидкість коронарного потоку, споживання міокардом глюкози, кальцію, вивільнення креатиніну та аспартатамінотрансферази. Під час перфузії за допомогою електрокардіографа вимірювали амплітуду зубця R та інтервал R-R. Для визначення впливу ішемії на серцевий м'яз, в умовах перфузії розчинами з різними концентраціями СО, здійснювали вимірювання площі ураженого міокарду після зафарбовування 2,3,5-трифенілтетразолієм хлористим.

Результати. Після проведених досліджень було встановлено, що різні концентрації СО спричиняють дозозалежний вплив на ізольоване серце миші. При цьому збільшення концентрації не означало посилення несприятливого впливу на міокард. Навіть навпаки – найменша концентрація призводила до посилення ознак ішемічного ушкодження міокарду. Зокрема, використання розчину, через який пропускали СО протягом 5 хв, обумовлювало вазоконстрикторний ефект у період перфузії. Наприкінці реперфузії спостерігався вазоконстрикторний ефект у випадку застосування розчину, через який пропускали СО протягом 10 хв. Посилення споживання глюкози спостерігалось у групі із 30-ти хвилинним пропусканням СО на тлі мінімального вивільнення креатиніну із міокарду. У цій групі також відбувалося зменшення втрати міокардом Ca^{2+} на початку реперфузії (відразу після ішемії). Зазначене пояснює найменший розвиток ішемічного ушкодження міокарду ізольованого серця миші.

Висновок. Отримані результати вказують на те, що за різної концентрації СО може по різному впливати на різні структури у кардіоміоциті: одна концентрація зв'язується із кальцієвими каналами, інші впливають на йонні канали плазматичної мембрани чим і можна пояснити ці відмінності.

Ключові слова: ізольоване серце, монооксид вуглецю, об'ємна швидкість, глюкоза, креатинін.

Зв'язок роботи з науковими роботами, планами, темами. Дана робота є фрагментом НДР «Вплив деяких вазоактивних речовин на центральні та периферичні лімфоїдні органи білих мишей», № державної реєстрації 0117U001764.

Вступ. Сигнальні молекули газоподібних сполук є невеликими молекулами, котрі в організмі, тканині або клітині викликають фізіологічні або біохімічні зміни, тим самим беручи участь у регуляції та модуляції фізіологічних і біохімічних процесів. Частина газотрансмітерів утворюються ендогенно, інші є екзогенними речовинами [1].

До ендогенних газотрансмітерів належить монооксид вуглецю (СО). Дійсно, це отруйний газ, який є забруднювачем повітря та, завдяки своїм властивостям зв'язуватися із гем-вмісними білками, призводить до загибелі організму під час пожежі. Проте у 60-ті роки минулого століття було з'ясовано, що СО за нормальних умов може бути ендогенного походження. В тканинах селезінки унаслідок активності ферменту гемоксигенази під час деградації гемоглобіну відбувається вивільнення СО. Пізніше було виявлено, що СО, так само як і оксид нітрогену, здатен до активації розчинної гуанілатциклази. З'явилися дослідження, які вказують на протизапальні, антипроліферативні властивості СО, здатність припиняти апоптоз [2].

Ендогенна продукція СО контролюється ферментом гемоксигеназою (НО-1, К. Ф. 1.14.99.3, ізоформи НО-2, НО-3). Цей фермент індукується стресорними факторами: гіпоксією, окисним стресом, впливом важких металів, прозапальних цитокінів. НО-1 відома під назвою HSP-32 (Heat shock

protein-32, білок теплового шоку-32). Експресія NO-2 відбувається за нормальних фізіологічних умов, вважається конститутивною ізоформою, локалізованою лише у ендоплазматичному ретикулумі. NO-3 також є конститутивною формою, на 90% вона гомологічна із NO-2, каталітично є менш активною і «працює» у присутності кисню. Подібно до eNOS, експресія NO-1 та NO-2 виявлена у ендотеліальному шарі кровоносних судин, що вказує на її роль у регуляції судинного тонусу [3, 4]. NO-3 виявлена у тканинах багатьох органів – легенях, селезінці, серці, печінці, нервовій тканині. Цікавим є те, що ці ізоформи кодуються різними генами і за амінокислотним складом вони дуже різняться [5].

За фізіологічних умов продукція CO гемоксигеназами сягає $20 \mu\text{M} \cdot \text{год}^{-1}$ [6, 7]. Проте посилення вивільнення CO відбувається за патологічних умов: тяжка астма, при муковісцидозі, вірусних інфекціях дихальних шляхів, діабеті, риніті, метаболічному синдромі [8]. Попередні дослідження вказують на те, що CO, подібно до NO, впливає на тонус судин [9]. В основному дія CO пояснюється його участю у регуляції загальних сигнальних шляхів, зокрема стимуляції sGC, відкритті кальційзалежних калієвих каналів великої провідності (BKCa каналів), активації мітоген-активованих протеїнкіназ (MAPK) та Akt, індукції NOS. Разом з тим, результати цієї активації у багатьох випадках залежать від типів клітин та обставин впливу [10].

Проблема використання CO полягає у складності його дозування. Через це було запропоновано використовувати т.зв. сполуки-донори (carbon monoxide-releasing molecules, CORMs) [11-13]. Відомо, що сполуки-донори CO призводять до розслаблення попередньо скорочених стінок кілець аорти, розширюють ниркові аферентні артеріоли, знижують внутрішньонирковий судинний опір, знижують внутрішньопечінковий судинний опір та збільшують перфузійний потік у печінці. Власне CO може опосередковано знижувати судинний опір шляхом блокування синтезу потужних вазоконстрикторів, зокрема ендотеліну-1, цитохром P450-опосередкованої генерації вазоконстрикторів [12].

