

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-

ных ИАА, определяли как общую активность гомогената (по обратной реакции) и относили к активности в контрольной группе. Обработку сердца ИАА осуществляли посредством 15-минутной перфузии с 0,5 ммоль/л ИАА и последующей отмывки раствором, не содержащим ИАА [8, 22]. Дефицит АН создавали согласно описанной ранее методике [15, 22, 24], перфузией сердца с 2 ммоль/л ДГ в присутствии 10 МЕ/л инсулина и 5 ммоль/л пирувата в течение 30 мин и последующей отмывкой ДГ в течение 60 мин. Изопротеренол (0,1 мкмоль/л) добавляли к перфузату после стабилизации работы сердца; его действие продолжалось в течение 30 мин с последующей 30-минутной отмывкой.

Таблица 1. Исходные параметры различных групп сердец, взятых в эксперимент

Группа сердец	ИРС, $\times 10^3$ мм рт. ст./мин	Содержание фосфатов, мкмоль/г сухой массы			Относительная активность КК, % контрольной
		ФКр	АТФ	Φ_n	
Нормальные	$34,0 \pm 2,0$	$39,0 \pm 1,8$	$18,2 \pm 1,1$	$7,5 \pm 1,2$	100
Истощенные по адениннуклеотидам	$30,0 \pm 1,0$	$26,5 \pm 1,1$	$5,1 \pm 0,4$	$5,7 \pm 1,2$	70
Истощенные по креатину	$29,0 \pm 3,0$	$7,3 \pm 0,4$	$21,6 \pm 1,2$	$6,0 \pm 1,2$	50
		[ФГП] $-28,2 \pm 4,8$			
Обработанные иодацетамидом	$24,0 \pm 2,0$	$21,8 \pm 1,6$	$12,6 \pm 0,9$	$15,0 \pm 2,0$	1

Приготовление образцов ткани сердца, тканевую экстракцию, измерения креатинкиназной активности и содержания АТФ, АДФ, АМФ и ФКр [3] проводили так, как описано ранее [1, 16, 23, 24]. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в тканевых гомогенатах измеряли по методу Bergmeyer [3]. Аденилатциклазную активность определяли, используя [α - 32 P] АТФ, согласно методу White [31], в сарколемальной фракции, выделенной по методике, описанной в работе Rapchenko и соавт. [27].

Пируват натрия, глюкоза, ферменты, нуклеотиды и иодацетамид были получены от фирмы «Sigma» (США), 2-дезоксид-Д-глюкоза и ЭДТА были поставлены фирмой «Merck» (Германия). Соли были квалификации «х. ч.» и «о. с. ч.»

Результаты

1. *Функциональное и энергетическое состояние сердца.* Начальные функциональные и метаболические параметры сердца перед введением изопротеренола приведены в табл. 1. Индекс работы сердца (ИРС) был достоверно снижен на 30 % в обработанных ИАА сердцах и имел тенденцию к снижению и в других группах на 12—15 %. В сердцах, дефицитных по Кр, содержание ФКр снижалось в 5 раз, а креатинкиназный поток — в 2 раза по сравнению с контролем [1, 16], тогда как содержание АТФ и Φ_n не изменялось. В сердцах, обработанных ИАА, в которых активность КК ингибировалась на 99 %, сохранялось 55 % ФКр, 70 % АТФ и содержалось в 2 раза больше Φ_n . Наконец, в сердцах, обработанных ДГ, было значительно снижено содержание АТФ (30 % нормального), в то время как содержание ФКр и однонаправленный поток через КК, ФКр $\rightarrow$ АТФ снижались гораздо меньше, а содержание Φ_n не изменялось вообще [20—22, 24].

Для того, чтобы получить информацию о распределении АН после обработки ДГ, контрольные и обработанные ДГ сердца перфузировали раствором, имитирующим внутриклеточную среду и содержащим 100 мг/л сапонины, в течение 30 мин при 10 °С, чтобы разрушить клеточную мембрану и удалить цитоплазматические адениннуклеотиды.

В табл. 2 приведены средние значения и их стандартные ошибки для трех сердец. Сердца перфузировали в течение 1 ч при 37°C либо без ДГ (контроль), либо с 10 ммоль/л ДГ. Затем сердца перфузировали при 10°C либо раствором, имитирующим внутриклеточную среду (см. [22]) и содержащим 100 мг/мл сапонины, в течение 30 мин с последующим замораживанием, либо с замораживанием до введения сапонины. Лактатдегидрогеназная активность в сердцах, обработанных

