

ЗАВИСИМОСТЬ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ И ПРОНИЦАЕМОСТИ САРКОЛЕММЫ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ “КАЛЬЦИЕВОМ ПАРАДОКСЕ” ОТ АКТИВНОСТИ ГЛИКОЛИЗА

В.В.АЛАБОВСКИЙ, А.А.ВИНОКУРОВ

Кафедра биохимии Воронежской государственной медицинской академии, г.Воронеж

Реперфузия сердца Ca^{2+} -содержащим раствором после 10 минут перфузии бескальциевой средой сопровождается высвобождением миоглобина в оттекающий раствор, снижением концентрации АТФ, фосфокреатина, разобщением окисления и фосфорилирования в митохондриях (“кальциевый парадокс”). Увеличение концентрации глюкозы ослабляет, а добавление 30 мкМ иодоацетата усиливает развитие “кальциевого парадокса” в изолированном сердце. Замена глюкозы как энергетического субстрата на ацетат или пируват сопровождалась неспособностью кардиомиоцитов поддерживать внутриклеточные пулы АТФ и фосфокреатина при “кальциевом парадоксе”. Обнаружена тесная корреляция между активированием гликолиза и содержанием АТФ в сердце при “кальциевом парадоксе”. Увеличенная активность гликолиза препятствовала выходу миоглобина из кардиомиоцитов.

Ключевые слова: сердце, “кальциевый парадокс”, энергетическое состояние.

Введение. В интактном сердце окислительному фосфорилированию принадлежит определяющая роль в энергообеспечении сокращений и метаболических реакций. Однако, для поддержания активности ионных насосов и, прежде всего, Na^+ , K^+ -АТФазы необходима АТФ гликолитического происхождения [1, 2, 3]. При патологических состояниях, сопровождающихся разобщением процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях (при ишемии и гипоксии), гликолиз, вероятно, способствует не только сохранению запасов АТФ и фосфокреатина, но и градиента ионов Na^+ и Ca^{2+} . Особенно значительные изменения внутриклеточной концентрации натрия и кальция происходят при “кальциевом парадоксе” [4, 5] и являются причиной разрушения сарколеммы кардиомиоцитов. Однако, сведения о вкладе гликолиза в поддержании уровня макроэргических соединений при “кальциевом парадоксе” в литературе отсутствуют. Не установлена и связь между активностью гликолиза и глубиной повреждения миокарда при перегрузке сердца кальцием. В связи с этим целью исследования явилось изучение роли гликолиза в энергетическом обеспечении и развитии повреждений миокарда при “кальциевом парадоксе”.

Методика. Эксперименты проводились на изолированных сердцах белых беспородных крыс, перфузированных через аорту оксигенированным ($t = 37^\circ\text{C}$) раствором Рингера-Локка (мм): NaCl — 140; NaHCO_3 — 2; NaH_2PO_4 — 0,5; KCl — 3,0; трис-ОН- — 5 ($\text{pH} = 7,4$); CaCl_2 — 2, глюкозы — 11. Другие субстраты добавляли в перфузионный раствор вместо глюкозы на протяжении всего эксперимента (5 мМ ацетата или 5 мМ пирувата). Под эфирным наркозом крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку и сердце помещали в охлажденный раствор Рингера-Локка. В аорту вводили канюлю и со скоростью 10 мл/мин подавали исходный раствор в течение 15 минут для стабилизации сократительной функции и показателей энергетического состояния. “Кальциевый парадокс” моделировали последовательной перфузией сердца бескальциевой средой, содержащей 0,5 мМ ЭДТА в течение 10 минут и содержащим 2 мМ Ca раствором. Через 5 минут реперфузии сердца исход-

