

УДК 613.632.615. 36
© Коллектив авторов

УМЕНЬШЕНИЕ ЛЕТАЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЦА КРЫС ПРИ РЕПЕРФУЗИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ ПРОТЕКТОРАМИ

О.И. Писаренко, Л.И. Серебрякова, О.В. Цкитишвили, И.М. Студнева*

ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Росмедтехнологий, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул. 15А; тел.: (495) 414-67-37;
факс: (495) 149-0559; эл. почта: olpi@cardio.ru

Изучено влияние внутривенного введения аспартата калия и магния (К-Mg-Асп), смеси глюкоза-инсулин-калий (ГИК), комбинации глюкозы, инсулина с аспартатом калия (ГИКАсп) и одного инсулина (И) после периода региональной ишемии миокарда на метаболизм зоны риска (ЗР) и повреждения клеточных мембран кардиомиоцитов у крыс. Острый инфаркт миокарда (ИМ) моделировали 40-мин окклюзией передней нисходящей коронарной артерии и 60-мин реперфузией. В течение реперфузии в яремную вену со скоростью 1 мл/кг/ч вводили один из растворов: физиологический раствор (контроль), К-Mg-Асп, ГИК, ГИКАсп или И. Размеры ИМ в экспериментальных группах были достоверно меньше, чем в контроле ($p < 0,05-0,01$) и снижались в ряду К-Mg-Асп > ГИКАсп > И > ГИК. Под действием протекторов содержание АТФ и фосфокреатина в ЗР к концу реперфузии восстанавливалось в 2-2,5 раза лучше, чем в контроле (в среднем до $56,3 \pm 3,4$ и $81,8 \pm 7,9\%$ от исходных значений, соответственно). В экспериментальных группах потери фонда аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также накопление лактата и глюкозы в ЗР были достоверно ниже, чем в контроле. Содержание общего креатина (Кр) в ЗР в конце реперфузии в контроле было снижено до $32,3 \pm 2,3\%$, а под влиянием ГИК, И и К-Mg-Асп возрастало до $78,0 \pm 5,7$, $76,7 \pm 5,5$ и $62,4 \pm 5,6\%$ от исходного значения, соответственно. Восстановление большинства показателей аэробного обмена и целостности мембран кардиомиоцитов было максимальным в группах И и ГИК и недостоверно ниже после реперфузии К-Mg-Асп. Метаболическая эффективность протекторов соответствовала ограничению размеров ИМ. Результаты работы указывают на перспективность использования метаболической защиты миокарда с помощью ГИК, И и К-Mg-Асп в качестве дополнительной терапии у пациентов с острым ИМ.

Ключевые слова: реперфузия сердца, макроэргические фосфаты, глутаминовая и аспарагиновая кислоты, глюкоза и лактат, мембраны кардиомиоцитов, апоптоз, некроз.

ВВЕДЕНИЕ. Нарушения в обмене, вызванные ишемией миокарда, диктуют необходимость использования метаболических кардиопротекторов для восстановления окислительного фосфорилирования в кардиомиоцитах во время реперфузии [1]. Для снижения ишемических и реперфузионных повреждений применяются протекторы, в состав которых входят естественные метаболиты сердца - аминокислоты, глюкоза, а также инсулин. К наиболее распространенным из них относятся "метаболический коктейль" глюкоза-инсулин-калий (ГИК) и регулятор внутриклеточного ионного гомеостаза аспартат калия и магния (К-Mg-Асп), известный под названием панангин или аспаркам.

* - адресат для переписки

Кардиозащитное действие К-Mg-Асп обычно связывают с транспортом ионов K^+ и Mg^{2+} с помощью аниона Асп²⁻ в миокардиальные клетки, что устраняет дисбаланс электролитов, предотвращая перегрузку кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} и Na^+ . Следствием этого является снижение возбудимости и проводимости миокарда при реперфузии и уменьшение частоты возникновения аритмий [2]. Наряду с улучшением электрофизиологических характеристик, сама аспарагиновая кислота способна запускать компенсаторные механизмы образования АТФ и ГТФ в митохондриях и цитозоле в условиях сниженного обеспечения клеток кислородом [3, 4]. Результатом этого может быть уменьшение потерь макроэргических фосфатов на стадии ранней реперфузии. При последующем восстановлении аэробного обмена увеличение внутриклеточной концентрации аспарагиновой кислоты в кардиомиоцитах способствует ресинтезу адениннуклеотидов и фосфокреатина [5].

В экспериментальных и клинических исследованиях установлено, что ГИК снижает уровень циркулирующих в крови свободных жирных кислот (СЖК) и их потребление миокардом [6]. Это уменьшает токсическое действие СЖК на ишемизированный миокард, связанное с повреждением мембран, которое приводит к возникновению аритмий и подавлению функции сердца [7]. Помимо этого, ГИК увеличивает захват K^+ миоцитами благодаря стимуляции активности Na^+/K^+ -АТФазы инсулином и способствует транспорту глюкозы в клетки [8]. Увеличение гликолитического потока не только поддерживает более высокие уровни АТФ и фосфокреатина (ФКр) в условиях ишемии, но и снижает внутриклеточные концентрации АДФ и неорганического фосфата, что значительно увеличивает свободную энергию гидролиза АТФ при протекании всех АТФазных реакций. Образующийся в гликолизе АТФ обеспечивает сохранение структуры плазматической мембраны и работу ионных насосов, уменьшая перегрузку миоцитов ионами Ca^{2+} [9]. Эти метаболические перестройки хорошо объясняют способность ГИК препятствовать развитию контрактуры и улучшать работу сердца при ишемии.

