© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ
УДК 612.174:311

ВЛИЯНИЕ ТРАНСМЕМБРАННОГО ГРАДИЕНТА НАТРИЯ НА ВЫХОД КРЕАТИНА ИЗ МИОКАРДА

В.В.АЛАБОВСКИЙ, А.А.ВИНОКУРОВ

Кафедра биохимии Воронежской государственной медицинской академии

При физиологическом содержании Na^+ и Ca^{2+} выход креатина из сердца относительно незначительный. Снижение концентрации натрия до 80 мМ, удаление Ca^{2+} или строфантин (50 мкМ) усиливали выход креатина из кардиомиоцитов. Увеличение трансмембранного градиента натрия ослабляло высвобождение креатина. Этот эффект гипернатриевой среды не зависел от повышенной осмотичности раствора, поскольку раствор сахарозы, имеющий такую же осмотичность что и гипернатриевая среда, не предотвращали выход креатина. Сохраняющее креатин действие гипернатриевой среды блокировалось строфантином. Предположено, что на сарколемме кардиомиоцитов имеется Na^+-зависимая система транспорта креатина.

Ключевые слова: трансмембранный градиент натрия, креатин, кальций, миокард.

Введение. Для получения изолированных кардиомиоцитов используют растворы, не содержащие ионов кальция [1]. Аналогичные среды применяют и в кардиохирургической практике для кардиоплегической остановки миокарда [2]. Удаление Ca^{2+} из внеклеточной среды вызывает выход из кардиомиоцитов креатина [3], являющегося неотъемлемым компонентом энергетического обмена миокарда. Остаются, однако, неясными причины этого явления.

Предполагается, что для большинства аминокислот и продуктов их метаболизма в сарколемме кардиомиоцитов существует переносчик, зависимый от ионов натрия [4]. Поскольку в бескальциевой среде в кардиомиоцитах накапливается Na^+, можно предположить о зависимости транспорта креатина от величины трансмембранного градиента натрия. Сведения по этому вопросу в доступной литературе отсутствуют. Не определены и условия, препятствующие потере миокардом креатина при изменении ионного состава внеклеточной среды. Учитывая это, целью настоящего исследования явилось изучение механизмов выхода креатина из сердца.

Методика. Эксперименты проводились на изолированных сердцах белых беспородных крыс, перфузированных по методу Лангендорфа оксигенированным (t = 37°C) раствором Рингера-Локка (мМ): NaCl — 140; $NaHCO_3$ — 2; NaH_2PO_4 — 0,5; KCl — 3,0; трис-OH = 2 (pH = 7,4); $CaCl_2$ — 2; глюкозы — 11. 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. Затем сердце перфузировали бескальциевой средой, содержащей 0,5 мМ ЭДТА в течение 10 минут. В растворах, содержащих 80 мМ Na^+, осмотичность сохраняли добавлением сахарозы. В экспериментах с растворами, содержащими ионы Ca^{2+} для исключения влияния сокращений сердца, после периода адаптации в раствор вводили 2 мкМ верапамила для остановки сердца. 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 KOH при 0-4°C. Содержание креатина оценивали спектрофотометрически с помощью альфа-нафтола. После предварительного гидролиза проб в 0,1 N CHl определяли содержание суммарного креатина (креатин + фосфокреатин). Концентрацию фосфокреатина вычисляли как разность содержания в ткани креатина и тотального креатина [5]. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия Т.Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Установлено, что перфузия сердца, остановленного верапамидом, сопровождается крайне незначительным выделением креатина во внеклеточную среду. Удаление ионов кальция из внеклеточной среды усиливало высвобождение значительного количества креатина (рис. 1), в результате чего его содержание в миокарде уменьшалось (рис. 2). Снижение внеклеточной концентрации натрия до 80 мМ усиливало этот эффект. Увеличение содержания натрия в перфузионном растворе до 200 мМ, напротив, ослабляло потерю креатина миокардом.

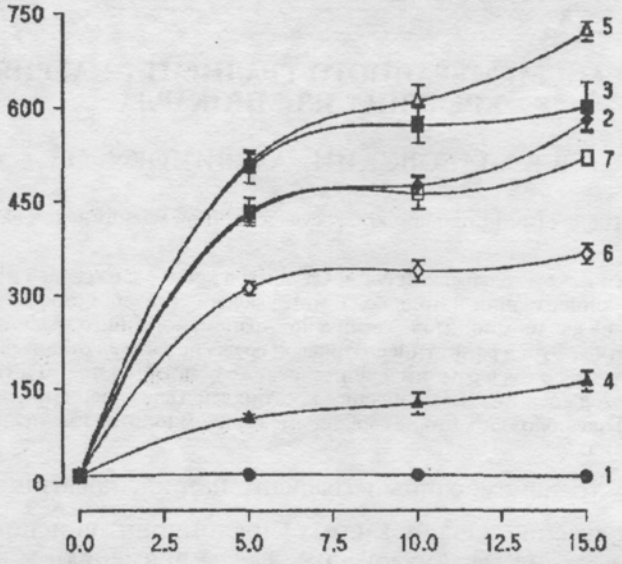

Рис. 1. Скорость выхода креатина сердцем при перфузии сердца бескальциевым раствором.