На клітинній лінії кардіоміоцитів щура H9c2 було виявлено протекторний вплив CO від ішемії-реперфузії шляхом інгібування Ca^{2+} каналів L-типу, що захищало їх від «перенавантаження» кальцієм, проте призводило до активації кальпаїну. Блокада спричиняла зниження потреби клітин у енергії, необхідній для скорочення, що у свою чергу відтермінувало ішемічну загибель [14].

Цікавим є те, що за нормальних умов CO діє як вазодилататор, а за умов окисного стресу може діяти як вазоконстриктор [15]. Про це свідчать експерименти, проведені на ниркових артеріях щурів. Відповідно, окисно-відновний стан клітини може

відігравати ключову роль у тому, як CO проявляє себе: як вазодилататор або вазоконстриктор. Такий механізм може вносити свій вклад у тонке налаштування судинного тонусу [16, 17].

Мета дослідження полягала у визначенні впливу різних концентрацій CO на метаболізм ізолюваних сердець мишей.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проводили із дотриманням Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту про захист тварин, що використовуються для наукових цілей та Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Мишей-самців розділили на 4 групи по 7 тварин у кожній, серця яких використовували для дослідження впливу різних концентрацій CO (перфузійний розчин насичували CO протягом 5, 10 та 30 хв). Ретроградну перфузію коронарних судин ізолюваного серця мишей здійснювали в умовах постійного тиску (70 ± 2 мм рт. ст.) теплим ($+37^\circ\text{C}$) перфузійним розчином Кребса-Хензелейта (ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO_4 – 1,2; KH_2PO_4 – 1,2; CaCl_2 – 2,5; глюкоза – 5,5; NaHCO_3 – 25. Перфузійний розчин (pH 7,2–7,4) постійно насичували вуглецем (95% O_2 і 5% CO_2). Перед початком вимірювань період стабілізації роботи серця становив 30 хв. Електричну активність серця досліджували у природному стані, штучну стимуляцію не проводили. Під час перфузії реєстрували електрограми серця електрокардіографом «МІДАС 6/12MINI» у II відведенні. Визначали об'ємну швидкість (ОШ) коронарного потоку вимірюванням об'єму, витікаючого з коронарних судин розчину (у мілілітрах за 1 хв) [18]. В отриманому перфузаті досліджували вміст глюкози, кальцію, креатиніну та аспартатамінотрансферази (AsAt) за допомогою набору реагентів НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна).

Для з'ясування впливу CO на ішемічне ушкодження міокарда, серця після реперфузії заморожували та нарізали кільцями товщиною 1,5–2 мм і фарбували 2,3,5-трифенілтетразолієм хлористим, який розчиняли у фосфатному буфері з pH 7,4. Площу некротичних ділянок (які не зафарбовувалися у червоний колір) вимірювали за допомогою програми ImageJ та виражали у відсотках до загальної площі зрізу. Для досліджень використовували реагенти фірми «Sigma-Aldrich» (США). Періоди перфузії, ішемії та реперфузії тривали по 30 хв.

Статистичний аналіз результатів проводили із використанням програми Statistica 6.0, показники виражали у вигляді середнього значення і стандартного відхилення. Достовірність відмінностей визначали за критерієм Мана-Уїтні та Вілкоксона. Зміни вважалися вірогідними при $P \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Різна тривалість пропускання CO через перфузійний розчин спричиняла різний вплив на об'ємну швидкість кровотоку (ОШ) ізольованого серця (рис. 1). Про зміни ОШ судили після порівняння показників першої та тридцятої хвилини (до ішемії), останньої хвилини перед ішемією та першої хвилини на початку реперфузії (перед ішемією – на початку реперфузії), першої хвилини і останньої хвилини реперфузії (початок – кінець реперфузії).

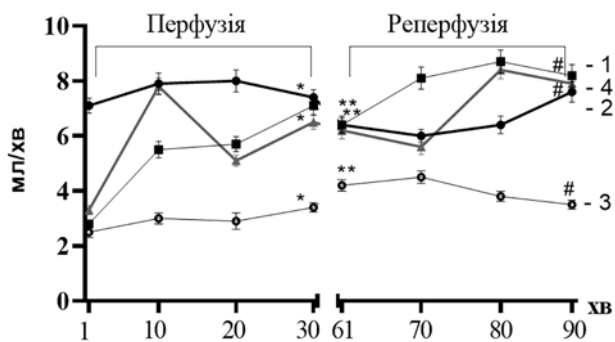


Рис. 1 – Динаміка об'ємної швидкості кровотоку ізольованого серця:

1 – контроль; 2 – насичення перфузійного розчину CO протягом 5 хв; 3 – протягом 10 хв; 4 – протягом 30 хв

Примітки: *P < 0,05 порівняно зі значеннями на початку перфузії; **P < 0,05 порівняно зі значеннями перед ішемією; #P < 0,05 порівняно зі значеннями на початку реперфузії

У контрольній групі перед початком ішемії ОШ збільшилася на 153%, на початку реперфузії – зменшилася на 9,8%, наприкінці реперфузії –

збільшилася на 28%. Використання перфузійного розчину, через який пропускали CO протягом 5 хв, збільшувало ОШ на 4,2% перед ішемією, знижувало ОШ на 13,5% на початку реперфузії та посилювало ОШ на 18,8% наприкінці реперфузії. Пропускання протягом 10 хвилин посилювало ОШ на 36% перед ішемією, після ішемії також спостерігали посилення на 23,5% та зниження на 16,7% наприкінці реперфузії. 30-хвилинне насичення перфузійного розчину CO спричиняло підвищення ОШ на 96,9% у період перед ішемією, проте на початку реперфузії знижувало ОШ на 4,6%, а наприкінці реперфузії спостерігалося збільшення на 27,42% (табл. 1).

