

УДК 613.632.615.36  
©Коллектив авторов

## **ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ АТРАЗЫ МИОЗИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫСЫ ПОСЛЕ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ**

*О.И. Писаренко\*, В.С. Шultzженко, 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 ингибитора АТРАЗЫ миозина 2,3-бутандионмонооксида (БДМ) в диапазоне концентраций 1,25-10,0 мМ на восстановление функции изолированного сердца крысы после 35-мин нормотермической (37°C) глобальной ишемии. Инфузию БДМ проводили со скоростью 4 мл/мин в течение 5 мин до ишемии (БДМ-И) или перед 25-мин реперфузией (БДМ-Р). В контроле с той же скоростью вводили раствор Кребса. Наибольшее восстановление функции сердца и коронарных сосудов обнаружено при инфузии 2,5 мМ БДМ до ишемии. К концу реперфузии содержание АТР и ФКр в сердцах этой группы было достоверно выше, а уровень лактата вдвое ниже, чем в контроле; содержание общего креатина (ΣКр) не отличалось от исходного. Сходные, но меньшие сдвиги в улучшении аэробного обмена и сохранении ΣКр после реперфузии были обнаружены под действием инфузии 2,5 мМ БДМ перед реперфузией. Они сочетались со сниженным восстановлением функции сердца и коронарного потока по сравнению с этими показателями в группе БДМ-И. Выведение лактатдегидрогеназы из сердца в миокардиальный отток на стадии ранней реперфузии под действием 2,5 мМ БДМ было снижено в группах БДМ-И и БДМ-Р почти вдвое по сравнению с контролем, указывая на меньшее повреждение клеточных мембран. Результаты предполагают, что улучшение энергетического обеспечения постишемических кардиомиоцитов может быть ключевым фактором, определяющим кардиопротекторную эффективность кратковременного введения БДМ перед ишемией.

**Ключевые слова:** ишемия и реперфузия, 2,3-бутандионмонооксид, макроэргические фосфаты, лактат, мембраны кардиомиоцитов, функция сердца и коронарных сосудов.

**ВВЕДЕНИЕ.** Эффективность защиты сердца от ишемических и реперфузионных повреждений в значительной степени зависит от сохранения макроэргических фосфатов, поддержки ионного гомеостаза и снижения повреждения клеточных мембран в постишемическом миокарде [1]. Более высокий уровень энергетического обеспечения кардиомиоцитов в условиях

---

\* - адресат для переписки

сниженного потребления кислорода и субстратов может быть достигнуто путём уменьшения активности клеточных АТФаз и снижения сократительной активности сердца. Известно, что 2,3-бутадионмонооксим (БДМ) – обратимый ингибитор АТФазы миозина – обладает мощным отрицательным инотропным действием на миокард из-за снижения чувствительности сократительных белков к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  [2], хелатирования ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и ингибирования  $\text{Ca}^{2+}$  каналов L-типа [3]. Продолжительная инфузия БДМ уменьшает гиперконтрактуру миокарда и замедляет распад макроэргических фосфатов в условиях гипоксии и ишемии [4, 5]. Эти свойства обусловили изучение БДМ в качестве кардиоплегического и консервирующего агента в экспериментальной кардиохирургии. Показано, что гипотермические растворы, содержащие 20-25 мМ БДМ, обеспечивают лучшее восстановление сократительной функции сердца и изолированных кардиомиоцитов при реперфузии или реоксигенации по сравнению с  $\text{K}^+$ - $\text{Mg}^{2+}$  кардиоплегическими средствами благодаря снижению перегрузки ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , уменьшению ацидоза и разрывов плазматических мембран [6-8]. Внутрикоронарная инфузия 53,4 мМ БДМ, ингибируя сократительную активность левого желудочка сердца, значительно снижает размеры инфаркта и отек миокарда, вызванный окклюзией коронарной артерии и последующей реперфузией у свиней [9]. Впоследствии были обнаружены повреждающие эффекты БДМ на миокард, связанные с его способностью активировать фосфатазы и непосредственно дефосфорилировать белки, ускорять распад АТФ при метаболической блокаде окислительного фосфорилирования и ингибировать транспорт адениннуклеотидов через внутреннюю мембрану митохондрий [10, 11]. Имеются данные об ингибировании 10 мМ БДМ окислительного фосфорилирования в комплексе I дыхательной цепи митохондрий сердца крысы [12]. Анализ результатов исследований позволяет заключить, что цитотоксическое или цитостатическое действие БДМ на ишемизированное сердце сильно варьирует в зависимости от условий опыта, экспериментальной модели и вида животного.

