

УДК 616.127—005.4—008.9:546.41

Р. А. Фролькис, Л. С. Мхитарян, О. К. Хилько

### КАЛЬЦИЙ-ТРАНСПОРТИРУЮЩАЯ СИСТЕМА САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА МИОКАРДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ НАРУШЕНИИ КОРОНАРНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Благодаря достижениям молекулярной биологии, в последние годы во многом стали понятными механизмы, обеспечивающие циклическую работу сердца, чередование систолы и диастолы. Особое внимание в этом аспекте привлекают системы регуляции обмена и транспорта кальция в миокарде, от которых зависит уровень ионизированного кальция в цитоплазме. Как известно, расслабление миокарда наступает при снижении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в миоплазме до  $10^{-7}$  моль, что обеспечивается аккумуляцией этого иона внутри саркоплазматического ретикулума (СР) с помощью кальциевого насоса, встроенного в его мембраны. Фазу сокращения индуцирует выход  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму из СР.

По современным данным, кальциевый насос представляет собой сложную систему белков, основным из которых является  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая АТФаза. Благодаря наличию специфических активных центров, этот фермент способен расщеплять АТФ и за счет полученной энергии транспортировать ионы  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану внутрь СР против высокого градиента концентрации.

Немногочисленные экспериментальные исследования позволили установить, что кальциевый насос миокарда значительно изменяется при недостаточности сердца, его гипертрофии. Однако до настоящего времени практически не исследованы Са-транспортирующие свойства СР и не выявлены механизмы нарушения этого процесса при коронарной недостаточности. В то же время хорошо известно, что у больных ИБС со стенозом коронарных сосудов нарушение процессов релаксации возникает уже на ранних стадиях заболевания.

Мы изучали  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующие и  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующие свойства СР миокарда при экспериментальной коронарной недостаточности.

#### Методика исследований

Экспериментальную коронарную недостаточность моделировали посредством ограничения коронарного кровотока в огибающей ветви левой коронарной артерии на 90 % в течение 30 мин. Биохимическому анализу подвергали зону ишемии и миокард левого желудочка вне области ишемии, где исследовали активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, связывание  $^{45}\text{Ca}$  фрагментами мембран СР с использованием техники миллипор-фильтрации, общую концентрацию кальция с помощью атомного адсорбционного спектрофотометра, содержание К, Na и их внутри- и внеклеточное распределение, концентрацию АТФ и ц'АМФ.

Фрагменты саркоплазматического ретикулума выделяли методом дифференциального ультрацентрифугирования.

#### Результаты исследований

Как видно из данных, приведенных в таблице, ограничение коронарного кровотока на 90 % сопровождается резкими изменениями Са-транспортирующих и Са-аккумулирующих свойств мембран саркоплазматического ретикулума, выделенных из зоны ишемии. Здесь активность  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФазы снижена в 4,5 раза, а связывание  $^{45}\text{Ca}$  фрагментами ретикулума составляет 25 % по сравнению с контролем. Важно отметить, что подобная направленность сдвигов характерна и для участков миокарда левого желудочка, отдаленных от области ишемии, где активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы составляет 31 % исходного уровня, а связывание  $^{45}\text{Ca}$  снижено в три раза.

Одновременное исследование общего содержания кальция в миокарде показало, что ограничение коронарного кровотока на 90 % сопровождается повышением концент-

#### Кальций-транспортирующая система

рации кальция не только в зоне ишемии (166 % контроля), но и вне ее (166 % контроля).

Для понимания механизмов транспорта и аккумуляции кальция нами СР мы исследовали общее соотношение внутриклеточное соотношение электролитов в миокарде.

Оказалось, что в зоне ишемии наблюдается значительное снижение концентрации натрия за счет изменения точного содержания этих электролитов. В результате чего соотношение этих ионов падает с 7,37 до 4,55. Однонаправленные сдвиги этих показателей наблюдаются также в миокарде вне зоны ишемии.

Учитывая энергезависимый транспорт кальция через мембраны, мы определяли содержание АТФ и ц'АМФ в образцах миокарда. В условиях ограничения коронарного кровотока наблюдаются отчетливые сдвиги уровня нуклеотидов в сердечной мышце. В зоне ишемии, так и в областях, от нее. Так убыль АТФ в зоне ишемии составила 39 %. Такое же изменение этого макроэрга наблюдается в зонах ишемии.