Таблиця 1 – Зміни об'ємної швидкості кровотоку ізольованого серця, мл/хв, $m \pm M$

| Група | Перфузія | | Реперфузія | |
|----------|----------|----------|------------|----------|
| | початок | кінець | початок | кінець |
| Контроль | 2,8±0,1 | 7,1±0,4* | 6,4±0,3** | 8,2±0,4# |
| CO 5 хв | 7,1±0,3 | 7,4±0,3 | 6,4±0,3** | 7,6±0,4# |
| CO 10 хв | 2,5±0,2 | 3,4±0,2* | 4,2±0,2** | 3,5±0,2# |
| CO 30 хв | 3,3±0,2 | 6,5±0,3* | 6,2±0,3 | 7,9±0,3# |

Примітки: *P < 0,05 порівняно зі значеннями на початку перфузії; **P < 0,05 порівняно зі значеннями перед ішемією; #P < 0,05 порівняно зі значеннями на початку реперфузії.

Споживання глюкози ізольованим серцем у досліджуваних групах також мало свої відмінності. Перед ішемією у контрольній групі цей показник збільшився на 33%, у початковий період реперфузії – на 36%, наприкінці реперфузії, навпаки, знизився на 63% відносно вихідного рівня (рис. 2А).

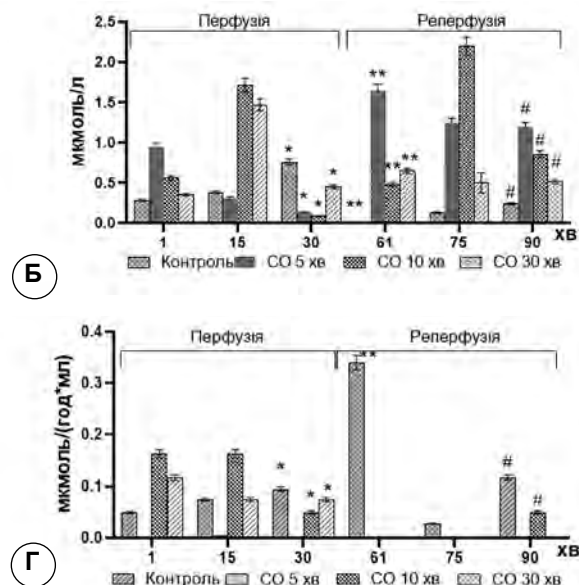
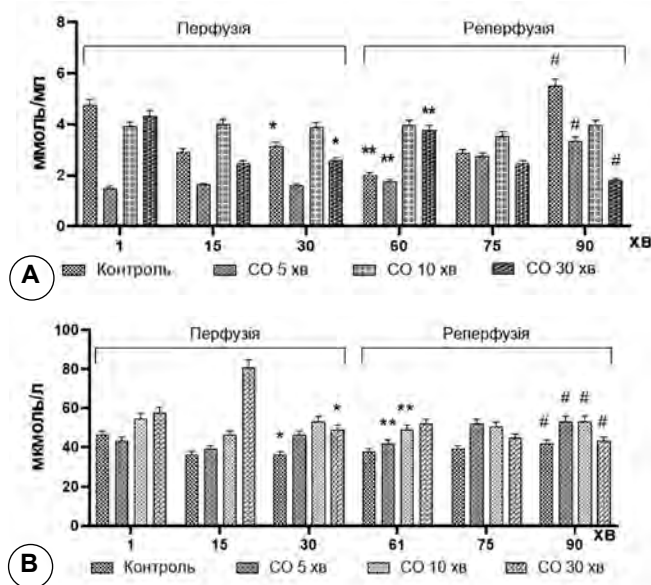


Рис. 2 – Динаміка змін біохімічних показників у перфузійному розчині, який витікав з ізольованого серця, під впливом на міокард різних концентрацій CO (А – вміст глюкози; Б – вміст Ca²⁺; В – вміст креатиніну; Г – вміст АсАт)

Примітки: *P < 0,05 порівняно зі значеннями на початку перфузії; **P < 0,05 порівняно зі значеннями перед ішемією; #P < 0,05 порівняно зі значеннями на початку реперфузії.

Дія перфузійного розчину, який насичували СО протягом 5 хвилин, у період до ішемії знижував споживання глюкози на 6%. На початку реперфузії споживання глюкози знизилося на 10%, а вже наприкінці реперфузії – на 90%. Разом з тим, після насичення протягом 10 хв не спостерігалось достовірних змін споживання глюкози міокардом. Насичення перфузійного розчину СО протягом 30 хв призвело до того, що перед ішемією споживання глюкози збільшилося на 40%, проте після ішемії спостерігалось її зниження на 47%. Наприкінці реперфузії знову спостерігалось посилення споживання глюкози на 53%.

Різна концентрація СО також чинить вплив на вміст кальцію у розчині, який відтікав від серця. У контрольній групі (рис. 2Б) перед ішемією депонування Ca^{2+} було знижене в 2,6 раза щодо вихідного значення. При порівнянні показників, отриманих на останній хвилині перед ішемією та на початку реперфузії, спостерігалось збільшення депонування кальцію у міокарді на 97%. Наприкінці реперфузії поглинання не лише знижувалося, а й відбувалося вивільнення кальцію із кардіоміоцитів, про що свідчить підвищення його вмісту в перфузійному розчині у 12 разів. Після п'ятихвилинного пропускання СО через перфузійний розчин та використання його для перфузії ізольованого серця, перед ішемією спостерігалось депонування Ca^{2+} міокардом на 85%, на початку реперфузії – кальцій виходив з міокарду (підвищення Ca^{2+} у 12 разів) але наприкінці реперфузії знову відбувалося поглинання і вміст Ca^{2+} у розчині знизився на 27% (табл. 2).

Насичення перфузійного розчину протягом 10 хв також спричиняло депонування Ca^{2+} , про що свідчить зниження його рівня на 84%. Разом з тим, на початку реперфузії вивільнення Ca^{2+} посилювалося у 5 разів. Наприкінці реперфузії надходження Ca^{2+} до перфузійного розчину збільшилося на 78%. Перед ішемією 30-хвилинне пропускання СО посилювало вивільнення Ca^{2+} з міокарду на 28%. Відразу на початку реперфузії – збільшення сягало 43%, проте наприкінці реперфузії кальцій знов почав депонуватися міокардом.