Хотя К-Mg-Асп и ГИК длительное время применяются для лечения и профилактики нарушений сердца различной природы, их влияние на необратимые повреждения кардиомиоцитов и метаболизм миокарда при реперфузии практически не изучены. Недавно в ряде лабораторий было продемонстрировано ограничение размеров инфаркта миокарда при использовании ГИК только во время реперфузии [10, 11]. Предполагают, что этот эффект мог быть обусловлен как антиапоптотическим действием самого инсулина (И), так и влиянием ГИК на метаболизм постишемических миоцитов [12-14]. Действие К-Mg-Асп на постишемический миокард до настоящего времени остается не изученным. Целью настоящей работы было оценить способность К-Mg-Асп, ГИК, комбинации глюкозы, инсулина с аспаратом калия (ГИКАсп) и одного И ограничивать размеры инфаркта миокарда (ИМ) у крыс при их введении на стадии ранней реперфузии. Для понимания механизмов уменьшения летальных повреждений кардиомиоцитов под действием кардиопротекторов были изучены показатели энергетического, углеводного и азотистого обмена, а также повреждения клеточных мембран в зоне риска (ЗР) в конце реперфузии.

МЕТОДИКА.

Препарирование животных. Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Wistar массой 300-450 г, наркотизированных кетаминном (100 мг/кг веса внутривенно). Искусственную вентиляцию легких осуществляли комнатным воздухом с добавлением кислорода, с частотой 60-80 в мин, под постоянным контролем насыщения кислородом артериальной крови. Правую яремную вену катетеризировали для введения гепарина и испытываемых растворов. Левую сонную артерию катетеризировали для регистрации артериального давления (Мингограф-804, Siemens Elema) и взятия проб артериальной крови (ABL-30, Radiometer, Copenhagen). Грудную клетку вскрывали во II-IV межреберье слева или продольным рассечением грудины и освобождали сердце от перикарда.

Для создания региональной ишемии миокарда левый желудочек прошивали атравматической иглой 5-0 под левым ушком в направлении, перпендикулярном большой оси сердца. Затягивание лигатуры на передней нисходящей коронарной артерии (ПНА), находящейся в толще прошитого миокарда, прекращало кровоснабжение участка миокарда; ослабление лигатуры приводило к восстановлению коронарного притока. По окончании опытов сердце окрашивали 2% раствором Эванса, введенным через яремную вену при затянутой лигатуре, отделяли левый желудочек, который замораживали при -20°C для последующей гистохимической обработки [15]. В отдельных сериях опытов ЗР левого желудочка быстро вырезали и замораживали щипцами Волленбергера, охлажденными в жидком азоте, для последующей оценки метаболического состояния.

Показатели кислотно-щелочного баланса артериальной крови контролировали на кислотно-щелочном газоанализаторе ABL-30 (Radiometer) и поддерживали на физиологическом уровне в течение всего опыта.

Протоколы опытов. После окончания препарирования животных и стабилизации в течение 30 мин гемодинамических показателей (исходное состояние) окклюдировали ПНА на 40 мин для создания региональной ишемии. Продолжительность последующей реперфузии составляла 60 мин. В течение всего периода реперфузии в яремную вену со скоростью 1 мл/кг/ч вводили физиологический раствор (контроль). Эффективность защиты ишемизированного миокарда с помощью метаболических протекторов оценивали в отдельных сериях опытов, вводя с той же скоростью во время реперфузии К-Mg-Асп (К-аспартат 2,6 М, Mg-(аспартат)₂ 2,75 М); ГИК (глюкоза 2,8 М, инсулин 100 МЕ/л, K^{+} 0,1 М), ГИКАсп (глюкоза 2,8 М, инсулин 100 МЕ/л, К-аспартат 0,1 М) или И (100 МЕ/л в физиологическом растворе). Оптимальное содержание компонентов в составе протекторов и их дозы введения были подобраны, исходя из имеющихся в литературе данных, и оценены в сериях предварительных опытов на используемой модели ИМ.

Измерение размеров инфаркта. Срезы левого желудочка толщиной около 1,5 мм инкубировали 10 мин в 1% растворе 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида, растворенном в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4 при 37°C . Затем их взвешивали для определения общей массы левого желудочка (ЛЖ). После подсушивания окрашенные срезы сканировали, размеры ИМ и ЗР определяли методом компьютерной планиметрии, используя программу Imagescal [16]. В каждой группе рассчитывали отношения ЗР/ЛЖ и ИМ/ЗР в %.

Обработка ткани и анализ метаболитов. По окончании исходного состояния или периода реперфузии ткань ЗР левого желудочка быстро вырезали и замораживали в жидком азоте. Замороженные образцы ткани измельчали в холодной 6% HClO_4 (10 мл/г ткани) и гомогенизировали с помощью Ultra-Turrax T225 (IKA-Labortechnik). Затем их экстрагировали 20 мин во льду и центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин при 4°C . Супернатанты нейтрализовали 5 М K_2CO_3 до pH 7,40 и повторно центрифугировали при 4°C для удаления осадка KClO_4 . Безбелковые экстракты хранили замороженными до определения метаболитов. Сухой вес ткани определяли взвешиванием части осадка ткани после экстракции HClO_4 , высушенной при 110°C в течение ночи [17]. Концентрации АТФ, фосфокреатина (ФКр), креатина (Кр), аспартата (Асп), глутамата (Глу), лактата и глюкозы определяли спектрофотометрически энзиматическими методами [18].

Статистическая обработка. Данные приведены как среднестатистические \pm ошибка средней. Различия между группами оценивали по t-критерию Стьюдента и считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Влияние протекторов на размеры ИМ. Введение физиологического раствора или метаболических протекторов во время реперфузии не влияло на артериальное давление и кислотно-щелочное состояние артериальной крови. Во всех группах

УМЕНЬШЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЦА ПРИ РЕПЕРФУЗИИ ПРОТЕКТОРАМИ

эти показатели в конце реперфузии не отличались от исходных значений и составляли в среднем: артериальное давление 100 ± 3 мм рт. ст.; pH $7,40 \pm 0,03$; $p\text{CO}_2$ $24,5 \pm 1,8$ мм рт. ст.; $p\text{O}_2$ 299 ± 30 мм рт. ст. Таким образом, животные всех групп были гемодинамически стабильны, и адекватный аэробный обмен поддерживался на протяжении всех протоколов.