Неоднозначность эффектов БДМ - потенциального кардиопротектора - инициировала изучение нами метаболических и функциональных ответов изолированного перфузируемого сердца крысы на введение различных концентраций этого соединения до и после глобальной ишемии. С этой целью восстановление функции сердца и коронарных сосудов при реперфузии было сопоставлено с метаболическим состоянием постишемического миокарда и повреждениями клеточных мембран.

#### МЕТОДИКА.

*Перфузия изолированного сердца крысы.* Опыты выполнены на изолированных сердцах крыс Wistar массой  $360 \pm 6$  г. У наркотизированных уретаном животных (1,25 мг на г массы тела внутривенно) извлекали сердца и ретроградно перфузировали их в течение 10-15 мин раствором Кребса (РК), насыщенным карбогеном (95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ ), при  $37^\circ\text{C}$  и постоянном перфузионном давлении 60 мм рт.ст. После этого осуществляли антеградную перфузию по Neely при постоянном давлении наполнения левого предсердия 15 мм рт.ст. и среднем перфузионном давлении в аорте 60 мм рт.ст. Состав РК был следующим (в мМ):  $\text{NaCl}$  – 118,0;  $\text{KCl}$  – 4,7;  $\text{CaCl}_2$  – 3,0;  $\text{MgSO}_4$  – 1,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,2;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  – 0,5;  $\text{NaHCO}_3$  – 25,0; глюкоза – 11,0; pH  $7,4 \pm 0,1$  при  $37^\circ\text{C}$  [13].

Давление в аорте и левом желудочке регистрировали при помощи тензометрических датчиков Р 50, монитора SP 1405 и регистратора SP 2010 (Gould Statham). Показателем интенсивности сократительной функции левого желудочка служило произведение частоты сокращений сердца на развиваемое давление (разность между систолическим и минимальным диастолическим давлением). Насосную функцию левого желудочка оценивали по величине минутного (сумма коронарного потока и аортального объёма) и ударного (отношение минутного объёма к частоте сокращений сердца) объёмов. Коронарное сопротивление рассчитывали из отношения аортального давления к коронарному потоку.

*Экспериментальный протокол.* После перфузии сердца по Neely в течение 15-20 мин регистрировали показатели функции сердца и коронарных сосудов (исходное состояние). Затем осуществляли 5-мин инфузию РК с постоянной скоростью 4 мл/мин, и подвергали сердца нормотермической (37°C) глобальной ишемии в течение 35 мин. За ишемией следовала 5-мин инфузия РК со скоростью 4 мл/мин и реперфузия по Neely в течение 25 мин.

В контроле инфузию РК без добавок проводили в течение 5-мин до и после ишемии. Дозо-зависимое влияние БДМ на постишемическое восстановление функции сердца и коронарных сосудов было оценено в отдельных сериях опытов. Для этого БДМ добавляли к РК до концентрации 1,25; 2,5; 5,0 или 10,0 мМ и вводили со скоростью 4 мл/мин в течение 5 мин до ишемии (БДМ-И) или в течение 5 мин перед реперфузией (БДМ-Р). Для изучения влияния БДМ на энергетическое состояние сердца и повреждения миокардиальной ткани при реперфузии были выполнены опыты с инфузией РК, содержащим 2,5 мМ БДМ, до и после ишемии в тех же условиях.

*Оценка метаболического состояния сердца.* По окончании исходного состояния, периода тотальной ишемии и реперфузии сердца замораживали щипцами Волленбергера, охлажденными в жидком азоте. Замороженную ткань гомогенизировали в холодной 6%  $\text{HClO}_4$  (10 мл/г ткани) с помощью гомогенизатора Ultra-Turrax T-25 (IKA-Labortechnik, Германия). Белки осаждали центрифугированием при 3000 g и 4°C в течение 10 мин. Супернатанты нейтрализовали 5 М  $\text{K}_2\text{CO}_3$  до pH 7,4. Осадок  $\text{KClO}_4$  отделяли центрифугированием в тех же условиях. Безбелковые экстракты хранили при -20°C до определения метаболитов. Сухие веса образцов определяли взвешиванием части ткани после экстракции  $\text{HClO}_4$  и высушивания при 110°C в течение ночи [13]. АТР и фосфокреатин (ФКр) в тканевых экстрактах определяли спектрофотометрически, используя глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гексокиназу и креатинкиназу [14]. Для определения креатина использовали сопряженные реакции с креатинкиназой, пируваткиназой и лактатдегидрогеназой [15]. Общий креатин рассчитывали как  $\text{Кр} = \text{ФКр} + \text{Кр}$ . Лактат определяли с помощью лактатдегидрогеназы [16]. Содержание метаболитов выражали в мкмоль/г сух. веса.

*Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ).* Оттекающий от сердца перфузат собирали в охлажденные льдом пробирки в течение 5 мин во время инфузии БДМ и в контроле перед ишемией и в течение 5 мин после ишемии. Активность ЛДГ в образцах перфузатов определяли немедленно после их получения на спектрофотометре Yanako UO-2000, используя в качестве субстрата пируват, по методу [17].

*Статистическая обработка.* Использовали t-критерий Стьюдента; различия между величинами показателей считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.**

*Влияние БДМ на функциональные показатели постишемического сердца.* Поскольку действие БДМ на ишемизированный миокард во многом зависит от используемой концентрации [4, 10], в предварительных сериях было изучено влияние варьирования его содержания в РК на восстановление функции сердца и коронарных сосудов после тотальной ишемии. В качестве примера на рисунке 1 суммировано влияние пред- и постишемической 5-мин инфузии БДМ в диапазоне концентраций от 1,25 до 10,0 мМ на восстановление минутного объема. Видно, что наиболее эффективное восстановление этого показателя по сравнению с контролем происходило в результате инфузии БДМ до ишемии, а не после неё. Подобная зависимость степени восстановления от концентрации БДМ с максимумом, соответствующим 2,5 мМ, сохранялась для большинства показателей сократительной и насосной функции сердца. Поэтому эта концентрация была использована в дальнейшем для изучения влияния БДМ на метаболические и функциональные показатели сердца.

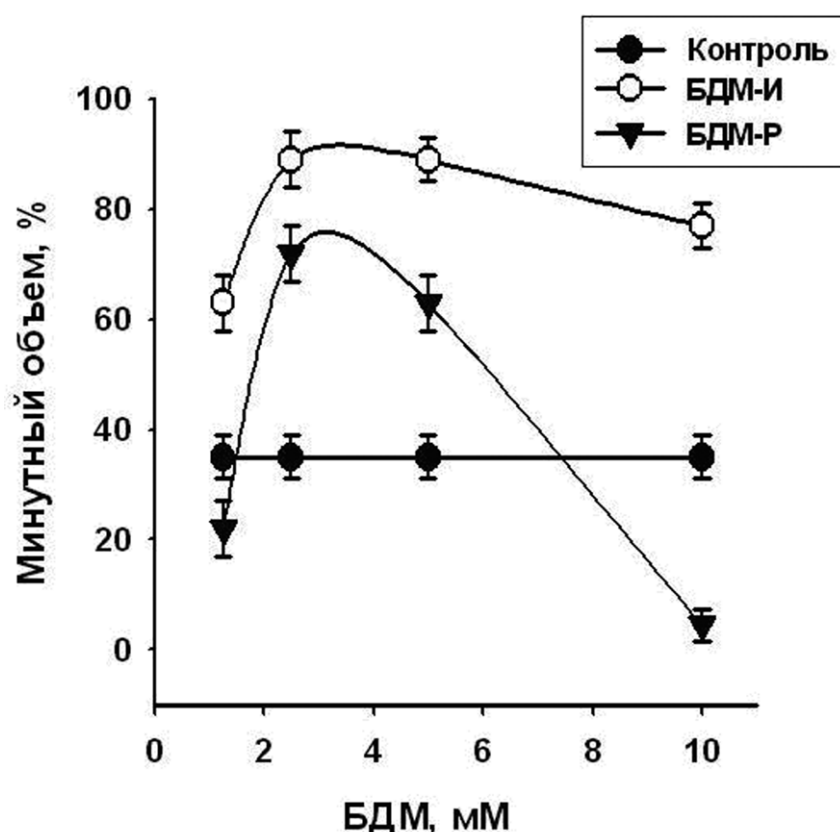


Рисунок 1.