Вміст креатиніну у контрольній групі в період перед

ішемією був знижений на 22% (рис. 2В). На початку реперфузії він збільшився на 4% відносно періоду до ішемії, наприкінці реперфузії – на 12%. Пропускання СО протягом 5 хв через перфузійний розчин у період до ішемії посилювало вивільнення креатиніну на 7%, проте, на початку реперфузії, відбувалося зниження на 9%. Наприкінці реперфузії вивільнення креатиніну збільшилося на 28%. Після 10-ти хвилинного насичення у період до ішемії не спостерігалась достовірна зміна рівня креатиніну. Проте на початку реперфузії вивільнення креатиніну знизилося на 8%. Наприкінці реперфузії – вивільнення креатиніну збільшилося на 9%. Пропускання СО через розчин протягом 30 хв перед ішемією призводило до зниження рівня креатиніну на 15%, на початку реперфузії – вивільнення збільшилося на 6%, а наприкінці реперфузії знову рівень знизився на 17%.

Вміст аспартатамінотрансферази (яка є маркером пошкодження кардіоміоцитів) за умов перфузії розчинами з різною концентрацією СО мав різну динаміку (рис. 2Г). У контрольній групі перед ішемією цей показник збільшився на 90% від вихідного рівня, на початку реперфузії – на 258%, а наприкінці реперфузії зменшився на 68%. Вміст АсАт за умови використання розчину, через який пропускали СО протягом 5 хв, зовсім не

Таблиця 2 – Біохімічні показники перфузійного розчину під впливом різних концентрацій СО, який витікав з ізольованого серця, $m \pm M$

| Група | Перфузія | | Реперфузія | |
|---|---------------|----------------|-----------------|----------------|
| | початок | кінець | початок | кінець |
| вміст глюкози, ммоль/мл | | | | |
| Контроль | 4,749± 0,237 | 3,156 ± 0,158* | 2,011 ± 0,101** | 5,503± 0,275# |
| СО 5 хв | 1,500± 0,075 | 1,592 ± 0,079 | 1,760± 0,088** | 3,352± 0,168# |
| СО 10 хв | 3,911± 0,196 | 3,883± 0,194 | 3,966± 0,198 | 3,966± 0,198 |
| СО 30 хв | 4,330± 0,216 | 2,570± 0,129* | 3,771± 0,189** | 1,788± 0,089# |
| вміст Ca^{2+}, мкмоль/л | | | | |
| Контроль | 0,287± 0,014 | 0,761± 0,038* | 0,020± 0,001** | 0,247± 0,012# |
| СО 5 хв | 0,949± 0,047 | 0,138± 0,007* | 1,650± 0,083** | 1,196± 0,059# |
| СО 10 хв | 0,563± 0,028 | 0,089± 0,004* | 0,484± 0,024** | 0,860± 0,043# |
| СО 30 хв | 0,356± 0,018 | 0,455± 0,023* | 0,652± 0,033** | 0,514± 0,026# |
| вміст креатиніну, мкмоль/л | | | | |
| Контроль | 46,124± 2,306 | 36,034± 1,802* | 37,476± 1,874 | 41,800± 2,090# |
| СО 5 хв | 43,241± 2,160 | 46,124± 2,306 | 41,800± 2,090** | 53,331± 2,667# |
| СО 10 хв | 54,772± 2,739 | 53,331± 2,667 | 49,007± 2,450** | 53,331± 2,667# |
| СО 30 хв | 57,655± 2,883 | 49,007± 2,450* | 51,889± 2,594 | 43,241± 2,162# |
| вміст аспартатамінотрансферази, ммоль (год*мл) | | | | |
| Контроль | 0,050± 0,002 | 0,095± 0,004* | 0,340± 0,014** | 0,118± 0,005# |
| СО 5 хв | 0,000± 0,000 | 0,000± 0,000 | 0,000± 0,000 | 0,000± 0,000 |
| СО 10 хв | 0,163± 0,008 | 0,050± 0,003* | 0,000± 0,000 | 0,050± 0,003# |
| СО 30 хв | 0,118± 0,006 | 0,075± 0,004* | 0,000± 0,000 | 0,000± 0,000 |

Примітки: *P < 0,05 порівняно зі значеннями на початку перфузії; **P < 0,05 порівняно зі значеннями перед ішемією; #P < 0,05 порівняно зі значеннями на початку реперфузії.

збільшувався. У розчині, через який пропускали CO протягом 10 хв на початку перфузії, вміст АсАт сягав $0,163 \pm 0,008$ мкмоль/(год*мл), перед ішемією цей показник знизився на 69%. Аналогічна ситуація спостерігалася і після 30-ти хвилинного насичення розчину: на початку перфузії $0,118 \pm 0,006$ мкмоль/(год*мл), перед ішемією зафіксоване зниження на 63%.

Цікавими виявилися результати, отримані при дослідженні електрокардіографічних параметрів ізольованого серця. У контрольній групі амплітуда зубця R перед ішемією підвищилася у 4,9 рази, у період ішемії – на 5% (рис. 3А). При цьому на початку реперфузії вона знизилася на 49% (відносно значень наприкінці ішемії), наприкінці реперфузії – збільшилася на 71%.