ным раствором сердца замораживали при температуре жидкого азота с помощью щипцов Волленбергера и приготавливали тканевые экстракты в 6% трихлоруксусной кислоте. После центрифугирования при 3000 g супернатант нейтрализовали 2 N КОН при 0 — 4°С. Содержание креатина оценивали спектрофотометрически с помощью альфа-нафтола. После предварительного гидролиза проб в 0,1 N HCl определяли содержание суммарного креатина (креатин + фосфокреатин). Концентрацию фосфокреатина вычисляли как разность содержания в ткани креатина и суммарного креатина [6]. Содержание адениннуклеотидов и лактата определяли стандартным ферментативными методами [7, 8]. В отдельной группе экспериментов содержание миоглобина в оттекающем перфузате оценивали спектрофотометрически непрерывно с помощью проточной кюветы [9]. Затем рассчитывали суммарное количество миоглобина, потерянного сердцем при реперфузии Са-содержащим раствором. Сухую массу ткани определяли после предварительного высушивания образцов при 100 °С в течение 12 часов. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Реперфузия сердца Са-содержащим раствором после 10 минут перфузии бескальциевой средой приводила к снижению содержания АТФ и фосфокреатина в ткани. Раствор, содержащий ацетат, не ослаблял интенсивность распада АТФ и фосфокреатина при “кальциевом парадоксе”. В условиях “кальциевого парадокса” активирование гликолиза было более значительным в присутствии в растворах глюкозы, чем ацетата. Пируват (5 мМ), по сравнению с ацетатом (5 мМ), уменьшал интенсивность образования молочной кислоты в сердце. Содержание АТФ и фосфокреатина были выше в растворах с глюкозой по сравнению с экспериментами, в которых в качестве энергетического субстрата присутствовали ацетат или пируват (табл.). Полное блокирование гликолиза йодоацетатом (30 мкМ) приводило к значительному снижению внутриклеточной концентрации АТФ, фосфокреатина при “кальциевом парадоксе”. Одновременно наблюдалось усиление выхода миоглобина из кардиомиоцитов (табл.; рис. 1).

Таблица

Влияние глюкозы, пирувата или ацетата на содержание в ткани сердца адениннуклеотидов, фосфокреатина и креатина при “кальциевом парадоксе” (мкмоль/г сухой массы) $M \pm m$.

Серии экспериментов	АТФ	АДФ	фосфокреатин	креатин
Исходное состояние	23,53±0,70	8,57±0,25	34,71±1,8	51,7±1,70
"кальциевый парадокс" глюкоза 11 мМ	4,9±0,90	1,90±0,42	1,60±0,20	35,0±3,50
"кальциевый парадокс" пируват 5 мМ	0,83±0,14*	0,82±0,86	0,31±0,03*	13,6±0,80*
"кальциевый парадокс" ацетат 5 мМ	1,80±1,20	2,2±0,90	0,80±0,06	34,5±1,50
"кальциевый парадокс" ацетат 5 мМ йодоацетат 30 мкМ	0,62±0,04**	1,1±0,25	0,00±0,00**	19,1±2,00**
"кальциевый парадокс" глюкоза 120 мМ	6,66±0,92*	4,09±2,18*	2,70±0,16	41,3±3,20
"кальциевый парадокс" сахароза 120 мМ	1,73±0,28	2,12±0,88	0,91±0,12	32,8±4,80

Примечание: Обозначена достоверность отличий по сравнению с контролем для $p < 0,05$ — одной звездочкой, двумя — для $p < 0,01$.

Таким образом, глюкоза по сравнению с другими субстратами препятствовала снижению внутриклеточной концентрации макроэргических соединений при “кальциевом парадоксе”.

Учитывая это, представляло интерес изучение влияния высоких концентраций глюкозы на развитие “кальциевого парадокса” в сердечной мышце. Исследования показали, что увеличение концентрации глюкозы до 120 мМ ослабляло высвобождение миоглобина из сердца, уменьшало снижение концентрации АТФ и фосфокреатина в сердце при “кальциевом парадоксе”. Защитное действие повышенной концентрации глюкозы сопровождалось усиленным образованием молочной кислоты в миокарде. Данный эффект не был связан с повышенной осмотичностью, поскольку сахароза (120 мМ) не влияла на развитие “кальциевого парадокса”. Следовательно, путем активирования гликолиза в изолированном сердце можно ослабить развитие “кальциевого парадокса”.

Исследования, проведенные в различных лабораториях, свидетельствуют о важной роли системы $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ обмена в неконтролируемом поступлении ионов Ca^{2+} при “кальциевом парадоксе” [4]. Установлено, что удаление Ca^{2+} из внеклеточной среды сопровождается снижением активности Na , K -АТФазы и накоплением в кардиомиоцитах Na^+ [40, 11]. Восстановление прежней концентрации кальция приводит к интенсивному обмену Ca^{2+} на внутриклеточный Na^+ . Однако, сохранение в данных условиях активности Na , K -АТФазы значительно ослабляет поступление Ca^{2+} через систему $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ обмена [1, 11]. Известно, что в сердечных клетках имеется тесное функциональное сопряжение между Na -насосом и гликолизом [1, 2, 12, 3]. Предполагалось, что активирование гликолиза путем увеличения концентрации глюкозы удастся сохранить градиент натрия и ослабить “кальциевый парадокс”. Проведенные нами исследования подтвердили это предположение: повышенная концентрация глюкозы ослабляла высвобождение миоглобина из сердца и препятствовала снижению внутриклеточного уровня АТФ и фосфокреатина. Корреляционный анализ показал наличие отрицательной зависимости между содержанием лактата в миокарде и высвобождением миоглобина из сердца при “кальциевом парадоксе” (рис. 2).