Существенные изменения по пути превращения АТФ, связанные с изменением ц'АМФ, концентрация которых в наших экспериментах снижалась в три раза по сравнению с контролем (270 пмоль/г при норме 800 пмоль/г).

Таким образом, полученные результаты показывают, что в условиях ограничения коронарного кровотока (на 90 %) в миокарде левого желудочка наблюдаются изменения на уровне мембран. Это проявляется в торможении  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФазы и снижении аккумуляционной способности фрагментов.

Наши исследования показали, что временно нарушается энергообеспечение кальциевого насоса СР, на что указывает снижение уровня АТФ и циклического аденозинмонофосфата.

Многочисленные наблюдения подтверждают важную роль экзогенных и эндогенных зависимых протеинкиназ в регуляции транспорта Са.

Под их воздействием происходит фосфорилирование основных мембран СР, необходимый для транспорта кальция.

Мхитарян, О. К. Хилько

# ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ КРОВООБРАЩЕНИЯ НА РАБОТУ СЕРДЦА

В последние годы во многом циклическую работу сердца, чередованием аспекте привлекают системы регуляции, от которых зависит уровень ионизированного кальция в миокарде. При этом расслабление миокарда наступает при снижении уровня кальция, что обеспечивается аккумуляцией кальция в саркоплазматическом ретикулуме (СР) с помощью кальциевого насоса. Сокращение индуцирует выход  $Ca^{2+}$  из СР.

Представляет собой сложную систему регуляции. Благодаря наличию кальциевого насоса способен расщеплять АТФ и за счет этого через мембрану внутрь СР против градиента.

Исследования позволили установить, что при недостаточности сердца, его функциональные не исследованы Са-транспортирующие свойства СР миокарда. Известно, что у больных ИБС со снижением релаксации возникает уже на ранней стадии заболевания.

Аккумуляционные свойства СР миокарда.

## Методы исследования

Эксперимент проводился на изолированном сердце крысы. В левую коронарную артерию вводили раствор с  $Ca^{2+}$ -индикатором. Активность  $Ca^{2+}$ -АТФазы, связанной с мембраной, определяли с помощью методики миллипор-фильтрации. Концентрацию кальция в миокарде определяли с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра.

Выделяли методом дифференциальной центрифугации.

## Результаты

При ограничении коронарного кровотока Са-транспортирующие и Са-аккумуляционные свойства СР снижены в 4,5 раза, а связывание кальция в СР снижено в 3 раза. Это свидетельствует о том, что Са-транспортирующие и Са-аккумуляционные свойства СР снижены в 4,5 раза, а связывание кальция в СР снижено в 3 раза.

Выводы. При ограничении коронарного кровотока Са-транспортирующие и Са-аккумуляционные свойства СР снижены в 4,5 раза, а связывание кальция в СР снижено в 3 раза.

рации кальция не только в зоне ишемии (166 % контроля), но и вне ее (138 % контроля).

Для понимания механизмов изменений транспорта и аккумуляции кальция мембранами СР мы исследовали общее содержание и внутриклеточное соотношение электролитов в миокарде.

Оказалось, что в зоне ишемии наблюдается значительное снижение концентрации К и нарастания Na за счет изменения внутриклеточного содержания этих электролитов, в результате чего соотношение этих ионов  $K_i/Na_i$  падает с 7,37 до 4,55. Однонаправленные, достоверные сдвиги этих показателей наблюдаются также в миокарде вне зоны ишемии.

Учитывая энергозависимый характер транспорта кальция через мембраны СР, мы определяли содержание АТФ и ц'АМФ в исследуемых образцах миокарда. В условиях ограничения коронарного кровотока наблюдаются отчетливые сдвиги уровня этих важных метаболитов в сердечной мышце, как в зоне ишемии, так и в областях, отдаленных от нее. Так убыль АТФ в зоне ишемии составляла 39 %. Такое же изменение содержания этого макроэрга наблюдается в ткани вне зоны ишемии.

Существенные изменения претерпевает путь превращения АТФ, связанный с образованием ц'АМФ, концентрация которого в условиях нашего эксперимента снижалась почти в три раза по сравнению с контролем (до 270 пмоль/г при норме 800 пмоль/г).