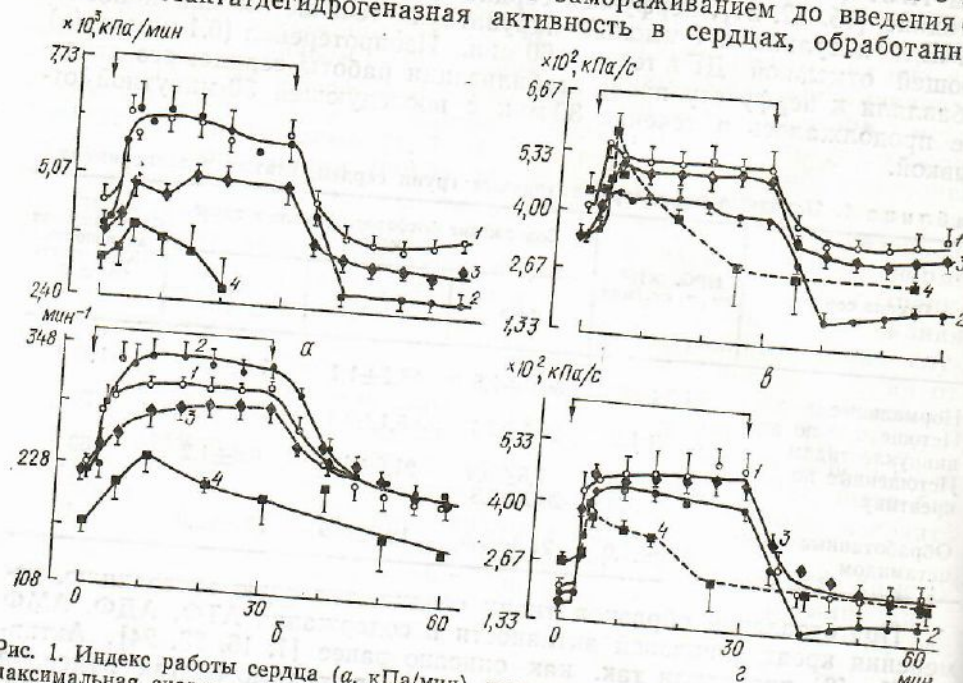


Рис. 1. Индекс работы сердца (а, кПа/мин), частота сердечных сокращений (б, мин⁻¹), максимальная скорость сокращения и расслабления (в, г соответственно, кПа/с) под влиянием изопроterenола (моменты введения и отмычки препарата показаны стрелками).

ДГ, была принята равной контрольной. Обработка сапонином приводила к удалению 91—94 % общего Кр миокарда и 87 % ЛДГ, что свидетельствовало о разрушении сарколеммы в 90 % кардиомиоцитов (см. табл. 2). Одновременно содержание АН в контрольных сердцах уменьшалось до 31 % исходного, в то время как в препаратах, предварительно обработанных ДГ, эта величина практически не изменялась и ее значения были близки к исходному (37 %), характерному для АН-дефицитных сердец (см. табл. 2).

2. *Эффект изопроterenола.* Введение 0,1 мкмоль/л изопроterenола увеличивало значение ИРС в контрольных и дефицитных по АН сердцах на 50—70 %, тогда как сердца, дефицитные по креатину и обработанные ИАА, реагировали меньше (на 35 и 25 % соответственно, рис. 1: 1 — нормальное сердце, 2 — дефицитное по адениннуклеотидам, 3 — дефицитное по фосфокреатину, 4 — обработанное йодацетамидом). Более того, стимуляция сердец, обработанных ИАА, была транзитор-

Таблица 2. Влияние обработки сапонином на содержание некоторых цитозольных компонентов в контрольных и истощенных по адениннуклеотидам (АН) сердцах

Группа сердец	До обработки			После обработки		
	Креатин	Аденин-нуклеотиды	Лактат-дегидрогеназа	Креатин	Аденин-нуклеотиды	Лактат-дегидрогеназа
Нормальные	49,3±1,7 (100)	23,9±0,9 (100)	152±5 (100)	2,8±0,3 (5,6)	7,4±0,7 (31)	17,6±0,3 (11,6)
Истощенные по АН	44,0±2,5 (100)	8,8±1,3 (37)	152±5 (100)	4,0±0,8 (9,0)	8,5±0,8 (36)	19,8±1,7 (13)

ной, и за ней следовало падение значения ИРС, начинавшееся после 5 мин. В других группах значения ИРС были постоянными в течение всего периода действия катехоламина и возвращались к несколько более низкому по сравнению с исходными после отмывки изопротеренола (см. рис. 1, а). Вызванное изопротеренолом увеличение значения ИРС происходило, в основном, из-за подъема спонтанной частоты сердечных сокращений (ЧСС) в 1,3—1,5 раза (см. рис. 1, б), в то время как систолическое давление (СД) оставалось почти неизменным. Аналогично, последующее уменьшение значения ИРС, наблюдавшееся после удаления изопротеренола, также было связано со снижением ЧСС до исходного значения. Максимальные скорости сокращения и расслабления ($+dp/dt_{\max}$ и $-dp/dt_{\max}$ соответственно; рис. 1, в, г) значительно увеличивались под

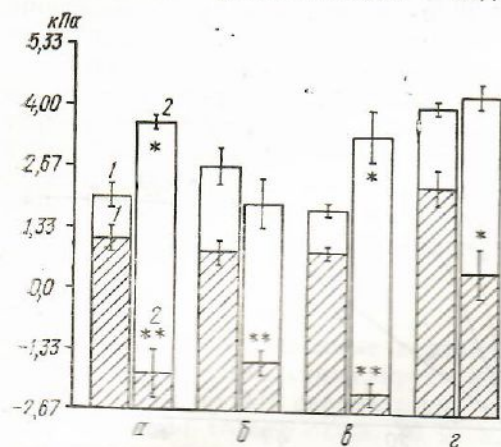
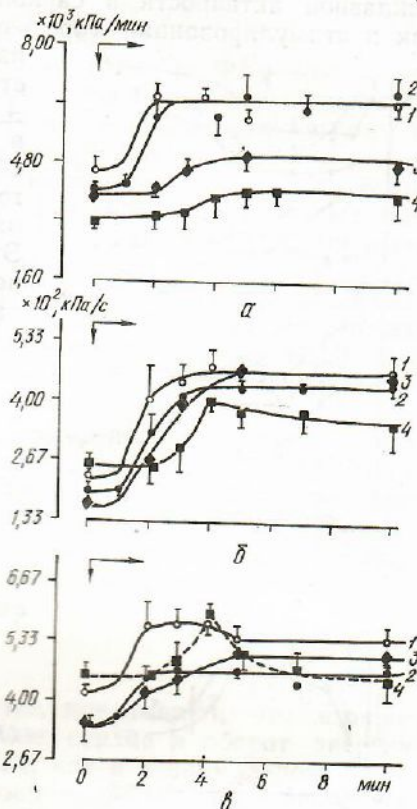