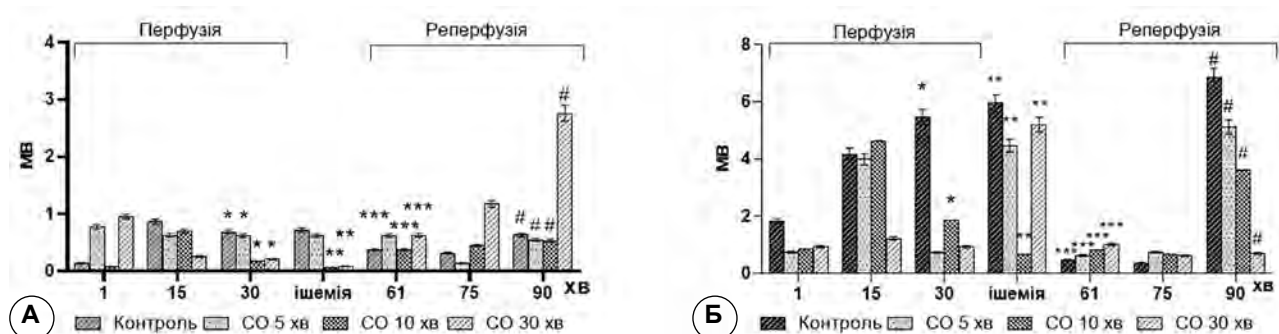


Рис. 3 – Електрокардіографічні параметри ізольованого серця під впливом різних концентрацій CO (А – амплітуда зубця R; Б – Тривалість інтервалу R-R)

Примітки: *P <0,05 порівняно зі значеннями на початку перфузії; **P <0,05 порівняно зі значеннями перед ішемією; *** P <0,05 порівняно зі значеннями під час ішемії; # P <0,05 порівняно зі значеннями на початку реперфузії.

Насичення CO перфузійного розчину протягом 5 хв впливало на показники амплітуди наступним чином: під час перфузії вона знижувалася на 19%, натомість під час ішемії та на початку реперфузії вона не змінювалася. Лише наприкінці реперфузії відбулося зниження на 12%. Насичення протягом 10 хв обумовило підвищення амплітуди у 2 рази на початку перфузії, під час ішемії відбулося її зниження на 62%. На початку реперфузії спостерігалася підвищення амплітуди у 5,9 разів, наприкінці реперфузії встановлено підвищення на 42%. У випадку насичення протягом 30 хв під час перфузії спостерігалася зниження амплітуди на 78%, під час ішемії – зниження на 58%. Проте на початку реперфузії відбулося підвищення амплітуди у 7 разів, а наприкінці реперфузії – у 4 рази (табл. 3).

Тривалість інтервалу R-R у контрольній групі перед ішемією збільшилася у 3 рази, під час ішемії – усього на 9%, на початку реперфузії відбулося вкорочення інтервалу на 92% та наприкінці реперфузії – знову відбулося подовження інтервалу у 15 разів. 5-ти хвилинне пропускання CO через перфузійний розчин проявилася подовженням інтервалу у 6 разів під час ішемії, проте на початку реперфузії цей показник знизився у 7 разів. Наприкінці реперфузії відбулося подовження інтервалу у 8 разів (рис. 3Б). 10-ти хвилинне пропускання CO спричинило подовження інтервалу перед ішемією у 2 рази, під час ішемії спостерігалася його вкорочення у 2,7 разів. На початку реперфузії відбувалося подовження інтервалу на 21%. Наприкінці реперфузії виявлено подовження інтервалу у 4 рази.

Таблиця 3 – Показники амплітуди зубця R (мВ) та інтервалу R-R (мс), $m \pm M$

| Група | 1 хв | 30 хв | Ішемія | 61 хв | 90 хв |
|-------------------------------|-------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| амплітуда зубця R (мВ) | | | | | |
| Контроль | $0,140 \pm 0,010$ | $0,69 \pm 0,007^*$ | $0,725 \pm 0,036$ | $0,372 \pm 0,019^{***}$ | $0,636 \pm 0,032^{\#}$ |
| CO 5 хв | $0,775 \pm 0,039$ | $0,625 \pm 0,031^*$ | $0,625 \pm 0,031$ | $0,625 \pm 0,031$ | $0,550 \pm 0,028^{\#}$ |
| CO 10 хв | $0,080 \pm 0,004$ | $0,170 \pm 0,009^*$ | $0,063 \pm 0,003^{**}$ | $0,375 \pm 0,019^{***}$ | $0,533 \pm 0,027^{\#}$ |
| CO 30 хв | $0,955 \pm 0,048$ | $0,210 \pm 0,011^*$ | $0,088 \pm 0,004^{**}$ | $0,630 \pm 0,032^{***}$ | $2,760 \pm 0,138^{\#}$ |
| інтервал R-R (мс) | | | | | |
| Контроль | $1,830 \pm 0,091$ | $5,470 \pm 0,274^*$ | $5,950 \pm 0,297^{**}$ | $0,470 \pm 0,024^{***}$ | $6,850 \pm 0,343^{\#}$ |
| CO 5 хв | $0,750 \pm 0,037$ | $0,730 \pm 0,036$ | $4,460 \pm 0,223^{**}$ | $0,630 \pm 0,031^{***}$ | $5,110 \pm 0,255^{\#}$ |
| CO 10 хв | $0,850 \pm 0,005$ | $1,870 \pm 0,002^*$ | $0,670 \pm 0,006^{**}$ | $0,810 \pm 0,003^{***}$ | $3,590 \pm 0,003^{\#}$ |
| CO 30 хв | $0,940 \pm 0,047$ | $0,930 \pm 0,046$ | $5,200 \pm 0,260^{**}$ | $1,020 \pm 0,051^{***}$ | $0,700 \pm 0,035^{\#}$ |

Примітки: *P <0,05 порівняно зі значеннями на початку перфузії; **P <0,05 порівняно зі значеннями перед ішемією; *** P <0,05 порівняно зі значеннями під час ішемії; # P <0,05 порівняно зі значеннями на початку реперфузії.

Пропускання СО протягом 30 хв у період до ішемії не впливало на зміни інтервалу. Проте під час ішемії подовження збільшилося в 6 разів. На початку реперфузії відбулося вкорочення інтервалу у 5 разів, а наприкінці – на 69%.