В экспериментальных группах отношение ЗР/ЛЖ не отличалось от этого показателя в контроле и в среднем составляло $24,2 \pm 1,3\%$, что указывало на стандартное повреждение миокарда при окклюзии ПНА. Отношение ИМ/ЗР составляло $55,5 \pm 3,9\%$ в контроле и достоверно снижалось под влиянием всех протекторов (рис. 1). Видно, что размеры ИМ в экспериментальных группах, оцененные по этому показателю, снижались в ряду ГИКАсп>К-Mg-Асп>И>ГИК. Существенно, что достоверных различий в размерах ИМ после реперфузии ГИК или одним И обнаружено не было. Это предполагает, что И играет ключевую роль в защитном эффекте ГИК. Замена K^+ в смеси ГИК эквимоллярным количеством К-аспартата (0,1 М) не приводила к дальнейшему ограничению размеров ИМ по сравнению с этим показателем в группе ГИК. Напротив, отношение ИМ/ЗР (в %) в группе ГИКАсп было самым высоким, но достоверно ниже, чем этот показатель в контроле. Поэтому исследование влияния ГИКАсп на метаболизм ЗР не проводили.

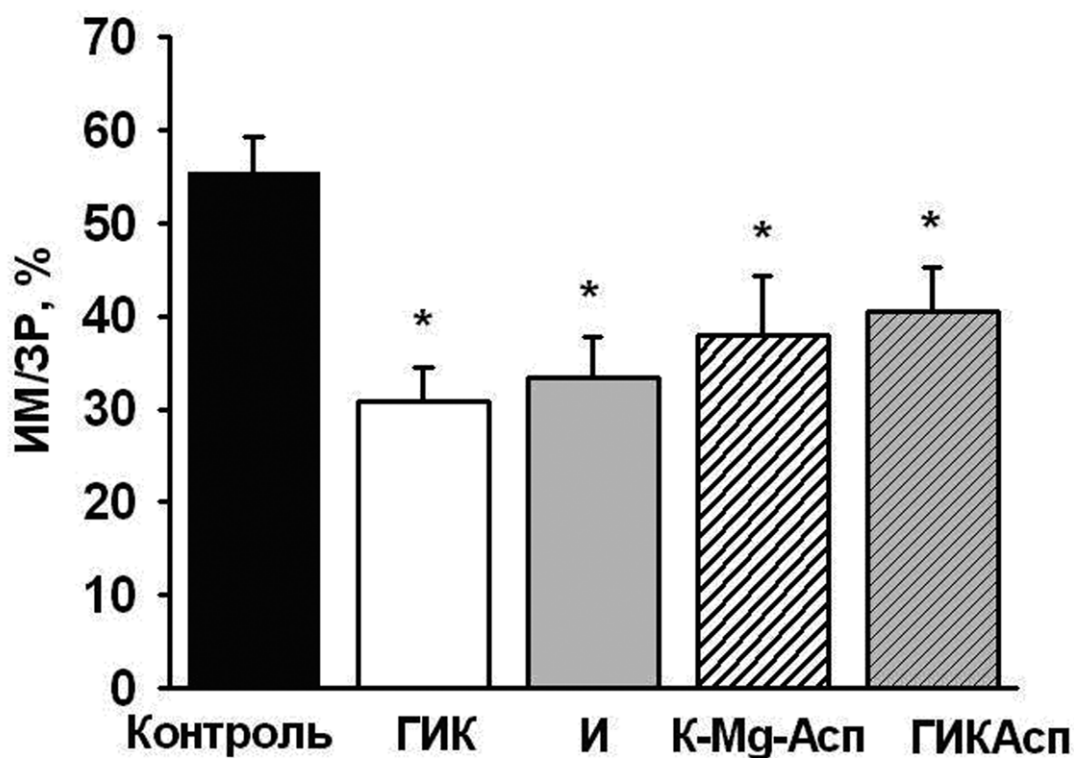


Рисунок 1.

Ограничение размеров инфаркта миокарда левого желудочка сердца крысы под действием метаболических протекторов. Здесь и в рисунках 2 и 3 представлены данные для серий из 10-12 опытов. Размеры инфаркта миокарда выражали отношением ИМ/ЗР в %. Контроль - 40-мин окклюзия ПНА с последующей 60-мин реперфузией. ГИК, И, К-Mg-Асп и ГИКАсп - 60-мин реперфузия с соответствующим протектором со скоростью 1 мл/кг/ч после 40-мин окклюзии ПНА. * - Достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$).

Изменения в метаболическом состоянии ЗР. Содержание макроэргических фосфатов, аминокислот, глюкозы и лактата в левом желудочке сердца крысы до окклюзии ПНА (исходное состояние) соответствовало обычно приводимым в литературе значениям (табл. 1, 2) [5, 8].

Таблица 1. Изменения в содержании метаболитов энергетического обмена в ЗР левого желудочка сердца крысы при региональной ишемии и реперфузии.

	АТФ	ФКр	Креатин
Исходное состояние	22,39±1,20	23,78±1,59	35,49±2,13
Контроль	5,26±0,61^а	7,53±0,87^а	11,62±1,87^а
К-Mg-Асп	11,35±0,75^{а,б}	18,87±1,74^{а,б}	18,67±2,34^{а,б}
ГИК	13,96±1,06^{а,б}	20,14±2,76^{а,б}	27,31±3,14^{а,б}
И	12,47±0,92^{а,б}	20,05±2,01^{а,б}	26,28±2,15^{а,б}

Примечание: Здесь и в таблице 2 представлены данные в мкмоль/г сух. веса ткани для серий из 10-12 опытов. Исходное состояние - 30-мин стабилизация гемодинамических показателей после препарирования животных. Контроль - 40-мин окклюзия ПНА с последующей 60-мин реперфузией. К-Mg-Асп, ГИК или И - 60-мин реперфузия с соответствующим протектором со скоростью 1 мл/кг веса/час после 40-мин окклюзии ПНА. ^а - Достоверно отличается от исходного состояния ($p<0,01$); ^б - достоверно отличается от контроля ($p<0,05$).