Рис. 2. Минимальное диастолическое давление (заштрихованные столбики) и конечное диастолическое давление (светлые столбики) в контрольном (а) и обработанном 2-дезоксиглюкозой (б), β -гуанидинпропионатом (в), ноацетамидом (г) сердце до (1) и после (2) воздействия изопротеренолом.

Рис. 3. Время (мин) максимальной ответной физиологической реакции (по а — индексу работы сердца; б, в — скорости сокращения и расслабления соответственно) на стимуляцию изопротеренолом (условия эксперимента и обозначения кривых те же, что и на рис. 1).



действием изопротеренола на 40—60 % соответственно. И в этом случае в сердцах, отравленных ИАА, эффект был транзиторным, стимуляция сменялась ингибированием. Отметим также, что во всех других группах максимальная скорость расслабления ($-dp/dt_{\max}$) была более чувствительна к стимуляции изопротеренолом, чем $+dp/dt_{\max}$.

Во всех группах под влиянием изопротеренола наблюдалось значительное снижение минимального диастолического давления (МДД), лишь в группе обработанных ИАА сердец наблюдалось заметное и транзиторное снижение МДД (рис. 2). Кроме того, в контрольных опытах, а также при дефиците Кр наблюдалось достоверное повышение КДД.

Таким образом, обработанные ИАА сердца были не в состоянии поддерживать повышенную активность сократительной функции во время стимуляции изопротеренолом. Кроме того, различия между этими группами проявлялись в скорости ответа на стимуляцию изопротеренолом (рис. 3). Действительно, ИРС, $-dp/dt_{\max}$ и $+dp/dt_{\max}$ в контрольных и дефицитных по АН сердцах достигали максимума

через 2—3 мин после введения гормона (задержка объясняется длительной перфузионной линией), тогда как в дефицитных по Кр и ингибированных ИАА сердцах максимальный эффект проявлялся лишь на 5-й минуте.

В связи с наличием слабого инотропного эффекта изопротеренола на обработанные ИАА сердца были проведены измерения аденилатциклазной активности в сарколеммальной фракции. Как базальная, так и стимулированная гормоном аденилатциклазная активность не изменялись под действием ИАА и составляли $11,4 \pm 0,7$ и $69,7 \pm 8,1$ пмоль $\cdot$ мин $^{-1} \cdot$ мг $^{-1}$ соответственно в контрольных и $15,7 \pm 0,4$ и $68,9 \pm 8,4$ в обработанных ИАА сердцах. Кроме того была оценена реакция этих сердец на добавление уабаина (50 мкмоль/л). Это количество в контрольных опытах через 10 мин увеличило значение индекса работы на 30 %, в то время как после обработки ИАА этот индекс понизился на 20 %.