Цікавими виявилися результати вимірювання площі ішемічного міокарду на зрізах (рис. 4). Найбільше ураження спостерігалось після використання перфузійного розчину через який пропускали СО протягом 5 хвилин (ушкодження сягало 52%). Найменше – після розчину, через який СО пропускали 30 хв (18%). Схожі результати були у контрольній групі та у групі із використанням розчину, через який пропускали СО протягом 10 хвилин (31% та 25% відповідно).

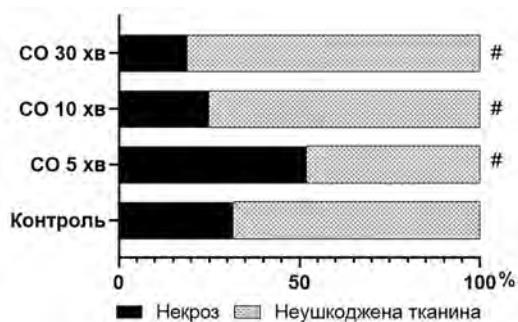


Рис. 4 – Вплив різних концентрацій СО на ступінь розвитку некрозу після ішемії-реперфузії ізольованого серця миші

Примітка: #P <0,05 порівняно з контролем.

Проведені дослідження вказують на те, що вплив низьких концентрацій СО має дозозалежні ефекти. Різні концентрації СО впливали як на біохімічні, так і на електрокардіографічні показники ізольованого серця миші. За динамікою ОШ найбільш стабільні показники спостерігалися у випадку використання перфузійного розчину через який пропускали СО протягом 5 хв. Споживання глюкози у цій групі посилювалося у період реперфузії. Депонування Ca^{2+} у цьому випадку відбувалося в період перфузії. Відразу після ішемії спостерігали дуже суттєве вивільнення Ca^{2+} з міокарду до перфузійного розчину. Маркером пошкодження міокарду є рівень креатиніну, який у цій групі посилено починав вивільнятися наприкінці реперфузії. Активність ферменту АсАт за цих умов не була виявлена, що вказує на відсутнє пошкодження кардіоміоцитів. Амплітуда зубця R була найбільш стабільною у цій групі.

Розчин, через який пропускали СО протягом 10 хвилин, посилював ОШ у період перфузії та на початку реперфузії (вказує на можливий вазодилататорний вплив після ішемії). Споживання глюкози при цьому істотно не змінювалося. Динаміка Ca^{2+} також показала депонування його у міокарді під час перфузії, а у період реперфузії – вихід у

розчин. Вивільнення креатиніну у цій групі було невеликим і незначно підвищилося наприкінці реперфузії (найменше з усіх груп). Отримані результати пояснюють те, чому у різних джерелах не існує єдиної думки стосовно впливу незначних концентрацій СО. Часто вплив СО пов'язували із гіпотонією [19], або навпаки – гіпертонією [20] та впливом на судинноруховий центр [21].

Разом з тим, найбільш наближені до ОШ контролю були показники після використання розчину через який пропускали СО протягом 30 хв. Тут спостерігалось посилення споживання глюкози у період перфузії та реперфузії, вказуючи на процес ішемії. У деяких дослідників зазначено, що при збільшенні рівня СО відбувається посилення споживання кисню, зміни у метаболізмі глюкози [22]. Стосовно періодів до ішемії та реперфузії, то Ca^{2+} переходив із міокарду до перфузійного розчину. Наприкінці реперфузії відбувалося поглинання Ca^{2+} . Зазначені результати можуть пояснити розвиток гіпертрофії міокарда при хронічному впливові СО [23], порушення водно-сольового балансу [24].

Насичення перфузійного розчину СО призвело до подовження інтервалу R-R. При цьому, найменший вплив встановлено у період до ішемії у групі, в якій використовували розчини через які пропускали СО протягом 5 та 30 хв. Отримані результати узгоджуються з іншими дослідниками, які виявили порушення шлуночкової провідності та явища блокади у серці кролів [25].

За даними Тиунова Л.А. та Кустова В.В. отруєння СО спричиняють ушкодження міокарда, його дегенерацію [26]. Проте використання низьких та короткотривалих концентрацій СО показало протилежний ефект. Найнижчий відсоток ішемічної зони (у порівнянні з іншими групами та контролем) виявлено у групі, в якій використовували розчин, насичений СО протягом 30 хв. Також наближеним до контролю був показник, отриманий у групі, для якої використовували перфузійний розчин через який пропускали СО протягом 10 хв. Таким чином, виявлено дозозалежний ефект впливу невеликих концентрацій СО на міокард. При цьому, найменша його концентрація не означає найменший вплив на біохімічні показники та мінімальне ішемічне ушкодження.

Висновки. Різні концентрації СО спричиняють дозозалежний вплив на ізольоване серце миші. Проте, вираженість ефектів не підпорядковується залежності «найменша концентрація-найменший вплив». Найменша концентрація здатна впливати потужніше, ніж концентрація у 10 разів більша. Невисока концентрація СО у перфузійному розчині обумовлювала вазоконстрикторний ефект у період перфузії. Наприкінці реперфузії спостерігався вазоконстрикторний ефект у випадку застосування

розчину через який пропускали CO протягом 10 хв. Посилення споживання глюкози спостерігалось у групі із 30-ти хвилинним пропусканням CO на тлі мінімального вивільнення креатиніну із міокарду. У цій групі також відбувалося зменшення втрати Ca^{2+} на початку реперфузії (відразу після ішемії). Це по-

яснює найменший розвиток ішемічного ушкодження міокарду ізольованим серцем миші.

Перспективи подальших досліджень. Результати потребують подальшого розширення досліджень функціонального стану серця в умовах дії сполук-донорів монооксиду вуглецю.