Влияние концентрации БДМ в РК на восстановление минутного объема сердца крысы после ишемии. Приведены средние величины  $\pm$  ошибка средней (в % от исходного значения) для 5-мин инфузии БДМ перед ишемией (светлые кружки) и после ишемии (темные треугольники). Восстановление минутного объема в контроле показано линией, параллельной оси абсцисс.

Инфузия 2,5 мМ БДМ перед ишемией и в начале реперфузии значительно улучшала восстановление насосной функции левого желудочка (табл. 1). Так, в контроле к 25-й мин реперфузии по Neely ударный и минутный объемы восстанавливались до  $36 \pm 2\%$  и  $35 \pm 2\%$  от исходных значений, составлявших  $191 \pm 10$  мкл/уд. и  $45 \pm 3$  мл/мин, соответственно. В группе БДМ-Р эти показатели восстанавливались до  $65 \pm 4\%$  и  $72 \pm 4\%$ , а в группе БДМ-И - до  $96 \pm 5\%$  и  $89 \pm 5\%$ , достоверно различаясь от контроля ( $p < 0,05$ ). Введение БДМ перед ишемией полностью восстанавливало коронарный поток при реперфузии, что было обусловлено достоверным снижением коронарного сопротивления. Этот эффект сочетался с большим восстановлением интенсивности сократительной функции на ранней реперфузии: к 10-й мин реперфузии этот показатель восстанавливался до  $74 \pm 4\%$  от исходного значения против  $60 \pm 3\%$  в контроле ( $p < 0,05$ ). Лучшее восстановление насосной функции в опытах с БДМ сопровождалось существенно меньшим возрастанием диастолического давления в левом желудочке при реперфузии по сравнению с контролем. Так, к окончанию реперфузии диастолическое давление составляло  $96 \pm 5\%$  и  $131 \pm 7\%$  от исходного значения ( $1 \pm 1$  мм рт.ст.) в группе БДМ-Р и БДМ-И соответственно по сравнению с  $309 \pm 16\%$  в контроле. Взаимосвязь между изменениями минутного объема и диастолического давления во время реперфузии в группах суммирована на рисунке 2. Таким образом, инфузия 2,5 мМ БДМ перед ишемией обеспечивала наилучшее восстановление функции сердца и сосудов во время реперфузии по сравнению с контролем и инфузией 2,5 мМ БДМ после ишемии.

Таблица 1. Влияние 2,5 мМ БДМ на восстановление функции коронарных сосудов и сердца в конце реперфузии.

Исходное состояние	Реперфузия, 30 мин		
	Контроль	БДМ-И	БДМ-Р
<b>Коронарный поток</b> <b>16±1 мл/мин</b>	<b>93±5</b>	<b>113±6<sup>а</sup></b>	<b>88±5<sup>б</sup></b>
<b>Коронарное сопротивление</b> <b>3,84±0,19 мм рт.ст./мл</b>	<b>103±5</b>	<b>84±4<sup>а</sup></b>	<b>109±6<sup>б</sup></b>
<b>Систолическое давление</b> <b>88±5 мм рт.ст.</b>	<b>90±5</b>	<b>98±5</b>	<b>86±5</b>
<b>Диастолическое давление</b> <b>1±1 мм рт.ст.</b>	<b>309±16</b>	<b>131±7<sup>а</sup></b>	<b>96±5<sup>а,б</sup></b>
<b>Развиваемое давление</b> <b>86±5 мм рт.ст.</b>	<b>91±5</b>	<b>98±5</b>	<b>88±5</b>
<b>Частота сокращений сердца</b> <b>239±12 уд./мин</b>	<b>102±5</b>	<b>103±5</b>	<b>107±6</b>
<b>Интенсивность</b> <b>сократительной функции</b> <b>20120±101 мм рт.ст./мин</b>	<b>94±5</b>	<b>89±5</b>	<b>93±5</b>
<b>Минутный объем</b> <b>45±3 мл/мин</b>	<b>35±2</b>	<b>89±5<sup>а</sup></b>	<b>72±4<sup>а,б</sup></b>
<b>Ударный объем</b> <b>191±10 мл/удар</b>	<b>36±2</b>	<b>96±5<sup>а</sup></b>	<b>65±4<sup>а,б</sup></b>

Примечание. Приведены средние величины ± ошибка средней для серий из 10-12 опытов. Инфузию РК с 2,5 мМ БДМ со скоростью 4 мл/мин проводили в течение 5 мин перед 35-мин глобальной ишемией (БДМ-И) или в течение 5 мин после ишемии (БДМ-Р). Контроль - 5-мин инфузия РК без БДМ с той же скоростью до и после периода ишемии. Исходные данные представлены в абсолютных значениях. Показатели к 25-ой мин реперфузии по Neely выражены в % от исходных значений. Достоверно отличается: а - от контроля; б - от БДМ-И (p<0,05).