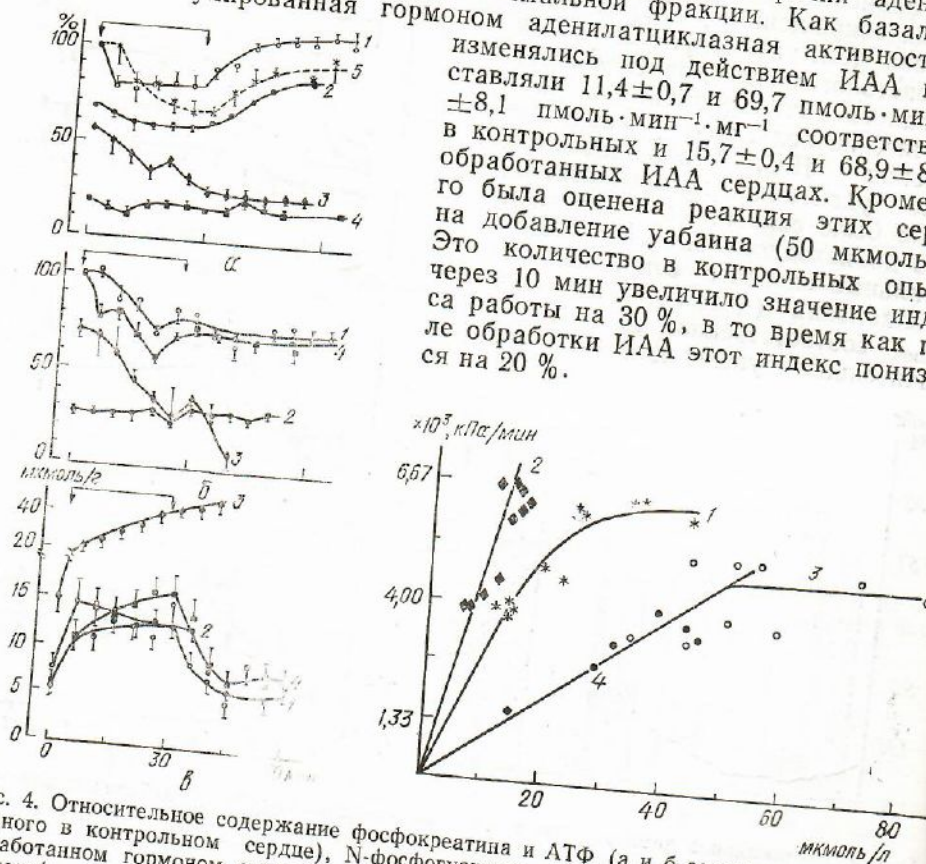


Рис. 4. Относительное содержание фосфокреатина и АТФ (а и б соответственно, % исходного в контрольном сердце), N-фосфогуанидинпропионата (а, б, % исходного в обработанном гормоном сердце) и удельное количество неорганического фосфата (в, мкмоль/г сухой ткани) в перфузируемом сердце под действием изопротеренола (ос- тальные обозначения кривых те же, что и на рис. 1).

Рис. 5. Зависимость индекса работы сердца (кПа/мин) от средней цитозольной концентрации АДФ (мкмоль/л) в ткани контрольного сердца (1), обработанного 2-дезок- сиглюкозой (2), β -гуанидинпропионатом (3) и иодацетамидом (4).

Биохимические изменения, вызванные изопротеренолом, представлены на рис. 4. Содержание ФКр уменьшалось на 20 и 10 % исходного в контрольных и дефицитных по АН сердцах соответственно в течение первых 5—10 мин действия изопротеренола и возвращалось к исходным значениям после его удаления (см. рис. 4, а). При этом содержание Φ_n изменялось прямо противоположным образом. Напротив, в обработанных ИАА сердцах содержание ФКр падало, а Φ_n росло в течение всего периода действия изопротеренола и его отмывки. В сердцах, дефицитных по Кр, содержащих сильно сниженное количество ФКр (5—6 мкмоль/г сухой массы против 30—40 в контроле) и значительное количество ФГП (28 мкмоль/г сухой массы), одновременным высвобождением Φ_n (содержание ФКр, N-фосфогуанидинпропионата — ФГП, АТФ и Φ_n вычисляли из зр-ЯМР-спектров, накапливавшихся каждые 5 мин). Реперфузия этих сердец средой без изопротеренола восстанавливала значения содержания ФКр, ФГП и

Φ_n до близких к исходным. Во всех группах внутриклеточный pH, оцененный по положению пика Φ_n в спектре ЯМР, оставался практически постоянным при введении изопротеренола и его удалении. Содержание АТФ также снижалось на 20—25 % исходного в контрольных и дефицитных по Кр сердцах при действии изопротеренола, но не возвращалось к исходному после удаления последнего. Это может быть объяснено необратимой потерей продуктов распада АН. Предположительно, это является результатом частичного и равномерного распада АН во всех миоцитах, так как содержание ФКр восстанавливалось до значений, превосходящих исходные. Такого рода изменения возможны только в том случае, если все клетки жизнеспособны и в состоянии ресинтезировать ФКр, используя дополнительное количество фосфата, освободившегося при расщеплении АН. В сердцах с предварительно уменьшенным фондом АН изопротеренол не вызывал дальнейшего их распада. Напротив, в обработанных ИАА сердцах, также содержащих уменьшенные запасы АТФ, наблюдался почти полный распад АН при действии изопротеренола и его последующей отмывке (см. рис. 4, б). В последнем случае это было также связано с необратимым падением ФКр и ИРС, а также подъемом КДД, что предполагает наличие необратимых повреждений кардиомиоцитов и их гибель.

Таким образом, стимуляция изопротеренолом сократительной активности изоволюмического сердца сопровождалась уменьшением содержания ФКр и ростом Φ_n , причем эти изменения были устойчивы и обратимы в группе контрольных, а также дефицитных по АН и Кр сердцах. Поэтому можно полагать, что эти изменения отражают естественный регуляторный процесс, а не являются результатом неадекватной региональной оксигенации миокарда.

