

УДК 616.127—005.4—06:616.127—091.818

В. И. Канелько, Н. А. Новикова, В. В. Куприянов, В. А. Саке

Роль креатинфосфокиназы в энергообеспечении насосной функции сердца

Изучали значение фосфокреатинового и аденилатного путей транспорта энергии в кардиомиоцитах для сократительной функции изолированного сердца крысы посредством ингибирования транспорта молекул фосфокреатина иодацетамидом (ИАА) или преимущественного уменьшения содержания адениннуклеотидов при обработке 2-деоксиглюкозой (ДОГ). В обоих случаях нарушения энергоснабжения возникающая недостаточность сократительной функции сердца сочетается с неполным расслаблением и сниженной растяжимостью миокарда, что особенно критично для выполнения насосной функции. Вместе с тем ингибирование фосфокреатинового пути сопровождалось значительно более глубоким нарушением насосной функции сердца. Это позволяет считать, что креатинфосфокиназная система является жизненно необходимой для осуществления полного расслабления миофибрилл и их адекватного растяжения во время диастолы, а также для поддержания высокой работоспособности сердца.

Введение

Известно, что в кардиомиоцитах энергоснабжение миофибрилл и других структур осуществляется транспортом молекул АТФ или фосфокреатина. Первый путь транспорта получил название аденилатного, второй — фосфокреатинового. Последний обеспечивается наличием в ключевых пунктах клеток изoenзимов креатинфосфокиназы, преобразующей митохондриальный АТФ в фосфокреатин, а в местах использования энергии — катализирующей обратную реакцию [1, 5—9, 13, 14]. Существование второго пути постулировалось биохимиками [5, 6] и было подтверждено результатами физиологических опытов на изолированных волокнах с гиперпроницаемой сарколеммой, которые показали, что вызванная дефицитом АТФ контрактура миофибрилл может быть предотвращена или устранена при добавлении фосфокреатина [1, 13, 14].

Однако сведений о значении креатинфосфокиназы для сократительной функции сердца практически нет. Недавно показано [10], что иодацетамид (ИАА) способен ингибировать креатинфосфокиназу практически полностью, в то время как активность ключевого фермента гликолиза — 3-альдегидросфатдегидрогеназы — сохраняется на уровне 30 %, а окислительное фосфорилирование практически не нарушается. При этом изоволюмическое развиваемое давление в левом желудочке оставалось неизменным.

Другой подход к оценке фосфокреатинового пути был основан на создании «фосфатной ловушки» в результате применения ингибитора гликолиза — 2-деоксиглюкозы (ДОГ), с помощью которой оказалось возможным снизить запасы АТФ примерно в 3 раза, в то время как содержание фосфокреатина снижалось всего на треть [12].

© В. И. КАПЕЛЬКО, Н. А. НОВИКОВА, В. В. КУПРИЯНОВ, В. А. САКС, 1991

INSS 0201-8489. Физиол. журн. 1991. Т. 37. № 6.

Таким образом, применение ИАА и ДОГ позволяет ингибировать либо фосфокреатиновый, либо аденилатный путь, что открывает возможность сравнительной оценки их значения для сократительной функции изолированного сердца. Это и было задачей наших исследований.

Методика

Опыты проводили на изолированном сердце крыс массой 200—300 г, наркотизированных уретаном (1,6 г/кг внутривенно), для перфузии использовали раствор Кребса, содержащий 11 ммоль/л глюкозы, 5 ммоль/л пирувата и 10 МЕ/л инсулина. После насыщения раствора смесью O_2 (95 %) с CO_2 (5 %) pH раствора был в пределах 7,3—7,4. Перфузию осуществляли при 37 °C двумя способами — ретроградным и антеградным. Первый способ, при котором перфузия происходила через аорту при постоянном потоке 15 мл/мин, задаваемом перистальтическим насосом, применяли в начале каждого опыта для оценки воздействия метаболического ингибитора. Второй способ, при котором перфузия происходила естественным путем — через канюли, введенные в левое предсердие и аорту, использовали для оценки насосной функции сердца. Приток к сердцу изменяли, варьируя давление наполнения от 5 до 20 см вод. ст., при этом давление сопротивления сохранялось на уровне 80 см вод. ст. Затем при максимальном давлении наполнения полностью перекрывали отток перфузату из аортальной камеры, направляя весь аортальный выброс в коронарное русло, что позволяло достичь максимальной функциональной активности сердца.