По оси X - время перфузии, минуты. По оси Y - скорость выхода креатина (нМ/мин на 1 грамм сырой ткани). На рисунках 1-4 представлены значения среднего и доверительные интервалы для $p < 0,01$. 1 — Ca^{2+} = 2,0 мМ, Na^+ = 140 мМ; 2 — Ca^{2+} = 0 мМ, Na^+ = 140 мМ; 3 — Ca^{2+} = 0 мМ, Na^+ = 80 мМ; 4 — Ca^{2+} = 0 мМ, Na^+ = 200 мМ; 5 — Ca^{2+} = 0 мМ, Na^+ = 140 мМ; строфантин 50 мкМ; 6 — Ca^{2+} = 0 мМ, Na^+ = 200 мМ; строфантин 50 мкМ; 7 — Ca^{2+} = 0 мМ, Na^+ = 140 мМ; 120 мМ сахарозы;

Эффект гипернатриевой среды мог быть связан с повышенной осмотичностью растворов. В связи с этим были проведены эксперименты, в которых осмотическое давление бескальциевой среды было увеличено путем добавления сахарозы, но не хлорида натрия. Установлено, что растворы, содержащие сахарозу и имеющие осмотическое давление, равное гипернатриевой среде, не влияют на скорость выхода миоглобина из сердца (рис. 1). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о незначи-

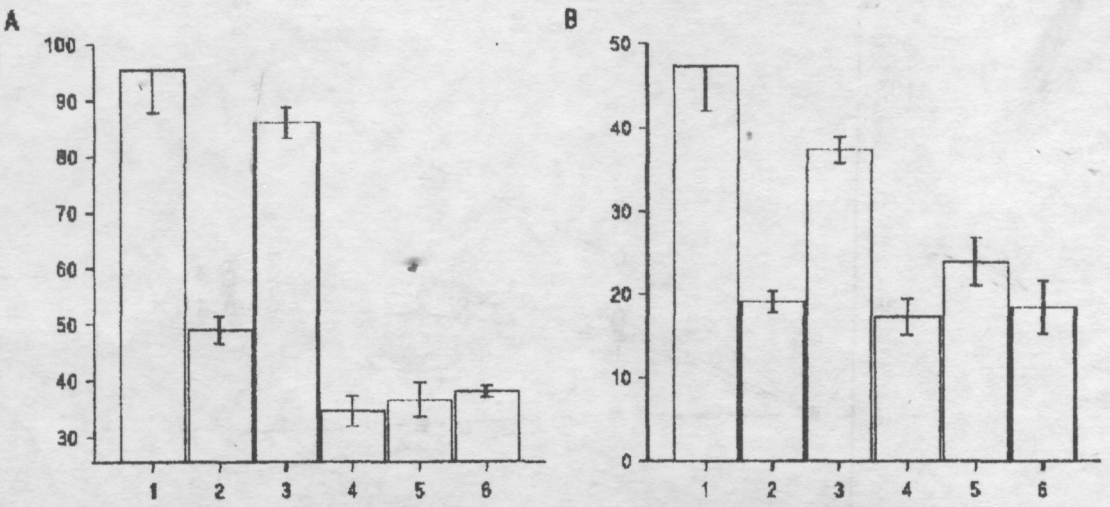

Рис. 2. Содержание суммарного креатина (А) и креатина (Б) при перфузии сердца. По оси X - серии экспериментов. По оси Y - содержание креатина (мкм/г сухой массы).

1 — Ca^{2+} = 2,0 мМ, Na^+ = 140 мМ; 2-6 Ca^{2+} = 0 мМ: 2 — Na^+ = 140 мМ; 3 —Na^+ = 200 мМ; 4 — Na^+ = 80 мМ; 5 — Na^+ = 140 мМ; строфантин 50 мкМ; 6 —Na^+ = 200 мМ; строфантин 50 мкМ;

тельной роли повышенной осмотичности гипернатриевой среды в регуляции транспорта креатина через сарколемму.

Известно, что повышение внеклеточного уровня натрия сопровождается увеличением его трансмембранного градиента. Для оценки роли градиента натрия в изменениях скорости выхода креатина из кардиомиоцитов изучалось влияние гипернатриевой среды в условиях, приводящих к снижению активности Na, K-АТФазы. С этой целью в бескальциевый раствор добавляли 50 мкМ строфантина. Было установлено, что строфантин полностью обращал действие гипернатриевой среды, усиливая высвобождение креатина из кардиомиоцитов.