Обсуждение

Результаты, представленные в этой статье, показывают, что изопротеренол значительно стимулирует функцию сердца и оборот энергии в дефицитном по АН сердце точно так же, как и в нормальном. Первое содержало только около 30 % клеточного АТФ по сравнению с нормальным, причем около половины АТФ локализовано в митохондриях. Сохранение значительной части общего пула АН после обработки сапонином предполагает, что митохондриальный фонд АН заметно не изменился, так как известно, что целостность внутренней митохондриальной мембраны не нарушается при действии использованных концентраций сапонины [22], которые обычно разрушают мембраны, содержащие холестерин, такие, как сарколемма. Действительно, если полагать, что остаточные АН после обработки сапонином состоят из АН интактных клеток (приблизительно 10 % общего клеточного содержания), а также митохондриального и миофибриллярного (АДФ, связанной с актином) фондов клеток с разрушенной сарколеммой, тогда последние составляют около 5—6 мкмоль/г сухой массы (20—25 % их нормального содержания). Это значение хорошо согласуется со значениями, полученными Geisbuhler и соавт. [9] после дигитониновой обработки кардиомиоцитов, которые оценили митохондриальный и миофибриллярный фонды, как 22 и 4 % соответственно. Согласно данным LaNoce и соавт. [25], митохондриальный фонд составляет 20 %. Таким образом, обработка сапонином позволяет селективно удалить цитоплазматический фонд АН. Поэтому тот факт, что не происходит дополнительного снижения содержания АН в сердцах, обработанных ДГ, после действия сапонины, предполагает, что ДГ вызывает деградацию, главным образом, цитоплазматического фонда АН. Если полагать, что митохондриальный АТФ видим в спектрах ЯМР, то тогда цитозольная концентрация АТФ и АДФ в этих препаратах, по крайней мере, в 5—6 раз ниже, чем в нормальных контрольных сердцах. Это предполагает, что цитозольные АН не являются лимитирующим

фактором в переносе энергии от митохондрий к миофибриллам и ионным насосам, когда креатинкиназная система активна.

Потенциальное значение последней системы может быть оценено из сравнения концентраций свободного цитоплазматического АДФ, который является лимитирующим фактором в переносе энергии по аденилатному пути, так как цитозольная концентрация АДФ в 100–400 раз ниже, чем концентрация АТФ, при одинаковых коэффициентах диффузии. Концентрация свободного цитоплазматического АДФ, вычисленная из креатинкиназного равновесия, была в несколько раз выше и в сердцах, истощенных по Кр, и в сердцах, обработанных ИАА, если сравнивать с нормальными и дефицитными по АН сердцами, при тех же значениях ИРС, как это следует из рис. 5. (концентрацию АДФ вычисляли, используя концентрацию АТФ и отношение $[ФКр]/[Кр]$ по креатинкиназному равновесию: $K=104$; цитозольную концентрацию АТФ оценивали, принимая содержание цитоплазматической воды, равным 2,5 мл/г сухой массы, и содержание митохондриальных адениннуклеотидов 20 % общего нормального содержания в митохондриальном АТФ не виден в спектрах ЯМР, вычисленные кривые будут слегка смещены в направлении более высоких значений концентраций АДФ. Таким образом, в зависимости от метаболического состояния, равные значения ИРС достигались при разных значениях концентрации цитоплазматического АДФ.

Более высокие концентрации АДФ в сердцах с частично или полностью блокированной КК, вероятно, отражают, потребности кардиомиоцитов в более высоких концентрациях АДФ, необходимых, чтобы компенсировать снижение скорости переноса энергии, вызванное ингибированием креатинкиназного пути. Это особенно ярко проявляется при обработке сердца ИАА, так как концентрацию АДФ в них следует рассматривать только как нижний предел реальных значений концентрации, поскольку остаточная креатинкиназная активность (1 %) могла быть недостаточной для поддержания креатинкиназного равновесия. В любом случае, сердца с полностью блокированной КК были способны достигать максимальных значений ИРС в ответ на стимуляцию АДФ. Более того, это приводило к дальнейшему необратимому распаду АН, содержание которых уменьшалось до очень низких значений, вероятно, вследствие активации 5'-нуклеотидаз (и фосфатаз), а также дезаминаз. Результаты, представленные на рис. 5, также ясно показывают, что цитозольный АДФ не может быть единственным регулятором оборота энергии в сердце в этих условиях.

В наших экспериментах подъем функциональной активности сердца, связанный с введением изопротеренола, приводил к уменьшению отношения $[ФКр]/[Кр]$ и, следовательно, цитоплазматического $[АТФ]/[АДФ]$ и потенциала фосфорилирования. Аналогичные изменения наблюдались ранее [4, 14] и могут быть отнесены за счет более высокой активации энергетического запроса по сравнению со стимуляцией митохондриального дыхания и синтеза АТФ, вызванных изопротеренолом. Однако это может быть либо отражением внутриклеточного регуляторного процесса, включая активацию окислительного фосфорилирования АДФ, $Ф_n$ [10, 11, 13] и, вероятно, Ca^{2+} (через дегидрогеназы пирувата, изоцитрата и 2-оксоглутарата) [6, 12], либо в результате неадекватной доставки кислорода при скорости коронарной перфузии, использованной в этих экспериментах. Тем не менее, оба эти эффекта могут наблюдаться в реальных физиологических условиях, но они отличаются положением стадии (стадий), контролирующей весь процесс, которая может быть локализована либо на транспорте и фосфатном переносчике, либо на Ca^{2+} -зависимых дегидрогеназах, либо на стадии доставки кислорода к кардиомиоцитам [6, 10–13, 18].

Вызванное изопротеренолом увеличение ИРС, ЧСС, $+dp/dt_{\max}$ и $-dp/dt_{\max}$, при наибольшем значении прироста последнего, и падение минимального диастолического давления являются обычными инотропными эффектами катехоламинов [17, 28, 32]. Неспособность обработанного ИАА сердца с полностью ингибированной КК к увеличению этих показателей в течение такого же длительного периода времени, как в других группах, скорее всего связана со значительно сниженным потенциалом фосфорилирования (особенно в миофибриллярном компартменте) и с нарушенным обеспечением энергией как самого сокращения, так и оборота Ca^{2+} . Прямое влияние ИАА на систему транспорта Ca^{2+} кажется маловероятным, поскольку изопротеренол и убаин, активирующие оборот Ca^{2+} с помощью разных механизмов, не оказывали длительного инотропного действия. Наконец, более значительное увеличение содержания Φ_n в сердце, обработанном ИАА (см. рис. 5, 3), может отчасти отвечать за наблюдаемую сердечную недостаточность, так как Φ_n способен уменьшать Ca^{2+} -чувствительность миофибрилл [19, 26].