Насосную функцию сердца характеризовали минутным объемом, представлявшим сумму аортального выброса и коронарного потока. Минутный объем измеряли с помощью электромагнитного флоуметра фирмы «Carolina Medical Electronics». В левый желудочек (ЛЖ) через стенку вводили иглу, давление в полости ЛЖ и аортальной камере измеряли с помощью электроманометров фирмы «Gould Statham» марки 23Св. Эти параметры, а также первую производную давления в ЛЖ регистрировали на приборе фирмы «Gould» марки 2600 S. Вычисляли показатель работы сердца как произведение среднего аортального давления на минутный объем (мм рт.ст.·мл·мин⁻¹).

Для характеристики расслабления определяли константу времени расслабления в изоволюмическом режиме [3], а для оценки растяжимости сердца в диастоле вычисляли показатель диастолической упругости ЛЖ посредством деления разности, полученной от вычитания минимального диастолического давления из конечного диастолического давления, на показатель заполнения желудочка за диастолу [3], который в условиях стабильной работы равен ударному объему. Поскольку давление наполнения было фиксированным, наполнение ЛЖ определялось изменениями диастолического давления. Поэтому критерием наполнения ЛЖ была площадь давления наполнения, ограниченная сверху фиксированным давлением наполнения, а снизу — кривой диастолического давления.

Введение ингибиторов метаболизма осуществляли во время ретроградной перфузии, при этом действие 0,5 ммоль/л ИАА длилось 15 мин с последующим 15-минутным его отмыванием [10]. Перфузия сердца с добавлением 2-ДОГ длилась 30 мин и его отмывание — 60 мин, что необходимо для постепенного восстановления содержания фосфокреатина (ФК) [12]. Содержание АТФ и ФК в сердце, замороженном шипцами Волленберга после отмывания ингибиторов, определяли энзиматическим методом [12].

Результаты

Оба способа ингибирования метаболизма сопровождались существенным изменением показателей энергетического метаболизма сердца. Действие ИАА, сопровождавшееся почти полным ингибированием креатинфосфокиназы (ее активность была менее 1 % исходной), приводило к умеренному снижению содержания фосфата (Φ_n), АТФ (на 31 %) и ФК (на 44 %) [4]. При этом отношение ФК к Φ_n снизилось примерно в 3 раза. В отличие от этого, обработка сердца ДОГ значительно больше снизила содержание АТФ (на 72 %), но в меньшей мере повлияла на содержание ФК, которое снизилось на 32 %. При этом

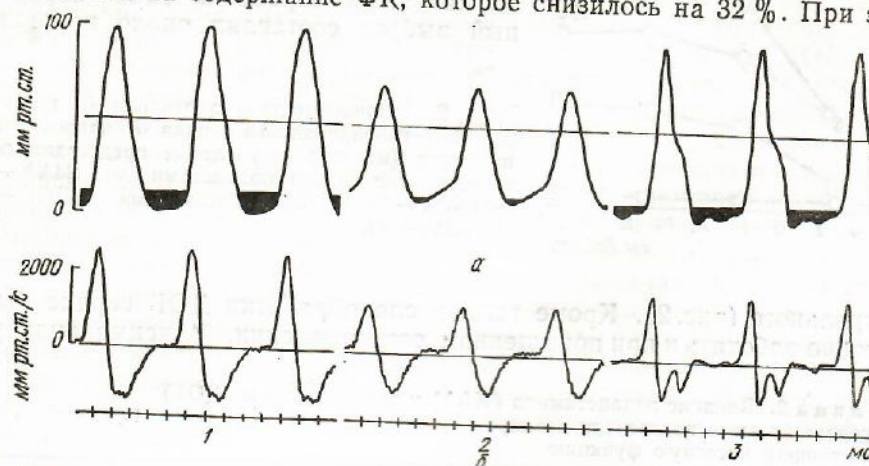


Рис. 1. Давление в левом желудочке (а) и его первая производная — $+dp/dt$ — (б) контрольного сердца (1), сердца, обработанного иодацетамидом (2) и 2-деоксиглюкозой (3). Заштрихованы участки, лежащие ниже значений стабильного давления в левом предсердии.