References

1. Kukoba TV, Moybenko OO. Hemoksyhenaza ta monooksyd vuhletsyu: zakhyst chy poshkodzhennya klityn? [Hemoxygenase and carbon monoxide: protection or cell damage?]. *Fiziol Zh.* 2002;48(5):79-92. [Ukrainian]
2. Motterlini R, Otterbein LE. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(9):728–743. PMID: 20811383. doi: 10.1038/nrd3228
3. Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharm Rev.* 2008;60:79–127. PMID: 18323402. doi: 10.1124/pr.107.07104
4. Abrahams S, Haylett WL, Johnson G, Carr JA, Bardien S. Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review. *Neurosci.* 2019;406:1-21. PMID: 30825584. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.02.020
5. McDonagh AF. Is bilirubin good for you? *Clin Perinatol.* 1990;17:359–369. doi: 10.1016/S0095-5108(18)30572-4
6. Marks GS, Brien JF, Nakatsu K, McLaughlin BE. Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12:185–188. doi: 10.1016/0165-6147(91)90544-3
7. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 1987;235:1043–1046. PMID: 3029864. doi: 10.1126/science.3029864
8. Beschasnyi S, Hasiuk O, Shakhman N, Sheldahayeva H. Oxidative stress in athletes after occasional smoking. *J Phys Educat Sport.* 2021;21(2):942-947. doi: 10.7752/jpes.2021.02117
9. Lamon BD, Zhang FF, Puri N, Brodsky SV, Goligorsky MS, Nasjletti A. Dual pathways of carbon monoxide-mediated vasoregulation: modulation by redox mechanisms. *Circ Res.* 2009;105:775–783. PMID: 19745167. PMID: PMC2771695. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.197434
10. Deniz T, Kandis H, Eroglu O, Gunes H, Saygun M, Kara IH. Carbon monoxide poisoning cases presenting with non-specific symptoms. *Toxicol Industrial Health.* 2017;33(1):53-60. PMID: 27495248. doi: 10.1177/0748233716660641
11. Petrova IV, Birulina JG, Trubacheva OA, Belyaeva SN, Shnayder OL, Nosarev AV, et al. Eksperimentalnaya otsenka vliyaniya ekzogennogo monooksida ugleroda na kletki krovi [Experimental estimation of the effects of exogenous carbon monoxide on blood cells]. *Bull Siberian Med.* 2020;19(1):94-100. [Russian]. doi: 10.20538/1682-0363-2020-1-94–100
12. Motterlini R, Foresti R. Biological signaling by carbon monoxide and carbon monoxide-releasing molecules. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2017;312(3):C302-C313. PMID: 28077358. doi: 10.1152/ajpcell.00360.2016
13. Beschasnyi S, Hasiuk O. CO-releasing molecule (CORM-2) in the regulation of Ca^{2+} -dependent K^{+} -permeability of erythrocyte. *Ukr J Med Biol Sport.* 2020;2(24): 66-171. doi: 10.26693/jmbs05.02.166
14. Johnson TE, Wells RJ, Bell A, Nielsen VG, Olver CS. Carbon monoxide releasing molecule enhances coagulation and decreases fibrinolysis in canine plasma exposed to *Crotalus viridis* venom in vitro and in vivo. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2019;125(4):328-336. PMID: 31059181. doi: 10.1111/bcpt.13242
15. Metere A, Iorio E, Scorza G, Camerini S, Casella M, Crescenzi M, et al. Carbon monoxide signaling in human red blood cells: evidence for pentose phosphate pathway activation and protein deglutathionylation. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(3):403-416. PMID: 23815439. PMID: PMC3894680. doi: 10.1089/ars.2012.5102
16. Wang R, Wu L. The chemical modification of KCa channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1997;272:8222–8226. PMID: 9079640. doi: 10.1074/jbc.272.13.8222
17. Kotsyuba AY, Chertok VM, Khramova IA. Vliyaniye sistemy gemoksygenaza-monooksid ugleroda (HO-CO) na reaktivnost' vetvey matochnoy arterii u krysa [Effect of the heme oxygenase-carbon monoxide (HO-CO) system on the reactivity of the branches of the uterine artery in rats]. *Byull Eksp Biol Med.* 2019;167(6):767-771. [Russian]
18. Sagach VF, Dorofeyeva NA, Drachuk KO. Contribution of hydrogen sulfide to cardio-vascular function restoration in old rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;120:35. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.05.108
19. Goldstein M. Carbon monoxide poisoning. *J Emergency Nurs.* 2008;34(6): 538-542. PMID: 19022078. doi: 10.1016/j.jen.2007.11.014
20. Hoetzel A, Schmidt R. Carbon monoxide-poison or potential therapeutic? *Der Anaesthetist.* 2006;55(10):1068-1079. PMID: 16826415. doi: 10.1007/s00101-006-1056-x
21. Kinoshita H, Türkan H, Vucinic S, Naqvi S, Bedair R, Rezaee R, et al. Carbon monoxide poisoning. *Toxicol Rep.* 2020;7:169-173. PMID: 32015960. PMID: PMC6992844. doi: 10.1016/j.toxrep.2020.01.005

22. Eichhorn L, Thudium M, Jüttner B. The diagnosis and treatment of carbon monoxide poisoning. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(51-52):863. PMID: 30765023. PMCID: PMC6381775. doi: 10.3238/arztebl.2018.0863
23. Kim H, Choi S. Therapeutic aspects of carbon monoxide in cardiovascular disease. *Int J Molec Sci.* 2018;19(8):2381. PMID: 30104479. PMCID: PMC6121498. doi: 10.3390/ijms19082381
24. Jeon SB, Sohn CH, Seo DW, Oh BJ, Lim KS, Kang DW, et al. Acute brain lesions on magnetic resonance imaging and delayed neurological sequelae in carbon monoxide poisoning. *JAMA Neurol.* 2018;75(4):436-443. PMID: 29379952. PMCID: PMC5885203. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.4618
25. Rose J, Nouriae M, Gauthier M, Pizon A, Saul M, Donahoe M, et al. Clinical outcomes and mortality impact of hyperbaric oxygen therapy in patients with carbon monoxide poisoning. *Critical Care Med.* 2018;46(7):e649. PMID: 29629990. PMCID: PMC6005724. doi: 10.1097/CCM.0000000000003135
26. Тиунов ЛА, Кустов ВВ. *Токсикологија окиси углерода* [Carbon monoxide toxicology]. М: Медіцина; 1980. 142 p. [Russian]

УДК 612.014.4; 591.044

**ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА
НА МЕТАБОЛИЗМ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ**
Бесчасный С. П., Лысенко Е. Н.