Таким образом, результаты, представленные в этой работе, позволяют предположить, что креатинкиназная система может быть необходима не только для обеспечения максимальной работы, но и для быстрого метаболического и физиологического ответа на внезапно возросший энергетический запрос, как это, например, происходит при действии катехоламинов. Кроме того, как было показано в нашей работе [22], эта система особенно необходима для обеспечения насосной функции сердца, для которой нужны как хорошее наполнение левого желудочка (низкое диастолическое давление), так и достаточно высокое систолическое давление, нарушаемые при ингибировании КК.

V. V. Kupriyanov, V. L. Lakomkin, A. Ya. Steinschneider,
V. I. Veksler, O. V. Korchazhkina, V. I. Kapelko, V. A. Saks

ADRENERGIC STIMULATION OF THE HEART DURING INHIBITION OF PHOSPHOCREATINE OR ADENYLATE PATHWAYS OF ENERGY TRANSFER IN CARDIOMYOCYTES

Functional and metabolic response of an isovolumically perfused heart of a rat to isoproterenol (0.1 μM) has been studied. A heart with the normal content of adenine nucleotides (AN) and phosphocreatine (PCr) as well as that with the 5-fold reduced AN content (with 2-deoxyglucose treatment) significantly increased cardiac work index (PRP), maximal contraction rate (MCR) and maximal relaxation rate (MRR) (by 50, 30-40 and 100-150 %, respectively). The effect was preserved for all the period of the hormone action (30 min) and was followed by a temporary decrease in the PCr content. The heart with an inhibited unidirectional flux of metabolites through creative kinase (CK) and normal level of AN responded to the hormone by the slower and decelerated growth of the function and in the heart with almost completely iodoacetamide (IAAm)-blocked CK the functional response was minimal and transient. In the latter a significant and irreversible decline in PCr and ATP content and a concomitant rise of inorganic phosphate took place. Both basal and isoproterenol-stimulated adenylate cyclase activity remained unchanged after IAAm treatment. An increase in PRP correlated with the elevation of the cytosolic ADP concentration, however, correlation was not uniform for different experimental groups. These data show significance of the creatine kinase system not only for maintenance of maximal work but also for a rapid functional response to the catecholamine stimulation.

Research Institute of Experimental Cardiology,
Academy of Medical Sciences, USSR, Moscow

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Капелько В. И., Куприянов В. В., Новикова Н. А. и др. Механизмы приспособления сократительной функции и энергетического метаболизма сердца к условиям хронического дефицита фосфокреатина // Физиол. журн.— 1988.— 34.— С. 3—11.