Таблица 2. Влияние реперфузии с метаболическими протекторами на содержание аминокислот, глюкозы и лактата в ЗР миокарда крыс.

	Аспартат	Глутамат	Лактат	Глюкоза
Исходное состояние	6,75±0,56	23,45±2,12	2,15±0,14	2,46±0,29
Контроль	0,46±0,11^а	9,35±0,84^а	12,83±1,80^а	38,26±4,12^а
К-Mg-Асп	3,98±0,45^{а,б}	16,27±0,90^{а,б}	10,05±0,55^а	26,30±2,74^{а,б}
ГИК	1,94±0,20^{а,б,в}	12,92±0,98^{а,б}	9,10±2,32^а	92,22±19,58^{а,б,в}
И	2,87±0,24^{а,б,в}	14,77±1,18^{а,б}	8,50±0,85^а	17,58±2,96^{а,б,в}

Примечание: Исходное состояние - 30-мин стабилизация гемодинамических показателей после препарирования животных. Контроль - 40-мин окклюзия ПНА с последующей 60-мин реперфузией. К-Mg-Асп, ГИК или И - 60-мин реперфузия с соответствующим протектором со скоростью 1 мл/кг веса/час после 40-мин окклюзии ПНА. Достоверно отличается от: ^а - исходного состояния; ^б - контроля; ^в - К-Mg-Асп ($p<0,05$).

Под влиянием региональной ишемии и последующей реперфузии содержание АТФ и ФКр в ЗР в контроле снижалось до 23,5±2,7 и 31,7±3,6% от исходных значений соответственно (табл. 1). В конце реперфузии содержание макроэргических фосфатов в ЗР сердца крыс, защищенных ГИК, И или К-Mg-Асп было в 2,5 раза выше, чем в контроле и в среднем составляло 56,3±3,4 и 81,8±7,9% от исходных значений для АТФ и ФКр, соответственно. Достоверных различий в содержании АТФ или ФКр в ЗР между экспериментальными группами не обнаружено.

УМЕНЬШЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЦА ПРИ РЕПЕРФУЗИИ ПРОТЕКТОРАМИ

Низкое содержание АТР и ФКр в ЗР в контрольной группе в конце реперфузии соответствовало метаболическим сдвигам, характерным для неэффективного восстановления аэробного обмена. К ним относятся высокое содержание продуктов гликолиза/гликогенолиза - лактата и глюкозы в ЗР к концу опыта и сниженное содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот (до $6,8 \pm 1,6$ и $41,1 \pm 3,6\%$ от исходных значений), указывающее на их включение в анаэробный обмен.

Под влиянием реперфузии с метаболическими протекторами потери фонда аспарагиновой и глутаминовой кислот в ЗР достоверно снижались. Наибольшее содержание аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты в ЗР было отмечено при использовании К-Mg-Асп. В этом случае общий фонд этих аминокислот был вдвое выше, чем в контроле и составлял $67,2 \pm 6,6$ и $33,5 \pm 4,9\%$ от исходного, соответственно ($p < 0,01$). Это предполагало транспорт аспарагиновой кислоты в кардиомиоциты и её последующее трансаминирование с образованием глутаминовой кислоты. Накопление лактата и глюкозы в ЗР уменьшалось в наибольшей степени под влиянием И, свидетельствуя об активации аэробного гликолиза. При реперфузии с ГИК содержание глюкозы в ЗР было наибольшим, что отражало увеличение не только внутриклеточного, но и внеклеточного содержания глюкозы, а уровень лактата был практически таким же, как и после реперфузии с одним И. Реперфузия с К-Mg-Асп также достоверно снижала уровни глюкозы и лактата в ЗР по сравнению с контролем.

Целостность мембран кардиомиоцитов в ЗР оценивали по внутриклеточному маркеру - содержанию общего креатина ($\Sigma\text{Кр} = \text{ФКр} + \text{Кр}$). В конце реперфузии этот показатель был минимальным в контроле за счет 3-кратного снижения уровня ФКр и Кр (табл. 1) и составлял $32,3 \pm 2,3\%$ от исходного содержания $\Sigma\text{Кр}$ (рис. 2). Под влиянием протекторов тканевый фонд $\Sigma\text{Кр}$ сохранялся значительно лучше, чем в контроле. После реперфузии с ГИК и И содержание $\Sigma\text{Кр}$ в ЗР составляло соответственно $80,1 \pm 4,9\%$ и $78,2 \pm 5,6\%$ от исходного, и было достоверно более высоким, чем в сердцах группы К-Mg-Асп ($63,3 \pm 5,5\%$, $p < 0,05$). Поскольку мембрана интактных кардиомиоцитов непроницаема для ФКр и Кр [19], более высокое содержание $\Sigma\text{Кр}$ предполагает лучшую интегрированность сарколеммы кардиомиоцитов в ЗР при реперфузии с ГИК и И, чем К-Mg-Асп.