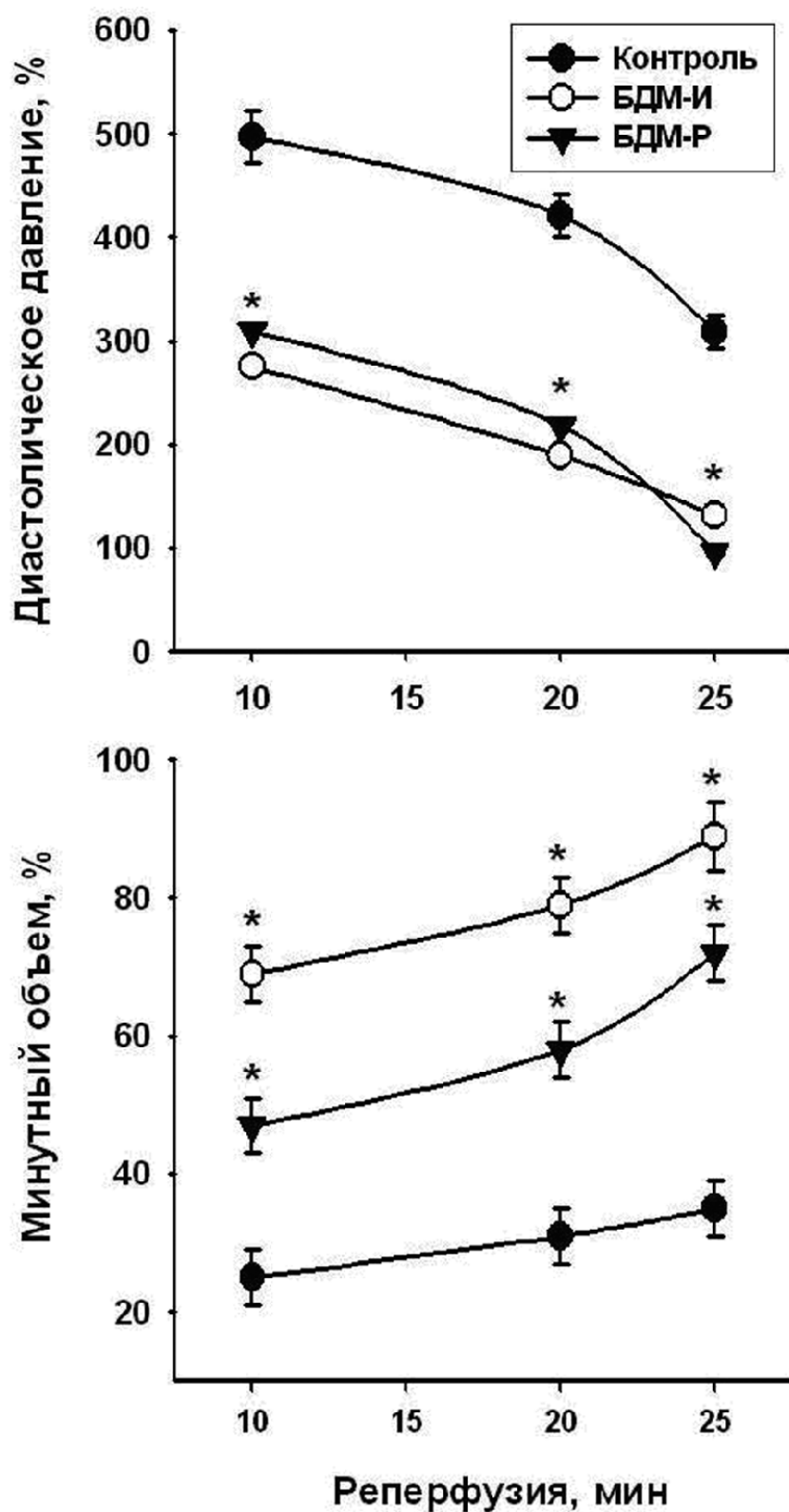


Рисунок 2.