Таким образом, полученные нами данные, показывают, что в условиях значительной степени ограничения (на 90 %) коронарного кровотока в миокарде левого желудочка возникают изменения на уровне мембран СР. Это проявляется в торможении активности  $Ca^{2+}$ -зависимой АТФазы и снижении  $Ca^{2+}$ -аккумуляционной способности фрагментов СР.

Наши исследования показали, что одновременно нарушается энергообеспечение работы кальциевого насоса СР, на что указывает снижение уровня АТФ и циклического аденозинмонофосфата.

Многочисленные наблюдения показали важную роль экзогенных и эндогенных ц'АМФ-зависимых протеинкиназ в регуляции транспорта Са.

Под их воздействием происходит процесс фосфорилирования основного белка мембран СР, необходимый для транспорта кальция.

Влияние ограничения коронарного кровотока на некоторые показатели обмена миокарда

| Условия эксперимента                            | Объект исследования   | Статистический показатель | Активность Са-АТФазы СР, мкмоль/мин | Связывание $^{45}Ca$ фрагментами СР, пмоль/мг белка в мин | Общее содержание Са в миокарде, мкмоль/кг сух. веса | Общее содержание К в миокарде, мэкв/кг сух. веса | Общее содержание Na в миокарде, мэкв/кг сух. веса | $K_i/Na_i$                | АТФ, мкмоль/г              |
|-------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Адекватная перфузия $n=6$                       | Левый желудочек       | $M \pm m$                 | $1,19 \pm 0,18$                     | $76,4 \pm 1,1$                                            | $1,75 \pm 0,35$                                     | $415,7 \pm 13,3$                                 | $222,7 \pm 11,0$                                  | $8,75 \pm 1,29$           | $5,0 \pm 0,21$             |
| Ограничение коронарного кровотока на 90 % $n=7$ | Зона ишемии           | $M \pm m$<br>$p <$        | $0,24 \pm 0,02$<br>$0,001$          | $19,5 \pm 0,34$<br>$0,001$                                | $2,90 \pm 0,23$<br>$0,05$                           | $367,2 \pm 8,0$<br>$0,01$                        | $279,8 \pm 4,1$<br>$0,01$                         | $4,32 \pm 0,40$<br>$0,01$ | $3,04 \pm 0,15$<br>$0,001$ |
|                                                 | Ткань вне зоны ишемии | $M \pm m$<br>$p <$        | $0,37 \pm 0,034$<br>$0,001$         | $27,8 \pm 1,34$<br>$0,001$                                | $2,43 \pm 0,59$<br>$0,05$                           | $372 \pm 8,4$<br>$0,02$                          | $243,6 \pm 6,2$<br>$—$                            | $4,95 \pm 0,71$<br>$0,05$ | $3,3 \pm 0,4$<br>$0,001$   |

Низкий уровень ц'АМФ и АТФ в ишемическом миокарде определяет нарушения энергообеспечения и регуляции работы Са насоса мембран СР.

Важное значение в транспорте кальция имеет соотношение электролитов в клетке. Установлено, что чем выше величина Na/K, тем ниже эффективность работы Са<sup>2+</sup>-АТФазы мембран СР. Следовательно, резкое снижение градиента K<sub>i</sub>/Na<sub>i</sub>, установленное нами в левом желудочке сердца при его частичной ишемии, может оказать существенное влияние на способность мембран СР к транспорту и аккумуляции ионов кальция. Изменение соотношения электролитов в сторону накопления внутриклеточного Na нарушает функцию Na/Ca обменного механизма.

На этом фоне угнетение Са<sup>2+</sup>-транспортирующих и Са<sup>2+</sup>-аккумулирующих свойств мембран СР может рассматриваться как одна из причин увеличения внутриклеточного содержания кальция, что может влиять на метаболизм сердечной мышцы, нарушать процессы сокращения и, в особенности, расслабления миокарда.

Украинский институт кардиологии,  
Киев

Поступила в редакцию  
15.XII 1980 г.