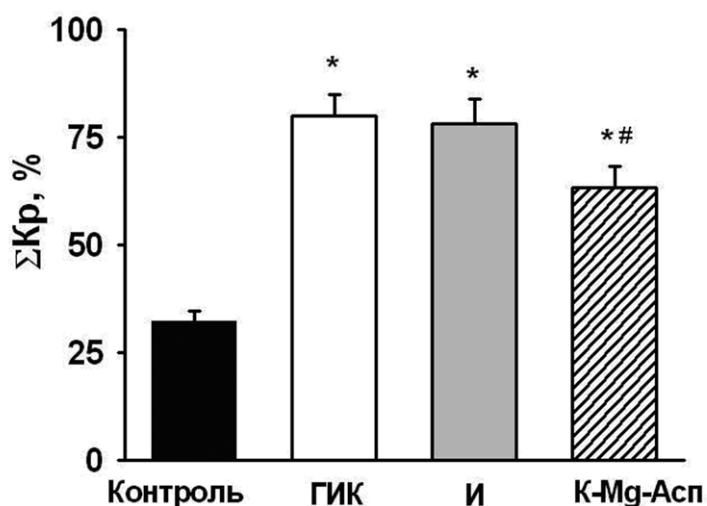


Рисунок 2.

Влияние реперфузии с метаболическими протекторами на содержание общего креатина в ЗР левого желудочка сердца крысы. Общий креатин ($\Sigma\text{Кр} = \text{ФКр} + \text{Кр}$) выражали в % к исходному содержанию в ЗР, которое составляло $59,26 \pm 1,96$ мкмоль/г сух. ткани. Контроль - 40-мин окклюзия ПНА с последующей 60-мин реперфузией. ГИК, И и К-Mg-Асп - 60-мин реперфузия с

соответствующим протектором со скоростью 1 мл/кг веса/час после 40-мин окклюзии ПНА.

Достоверно отличается от: * - контроля; # - К-Mg-Асп ($p < 0,05$).

Корреляционный анализ выявил тесную положительную взаимосвязь между средними значениями потерь общего креатина в ЗР ($\Delta\Sigma\text{Кр}$ в % от исходного содержания) и средними значениями отношений ИМ/ЗР (в %) в исследуемых группах ($r=0,99$; $p<0,05$; рис. 3). Это означает, что большему ограничению размеров инфаркта миокарда под влиянием протекторов соответствовало лучшее сохранение содержания $\Sigma\text{Кр}$ в ЗР, а, следовательно, и меньшие разрывы сарколеммы ишемизированных кардиомиоцитов.

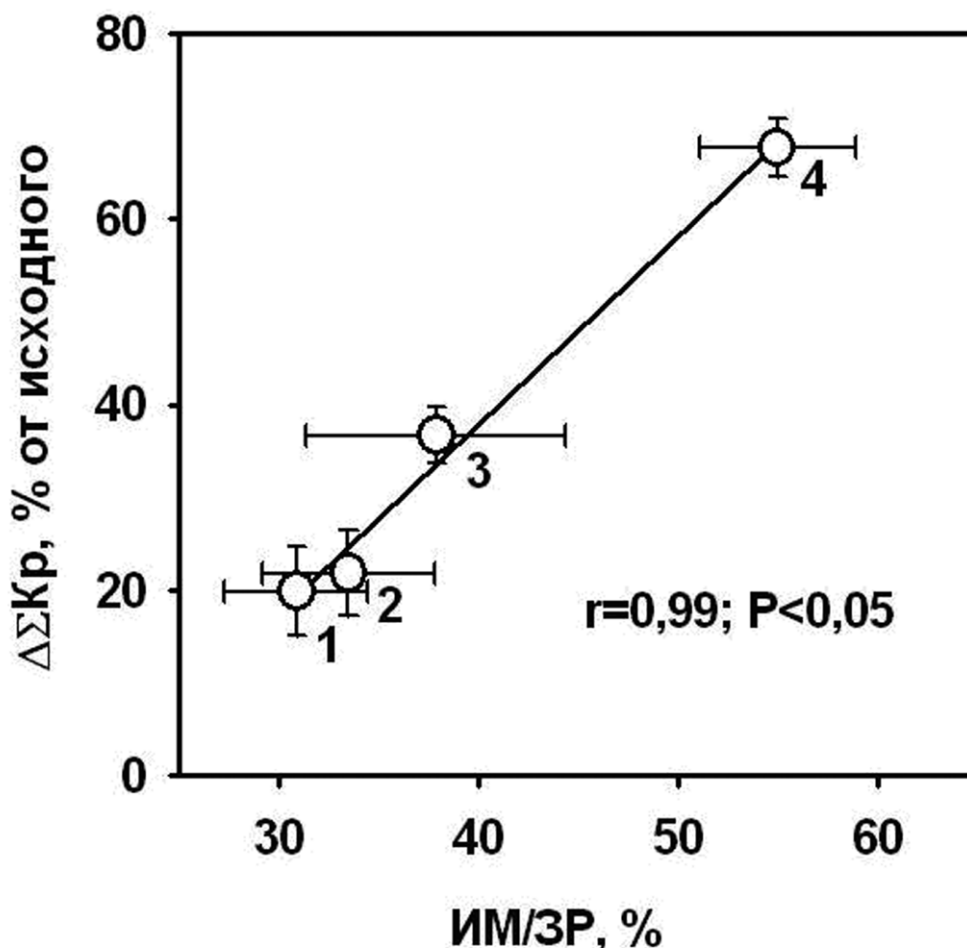


Рисунок 3.

Корреляция между средними значениями потерь общего креатина ($\Delta\Sigma\text{Кр}$) в ЗР (в % от исходного содержания) и средними значениями отношений ИМ/ЗР (в %) в исследуемых группах.

1 – ГИК; 2 – И; 3 – К-Mg-Асп; 4 – контроль.

Эффективность протекторов при реперфузии. Результаты работы свидетельствуют о том, что внутривенное введение всех изученных протекторов на реперфузии увеличивает толерантность постишемических кардиомиоцитов ЗР к реперфузионному повреждению по сравнению с контролем. Наибольшее и практически одинаковое снижение необратимого повреждения, охарактеризованное отношением ИМ/ЗР (в %), обеспечивала ранняя реперфузия ГИК и И, в меньшей степени ИМ снижался под действием К-Mg-Асп (рис. 1). Включение аспартата К в состав ГИК не увеличивало кардиопротекторную эффективность ГИК. Отсутствие дополнительного защитного эффекта, вероятно, связано как с низким содержанием самого аспартата в составе ГИКАсп по сравнению с К-Mg-Асп, так и с отсутствием второго необходимого компонента для проявления протекторных свойств аспартата – ионов Mg^{2+} .