Резюме. *Цель исследования* – определить влияние разных концентраций СО на метаболизм изолированных сердец мышей.

Материалы и методы. Для выяснения влияния низких концентраций монооксида углерода на миокард было проведено ретроградную перфузию изолированных сердец лабораторных мышей раствором Кребса-Хензелейта, который насыщали СО в течение 5, 10 и 30 минут. После этого определяли, каким образом разные концентрации СО влияют на объемную скорость коронарного потока, потребление миокардом глюкозы, кальция, высвобождение креатинина и аспартатаминотрансферазы. Во время перфузии при помощи электрокардиографа измеряли амплитуду зубца R и интервал R-R. Для определения влияния ишемии на сердечную мышцу в условиях перфузии растворами с разными концентрациями осуществляли измерение площади пораженного миокарда после окрашивания 2,3,5-трифенилтетразолием хлористым.

Результаты. После проведенных исследований было установлено, что разные концентрации СО оказывают дозозависимое влияние на изолированное сердце мыши. При этом увеличение концентрации не означало усиление неблагоприятного воздействия на миокард. Даже наоборот – малейшая концентрация приводила к усилению признаков ишемического повреждения миокарда. В частности, использование раствора, через который пропускали СО в течение 5 мин, обуславливала вазоконстрикторный эффект в период перфузии. В конце реперфузии наблюдался вазоконстрикторный эффект после применения раствора через который пропускали СО на протяжении 10 мин. Усиление потребления глюкозы наблюдали в группе с 30 минутным пропуском СО на фоне минимального высвобождения креатинина из миокарда. В этой группе также происходило уменьшение потери Ca^{2+} в начале реперфузии (сразу после ишемии). Указанное явление объясняет наименьшую степень развития ишемического повреждения миокарда изолированного сердца мыши.

Выводы. Полученные результаты указывают на то, что при разной концентрации СО может по-разному влиять на разные структуры кардиомиоцита: при одной концентрации связывается с кальциевыми каналами, другие концентрации влияют на ионные каналы плазматической мембраны, чем и можно объяснить все эти зависимости.

Ключевые слова: изолированное сердце, монооксид углерода, объемная скорость, глюкоза, креатинин.

UDC 612.014.4; 591.044

**Influence of Low Concentrations of Carbon Monoxide on Metabolism
of Isolated Heart under Conditions of Ischemia-Reperfusion**
Beschasnyi S. P., Lysenko Ye. M.

Abstract. *The purpose of the study* was to determine the effect of different concentrations of carbon monoxide on the metabolism of isolated mice hearts.

Materials and methods. To elucidate the effect of low concentrations of carbon monoxide on the myocardium, we performed retrograde perfusion of isolated hearts of laboratory mice with Krebs-Henseleit solution, which was saturated with carbon monoxide for 5, 10, and 30 minutes. We then determined how different concentrations of carbon monoxide affected coronary volumetric flow rate, myocardial glucose and calcium uptake, creatinine release, and aspartate aminotransferase release. During perfusion, R-wave

amplitude and R-R interval were measured using an electrocardiograph. To determine the effect of ischemia on the heart muscle during perfusion with solutions of different concentrations, we measured the area of the affected myocardium after staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride.

Results and discussion. After these studies, it was found that different concentrations of carbon monoxide had a dose-dependent effect on the isolated mouse heart. However, the dependence of the effects does not follow the pattern «lowest concentration – lowest effect». At the same time, an increase in concentration did not mean an increase in adverse effects on the myocardium. Even on the contrary, the smallest concentration led to increased signs of ischemic myocardial damage. In particular, the use of the solution, through which carbon monoxide was passed for 5 minutes, caused vasoconstrictor effect during perfusion. At the end of reperfusion, vasoconstrictor effect was observed after using a solution through which carbon monoxide was passed for 10 minutes. Increased glucose uptake was observed in the group with 30-minute carbon monoxide permeation against the background of the minimal myocardial creatinine release. In this group there was also a decrease in Ca^{2+} loss at the beginning of reperfusion (immediately after ischemia). The above phenomenon explains the least degree of ischemic myocardial damage in the isolated mouse heart. The obtained data should be expanded. Since it is difficult to accurately determine the dose of carbon monoxide, then the use of donor compounds is promising. Such compounds include CORM-2 and CORM-3. Under physiological conditions, they decompose in a controlled manner, releasing a specific amount of carbon monoxide.

Conclusion. The obtained results indicate that at different concentrations of carbon monoxide can differently influence different structures of cardiomyocyte: at one concentration it binds to calcium channels, other concentrations influence ion channels of plasma membrane, which can explain all these dependencies.

Keywords: isolated heart, carbon monoxide, volumetric rate, glucose, creatinine.

ORCID and contributionship:

Sergii P. Beschasnyi : 0000-0002-7423-4112^{A,C,D,E,F}

Eugene M. Lysenko : 0000-0001-8637-0771^B

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR

Sergii P. Beschasnyi

Kherson State University

Department of Human Biology and Immunology

27, Universitetska St., Kherson 73000, Ukraine

tel. +38 (0552) 494375, e-mail: beschasnyis@gmail.com

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 07.10.2021 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування