

虚血心筋に対する Trifluoperazine の効果

— ライソゾーム酵素の細胞内分布による検討 —

岡山大学医学部第二外科学教室 (指導: 寺本 滋教授)

菅 原 英 次

(平成2年6月1日受稿)

Key words : trifluoperazine, calmodulin 阻害剤,
ライソゾーム, 心筋保護

緒 言

心筋虚血再灌流障害の発生機序として, oxygen-derived free radical の発生と細胞内への Ca^{2+} overload が二つの大きな要因として挙げられている¹⁾. しかし, 心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度の過剰な上昇に続く障害過程については, 不明な点も多い.

最近, 多くの Ca^{2+} 依存酵素の活性化に細胞内の Ca^{2+} 受容タンパクである Calmodulin (CaM) が関与していることが明らかにされており²⁾, Ca^{2+} overload による心筋虚血再灌流障害の進行に関わる Ca^{2+} 依存酵素の活性化にも CaM が重要な役割を果たしていることが指摘されている³⁾⁴⁾. また, Ca^{2+} -CaM complex を阻害する CaM 阻害剤が, 虚血⁵⁾や低酸素状態⁶⁾, または Ca-paradox³⁾⁴⁾⁷⁾の際に見られる Ca^{2+} overload による心筋細胞の障害過程を軽減するのに有効であるという報告も見られる. しかし, 臨床での開心手術を想定した低温虚血心筋に対する CaM 阻害剤の影響に関して検討したものは少ない. そこで, 今回, 我々は CaM 阻害剤である trifluoperazine (TFP) を低温虚血時に投与し, その心筋保護効果をライソゾーム酵素活性の細胞内分布および再灌流後の心機能の面から検討した.

対 象 と 方 法

300—400 g の Wistar 系雄ラットを使用した. エーテル麻酔の後, 大腿静脈よりヘパリン200IU

を静注した. 心臓を素早く摘出し, ただちに 4°C に冷却された生理食塩水に浸漬し, 心拍動の停止を得た後, Langendorff 回路に接続し, 逆行性灌流を行った. 灌流液として O_2 95%, CO_2 5% の混合ガスで飽和された 37°C Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHB) [NaCl : 118mM/L, KCl : 4.7mM/L, NaHCO_3 : 25mM/L, MgSO_4 : 1.2mM/L, CaCl_2 : 2.5mM/L, KH_2PO_4 : 1.2mM/L, pH7.4] を使用し, 基質として11mM/Lのブドウ糖を加えた. Langendorff 灌流の灌流圧は100cmH₂Oとし, 左房より僧帽弁經由で左室内にラテックス製バルーン付カテーテルを挿入した. 左室拡張末期圧が10mmHgになるようにバルーンに生理食塩水を注入し, 左室容性収縮力として左室 developed pressure (LVDP: 左室最大収縮期圧—左室拡張末期圧)を圧トランスデューサーにて計測し, 記録した圧波形より心拍数 (HR) を算定した.

摘出した心臓を灌流装置に接続した後, 37°C 20分間の Langendorff 灌流を行った. その後, 大動脈カニューラを遮断し, 20°C 120分間の global ischemia とした. 再灌流は 37°C で30分間行った. ライソゾーム酵素活性

心筋を虚血前後に冷 Buffer に採取し, テフロンホモジナイザーを用いホモジナイズした. 市原らの抽出液[sucrose 0.25M/L, EDTA 0.1mM/L, Tris-HCl 10mM/L, pH 7.4]を用い450 g, 10分間の遠心分離によって得られた上清を30,000 g, 40分間遠心分離を行った⁸⁾⁹⁾. この2回の遠心分離により得られた上清をライソゾ

ーム膜の崩壊に伴い細胞質内へ逸脱した酵素 (nonsedimentable enzyme 分画) とし、つぎに沈渣を0.1% Triton X-100を含む抽出液を加え可溶化したものをライソゾーム中の酵素 (sedimentable enzyme 分画) として、それぞれ酵素活性を測定した。虚血によりライソゾーム膜が崩壊し、ライソゾーム酵素が細胞質内に遊出する程度をライソゾーム酵素の細胞内分布 (LED: lysosomal enzyme distribution) で示した⁸⁾。LED は次式より求めた。

$$\text{LED} = \frac{\text{nonsedimentable enzyme activity}}{(\text{nonsedimentable} + \text{sedimentable}) \text{ enzyme activity}}$$

ライソゾーム酵素として、N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) および Cathepsin D について検討を行った。NAG は MCP-NAG 法¹⁰⁾で、Cathepsin D は Barrett ら¹¹⁾の方法で測定を行った (図1)。

なお、予備実験として、20℃120分間の虚血前後 (各 n=6) に LED を測定し、虚血障害の指標としての LED の妥当性について検討を行った。

実験プロトコール

実験群は4群 (各 n=6) で、I群では大動脈カニューラを遮断後、カニューラ側枝より20℃ KHBのみを初回3分間、その後30分ごとに2分間ずつ注入した。II群では 2.5×10^{-6} M/L の TFP を添加した KHB を同様に投与した。III群は、当科で臨床使用している心筋保護液である modified St. Thomas' Hospital 液¹²⁾ [生理食塩水1,000ml, 10% MgSO₄ 40ml, 5% KCl 20ml, 2% Xylocaine 13.6ml, 8.5% Ca gluconate 6.0 ml, 50% glucose 4.0ml] のみを同様に注入した。また、IV群では St. Thomas' Hospital 液に 2.5×10^{-6} M/L の TFP を加え注入した。なお、注入圧は75cmH₂O とした。(図2)

各群で20℃120分間の虚血後に心筋内ライソゾーム酵素活性を測定し LED を求めた。また、再灌流後15分、30分に LVDP, HR を測定し虚血前値に対する回復率で示した。

すべての測定値は、平均値±標準誤差 (mean±SEM) で表し、統計学的な有意差検定は Student's t-test により行い p<0.05 を有意と判定した。

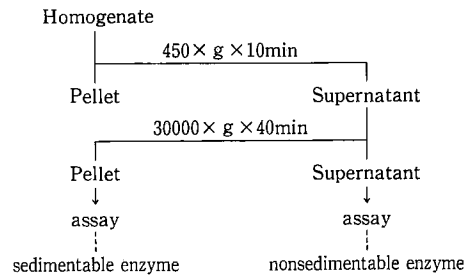


Fig. 1 Fractionation procedure

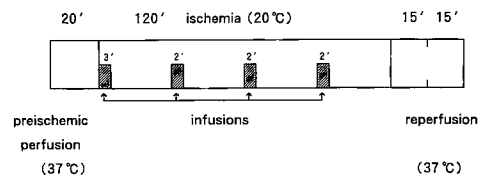


Fig. 2 Experimental protocol

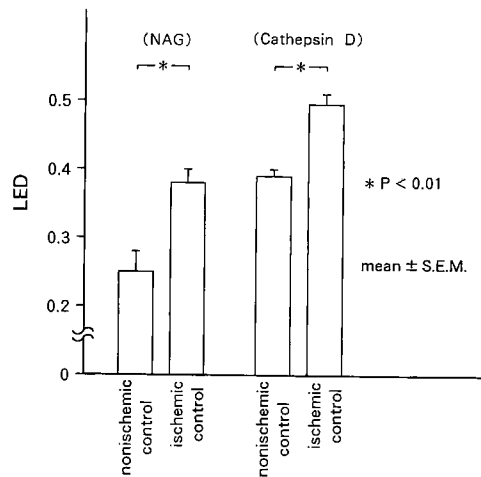


Fig. 3 Lysosomal enzyme distribution at 2 hours' hypothermic ischemia.

結 果

1. ライソゾーム酵素の細胞内分布

予備実験として、20℃120分間の虚血前後の LED を測定した。虚血前の LED は、NAG で 0.25 ± 0.03 、Cathepsin D では 0.39 ± 0.01 であったが、虚血後には、それぞれ 0.38 ± 0.02 , 0.51 ± 0.02 と有意 (それぞれ p<0.01) に増加してい

Table 1 Effect of TFP on lysosomal enzyme distribution. Values are means $\pm$ standard error of the mean.

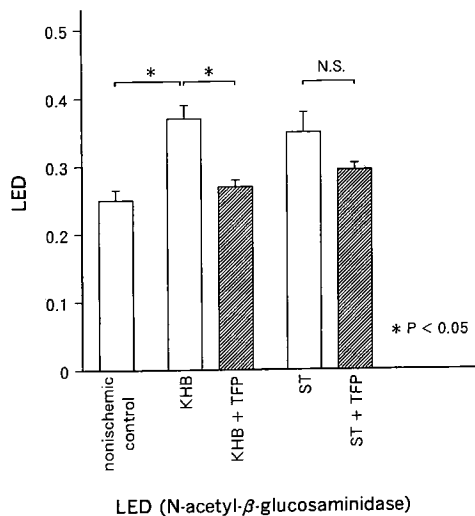
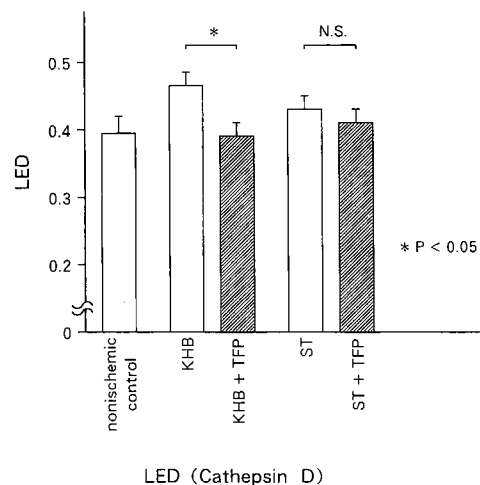
	preischemic control	Group			
		I (KHB)	II (KHB+TFP)	III (ST)	IV (ST+TFP)
NAG	0.25 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.02*	0.27 $\pm$ 0.01*	0.35 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.01
Cathepsin D	0.39 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.02*	0.39 $\pm$ 0.02*	0.43 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.02

* P<0.05vs. the preischemic value * P<0.05vs. I

Table 2 Systolic function and heart rate at LVEDP 10mmHg, expressed as percent of preischemic value. Values are means $\pm$ standard error of the mean. KHB, Krebs-Henseleit bicarbonate buffer ; TFP, Trifluoperazine ; ST, St. Thomas' Hospital cardioplegic solution ; DP, Developed pressure ; HR, Heart rate.

Group	n	15-Minute Reperfusion		30-Minute Reperfusion	
		DP (%)	HR (%)	DP (%)	HR (%)
I. (KHB)	6	30.2 $\pm$ 4.9	95.0 $\pm$ 4.0	41.7 $\pm$ 5.8	92.7 $\pm$ 2.4
II. (KHB+TFP)	6	66.3 $\pm$ 5.2*	97.7 $\pm$ 0.8	78.2 $\pm$ 2.3*	96.8 $\pm$ 2.5
III. (ST)	6	76.2 $\pm$ 3.5	92.2 $\pm$ 3.1	90.0 $\pm$ 3.4	97.3 $\pm$ 1.6
IV. (ST+TFP)	6	75.0 $\pm$ 3.3	97.7 $\pm$ 4.0	89.0 $\pm$ 2.0	97.0 $\pm$ 2.4

* P<0.01vs. I

Fig. 4 Effect of TFP on lysosomal enzyme (NAG) distribution. Error bars are $\pm$ the standard error of the mean.Fig. 5 Effect of TFP on lysosomal enzyme (Cathepsin D) distribution. Error bars are $\pm$ the standard error of the mean.

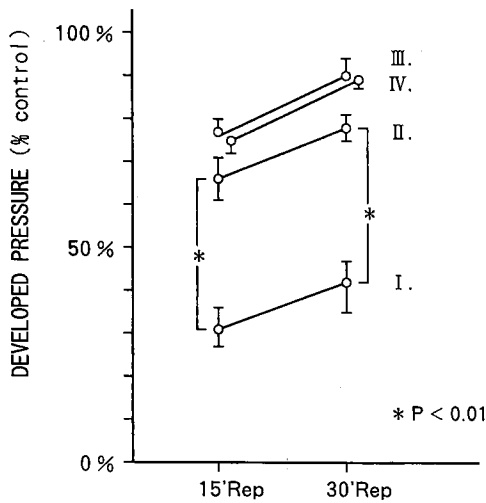


Fig. 6 Recovery of systolic function after 120 minutes of global hypothermic ischemia. Measurements were made at an EDP of 10mmHg and are expressed as percent of preischemic value.

た(図3)。これは、虚血によりライソゾーム膜が崩壊し、細胞質内へライソゾーム酵素が遊出した結果、細胞質内の酵素活性が有意に増大したことをしめしている。以上の結果から、LEDを虚血障害の一つの指標としてTFPの心筋保護効果について検討を行った。

NAGのLEDは、TFPを投与したII群では 0.27 ± 0.01 で、KHBのみを投与したI群の 0.37 ± 0.02 と比較すると、有意($p < 0.05$)に低い値を示し、TFPは虚血中のNAGの細胞質内への遊出を有意に抑制した。また、Cathepsin DでもII群では 0.39 ± 0.02 でI群の 0.46 ± 0.02 に比べ、有意($p < 0.05$)に低い値を示した。

虚血中にSt. Thomas' Hospital液のみを投与したIII群のNAGおよびCathepsin DのLEDは 0.35 ± 0.03 , 0.43 ± 0.02 で、St. Thomas' Hospital液にTFPを添加したIV群では、それぞれ 0.29 ± 0.01 , 0.41 ± 0.02 で、いずれもTFPを添加したIV群で、低い傾向を示した。

以上の結果から、TFPがライソゾーム膜の安定化作用を有することが確認された(表1, 図4, 5)。

2. 再灌流後心機能(表2)

HRの回復率は、再灌流後15分、30分ともにI, II群間, III, IV群間で有意差を認めず、TFPはHRの回復率には影響を及ぼさなかった。

LVDPの回復率は、I群では再灌流後15分、30分で、それぞれ $30.2 \pm 4.9\%$, $41.7 \pm 5.8\%$ であった。一方、TFPを投与したII群では、 $66.3 \pm 5.2\%$, $78.2 \pm 2.3\%$ で再灌流後15分、30分ともに、TFPは心機能の回復を有意(それぞれ $p < 0.01$)に改善した。

III群では、再灌流後15分で $76.2 \pm 3.5\%$, 30分で $90.0 \pm 3.4\%$ であった。また、IV群では、 $75.0 \pm 3.3\%$, $89.0 \pm 2.0\%$ で、III, IV群とも心機能回復は良好でありIII, IV群間で有意差を認めなかった(図6)。

考 察

虚血心筋では、ミトコンドリアをはじめとする種々の細胞内小器官の変化が生じるが、その中で虚血心筋障害に対するライソゾームの役割が注目されている¹³⁾¹⁴⁾。

ライソゾームは、種々のタンパク分解酵素、核酸分解酵素などを含む細胞内小器官であるが、通常ライソゾーム酵素は結合型として存在し活性を示さない。しかし、虚血によるストレスでライソゾーム膜は早期から崩壊し¹⁵⁾、水解酵素が遊出して心筋細胞を障害する。虚血再灌流障害に対するライソゾームの役割について、Wildenthal¹⁶⁾は「ライソゾーム説」として、以下のような機序を提唱している。すなわち、(1)虚血によりATPの低下、細胞内pHの低下、膜活性化物質の集積をきたす。(2)その結果、ライソゾーム膜を含む膜統合性の低下を引き起こし、(3)ライソゾーム酵素が遊出する。(4)さらに、細胞内acidosisにより、至適pHの状態で活性化された水解酵素は基質と結合し、細胞構成成分を崩壊させ、(5)心筋内細胞小器官を破壊し、不可逆性の変化をきたす、というものである。

Wildenthal自身もライソゾーム酵素の活性化が心筋の不可逆変化の主要原因であるのか、単なる結果にすぎないのかは断定を避けているし、ライソゾームの変化は、可逆性の障害を受けた細胞の修復過程においても見られることも指摘

されている¹⁵⁾¹⁶⁾。しかし、今回の予備実験では 20℃120分間の虚血においても、ライソゾーム酵素である NAG および Cathepsin D は、ともに細胞質中の活性が有意に高くなることが確認された。この結果は、ライソゾーム酵素の遊出が可逆性の心筋障害から不可逆性の変化への進行に重要な役割を果たしているという考えに一致するものであり、ライソゾーム酵素の細胞質内への遊出の程度を指標として、心筋保護効果を評価することは妥当と思われた。

Calmodulin (CaM) は、Ca²⁺依存性ホスホジエステラーゼの活性化因子として発見された¹⁷⁾¹⁸⁾が、cyclic AMP と並ぶ細胞内情報伝達物質である Ca²⁺の細胞内受容体のうち、最も重要なもののひとつと考えられている。また、細胞内 Ca²⁺依存性酵素の多くは CaM 依存性であり、CaM は多くの細胞機能の Ca²⁺調節に重要な役割を果たしている。心筋では phosphorylase kinase の活性化により glycogen 代謝を調節¹⁹⁾したり、心筋小胞体ではホスホランパンのリン酸化により、Ca²⁺の能動輸送を制御している²⁰⁾ことなどが明らかになっている。

心筋が虚血にさらされると、種々の機能障害が起こる。心筋虚血によって起こる代謝変化として、高エネルギーリン酸の低下、細胞内のイオン濃度調節の乱れ、さらに細胞内 Ca²⁺濃度の上昇をきたし²¹⁾、protease や phospholipase などの Ca²⁺依存酵素を活性化し、不可逆性の障害を生じる。最近、心筋虚血再灌流障害の進行に関与する Ca²⁺依存酵素の活性化に CaM が重要な役割を果たしていることが指摘されている²¹⁾⁴⁾。また、CaM 阻害剤により、Ca²⁺-CaM 依存酵素の活性化を抑制し、虚血再灌流障害を軽減することが可能であるという報告もみられる²²⁾。

しかし、低温虚血再灌流障害においても、CaM が関与するのか、また低温虚血中に投与した CaM 阻害剤の効果に関しては未だ明らかではない。そこで、本実験では開心手術における低温心筋虚血および再灌流を想定して、20℃の global ischemia 中に phenothiazine 系の CaM 阻害剤である TFP を投与し、その効果を検討した。

現在まで、様々な実験モデルで CaM 阻害剤の心筋保護効果が検討されている。Otani ら²³⁾

は、ブタを用いた急性心筋梗塞モデルで、TFP を投与することによって、虚血中の心筋内 ATP は保たれ、再灌流後の左室収縮能およびコンプライアンス、冠血流量が改善し、CPK の漏出が減少することを認めている。冠血流の増大に関して、Beresewicz ら²⁴⁾は phenoxybenzamine や phentolamine によって阻止できないことから、TFP のこの効果は α 受容体遮断による冠動脈に対する作用ではなく、CaM 阻害による心筋に対する直接作用と考えている。また、Higgins ら²⁵⁾はラットの working heart モデルで選択的な CaM 阻害剤である W-7 (ナフタレンスルホンアミド誘導体) を、虚血前あるいは再灌流後に投与し、心機能が改善され、LDH の漏出が抑制されたと述べており、Barron ら²⁶⁾は、ラットの冠動脈結紮後の再灌流不整脈に対し、TFP および W-7 が抗不整脈作用を有することを報告している。

本実験では、低温虚血中に TFP を投与することによって、再灌流後の心拍数に影響を及ぼすことなく、心機能の回復が改善された。また、同時に虚血中のライソゾーム酵素の細胞質中への逸脱が有意に抑制されることが確認された。この実験結果は、低温下虚血再灌流障害においても CaM が関与していることを示唆している。さらに、虚血心筋保護作用を有する propranolol, diltiazem や prostacyclin などの薬剤は、虚血中のライソゾーム膜を安定化することが報告されている²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾。これらの薬剤と同様に TFP もライソゾーム膜を安定化することが心筋保護効果の機序のひとつであると推察された。また、Otani ら²³⁾は虚血前に TFP を投与して、虚血心筋での ATP が高値に保たれることを確認している。ATP は心筋のライソゾーム膜の安定化因子として重要であり³⁰⁾、本実験では虚血中の ATP が保たれた結果、ライソゾーム酵素の遊出が抑制されたと考えられた。

一方、St. Thomas' Hospital 液に TFP を添加した場合、ライソゾーム酵素の遊出を抑制する傾向を示したが、その差は有意ではなく、心機能にも非添加群とは差を認めなかった。

これは、St. Thomas' Hospital 液および低温によって心筋代謝が抑制されたためであり、虚

血がさらに長時間に及ぶ場合や心筋障害を有する場合には、TFPは有効であろうと思われた。

CaM阻害剤の投与時期とその効果については、意見の別れるところであり、再灌流時にTFPを投与した場合は無効であるという報告⁶⁾も見られるが、Higginsら²⁵⁾のW-7を用いた実験では、再灌流時に投与しても虚血前に投与した場合と同様に心筋保護効果を認めている。CaM阻害剤によって、その効果が異なることが報告されているが、本実験では虚血中にTFPを投与することによって、虚血中のライソゾーム酵素の遊出を抑制しており、虚血中あるいは虚血前に投与することにより、十分な効果が期待できると思われた。

TFPの虚血心筋保護効果については、CaM阻害剤としての以下のような機序が考えられている。

細胞内Ca²⁺濃度の上昇が、心筋虚血再灌流障害の共通の特徴であり、障害発生の原因として重要視されている。虚血再灌流により細胞内イオン濃度調節機能が破綻し、細胞内Na⁺が生理的レベルを越えて上昇するとNa⁺-Ca²⁺交換系が活性化され細胞内へCa²⁺が流入する。虚血再灌流時の心筋内へのCa²⁺流入経路の中で、Na⁺-Ca²⁺交換系が心筋細胞内Ca²⁺の増加に大きく関わっている³¹⁾。TFPはCa²⁺-CaM依存性のprotein kinaseを阻害することにより、Na⁺-Ca²⁺交換系の活性化を抑制し、有害な細胞内Ca²⁺の過剰な上昇を阻止して、Ca²⁺ overload自体を軽減すると考えられている²³⁾²⁵⁾³²⁾。

また、心筋虚血再灌流によるCa²⁺の増加がphospholipaseを活性化し、生体膜の重要な構成成分であるphospholipidの変性をおこし、不可逆性の変化が作られる³³⁾。TFPはCa²⁺-CaM依存性のphospholipaseの活性化を抑制し、その結果、膜の変性を軽減し心筋保護効果を示した可能性も考えられる³⁴⁾³⁵⁾。

さらに、oxygen-derived free radicalの産生に重要な酵素であるxanthine oxidaseのxanthine dehydrogenaseからの変換がCaMに依存しているとの報告もあり³⁶⁾、TFPの心筋保護効果の機序としてfree radical産生系への影響も否定できない。

その他、CaMは心筋のphosphorylase kinaseを活性化することが知られている。TFPはCaMを阻害することによって、phosphorylase kinaseの活性化を抑制しglycogenの崩壊を阻止し、乳酸の産生を抑制すると考えられている⁶⁾。また、小胞体におけるCa²⁺輸送に対する作用や、アクトミオシン系に対する直接作用などもCaM阻害剤の心筋保護作用の機序として挙げられる³⁷⁾。

CaMは多くのCa²⁺調節系に関係している。このため、どのCa²⁺調節系のCaMが阻害されて心筋保護効果を発現したかを確定することは困難である。今回、用いたphenothiazine系の薬剤であるTFPは、膜との結合性が高い非特異的なCaM阻害剤であり、いわゆる「膜安定化作用」を有している³⁸⁾³⁹⁾。さらにCa²⁺-CaM系以外にCa²⁺、リン脂質およびphosphatidylinositol (PI)代謝回転によって産生されるdiacylglycerol (DG)により活性化されるタンパク質リン酸化酵素のCキナーゼを介する細胞内情報伝達系が存在するが⁴⁰⁾、多くのCaM阻害剤は同時にCキナーゼの阻害作用も有するので⁴¹⁾、TFPもCキナーゼ系を阻害することによって心筋保護効果を示した可能性がある。このため、TFPの心筋保護効果がCaM阻害のみによるものである、と断定はできない。

しかし、今回の実験結果は、低温虚血中の心筋代謝および虚血再灌流障害にCaMが関与していることを示唆しており、今後、他のCaM阻害剤を用いた一層の検討が待たれるが、低温虚血中にTFPを投与し、心筋保護効果を認めたことから、臨床での開心手術における長時間大動脈遮断例や重症例ではCaM阻害剤の効果が十分期待できると思われた。

結 論

CaM阻害剤であるTFPの低温虚血心筋に対する効果を、心筋ライソゾーム酵素活性の細胞内分布の面から検討し、以下の結論を得た。

1. 予備実験において、20℃120分間の虚血により、ライソゾーム酵素であるNAGおよびCathepsin Dの細胞質中の活性は有意に増加した。これは、心筋虚血障害の進行にライソゾームが重要な役割を果たしていることを示してお

り、ライソゾーム酵素の細胞質内への遊出の程度が心筋虚血障害の指標となり得る、と思われた。

2. TFP は、低温虚血中のライソゾーム酵素の遊出を有意に抑制し、再灌流後の心機能を改善した。これは、低温虚血中の心筋代謝および虚血再灌流障害の進行に CaM が関与することを、示唆した。また、ライソゾーム膜の安定化が TFP の心筋保護効果の機序の一つと考えら

れた。

本論文の要旨は第89回日本外科学会総会において発表した。

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導御校閲を賜りました恩師、寺本 滋教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究に御助言、御指導をいただきました、妹尾嘉昌助教授、中山頼和講師に心から感謝致します。

文 献

- 1) Hess ML and Manson NH : Molecular oxygen : friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* (1984) **16**, 969—985.
- 2) Walsh MP, Le Peuch CJ, Vallet B, Cavadore J and Demaille JG : Cardiac calmodulin and its role in the regulation of metabolism and contraction. *J Mol Cell Cardiol* (1980) **12**, 1091—1101.
- 3) Schaffer SW, Roy RS and McMcord JM : Possible role for calmodulin in calcium paradox-induced heart failure. *Eur Heart J* (1983) **4** Suppl H, 81—87.
- 4) Schaffer SW, Burton KP, Jones HP and Oei HH : Phenothiazine protection in calcium overload-induced heart failure : a possible role for calmodulin. *Am J Physiol* (1983) **244**, H328—H334.
- 5) Lochner A, Van Niekerk I and Kotze JCN : Normothermic ischemic cardiac arrest of the isolated perfused rat heart : effects of trifluoperazine and lysolecithin on mechanical and metabolic recovery. *Basic Res Cardiol* (1985) **80**, 363—376.
- 6) Beresewicz A and Karwatowska-Krynska E : Effect of calmodulin antagonists on hypoxia and reoxygenation damage in isolated rabbit hearts. *Basic Res Cardiol* (1986) **81**, 311—325.
- 7) Okumura K, Ogawa K and Satake T : Effects of trifluoperazine on calcium-repleted injury in isolated ventricular strips. *Basic Res Cardiol* (1985) **80**, 556—563.
- 8) 安孫子保, 市原和夫 : 虚血によるリソゾーム酵素の遊出 ; 虚血心筋, 病態生理と薬理 安孫子保, 市原和夫編, 富士書院, 札幌 (1987) pp 137—148.
- 9) Ricciutti MA : Myocardial lysosome stability in the early stages of acute ischemic injury. *Am J Cardiol* (1972) **30**, 492—497.
- 10) Noto A, Ogawa Y, Mori S, Yoshioka M, Kitakaze T, Hori T, Nakamura M and Miyake T : Simple, rapid spectrophotometry of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase with use of a new chromogenic substrate. *Clin Chem* (1983) **29**, 1713—1716.
- 11) Barrett AJ and Heath MF : Lysosomal enzymes ; in *Lysosomes : a laboratory handbook*. Dingle eds, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1977) pp 19—145.
- 12) Hearse DJ, Braimbridge MV and Jynge P : Protection of the ischemic myocardium ; in *Cardioplegia*. Raven Press, New York (1981) pp 346—348.
- 13) Kennett FF and Weglicki WB : Effects of well-defined ischemia on myocardial lysosomal and microsomal enzymes in a canine model. *Circ Res* (1978) **43**, 750—758.
- 14) 奥田 稔 : 心筋ライソゾームと心筋虚血傷害, 心臓 (1981) **13**, 106—116.
- 15) Decker RS, Poole AR and Wildenthal K : Distribution of lysosomal cathepsin D in normal, ischemic,

- and starved rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* (1980) **46**, 485—494.
- 16) Wildenthal K : Lysosomal alterations in ischemic myocardium. Result or cause of myocellular damage? *J Mol Cell Cardiol* (1978) **10**, 595—603.
 - 17) Cheung WY : Cyclic 3', 5' -nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Commun* (1970) **38**, 533—538.
 - 18) Kakiuchi S and Yamazaki R : Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. Studies on cyclic 3', 5' -nucleotide phosphodiesterase (III). *Biochem Biophys Res Commun* (1970) **41**, 1104—1110.
 - 19) Werth DK, Hathaway DR and Watanabe AM : Regulation of phosphorylase kinase in rat ventricular myocardium. Role of calmodulin. *Circ Res* (1982) **51**, 448—456.
 - 20) Bilezikjian LM, Kranias EG, Potter JD and Schwartz A : Studies on phosphorylation of canine cardiac sarcoplasmic reticulum by calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res* (1981) **49**, 1356—1362.
 - 21) Shen AC and Jennings RB : Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol* (1972) **67**, 417—440.
 - 22) Thomas GE, Levitsky S and Feinberg H : Chlorpromazine inhibits loss of contractile function, compliance and ATP in ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* (1983) **15**, 621—628.
 - 23) Otani H, Engelman RM, Rousou JA, Breyer RH, Clement R, Prasad R, Klar J and Das DK : Improvement of myocardial function by trifluoperazine, a calmodulin antagonist, after acute coronary artery occlusion and coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* (1989) **97**, 267—274.
 - 24) Beresewicz A : Anti-ischemic and membrane stabilizing activity of calmodulin inhibitors. *Basic Res Cardiol* (1989) **84**, 631—645.
 - 25) Higgins AJ and Blackburn KJ : Prevention of reperfusion damage in working rat hearts by calcium antagonists and calmodulin antagonists. *J Mol Cell Cardiol* (1984) **16**, 427—438.
 - 26) Barron E, Marshall RJ, Martorana M and Winslow E : Comparative antiarrhythmic and electrophysiological effects of drugs known to inhibit calmodulin (TFP, W-7 and bepridil). *Br J Pharmacol* (1986) **89**, 603—612.
 - 27) Welman E : Stabilization of lysosomes in anoxic myocardium by propranolol. *Br J Pharmacol* (1979) **65**, 479—482.
 - 28) 羽根田俊, 市原和夫, 小野寺壮吉, 安孫子保 : Diltiazem の虚血心筋保護作用, リソゾーム酵素の関与, 心筋の構造と代謝 (1985) **7**, 187—193.
 - 29) Hieda N, Toki Y, Sugiyama S, Ito T, Satake T and Ozawa T : Prostaglandin I₂ analogue and propranolol prevent ischemia induced mitochondrial dysfunction through the stabilization of lysosomal membranes. *Cardiovasc Res* (1988) **22**, 219—225.
 - 30) Spanier AM, Dickens BF and Weglicki WB : Response of canine cardiocyte lysosomes to ATP. *Am J Physiol* (1985) **249**, H20—H28.
 - 31) Tani M and Neely JR : Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na²⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ Res* (1989) **65**, 1045—1056.
 - 32) Carafoli E : Calmodulin in the regulation of calcium fluxes in cardiac sarcolemma ; in *Advances in Myocardiology*, Harris and Poole-Wilson eds, Plenum, New York (1985) pp 97—101.
 - 33) Chien KR, Pfau RG and Farber JL : Ischemic myocardial cell injury. Prevention by chlorpromazine

- of an accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction. *Am J Pathol* (1979) **97**, 505—530.
- 34) Slezak J, Tribulova N, Gabauer I, Ziegelhoffer A, Holec V and Slezak JJr : Diminution of injury in reperfused ischemic myocardium by phenothiazines. A quantitative morphological study. *Biomed Biochim Acta* (1987) **46**, S606—S609.
- 35) Scott JA, Khaw B, Fallon JT, Locke E, Rabito CA, Peto CA and Homcy CJ : The effect of phenothiazines upon maintenance of membrane integrity in the cultured myocardial cell. *J Mol Cell Cardiol* (1986) **18**, 1243—1254.
- 36) McCord JM : Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* (1985) **312**, 159—163.
- 37) Shikano K, Kusagawa M, Itoh H and Hidaka H : Protective effects of calmodulin antagonist bepridil on ischemia induced in the rat myocardium. *Cardiovasc Res* (1986) **20**, 364—368.
- 38) Edoute Y, van der Merwe EL, Sanan D, Kotze JCN, van Niekerk I and Lochner A : Normothermic ischemic cardiac arrest and reperfusion in the isolated working heart. Effect of chlorpromazine on functional, metabolic and morphological recovery. *J Mol Cell Cardiol* (1983) **15**, 603—620.
- 39) Janero DR and Burghardt B : Prevention of oxidative injury to cardiac phospholipid by membrane-active "stabilizing agents". *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* (1989) **63**, 163—173.
- 40) Nishizuka Y : The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* (1984) **308**, 693—698.
- 41) Tanaka T, Ohmura T, Yamakado T and Hidaka H : Two types of calcium-dependent protein phosphorylations modulated by calmodulin antagonists. Naphtalen-sulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol* (1982) **22**, 408—412.

**Protective effects of trifluoperazine, a calmodulin antagonist,
on ischemic rat hearts through the stabilization
of lysosomal membranes**

Eiji SUGAWARA

**Second Department of Surgery,
Okayama University Medical School,**

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. S. Teramoto)

Disruption of lysosomal membranes is one of the earliest changes seen in the ischemic myocardium and a calcium-calmodulin-dependent process may be involved in irreversible myocardial injury. This study was designed to determine the effect of trifluoperazine (TFP), a calmodulin antagonist, on the isolated rat heart. To assess the cardioprotective effect of TFP, changes in the distribution of lysosomal enzymes in myocardial cells and post-ischemic myocardial recovery were studied. Experimental groups (n=6 hearts per group) were : Group I, infusion of 20°C Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHB) every 30 min during ischemia ; Group II , infusion of KHB containing TFP (2.5×10^{-6} M/L) ; Group III, infusion of St. Thomas' Hospital cardioplegic solution (ST) ; Group IV, infusion of ST containing TFP (2.5×10^{-6} M/L). Isolated perfused rat hearts were ischemic for 2 h at 20°C and were reperfused at 37°C for 30 min. Functional recovery after ischemia and reperfusion was measured by developed pressure.

Addition of TFP in Group II hearts prevented leakage of lysosomal enzymes (N-acetyl- β -glucosaminidase and Cathepsin D) compared with Group I ($p < 0.05$, respectively). The activities of lysosomal enzymes in cytosol were lower in Group IV than in Group III, though the difference was not statistically significant. Hearts receiving TFP (Group II) showed improved recovery of developed pressure at 15 min and 30 min after reperfusion when compared with Group I ($p < 0.01$, respectively). These results suggest that TFP reduces ischemia/reperfusion injury and calcium-calmodulin-dependent enzymes may play an important role in the development of cellular damage in the myocardium during hypothermic ischemia.