Влияние 2,5 мМ БДМ на изменения диастолического давления и минутного объема при реперфузии сердца крысы. Приведены средние величины  $\pm$  ошибка средней (в % от исходного значения). \* - достоверно отличается от контроля ( $p < 0,05$ ).



*Снижение повреждения ишемизированных кардиомиоцитов БДМ.* Способность БДМ снижать повреждение миокардиальной ткани, вызванное ишемией, оценивали по выходу активности ЛДГ в миокардиальный отток в течение 5 мин инфузии с постоянной скоростью 4 мл/мин перед реперфузией по Neely. Этот показатель сравнивали с выведением ЛДГ в перфузат в течение 5-мин инфузии РК с той же скоростью перед ишемией. Из данных таблицы 2 видно, что за время 5-мин предишемической инфузии 2,5 мМ БДМ выход ЛДГ из миокардиальных клеток был таким же, как в контроле и в группе БДМ-Р. Таким образом, БДМ не влиял на интактность мембран кардиомиоцитов до ишемии. Однако в течение 5-мин инфузии после ишемии выведение ЛДГ достоверно снижалось до  $54 \pm 7$  и  $47 \pm 5\%$  в группе БДМ-И и БДМ-Р, соответственно, от значения в контроле. Это указывало на меньшие дефекты клеточных мембран, определяющие выведение цитоплазматической ЛДГ в перфузат из постишемического миокарда.

Таблица 2. Влияние 2,5 мМ БДМ на выведение ЛДГ из сердца в перфузат до и после ишемии.

	<b>Выход ЛДГ, МЕ/г сух веса за 5 мин</b>	
	<b>перед ишемией</b>	<b>после ишемии</b>
<b>Контроль (n=9)</b>	<b>2,87<math>\pm</math>0,64</b>	<b>6,65<math>\pm</math>0,83</b>
<b>БДМ-И (n=11)</b>	<b>2,57<math>\pm</math>0,51</b>	<b>3,57<math>\pm</math>0,50<sup>б</sup></b>
<b>БДМ-Р (n=10)</b>	<b>3,05<math>\pm</math>0,39</b>	<b>3,15<math>\pm</math>0,32<sup>а</sup></b>

Примечание. Приведены средние величины  $\pm$  ошибка средней, в скобках - количество опытов в каждой серии. Инфузию РК с 2,5 мМ БДМ со скоростью 4 мл/мин проводили в течение 5 мин перед 35-мин глобальной ишемией (БДМ-И) или в течение 5 мин после ишемии (БДМ-Р). Контроль - 5-мин инфузия РК без БДМ с той же скоростью до и после периода ишемии. Активность ЛДГ определяли в оттекающих от сердца перфузатах, собранных за 5 мин инфузии до и после ишемии. Достоверно отличается от контроля после ишемии: а -  $p < 0,01$  и б -  $p < 0,02$ .

*Влияние БДМ на энергетическое состояние реперфузированного сердца.* Восстановление окислительного обмена при реперфузии в данной работе было охарактеризовано содержанием в миокарде макроэргических фосфатов (АТР и ФКр) и накоплением лактата. Содержание метаболитов в ткани сердца в конце реперфузии в группах сопоставлено с их уровнями в исходном состоянии в таблице 3. В контроле в сердцах, реперфузированных после 35-мин тотальной ишемии, содержание АТР и ФКр было снижено примерно на 40 и 30% от исходного значения соответственно, а уровень лактата увеличен почти в 4 раза по сравнению с исходным. Фонд общего креатина ( $\Sigma$ Кр) после реперфузии сердец контрольной группы был достоверно ниже, чем в исходном состоянии. Это подтверждало повреждения плазматических мембран кардиомиоцитов и соответствовало увеличенному выходу ЛДГ в перфузат (табл. 2). Инфузия 2,5 мМ БДМ до и после ишемии улучшала энергетическое состояние реперфузированного сердца. В группе БДМ-И к концу реперфузии содержание АТР и ФКр было

## ПОСТИШЕМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ СЕРДЦА

достоверно выше, а уровень лактата вдвое ниже, чем в контроле. Это сочеталось с лучшим сохранением  $\Sigma$ Кр, содержание которого не отличалось от исходного. Сходные, но меньшие сдвиги в улучшении аэробного обмена были обнаружены в конце реперфузии в группе БДМ-Р. Фонд  $\Sigma$ Кр был достоверно выше, чем в контроле ( $90 \pm 2\%$  от предишемического значения) и не отличался от этого показателя в группе БДМ-И. В целом защитное действие БДМ на метаболизм постишемического сердца было более выраженным в случае его инфузии до ишемии, чем после. Это хорошо согласуется с более эффективным восстановлением функции сердца и меньшим выведением ЛДГ в миокардиальный отток при реперфузии в группе БДМ-И (табл. 2).