Существенно, что полученные данные прямо указывают на метаболическую природу защитного действия использованных реперфузионных составов: ГИК, И и К-Mg-Асп улучшали восстановление аэробного обмена в постишемических кардиомиоцитах. Это подтверждалось более высоким содержанием АТФ и ФКр, лучшим сохранением фонда ключевых аминокислот сердца – Асп и Глу – одновременно со снижением накопления лактата в ЗР в конце реперфузии (табл. 1, 2). В дополнение к этому, нами была обнаружена тесная корреляция между сохранением содержания Σ Кр в ЗР и снижением размеров ИМ во всех группах (рис. 3). В целом восстановление аэробного обмена и уменьшение повреждения мембран кардиомиоцитов, оцененное по содержанию Σ Кр, было максимальным в группах И и ГИК и незначительно ниже после реперфузии К-Mg-Асп. Таким образом, метаболическая эффективность протекторов соответствовала ограничению размеров ИМ и увеличивалась в ряду контроль < К-Mg-Асп < И < ГИК.

Механизмы защитного действия ГИК. Особый интерес представляет анализ влияния ГИК и И на снижение гибели кардиомиоцитов в ЗР. Ранее защитные механизмы “поляризующей смеси” ГИК связывали с обеспечением электрической стабильности сердца при ишемии [20]. Впоследствии Оrie и соавт. была разработана метаболическая концепция действия ГИК, базирующаяся на регуляции энергетического обмена [21]. На различных моделях ишемии и реперфузии миокарда было подтверждено, что под влиянием ГИК увеличивается продукция АТФ в гликолизе, лучше сохраняются запасы гликогена, происходит образование пирувата, сопряженное с обеспечением физиологических уровней интермедиатов цикла трикарбоновых кислот [6]. Следствием этого является большая интегрированность плазматических мембран и поддержка ионного гомеостаза кардиомиоцитов. Принципиально важно, что ГИК способен оптимизировать утилизацию энергопродуцирующих субстратов ишемизированным сердцем, снижая уровень циркулирующих в крови СЖК и их захват миокардиальными клетками [22]. В экспериментальных работах и у пациентов, подвергшихся реваскуляризации коронарных артерий, были обнаружены тесные взаимосвязи между увеличенной экстракцией миокардом глюкозы, метаболическими эффектами ГИК и снижением постишемической дисфункции сердца [10, 23]. Совокупность этих результатов принципиально согласуется с ограничением ИМ при использовании ГИК в период реперфузии, продемонстрированным нами и другими исследователями [6, 11, 13, 14]. Очевидно, что факторами, определяющими уменьшение гибели кардиомиоцитов в ЗР, являются снижение ингибирующего действия СЖК на энергетический обмен, увеличение продукции АТФ при окислении глюкозы, меньшее накопление лактата и H^+ , инициирующее перегрузку ионами Ca^{2+} , и развитие дефектов сарколеммы.

Полученные нами результаты показывают, что основным кардиозащитным компонентом ГИК является И. Это подтверждается как одинаковым снижением размеров ИМ под действием ГИК и одного И (рис. 1), так и их сходным влиянием на показатели энергетического обмена, продукцию лактата и содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот в ЗР (табл. 1, 2). Более того, введение в состав ГИК еще одного потенциального кардиопротектора - аспартата - при замене K^+ эквивалентным количеством К-аспартата (ГИКАсп) не вызывало дальнейшего уменьшения ИМ (рис. 1). Это предполагает, что снижение реперфузионного повреждения ЗР под влиянием ГИК прямо не связано с захватом ишемизированными миоцитами глюкозы или K^+ и может быть обусловлено независимыми кардиопротекторными механизмами. В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что ГИК в равной степени снижал размеры ИМ у крыс *in vivo* при внутривенном введении в период ишемии и реперфузии и при введении только на реперфузии [12]. Однако в последнем случае изменений в содержании СЖК и глюкозы в крови по сравнению с контролем не происходило.

Активация метаболических и сигнальных путей инсулином. В опытах на изолированном перфузируемом сердце крысы и на животных различных видов *in vivo* показано, что реперфузия одним И способна восстанавливать функцию сердца и уменьшать размеры ИМ, вызванные ишемическим и реперфузионным стрессом, практически в той же степени, что и ГИК [11, 12]. Эти данные хорошо согласуются с результатами настоящей работы (рис. 1). Имеются экспериментальные и клинические подтверждения того, что это может быть вызвано ингибированием липолиза в жировой ткани И, приводящим к снижению концентрации СЖК в крови и уменьшению их экстракции миокардом [24]. Сдвиг в утилизации энергетических субстратов под действием И в пользу углеводов уменьшает “бесполезный расход” АТР при включении СЖК в триглицериды и снижает ингибирование окисления глюкозы ацетилкоэнзимом А и цитратом - продуктами окисления СЖК. Следствием этих метаболических перестроек является меньшее повреждение функции митохондрий и накопление H^+ в постишемических кардиомиоцитах, способствующее сохранению внутриклеточного ионного гомеостаза и целостности плазматических мембран [7, 9, 14]. Прямые доказательства улучшения восстановления аэробного метаболизма в ЗР и снижение повреждений мембран кардиомиоцитов под действием И получены в настоящей работе (табл. 1, 2).