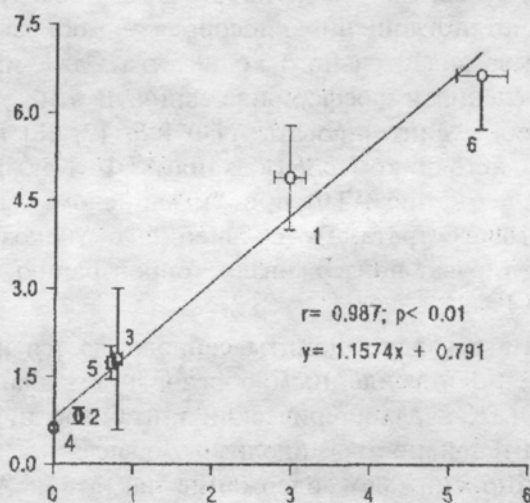


Рис. 1. Корреляционная зависимость между концентрацией лактата (мкМ/г сухой массы по оси X) и АТФ (мкМ/г сухой массы по оси Y) в миокарде при “кальциевом парадоксе”.

На рисунках 1 и 2 представлены значения среднего и доверительные интервалы для $p < 0,05$. Субстраты: 1 — глюкоза 11 мМ, 2 — пируват 5 мМ, 3 — ацетат 5 мМ, 4 — ацетат 5 мМ и 30 мМ иодоацетата, 5 — глюкоза 11 мМ, сахарозы — 120 мМ, 6 — глюкозы 120 мМ.

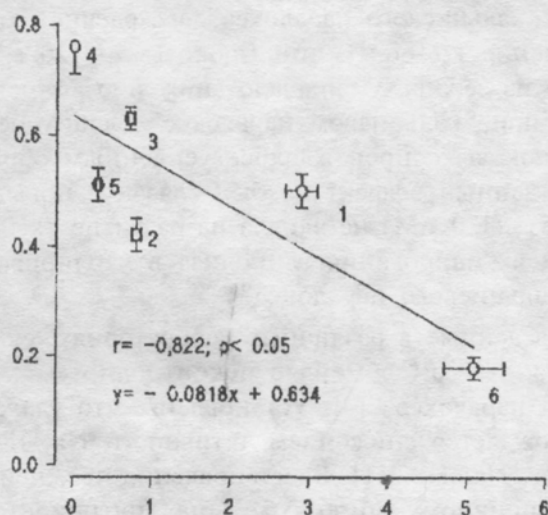


Рис. 2. Корреляционная зависимость между концентрацией лактата в миокарде (мкМ/г сухой массы по оси X) и количеством миоглобина, теряемого сердцем при "кальциевом парадоксе" (мкг/г сухой массы по оси Y). Остальные обозначения как и на рис. 1.

Известно, что окислительному фосфорилированию принадлежит определяющее значение в энергообеспечении сердечной мышцы. Вклад гликолиза в аэробных условиях невелик и, как правило, не превышает 5-10% АТФ, образующейся в миокарде [12]. Удаление Ca^{2+} из внеклеточной среды сопровождается остановкой сердечных сокращений, снижением потребления кислорода [13]. Концентрация макроэргических соединений в этих условиях не изменяется [14]. Последующая реперфузия сердца Са-содержащим раствором приводит к интенсивному потоку Ca^{2+} внутрь клеток [15, 4]. Активируя дегидрогеназы цикла трикарбоновых кислот, ионы кальция усиливают поглощение кислорода и глюкозы сердечной мышцей [13]. Однако, поглощение значительного количества Ca^{2+} митохондриями приводит к разобщению окисления и фосфорилирования. В этих условиях митохондрии становятся уже неспособны синтезировать АТФ [16, 17, 18] и гликолиз, вероятно, является единственным источником образования АТФ. Как показали проведенные нами исследования, содержание АТФ при "кальциевом парадоксе" зависело от вида метаболизируемого субстрата. По сравнению с глюкозой, не используемые гликолизом ацетат или пируват поддерживали концентрацию АТФ на низком уровне.