Таблица 3. Влияние инфузии 2,5 мМ БДМ до и после ишемии на содержание метаболитов в сердце крысы после реперфузии.

	АТР	ФКр	Креатин	$\Sigma$ Кр	Лактат
<b>Исходное состояние</b>					
	23,50 $\pm$ 1,65	26,61 $\pm$ 2,98	36,73 $\pm$ 2,87	63,34 $\pm$ 1,86	1,24 $\pm$ 0,12
<b>После реперфузии</b>					
<b>Контроль</b>	13,89 $\pm$ 1,27 <sup>а</sup>	18,44 $\pm$ 1,73 <sup>а</sup>	32,82 $\pm$ 1,74	51,27 $\pm$ 2,77 <sup>а</sup>	4,69 $\pm$ 1,14 <sup>а</sup>
<b>БДМ-И</b>	17,77 $\pm$ 0,92 <sup>а<sup>б</sup></sup>	24,94 $\pm$ 0,86 <sup>б</sup>	35,57 $\pm$ 2,33	60,51 $\pm$ 1,68 <sup>б</sup>	2,35 $\pm$ 0,56 <sup>а<sup>б</sup></sup>
<b>БДМ-Р</b>	15,56 $\pm$ 0,66 <sup>а</sup>	21, 23 $\pm$ 1,15	35,43 $\pm$ 2,05	56,66 $\pm$ 1,54 <sup>а</sup>	2,06 $\pm$ 0,68 <sup>а<sup>б</sup></sup>

Примечание. Приведены средние величины  $\pm$  ошибка средней для серий из 8-10 опытов. Содержание метаболитов в ткани сердца выражено в мкмоль/г сух. веса.  $\Sigma$ Кр - общий креатин (ФКр + креатин). Достоверно отличается от: а - исходного состояния, б - контроля ( $p < 0,05$ ).

*Механизмы действия БДМ на ишемизированное сердце.* Полученные результаты свидетельствуют о том, что влияние БДМ на восстановление функции сердца после глобальной ишемии определяется балансом между его повреждающим и защитным действием на миокард. На использованной нами модели ишемического и реперфузионного повреждения миокарда ощутимые протекторные эффекты были обнаружены при инфузии 2,5 мМ БДМ как до, так и после ишемии (рис. 1). Более высокие или низкие концентрации БДМ были менее эффективны или ухудшали восстановление функции сердца. Эти данные согласуются с тем, что БДМ в концентрации  $> 5$  мМ активирует фосфатазы 1 и 2а, тем самым увеличивая хрупкость мембран постишемических кардиомиоцитов и их повреждения в результате осмотического шока [10, 18]. Показано, что 5-20 мМ БДМ промотирует дефосфорилирование белков кардиомиоцитов крысы, включая легкие цепи миозина, тропонин Т, С и тропомиозин [19]. В соответствии с этим ингибирование фосфатазы 2а защищает ишемизированное сердце от реперфузионного повреждения [20]. Полагают, что мишенью фосфатаз и самого БДМ является дистрофин, стабилизирующий сарколемму кардиомиоцитов, потери которого из мембран при реперфузии связывают с выведением внутриклеточных ферментов, разрывом сарколеммы и некрозом клеток [21]. 50 мМ БДМ ускоряет дезэнергизацию кардиомиоцитов в условиях блокады окислительного фосфорилирования, значительно снижая уровень цитоплазматического и



митохондриального АТР при 35°C, но не при 4°C [22]. В то же время, гипотермическая кардиоплегия или консервация сердец в растворах 20-25 мМ БДМ при температуре 2-4°C сохраняют миокардиальный фонд макроэргических фосфатов [23, 24]. При 37°C, но не при 4°C, БДМ сдвигает равновесие между фосфорилированием и дефосфорилированием белков в кардиомиоцитах, компенсаторно увеличивая активность серин/треониновых и тирозиновых киназ за счет расхода АТР. Это способствует дополнительному снижению уровня АТР в ишемическом сердце [22]. Таким образом, влияние БДМ на метаболизм миокарда определяется не только его концентрацией, но и в значительной степени зависит от температуры.