УДК 616—005.4:612.04.464

О. А. Москвитина, А. В. Трубецкой

### ДИНАМИКА НАПРЯЖЕНИЯ КИСЛОРОДА И СОКРАТИМОСТИ РАЗНЫХ СЛОЕВ МИОКАРДА ПРИ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ИШЕМИЯХ

Взаимоотношения между регионарной перфузией миокарда и локальной сократительной функцией до сих пор не установлены. Эта проблема представляет особый интерес в условиях неадекватного кровоснабжения миокарда, так как имеет прямое отношение к ишемической болезни сердца. В условиях недостаточного кровоснабжения субэндокардиальные слои миокарда испытывают более значительную недоперфузию, чем субэпикардиальные, и чаще страдают от ишемии. Поэтому весьма актуально изучение соотношения напряжения кислорода (Р<sub>О<sub>2</sub></sub>) и сократительной активности разных слоев миокарда при локальной ишемии.

#### Методика исследований

На собаках со вскрытой грудной клеткой в условиях острого опыта регистрировали локальное Р<sub>О<sub>2</sub></sub>, сократимость сегмента миокарда, давление в левом желудочке, его первую производную, электрограмму сердца. Р<sub>О<sub>2</sub></sub> регистрировали полярографически. В качестве рабочих использовали золотые и платиновые электроды диаметром от 15 до 100 мкм, которые погружали в стенку левого желудочка на глубину, соответствующую субэпикардиальным (2 мм) и субэндокардиальным (7 мм) слоям. Локальную сократимость миокарда регистрировали модифицированными миниатюрными тензометрическими арочными датчиками типа Уолтон—Броуди с использованием кремниевых тензоэлементов. Для регистрации сократимости поверхностных слоев миокарда датчики подшивали параллельно большой оси сердца и поверхностным волокнам, сократимость внутренних слоев регистрировали, ориентируя датчики перпендикулярно большой оси сердца и глубоко прошивая миокард (см. рисунок). Левую нисходящую коронарную артерию в нижней трети или ее веточку пережимали на 30—180 с. Исследуемые показатели сравнивали с исходными, изменения выражали в процентах.

#### Результаты исследований

Как видно из табл. 1, значительное уменьшение сократительной функции миокарда наступало в первые 5—10 с после начала окклюзии, Р<sub>О<sub>2</sub></sub> снижалось более плавно. В субэндокардиальном слое миокарда в большей части экспериментов наблюдали более выраженное, чем в субэпикардиальном слое, снижение измеряемых параметров. В

#### Динамика напряжения кислорода

части экспериментов в субэндокардиальном слое Р<sub>О<sub>2</sub></sub> снижалось до 32±9,1 % от исходного уровня.

Возобновление перфузии в течение 30 с приводило к восстановлению исходных показателей Р<sub>О<sub>2</sub></sub> и сократимости.

#### Схема расположения датчиков электродов на сердце

Тензометрический датчик для регистрации сократимости субэндокардиальных (1) и субэпикардиальных (2) слоев миокарда; электрод для полярографической регистрации напряжения кислорода в миокарде (3). ОКА — огибающая ветвь левой коронарной артерии; НКЛ — нисходящая ветвь левой коронарной артерии. ЭГ — электрограммы сердца; ДЛЖ — датчик для регистрации давления в левом желудочке. Стрелкой обозначено место пережатия коронарной артерии.

после восстановления перфузии Р<sub>О<sub>2</sub></sub> достигал исходного уровня. Динамика восстановления Р<sub>О<sub>2</sub></sub> в субэндокардиальном слое аналогичной, однако, исходный

#### Изменение локального

| Время с начала ишемии, с | Локальная сократимость миокарда, М±m |
|--------------------------|--------------------------------------|
| 10                       | 83,84±1,14                           |
| 20                       | 75,17±1,44                           |
| 30                       | 71,0±1,78                            |
| 60                       | 67,44±1,9                            |
| 120                      | 72,43±1,31                           |
| 180                      | 73,0±4,62                            |
| 10                       | 70,13±3,67                           |
| 20                       | 68,71±2,85                           |
| 30                       | 66,2±2,31                            |
| 60                       | 62,77±3,73                           |
| 120                      | 63,33±4,02                           |
| 180                      | 64,4±4,55                            |

В субэндокарде сократимость его превышения. Время достижения максимума сократимости в слоях существенно не отличалось, зависела от длительности ишемии, чем в субэндокардиальном слое, чем в субэпикардиальном слое, ритм не наблюдали.