2. Ambrosio G., Jacobus W. E., Bergman C. A. et al. Preserved high energy phosphate metabolic reserve in globally «stunned» hearts despite reduction of basal ATP content and contractility // *J. Mol. Cell. Cardiol.*—1987.—19.—P. 953—964.
3. Bergmeyer H. U. *Methods in Enzymatic Analysis*.—New York: Acad. press.—1977. 2nd edn.—Vol. 4.—P. 1625—2305.
4. Bittl J. A., Balschi J. A., Ingwall J. S. Effect of norepinephrine infusion on myocardial high energy phosphate content and turnover in the living heart // *J. Clin. Invest.*—1987.—79.—P. 1852—1859.
5. Chevli R., Fitch C. D. Beta-guanidine propionate and phosphorylated beta-guanidine propionate as substrates for creatine kinase // *Biochem. Med.*—1979.—21.—P. 162—167.
6. Denton R. M., McCormack J. G. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria // *FEBS. Lett.*—1980.—119.—P. 1—8.
7. Fitch C. D., Jellinek M., Fitts R. H. et al. Phosphorylated beta-guanidine propionate as a substitute for phosphocreatine in rat muscle // *Amer. J. Physiol.*—1975.—228.—P. 1123—1125.
8. Fossel E. T., Hoefeler H. Complete inhibition of creatine kinase in isolated perfused rat hearts // *Ibid.*—1987.—252.—P. E124—E130.
9. Geisbuhler T., Altschuld R. A., Trewyn R. W. et al. Adenine nucleotide metabolism and compartmentalization in isolated adult rat heart cells // *Circ. Res.*—1984.—54.—P. 536—546.
10. Gibbs C. The cytoplasmic phosphorylation potential: its possible role in the control of myocardial respiration and cardiac contractility // *J. Mol. Cell. Cardiol.*—1985.—17.—P. 727—731.
11. Giesen J., Kammermeier H. Relationship of phosphorylation potential and oxygen consumption in isolated perfused hearts // *Ibid.*—1980.—12.—P. 891—907.
12. Hansford R. G. Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism // *Rev. Physiol., Biochem. and Pharmacol.*—1985.—102.—P. 1—62.
13. Hassinen I. E. Mitochondrial respiratory control in the myocardium // *Biochim. et biophys. Acta.*—1986.—853.—P. 135—151.
14. He M.-X., Wangler R. D., Dillon P. F. et al. Phosphorylation potential and adenosine release during norepinephrine infusion in guinea pig heart // *Amer. J. Physiol.*—1987.—253.—P. H1184—H1191.
15. Hoerter J. A., Lauer C., Vassort G., Gueron M. Sustained function of normoxic hearts depleted in ATP and phosphocreatine: a ³¹P-NMR study // *Amer. J. Physiol.*—1988.—255.—P. C192—201.
16. Kapelko V. I., Kupriyanov V. V., Novikova N. A. et al. The cardiac contractile failure induced by chronic creatine and phosphocreatine deficiency // *J. Mol. Cell. Cardiol.*—1988.—20.—P. 465—479.
17. Katz A. Role of contractile proteins and sarcoplasmic reticulum in the response of heart to catecholamines: a historical review // *Adv. Cyc. Nuc. Res.*—1979.—11.—P. 303—343.
18. Katz L. A., Swain J. A., Portman M., Balaban R. S. Relation between phosphate metabolites and oxygen consumption in heart in vivo // *Amer. J. Physiol.*—1989.—256.—P. H265—H274.
19. Kentish J. C. The effect of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle // *J. Physiol.*—1986.—370.—P. 585—604.
20. Kupriyanov V. V., Kapelko V. I., Saks V. A. Myoplasmic proshosphate metabolites in the integration of oxidative phosphorylation and contractile function // *Biomed. Sci.*—1990.—1.—P. 113—121.
21. Kupriyanov V. V., Lakomin V. L., Steinschneider A. Ya. et al. The role of phosphocreatine and ATP in contraction of normal and ischemic heart // *Biomed. Biochim. Acta.*—1987.—46.—P. 493—498.
22. Kupriyanov V. V., Lakomkin V. L., Steinschneider A. Ya. et al. Phosphocreatine and adenylate pathways in energy supply for cardiac contractile function // *Cardioprotection with Phosphocreatine in Cardiology and Cardiac Surgery*.—Pavia: Università di Pavia, 1989.—P. 279—299.
23. Kupriyanov V. V., Steinschneider A. Ya., Ruuge E. K. et al. Regulation of energy flux through the creatine kinase reaction in vitro and in perfused rat heart. ³¹P-NMR studies // *Biochim. et biophys. acta.*—1984.—805.—P. 319—331.
24. 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.
25. LaNoue K. F., Bryla J., Williamson J. R. Feedback interaction in the control of citric acid cycle activity in rat heart mitochondria // *J. Biol. Chem.*—1972.—247.—P. 667—674.
26. Mekhji H., Ventura-Clapier R. Dependence upon high-energy phosphates of the effects of inorganic phosphate on contractile properties in chemically skinned rat cardiac fibres // *Pflügers Arch.*—1988.—411.—P. 378—385.
27. Panchenko M. P., Grigorian G. Yu., Svitina-Ulitina I. V. et al. Separation and reconstitution of regulatory and catalytic components of heart adenylate cyclase // *J. Mol. Cell. Cardiol.*—1985.—17.—P. 133—143.
28. Rollet E. M. *Adrenergic mechanisms in mammalian myocardium* // *The Mammalian Myocardium*.—New York: Wiley, 1974.—P. 215—250.

29. Shoubridge E. A., Jeffry F. M. H., Keogh J. M., et al. Creatine kinase kinetics, ATP turnover, and cardiac performance in hearts depleted of creatine with substrate analogue beta-guanidine propionic acid // Biochim. et Biophys. acta. — 1985. — 847. — P. 25—32.
30. Williamson J. R., Schaffer S. W., Scarpa A., Safer B. Investigation of the calcium cycle in the perfused rat and frog hearts // Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. — Baltimore: University Park press, 1975. — Vol. 4. — P. 375—392.
31. White A. A. Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography // Methods in Enzymology. — 1974. — 38C. — P. 41—46.
32. Young M. A., Hintze T. H., Vatner S. F. Correlation between cardiac performance and plasma catecholamine level in conscious dogs // Amer. J. Physiol. — 1985. — 248. — P. H82—H88.

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

Материал поступил
в редакцию 03.06.91

УДК 577.155.2:612.17.001.8

А. И. Кузьмин, О. В. Циктишвили, Л. И. Серебрякова,
В. С. Шульженко, Е. Р. Мартынова, В. И. Капелько, О. С. Медведев

Микродиализное исследование in vivo высвобождения продуктов распада адениннуклеотидов в межклеточное пространство миокарда собаки при региональной ишемии и реперфузии