как содержание Φ_n , так и отношение ФК к Φ_n сохранились практически неизменными. Интенсивность потока через креатинфосфокиназу снижалась только на 30 % [4, 12].

В отличие от этого, значения показателей сократительной функции изолированного сердца, не выполнявшего внешней работы, в обеих сериях были не ниже соответствующих контрольных значений (табл. 1). Однако после перехода к антеградной перфузии, когда сердце начинало выполнять насосную функцию, эта функция оказалась значительно сниженной в обеих экспериментальных сериях не только по сравнению с исходной, но также и с соответствующей по времени контрольной (табл. 2). При этом неизменными оставались лишь частота сокращений и скорость коронарной перфузии, а показа-

Таблица 1. Влияние иодацетамида (ИАА) и деоксиглюкозы (ДОГ) на функциональные показатели изолированного сердца при ретроградной перфузии

Показатель	Контроль-1 (5)	ИАА (6)	Контроль-2 (10)	ДОГ (7)
Частота сокращений, мин^{-1}	241 ± 10	257 ± 22	258 ± 12	245 ± 18
Давление, мм рт. ст.:				
систолическое	66 ± 5	61 ± 6	72 ± 3	$95 \pm 5^*$
конечное диастолическое	$0,4 \pm 0,8$	$3,7 \pm 2,5$	$3,2 \pm 0,8$	$6,0 \pm 1,0$
перфузионное в аорте	69 ± 6	69 ± 4	78 ± 4	$99 \pm 6^*$
Максимальная скорость, мм рт. ст./с.:				
развития давления	2180 ± 180	1870 ± 258	2330 ± 200	3070 ± 264
снижения давления	1400 ± 120	1070 ± 50	1610 ± 110	1500 ± 80
Изоволюмическая константа расслабления, с^{-1}	63 ± 3	46 ± 8	67 ± 4	74 ± 6

* $P < 0,01$ по сравнению с контролем.

тели, характеризующие насосную функцию, были достоверно ниже, особенно после обработки ИАА. Это сердце было неспособно поддерживать стандартный уровень аортального давления, аортального выброса практически не было. Низкая насосная функция при этом сочеталась со снижением систолического давления и крайне малой площадью давления наполнения (рис. 1). Подобные изменения после обработки ДОГ менее выражены.

После обработки ИАА внешняя работа сердца не проявлялась при любом давлении в левом предсердии, в то время как после обработки ДОГ аортальный выброс составлял около половины

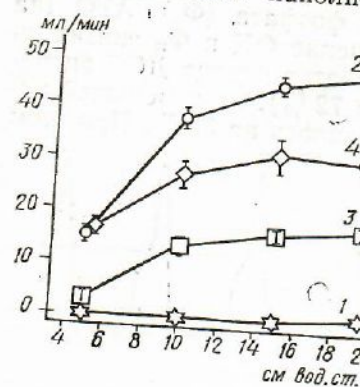


Рис. 2. Зависимость аортального выброса (мл/мин) изолированного сердца от давления наполнения (мм вод. ст.) в левом предсердии после обработки сердца иодацетамидом (ИАА — 1, контроль — 2) и 2-деоксиглюкозой (ДОГ — 3, контроль — 4).

контрольного (рис. 2). Кроме того, после обработки ДОГ сердце было способно работать и при повышенном сопротивлении. Максимальная ра-

Т а б л и ц а 2. Влияние иодацетамида (ИАА) и деоксиглюкозы (ДОГ) на функциональные показатели изолированного сердца, выполняющего насосную функцию

Показатель	Контроль перед ретроградной перфузией (17)	ИАА в течение 30 мин (6)	Контроль после ретроградной перфузии (6)	ДОГ в течение 90 мин (6)	Контроль после ретроградной перфузии (9)
Минутный объем, мл/мин	64±2	14±4*	56±5	29±2*	44±2
Аортальный выброс, мл/мин	47±3	3±3*	42±5	16±2*	32±3
Коронарный поток, мл/мин	17±1	11±1	14±2	13±1	12±1
Частота сокращений, мин ⁻¹	277±10	249±21	262±13	260±10	268±10
Работа сердца, мм рт. ст. мл·мин ⁻¹	4548±238	862±293*	3960±422	1894±124*	2984±167
Максимальная скорость, мм рт. ст./с: развития давления	6320±360	2210±400*	5500±480	3480±300	4670±440
снижения давления	3790±430	1160±157*	3450±250	1940±64*	2930±190
Извольюмическая константа расслабления, с ⁻¹	70±6	42±9*	68±2	71±3	68±4
Давление, мм рт. ст.: систолическое в левом желудочке	122±4	66±8*	98±7	93±2	103±5
минимальное диастолическое	0,5±0,5	7,6±1,6*	1,2±0,7	4,5±1,0*	1,8±0,6
конечное диастолическое	9±0,5	14±1*	8±1	14±1	11±1,5
Диастолическая упругость левого желудочка, мм рт. ст./мл	31±4	106±15*	33±2	88±12	54±3
Площадь давления наполнения левого желудочка, мм рт. ст.·с	0,63±0,07	0,13±0,1*	0,54±0,08	0,26±0,1	0,40±0,07

* $P < 0,01$ по сравнению с соответствующим контролем.

бота сердца этой серии — (2395 ± 105) мм рт. ст. · мл · мин⁻¹ — была ниже соответствующего контрольного значения — (3000 ± 232) мм рт. ст. × мл · мин⁻¹ — всего на 20 % ($P < 0,05$), а после обработки ИАА максимальное значение работы, наблюдавшееся в ходе увеличения притока — (1223 ± 287) мм рт. ст. · мл · мин⁻¹ — составляло 27 % своего контроля.

Обсуждение

Результаты исследований показали, что ингибирование фосфокреатинного пути транспорта энергии посредством ИАА сопровождается значительно более глубокой депрессией насосной функции сердца, чем ингибирование аденилатного пути транспорта посредством ДОГ. В первом случае, при доминировании аденилатного пути, сократительная функция сердца остается неизменной только при ретроградной перфузии и невысокой функциональной активности, что согласуется с ранее полученными данными [10]. В этих условиях энергетический запрос миофибрилл, вероятно, может вполне быть удовлетворен прямой диффузией АТФ. Однако такое сердце оказалось неспособным выполнять устойчивую насосную функцию, что обусловлено сниженным систолическим давлением в ЛЖ. Поскольку этот показатель не был снижен при ретроградной перфузии, можно думать, что неспособность развивать достаточно высокое давление при антеградной перфузии обусловлена плохим наполнением полости ЛЖ, о чем могут свидетельствовать крайне малая площадь давления наполнения ЛЖ и повышенная диастолическая упругость ЛЖ, что типично для энергодефицита вообще [3].

Основу такого ухудшения растяжимости миокарда, вероятно, составляет контрактура, вызванная недостаточным рефосфорилированием молекул АДФ в миофибриллах. Их диффузия к митохондриям значительно затруднена из-за низкого концентрационного градиента АДФ, который примерно в 200 раз меньше, чем АТФ. Увеличение числа молекул АДФ, связанных с миозиновой АТФазой, как известно, приводит к тому, что некоторое число актомиозиновых связей остается неразомкнутым во время диастолы. Возникающая вследствие этого сниженная растяжимость миофибрилл может значительно ограничивать необходимую развиваемую силу сокращения. Сходные изменения сократительной функции сердца — ограниченная максимальная работа и повышенная диастолическая упругость ЛЖ — отмечены также при хроническом ингибировании фосфокреатинного пути из-за дефицита креатина, созданного применением ингибитора его транспорта в кардиомиоциты — гуанидинпропионата [2].