В тоже время ранее были получены экспериментальные подтверждения того, что И промотирует внутриклеточные сигнальные пути выживания ишемизированных кардиомиоцитов при реперфузии. Так, на модели изолированного сердца крысы показано, что инфузия И на стадии ранней реперфузии уменьшает не только некроз, но и запрограммированную гибель клеток – апоптоз [11, 25]. Антиапоптотное действие И не зависит от энергетического субстрата и полностью воспроизводится при замене глюкозы в перфузате пируватом. С помощью ингибиторного анализа было доказано, что этот кардиопротекторный фенотип опосредуется сигнальными каскадами, в которых участвуют тирозинкиназа, фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3-киназа) и p70S6-киназа (S6K), а активация сигнальных интермедиатов – протеинкиназы В (Akt) и S6K - происходит при их фосфорилировании И при реперфузии [12]. Эти же авторы показали, что И при реперфузии поддерживает проапоптотный пептид BAD (Bcl-2/Bcl-X_L – агонист, вызывающий гибель клеток) в неактивной фосфорилированной форме. В последние годы был идентифицирован дополнительный сигнальный каскад, инициируемый И в реперфузируемом сердце, мишенью которого является эндотелиальная NO-синтаза [26]. Фосфорилирование этого фермента И через опосредованный PI3-киназой – Akt путь вызывает образование в эндотелии оксида азота (NO), обладающего свойствами не только вазодилатора, но и ингибитора апоптоза [27]. Таким образом, митоген И может действовать как “метаболически независимый” компонент ГИК коктейля, снижая вклад апоптоза в реперфузионное повреждение миокарда.

Особенности действия K-Mg-Асп. Хотя целесообразность применения аспарагиновой кислоты при остром ИМ давно обоснована экспериментально [3, 28], данные по влиянию K-Mg-Асп на ИМ и метаболизм ЗР в доступной литературе отсутствуют. Механизм его действия связывают с ролью аниона Асп²⁻ как переносчика ионов K^+ и Mg^{2+} во внутриклеточное пространство и участием самого Асп²⁻ в метаболических процессах. Благодаря этому K-Mg-Асп способен уменьшать дисбаланс электролитов, снижать возбудимость и проводимость миокарда, производя антиаритмический эффект, и улучшать метаболическое состояние постишемического сердца. Полученные нами результаты показывают, что ограничение размеров ИМ под действием K-Mg-Асп на реперфузии прямо связано с его включением во внутриклеточный обмен. Это подтверждается значительным снижением потерь аспарагиновой кислоты в ЗР к окончанию реперфузии и одновременным увеличением содержания продукта её метаболизма – глутаминовой кислоты (табл. 2). Образование интермедиатов цикла

трикарбоновых кислот и активация переноса восстановительных эквивалентов NADH из цитозоля в митохондрии в малат-аспартатном челноке в результате сопряженного трансаминирования глутаминовой и аспарагиновой кислот способствует аэробному окислению глюкозы и восстановлению макроэргических фосфатов [3-5]. Об этом свидетельствуют достоверно более низкие уровни лактата и глюкозы (табл. 2) и двукратное увеличение содержания АТР и ФКр в ЗР по сравнению с контролем (табл. 1). Помимо этого, изменение трансмембранных ионных потоков, вызванное введением К-Mg-Асп, влияет на активность фосфоинозитидной и аденилатциклазной систем в миокарде [2]. Поскольку обе мессенджерные системы находятся в центре влияния гормонов и биологически активных веществ, “быстрые ответы” кардиомиоцитов, обусловленные изменениями мембранных потенциалов, также могут быть ответственны за предотвращение гибели постишемических кардиомиоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Тромболитическая терапия или первичная ангиопластика являются стандартной помощью при остром ИМ. Очевидно, что восстановления коронарного кровотока и снабжения кислородом ЗР недостаточно для спасения постишемических кардиомиоцитов, и следующей мишенью терапевтического воздействия должен быть миокард. Поэтому для успешной миокардиальной защиты в условиях срочной реперфузии необходимо использование метаболических протекторов. Это, в частности, подтверждают клинические исследования ECLA и DIGAMI, продемонстрировавшие высокую кардиопротекторную эффективность реперфузии ГИК, снижавшую смертность больных с острым коронарным синдромом [29, 30]. Результаты настоящей работы, также как и более ранних экспериментальных исследований, указывают на перспективность такого подхода. Применение метаболических протекторов позволяет снижать обе составляющие необратимого повреждения миокардиальных клеток – некроз и апоптоз. Это достигается комплексным воздействием на внутриклеточный обмен и ионный гомеостаз, модуляцией активности сигнальных каскадов и мессенджерных систем. Полученные результаты указывают на целесообразность дальнейшего изучения действия этого класса кардиопротекторов в условиях реперфузионного стресса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 05-04-48524.

ЛИТЕРАТУРА

1. Verma S., Fedak P.W.M., Eeisel R.D. (2002) *Circulation*, **105**, 2332-2336.
2. Вишневский А.А., Берляков А.А. (2002) Бюлл. exper. биол. мед., **134**(9), 299-302.
3. Rosenfeldt F.L., Korchazhkina O.V., Richards S.M., Fisher J.L., Tong S., Pisarenko O.I. (1998). *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.*, **14**, 185-190.
4. Snaith Ch.D., Wright G., Lofkin M. (1992) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **24**, 305-315.
5. Pisarenko O.I. (2001) in: *Ischemia-Reperfusion Injury in Cardiac Surgery*, (Beersdorf F. ed.), Georgetown, Landes Bioscience, pp. 90-96.
6. Apstein C.S., Taegtmeyer H. (1997) *Circulation*, **95**, 1074-1077.
7. Lopaschuk G.D., Wambolt R.R., Barr R.I. (1993) *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **264**, 135-144.
8. Cross H.R., Radda G.K., Clarke K. (1995) *Magn. Reson. Med.*, **34**, 673-685.
9. Xu K.Y., Zweier J.L., Becker L.C. (1995) *Circ. Res.*, **77**, 88-97.
10. Jonassen A.K., Aasum E., Reismersma R.A., Mjos O.D., Larsen T.S. (2000) *Cardiovasc. Drugs and Therapy*, **14**, 615-623.
11. Zhang H.F., Fan Q., Qian X.X., Lopez. B.L., Cristopher T.A., Ma X.L., Gao F. (2004) *Apoptosis*, **9**, 777-783.
12. Jonassen A.K., Sack M.N., Mjos O.D., Yellon D.M. (2001) *Circ. Res.*, **89**(10), 1191-1199.