С помощью микродиализа было исследовано высвобождение продуктов распада адениннуклеотидов (ПРАН) — аденозина, инозина и гипоксантина — в межклеточное пространство ишемической и контрольной зон сердца собак во время 20- и 40-минутной окклюзии коронарной артерии и реперфузии. У собак, у которых при реперфузии после 40-минутной ишемии наблюдалась фибрилляция левого желудочка (ФЛЖ) сердца, в ишемический период отмечался более интенсивный катаболизм адениннуклеотидов в зоне ишемии, что, возможно, и предопределяло возникновение реперфузионной аритмии. ФЛЖ сопровождалась повышением концентрации ПРАН в межклеточном пространстве контрольного участка сердца, которое свидетельствовало о развитии тотальной ишемии. В сердце, подвергавшемся 20-минутной ишемии, в начальный период реперфузии отмечалось резкое увеличение выброса ПРАН кардиомиоцитами ишемической зоны по сравнению с наблюдавшимся в конце ишемии, что может быть объяснено демаскированием в этом случае реперфузионного повреждения. Реперфузия после 20- и 40-минутной ишемии приводила к медленному снижению концентрации ПРАН в межклеточном пространстве ишемизированной зоны (через 25 мин он все еще составлял 17 % и 44 % концентрации в начале реперфузии соответственно), тогда как региональный кровоток уже через 5 мин реперфузии не отличался от кровотока в контрольной зоне. Предполагается, что медленное вымывание ПРАН обуславливалось проявляющимся во время реперфузии нарушением микроциркуляции в ишемизированной зоне (т. е. феноменом «no-reflow»).

Введение

В экспериментах на изолированных сердцах крыс было показано, что во время гипоперфузии [10] или при реперфузии после тотальной

© А. И. КУЗЬМИН, О. В. ЦИКТИШВИЛИ, Л. И. СЕРЕБРЯКОВА, В. С. ШУЛЬЖЕНКО,
Е. Р. МАРТЫНОВА, В. И. КАПЕЛЬКО, О. С. МЕДВЕДЕВ, 1991

ишемии [3] суммарное количество высвобождающихся из миокарда продуктов распада адениннуклеотидов (ПРАН) может являться чувствительным и надежным маркером снижения уровня АТФ в кардиомиоцитах. На той же модели нами было продемонстрировано [2], что процесс катаболизма адениннуклеотидов в условиях ишемии и при реперфузии можно комплексно оценить с помощью вживленного в стенку левого желудочка микродиализатора. Измеряемая в диализате концентрация ПРАН отражает их концентрацию в межклеточном пространстве миокарда. Так как одним из ПРАН является аденозин — эффективный эндогенный регулятор коронарного кровотока [6], то микродиализная техника позволяет судить о его концентрации вблизи аденозиновых рецепторов, опосредующих вазоактивное действие этого метаболита.

В нашей работе (уже на сердце *in situ*) с помощью микродиализа было исследовано влияние региональной ишемии и реперфузии на энергетический метаболизм в ишемической и интактной зонах миокарда.

Методика

Эксперименты проводили на беспородных собаках обоего пола массой 10—15 кг под нембуталовым наркозом (35 мг/кг внутривенно). Животным с открытой грудной клеткой искусственно вентилировали легкие атмосферным воздухом с добавлением кислорода. На протяжении всего опыта регистрировали давление в левом желудочке (с помощью катетера, введенного через правую сонную артерию) и ЭКГ в отведении, соответствующем 1-му стандартному отведению.

В начале опыта при кратковременном пережатии 1—2 левых коронарных артерий 3-го — 4-го порядка идентифицировали ишемическую зону левого желудочка, которую затем прошивали на глубину 1—1,5 мм диализным волокном (фирма «Cordis Dow», США) внешнего диаметра 0,25 мм, проникаемым для веществ, имеющих молекулярную массу до 5 000 Д. Концы диализного волокна вклеивали в силиконовые трубки, одна из которых предназначалась для подсоединения к перфузионному насосу (фирма «Braun», Гер-

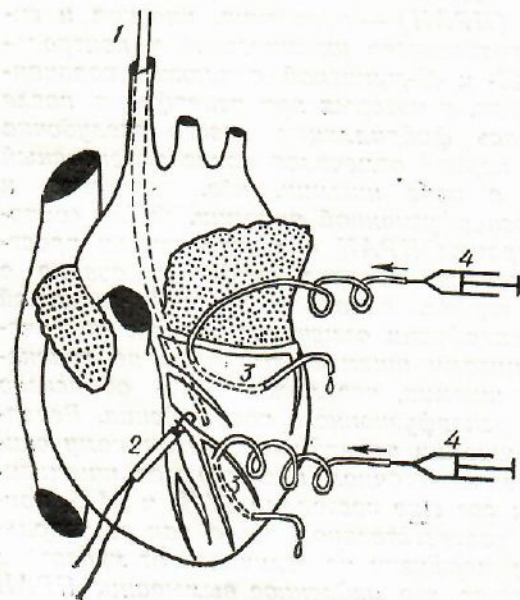


Рис. 1. Схема проведения опыта (1 — катетер в левом желудочке, 2 — окклюдер, 3 — диализные трубки в ишемической и контрольной зонах, 4 — шприцы насоса-перфузора).

мания), вторая — для сбора диализата (рис. 1). Достаточно жесткая фиксация диализатора в сердце обеспечивалась плотным контактом силиконовых трубок с эпикардальной поверхностью. Диализатор целиком находился в зоне, которой в дальнейшем предстояло стать ишемической. Аналогичным образом помещали другой диализатор в контрольную зону. Эффективная длина диализаторов составляла около 20 мм. Операция по их установке занимала около 15 мин, после чего через них начинали перфузировать раствор Рингера (4 ммоль K^+ , 2,3 ммоль Ca^{2+} , 147 ммоль Na^+) со скоростью 2,7 мл/мин.