Эти изменения были значительно менее выраженными при действии ДОГ. В этой серии, как показали контрольные опыты, значительное увеличение длительности ретроградной перфузии ухудшает восстановление насосной функции сердца, что было отмечено ранее [11]. Причина этого, возможно, связана с уменьшением растяжимости ненагружаемого левого предсердия. Сохранение примерно 50 % насосной функции сердца наблюдалось, несмотря на весьма низкое содержание АТФ при действии ДОГ. Сниженная при этом скорость метаболического потока через креатинфосфокиназу все же выше, чем скорость гидролиза АТФ [12] и поэтому, вероятно, достаточна для адекватного снабжения миофибрилл молекулами АТФ.

В ряде работ было показано, что сократительная функция сердца более тесно коррелирует со скоростью потока через креатинфосфокиназу, чем с содержанием фосфокреатина или АТФ [7—9]. Кроме того, как было показано в опытах на миокардиальных волокнах с гиперпроницаемой сарколеммой, наличие действующей креатинфосфокиназной системы необходимо не только для осуществления полного расслабления миофибрилл [1, 13, 14], но и для поддержания их нормальной чувствительности к ионам Ca^{2+} [13].

11. Kreher P., Verdeti J. Role of ATP in the maintenance of action potential configuration of the isolated rat heart // *Cardiovasc. Res.*—1986.—20.—P. 89—99.
12. Kupriyanov V. V., Lakomkin V. L., Kapelko V. I. et al. Dissociation of adenosine triphosphate levels and contractile function in isovolumic hearts perfused with 2-deoxyglucose // *J. Mol. Cell. Cardiol.*—1987.—19.—P. 729—740.
13. McClellan G., Weisberg A., Winegrad S. Energy transport from mitochondria to myofibril by a creatine phosphate shuttle in cardiac cells // *Amer. J. Physiol.*—1983.—245.—P. C423—C427.
14. Ventura-Clapier R., Saks V. A., Vassort G. et al. Reversible MM-creatine kinase binding to cardiac myofibrils // *Ibid.*—1987.—253 (*Cell. Physiol.* 22).—P. C444—C455.

Науч.-исслед. ин-т
эксперим. кардиологии
Всесоюз. кардиол. науч. центра
АМН СССР, Москва

Материал поступил
в редакцию 03.06.91

УДК 616.127—005.4—06:616.127—091.818

В. В. Куприянов, В. Л. Лакомкин, А. Я. Штейншнейдер,
В. И. Векслер, О. В. Корчажкина, В. И. Капелько, В. А. Сакс

Адренергическая стимуляция сердца при ингибировании фосфокреатинового или аденилатного пути транспорта энергии в кардиомиоцитах

Изучали функциональный и метаболический ответ изоволюмического сердца крыс на изопроterenол (0,1 мкмоль/л). Сердце, в ткани которого содержится нормальное количество адениннуклеотидов (АН), а также фосфокреатина (ФКр), и сердце, в ткани которого снижено в 5 раз содержание АН, реагировали значительным увеличением (на 50, 30—40 и 100—150 % соответственно) индекса работы сердца (ИРС), максимальной скорости сокращения и максимальной скорости расслабления. Эффект сохранялся в течение всего периода действия гормона (30 мин) и сопровождался временным снижением содержания ФКр. Сердце, в ткани которого снижен вдвое поток метаболитов через креатинкиназу (КК) и нормальное содержание АН, реагировало на гормон меньшим и замедленным приростом функции, а сердце с почти полностью ингибированной иодацетамидом (ИАА) КК отвечало небольшим и кратковременным приростом функции. При этом концентрация ФКр и АТФ необратимо падала до очень низких значений, что было сопряжено с увеличением содержания неорганического фосфата. Как базальная, так и стимулированная изопроterenолом аденилатциклическая активность не изменялась под действием ИАА. Увеличение ИРС коррелировало с увеличением концентрации цитоплазматического АДФ, однако эта корреляция не универсальна. Креатинкиназная система обеспечивает не только максимальную работу сердца, но и быстрый физиологический ответ на стимуляцию катехоламинами.