Поступление пирувата в кардиомиоциты сопровождается не только его окислением в митохондриях, но и усиленным образованием аланина в ходе реакции трансаминирования [19]. Как аллостерический ингибитор пируваткиназы, аланин, вероятно, уменьшал интенсивность гликолиза. Добавление ингибитора гликолиза иодоацетата существенно снижало содержание лактата и АТФ в ткани сердца. Тесная корреляционная зависимость между образованием молочной кислоты и содержанием АТФ является подтверждением важности гликолиза в поддержании внутриклеточного пула макроэргических соединений при "кальциевом парадоксе" (рис. 1).

Таким образом, гликолиз способствует сохранению внутриклеточного уровня АТФ и целостности сарколеммы при "кальциевом парадоксе".

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Hasin Y., Barry W.H. // Am. J. Physiol. — 1984. — V. 247. — P. H322-H329.
- 2 Paul R.J. // Am. J. Physiol. — 1983. — V. 244. — P. C399-C409.
- 3 Weiss J., Hilbrand B. // J. Clin. Invest. — 1985. — V. 75. — P. 436-447.
- 4 Chapman R.A., Tunstall J. // Progr. Physiol. Mol. Biol. — 1987. — V. 50. — P. 67-96.
- 5 Rodrigo G.S., Chapman R.A. // J. Physiol. (G.B.) — 1991. — V. 434. — P. 627-645.
- 6 Eggleton P., Elsdon S.R., Gough N. // Biochem. J. — 1943. — V. 37. — P. 526-529.
- 7 Jaworek D., Gruber W., Bergmeyer H. // Methods in enzymatic analysis. N.-Y. 1974. — V. 4. — P. 2127-2129.
- 8 Lamprecht W.I. // Methods in enzymatic analysis. N.-Y. Acad. Press. — 1974. — P. 2101-2110.
- 9 Busselen P. // Pflugers Arch. 1987. — V. 408. — P. 458-464.
- 10 Dhalla N.S., Singh J.N., McNamara D.B., Bernatsky A., Singh A., Harrow J.A.C. // Proc. 4-th Annu. Meet. Amer. Sec. Int. Soc. Heart Res. — 1983. — P. 305-316.
- 11 Lamers J.M.J., Stinis J.T., Ruigrok T.J.C. // Circ. Res. — 1984. — V. 54. — N. 2. — P. 217-226.
- 12 Opie L.H. // Pathophysiology of the several ischemic myocardial injury. — 1990. — P. 41-65.
- 13 Schaffer S.T., Tan B.H. // Can. J. Physiol. Pharmacol. — 1985. — V. 63. — P. 1384-1391.
- 14 Ruigrok T.J.C., Boink A.B.T.J., Spies F., Blok F. // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1978. — V. 10. — P. 991-1002.
- 15 Minezaki K.K., Suleiman M.-S., Chapman R.A. // Cardiovasc. Res. — 1994. — V. 476. — N. 3. — P. 459-471.
- 16 Лейкин Ю.Н., Виноградов А.Д. // Митохондрии: молекулярные механизмы ферментативных реакций. — М.: 1972. — С. 131-137.
- 17 Ban K., Chapman R.A. // Abstr. Meet. Physiol. Soc. Great Brit. Aberdeen. — 1994. — P. 66P.
- 18 Haworth R.A., Hunter D.P., Berkoff H.A. // Circ. Res. — 1981. — V. 49. — P. 1119-1128.
- 19 Peuhkurinen P., Hiltunen J., Hassinen I.E. // Biochem. J. — 1983. — V. 210. — N. 1. — P. 193-198.

DEPENDENCE OF SARCOLEMAL PERMEABILITY AND MYOCARDIAL ENERGY STATE ON GLYCOLITIC ACTIVITY DURING CALCIUM PARADOX

V.V. Alabovskii, A.A. Winokurov

Voronezh State Medical Academy, Voronezh, Russian Federation

Reperfusion by Ca^{2+} -containing solution after 10 minutes of Ca^{2+} -depletion resulted in the loss of myoglobin, depletion of ATP and phosphocreatine (calcium paradox). Exhaustion of high energy phosphates exacerbated when glucose was substituted by pyruvate or acetate. Iodoacetate (30 mM) elevated loss of myoglobin due to calcium paradox. Addition of 120 mM glucose reduced loss of myoglobin and depletion of high energy phosphates after induction of calcium paradox. There is a close correlation between concentration of lactate and ATP in the hearts subjected to calcium paradox. Elevated activity of glycolysis protected hearts against the calcium paradox.

Key words: heart, "calcium paradox", energy state