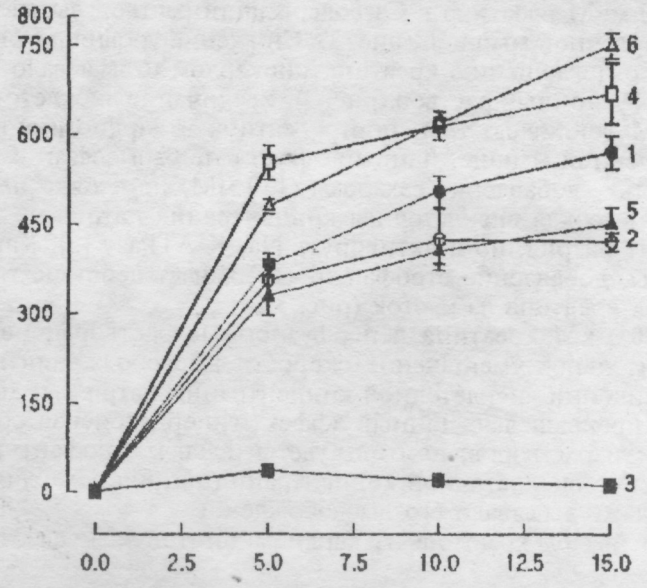

Рис. 3. Скорость выхода креатина сердцем при перфузии сердца бескальциевым раствором, содержащим 100 мкМ креатина.

По оси X - время перфузии, минуты.
По оси Y - скорость выхода креатина (нМ/мин на 1 грамм сырой ткани).
1 — Na^+ = 14- мМ (без 100 мкМ креатина); Со 100 мкМ креатина: 2 — 6: 2 — Na^+ = 140 мМ; 3 — Na^+ = 200 мМ; 4 — Na^+ = 200 мМ; строфантин 50 мкМ; 5 — Na^+ = 140 мМ, 120 мМ сахарозы; 6 — Na^+ = 80 мМ;

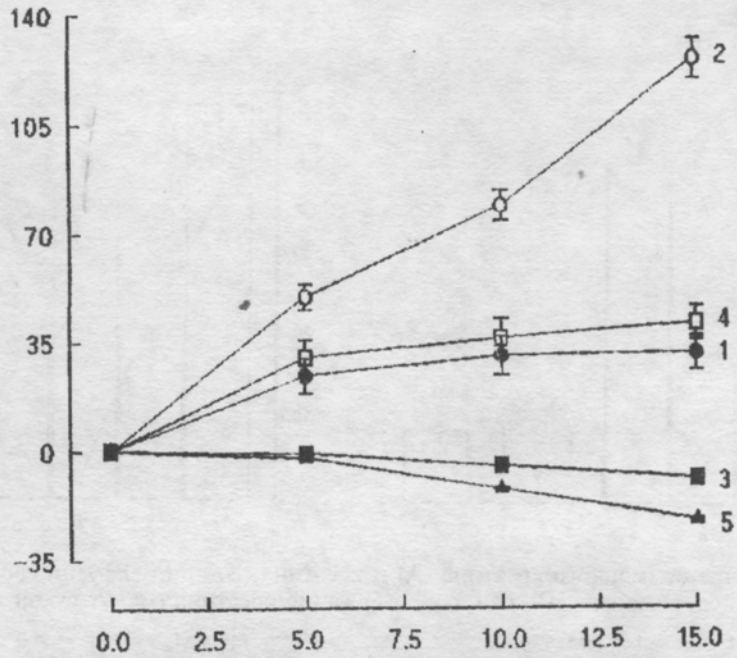

Рис. 4. Скорость поглощения креатина сердцем при перфузии сердца Са-содержащим раствором, содержащим 100 мкМ креатина.

По оси X - время перфузии, минуты. По оси Y - скорость поглощения креатина (нМ/мин на 1 грамм сырой ткани).
1 — Na^+ = 140 мМ; 2 — Na^+ = 200 мМ; 3 — Na^+ = 200 мМ; строфантин 50 мкМ; 4 — Na^+ = 140 мМ, 120 мМ сахарозы; 5 — Na^+ = 80 мМ.

Известно, что внеклеточное содержание креатина в плазме крови в физиологических условиях составляет около 100 мкМ/л. В связи с этим представляло интерес изучение особенностей транспорта креатина при данном значении его внеклеточной концентрации.