Введение

Быстрая потеря сократительной активности миокарда при аноксии и метаболическом ингибировании сопряжены также с подавлением устойчивого инотропного эффекта катехоламинов [30]. Среди многих возможных причин этого явления — уменьшение количества фосфокреатина (ФКр), отношения [АТФ]/[АДФ] и потенциала фосфорилирования, что может сопровождаться подавлением работы сердца как

© В. В. КУПРИЯНОВ, В. Л. ЛАКОМКИН, А. Я. ШТЕЙНШНЕЙДЕР, В. И. ВЕКСЛЕР,
О. В. КОРЧАЖКИНА, В. И. КАПЕЛЬКО, В. А. САКС, 1991

в результате прямого действия на миофибриллы, так и посредством ингибирования оборота Ca^{2+} . В связи с этим представляет большой интерес изучение эффекта катехоламинов на искусственно созданных моделях состояния миокарда, дефицитного по макроэргическим соединениям.

Так, в частности, для оценки роли креатинкиназной и аденилатной систем в обеспечении сократительной активности сердца пользовались двумя основными подходами [1, 7, 8, 16, 20—22, 24, 29]. Первый из них заключается в частичном или полном ингибировании креатинкиназы (КК) посредством замещения клеточного креатина (Кр) и ФКр метаболитически инертными β -гуанидинпропионатом (ГП) и его N-фосфорилированным производным [1, 7, 16, 20, 21, 23, 24, 29], либо перфузией сердца с иодацетамидом (ИАА) [8, 20, 22]. Вторым подходом основывается на способности 2-дезоксиглюкозы (ДГ) истощать фонд цитоплазматических адениннуклеотидов (АН) на 80 % их количества в нормальном сердце, обработанное ДГ, сохраняло около 75 % нормального значения индекса работы и содержания ФКр [20, 22, 24]. Уменьшение сократительной функции в обоих случаях может происходить за счет или замедления переноса энергии от митохондрий к миофибриллам и ионным насосам, или подавления оборота ионов кальция, или того и другого одновременно [1, 16, 20—22, 24]. Для того, чтобы различить эти две возможности использования катехоламинов, ускоряющих оборот Ca^{2+} [17, 28, 32], было бы полезным, как это было продемонстрировано ранее Ambrosio и соавт. [2], при исследовании постишемического миокарда.

В нашей работе, проведенной на изолированном сердце крысы, мы обнаружили, что эффект стимуляции сократительной функции миокарда изопроterenолом сохранялся в сердце, дефицитном по АН, но был замедленным и ограниченным в сердце с частично или полностью заблокированной КК. Эти результаты позволяют полагать, что цитоплазматические адениннуклеотиды не являются лимитирующим фактором в поддержании максимальной производительности сердца и максимальной скорости ответа на увеличенную нагрузку, тогда как креатинкиназная система может быть необходимой для обеих этих функций.

Методика

Перфузию сердца и накопление спектров ^{31}P -ЯМР выполняли так, как описано в предыдущих работах [1, 16, 22—24]. Сердце перфузировали через аорту модифицированным перфузатом Кребса — Хензеля, содержащим 5 ммоль/л пирувата в качестве окисляемого субстрата, со скоростью около 15 мл/мин. В левый желудочек помещали заполненный жидкостью латексный баллончик, в котором регистрировали давление. Вместимость баллончика была оптимальной для развития максимального давления. Сердце помещали в ампулу спектрометра ЯМР СХР-200 (фирма «Bruker», Германия) и осуществляли непрерывную регистрацию спектров ^{31}P -ЯМР, исходя из которых оценивали содержание ФКр, АТФ и P_i .

Были исследованы четыре группы сердец: 1-я группа — контрольная, которая состояла из нормальных сердец; 2-я группа — сердца, дефицитные по Кр; 3-я группа — сердца, обработанные ИАА; 4-я группа — сердца, дефицитные по АН.

Выдерживая животных на диете с 1 % -ным ГП по описанной ранее методике [1, 7, 16, 29], добивались истощения Кр. Это приводило к замещению 80 % клеточного Кр и ФКр на ГП и ФГП. В табл. 1 приведены средние значения и их стандартные ошибки для пяти сердец в каждой группе. Креатинкиназную активность в сердцах, истощенных по АН и Кр, определяли как однонаправленный поток между ФКр и АТФ, измеренный методом переноса насыщения [22, 24], отнесенный к контрольному значению. Активность препаратов, обработан-