13. *LaDisa J.F., Krolikowski J.G., Pagel P.S., Warltier D.C., Kersten J.R.* (2004) *Am. J. Physiol. (Heart Circ Physiol)*, **287**(4), H601-H607.
14. *Angelos M.G., Murray H.N., Gorsline R.T., Klawitter P.F.* (2002) *Resuscitation*, **55**, 329-336.
15. *Писаренко О.И., Студнева И.М., Серебрякова Л.И., Цкитишвили О.В., Тимошин А.А.* (2005) *Кардиология*, **45** (2), 37-44.
16. *Писаренко О.И., Серебрякова Л.И., Цкитишвили О.В., Студнева И.М., Тимошин А.А.* (2003) *Кардиология*, **43**(12), 65-70.
17. *Pisarenko O.I., Tskitishvili O.V., Studneva I.M., Serebryakova L.I.* (1996) *Ann. NY Acad. Sci.*, **793**(1), 85-97.
18. *Bergmeyer H.U.* (1974) in: *Methods of enzymatic analysis*. (Bergmeyer H.U. ed.) New York: Academic Press vol. 3-4: pp. 1464-1467, pp. 1696-1700, pp. 1704-1708, pp. 1772-1776, pp. 2101-2110, pp. 2127-2131.
19. *Reimer K.A., Hill M.L., Jennings R.B.* (1981) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **13**(2), 229-239.
20. *Sodi-Pallares D., Testelli M., Fishleder F.* (1962) *Am. J. Cardiol.*, **9**, 166-181.
21. *Opie L.H.* (1995) *Lancet*, **345**, 1520-1521.
22. *Sidossis L.S., Stuart C.A., Shulman G.I., Lopaschuk G.D., Wolfe R.R.* (1996) *J. Clin. Invest.*, **98**, 2244-2250.
23. *Coleman G.M., Gradinac S., Taegtmeier H., Sweeney M., Frazier O.H.* (1989) *Circulation*, **80**, 191-196.
24. *Randle P.J.* (1998) *Diabetes Metab. Rev.*, **14**, 263-283.
25. *Sack M.N., Yellon D.M.* (2003) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **41**, 1404-1407.
26. *Gao F., Gao E., Yue T-L., Ohlstein E.H., Lopez B.L., Christopher T.A., Ma X-L.* (2002) *Circulation*, **105**, 1497-1506.
27. *Rakhit R.D., Marber M.S.* (2001) *Heart*, **86**, 368-372.
28. *Engelman R.M., Rousou J.A., Flack J.E. 3rd, Iyengar J., Kimura Y., Das D.K.* (1991) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **101**, 855-859.
29. *Diaz R., Paolasso E.A., Piegas L.S., Tajer C.D., Moreno M.G., Corvalan R., Isea J.E., Romero G.* (1998) *Circulation*, **98**, 2227-2234.
30. *Malmberg K., Ryden L., Hamsten A., Herlitz J., Waldenstrom A., Wedel H.* (1996) *Eur. Heart J.*, **17**, 1337-1344.

Поступила: 21. 06. 2007.

ATTENUATION OF IRREVERSIBLE RAT HEART INJURY BY REPERFUSION WITH
METABOLIC PROTECTORS

O.I. Pisarenko, L.I. Serebryakova, O.V. Tskitishvili, I.M. Studneva

Cardiology Research Complex, Institute of Experimental Cardiology, 3-rd Cherepkovskaya str., 15A,
Moscow, 121552 Russia; tel.: (495) 414-67-37; fax: (495)149-0559; e-mail: olpi@cardio.ru

The aim of this study was to evaluate the effects of intravenous infusion of potassium-magnesium aspartate (K-Mg-Asp), a glucose-insulin-potassium cocktail (GIK), a combination of glucose, insulin and potassium aspartate (GIKAsp), and insulin (I) alone during reperfusion after myocardial regional ischemia on metabolism of the risk area (AR) and cardiomyocyte membrane damage in rats *in vivo*. Acute myocardial infarction (MI) was induced by 40-min occlusion of the anterior descending coronary artery followed by 60-min reperfusion. At the onset of reperfusion, K-Mg-Asp, GIK, GIKAsp, I or the physiological solution (control) was infused into the jugular vein at a rate of 1 ml/kg/h. After reperfusion, MI size was estimated by myocardial staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. In separate series transmural biopsies from the AR were taken for metabolite analysis. MI size in all experimental groups was less than that in the control and reduced in the following rank: K-Mg-Asp > GIKAsp > I > GIK. By the end of reperfusion with metabolic protectors, ATP and phosphocreatine levels in the AR were 2-2.5 times higher than in the control (56.3 ± 3.4 and $81.8 \pm 7.9\%$ of the initial values, respectively). The losses of aspartate and glutamate pool and lactate and glucose accumulation in the AR were significantly lower in the experimental groups than in control. At the end of the reperfusion, the total creatine content in the AR decreased to $32.3 \pm 2.3\%$ of the initial value in control, but restored to 78.0 ± 5.7 ; 76.7 ± 5.5 and $62.4 \pm 5.6\%$ under effects of GIK, I and K-Mg-Asp, respectively. The recovery of the majority indices of aerobic metabolism and cell membrane integrity was maximal in the GIK and I groups and insignificantly lower after reperfusion with K-Mg-Asp. Therefore the metabolic efficacy of the protectors on reperfusion corresponded to MI size limitation. The results suggest that myocardial reperfusion with GIK, I and K-Mg-Asp is a promising adjunctive therapy in patients with acute MI.

Key words: myocardial reperfusion, high energy phosphates, amino acids, cell membrane integrity.