Добавление 100 мкМ креатина в Са-содержащий раствор вызывало незначительное его поглощение сердечной мышцей (рис. 3). Снижение уровня натрия в растворах до 80 мМ препятствовало поглощению креатина миокардом и вызывало его высвобождение в оттекающий перфузионный раствор (рис. 3). Увеличение внеклеточной концентрации натрия до 200 мМ усиливало транспорт креатина в кардиомиоциты, повышало его содержание в сердечной мышце. Данный эффект не был связан с повышенной осмотичностью, поскольку добавление сахарозы (120 мМ) не влияло на транспорт креатина. Известно, что высокая внеклеточная концентрация натрия не только создает увеличенный градиент натрия, но и активирует Na, K-АТРазу [6]. Как показали следующие эксперименты, добавление строфантина обращает действие гипернатриевой среды, вызывая выход креатина из клеток (рис. 3).

Добавление 100 мкМ креатина в перфузионные растворы, не содержащие Ca^{2+}, вызывало незначительное уменьшение скорости высвобождения креатина из сердца (рис. 4). При увеличении внеклеточной концентрации натрия до 200 мМ этот процесс почти полностью прекращался. Данный эффект гипернатриевой среды также не зависел от осмотичности растворов, но был чувствителен к строфантину, ингибитору Na, K-АТРазы. Снижение внеклеточной концентрации натрия ослабляло поглощение креатина сердцем и даже вызывало его высвобождение.

Таким образом, выход креатина из кардиомиоцитов зависел от трансмембранного градиента натрия.

Известно, что в сарколемме кардиомиоцитов существуют транспортные системы, облегчающие поступление аминокислот внутрь клеток. Полагают, что в физиологических условиях градиент ионов натрия препятствует высвобождению аминокислот из сердечной мышцы. Как показали проведенные нами эксперименты, в физиологических условиях высвобождение креатина из кардиомиоцитов относительно невелико. Удаление Ca^{2+} из

внеклеточной среды сопровождается снижением активности Na, K-АТРазы и накоплением в кардиомиоцитах Na^+. Вследствие этого градиент концентрации Na^+ снижается в несколько раз [4, 7-8]. Учитывая наличие в сарколемме переносчика для креатина и Na^+, можно было ожидать усиление выхода креатина из сердца, перфузируемого бескальциевой средой, что было подтверждено экспериментально. Искусственное увеличение трансмембранного градиента натрия путем увеличения его внеклеточной концентрации наоборот препятствовало выходу креатина из миокарда. Таким образом, потеря креатина сердцем, так же как и его поглощение, оказалось высоко чувствительным процессом к изменениям трансмембранного градиента натрия. Это позволяет предполагать, что в сарколемме кардиомиоцитов существует Na- зависимая система транспорта креатина, вероятно, аналогичная симпорту аминокислот и ионов натрия.

ЛИТЕРАТУРА

1 *Isenberg G., Klockner U.* // Pfluger's Arch. — 1982. — V. 395. — P. 6-18.
2 *Chapman R.A., Tunstall J.* // Progr. Physiol. Mol. Biol. — 1987. — V. 50. — P. 67-96.
3 *Винокуров А.А.* / Значение трансмембранного градиента натрия в осуществлении защитного действия макроэргических соединений при повреждении сердца ионами кальция. Автореф. дис... канд. мед. наук. Смоленск. 1992. —С. 23.
4 *Suleiman M.-S., Rodrigo G.C., Chapman R.A.* // Cardiovasc. Res. — 1992. — V. 267. — P. 897-905.
5 *Eggleton P., Elsden S.R., Gough N.* // Biochem. J. — 1943. — V. 37. —P. 526-529.
6 *Кужман М.И., Алабовский В.В., Олейников О.Д.* // Вестн. АМН СССР. —1984. — N 8. С. 35-41.
7 *Bhojani I.H., Chapman R.A.* // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1990. — V. 22. — P. 507-522.
8 *Lamers J.M.J., Stinis J.T., Ruigrok T.J.C.* // Circ. Res. — 1984. — V. 54. — N 2. — P. 217-226.

EFFECT OF TRANSMEMBRANE SODIUM GRADIENT ON MYOCARDIAL CREATINE RELEASE

V.V.Alabovsky, A.A.Winokurov

Chair of Biochemistry of the Voronezh Medical Academy

Heart maintains a gradient for creatine under physiological conditions, so that creatine release is relatively small. Calcium depletion, addition of strophanthine or decrease of sodium concentration (till 80 mM) provoke release of creatine. Elevation of transmembrane sodium gradient by raising of extracellular sodium concentration prevented loss of creatine. The effect of elevated concentration of sodium ions was blocked by strophanthine but depended on osmolarity, because solutions with the same osmolarity that hypersodium media had no protective effect on release of creatine. A sarcolemmal mechanism of Na creatine cotransports is proposed.

Key words: transmembrane sodium gradient, creatine, calcium, myocardium.