Низкие (<5 мМ) концентрации БДМ способны ингибировать АТРаза миозина, сохраняя в ишемизированном миокарде более высокий уровень АТР для обеспечения энергозависимых функций кардиомиоцитов [25]. Так, увеличение содержания АТР и ФКр после 30-мин гипоперфузии изолированного сердца крысы 5 мМ БДМ по сравнению с контрольной гипоперфузией без ингибитора были отмечены в работах [4, 5]. Вероятно, этот механизм может быть ответственным за снижение диастолического давления (уменьшение реперфузионной контрактуры) и лучшее восстановление АТР и ФКр в период реперфузии, которые наблюдались в наших опытах после кратковременной инфузии БДМ перед ишемией или после неё (рис. 2, табл. 2). Известно, что БДМ ингибирует  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  переносчики в сарколемме путем их дефосфорилирования или действуя непосредственно, как фосфатаза, на регуляторный белок [9, 26], тем самым, снижая перегрузку кардиомиоцитов ионами  $\text{Ca}^{2+}$  при реперфузии. Это подтверждено уменьшением захвата миокардом  $\text{Ca}^{45}$  при реперфузии после гипоперфузии с 5 мМ БДМ [4]. Показано также, что способность БДМ в концентрациях < 5мМ к поддержке ионного гомеостаза в ишемических кардиомиоцитах связана с уменьшением выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума [27]. Предполагают, что улучшение энергетического обмена под действием БДМ способствует обратной транслокации дистрофина к плазматической мембране кардиомиоцитов при реперфузии, прямо связанной с фосфорилированием остатков серина и треонина С-концевой области этого белка [28]. В свою очередь уменьшение цитоплазматической концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  снижает возможность расщепления дистрофина  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми протеазами [21, 29]. Результатом восстановления дистрофина в мембране кардиомиоцитов, вероятно, является наблюдающееся под влиянием инфузии БДМ снижение выхода ЛДГ из кардиомиоцитов.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Из полученных результатов настоящего и ранее выполненных исследований следует, что действие БДМ на миокард не ограничивается ингибированием миозина с актином. Анализ имеющихся в литературе сведений обнаруживает неоднозначное влияние БДМ на энергетический обмен, гликолиз, функцию митохондрий и регуляцию внутриклеточного рН и гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  в ишемизированном миокарде [10-12, 18, 27]. Эти противоречия связаны с различиями в экспериментальных моделях и видах животных, использованных концентраций БДМ и способах его введения. В последние годы появились данные о влиянии БДМ на экспрессию генов, кодирующих образование белков цитоскелета,  $\text{Ca}^{2+}$ -регулирующих белков и белков  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  каналов [30]. Таким образом, БДМ может оказывать как прямое влияние на метаболические реакции, обладая фосфатазо-подобной активностью и ингибируя АТРаза, так и опосредованное, включающее регуляцию переноса катионов и активности киназ, участвующих во внутриклеточной сигнализации. Защитный эффект кратковременной инфузии 2,5 мМ БДМ в наших опытах сопровождался улучшением аэробного обмена и сохранения целостности клеточных мембран при реперфузии. Причем, лучшее восстановление функции и сосудов сердца в случае предишемической инфузии БДМ сочеталось с достоверным улучшением метаболического состояния реперфузированного сердца по сравнению с этими

показателями при введении препарата после ишемии (табл. 1, 3). В то же время достоверных отличий в снижении выхода ЛДГ из сердца или уменьшении потерь внутриклеточного Кр при реперфузии между группами БДМ-И и БДМ-Р не обнаружено (табл. 2, 3). Из этого следует, что на данной экспериментальной модели улучшение энергетического обеспечения постишемических кардиомиоцитов определяет эффективность БДМ как кардиопротектора в большей степени, чем его способность снижать повреждения клеточных мембран.

Данная работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 05-04-48524).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Verma S., Fedak P.W.M., Eisel R.D. (2002) *Circulation*, **105**, 2332-2336.
2. Higuchi H., Takemori S. (1989) *J. Biochem.*, **105**, 638-643.
3. Einsfeld J., Mikala G., Varadi G., Schwartz A., Klockner U. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230** (3), 489-492.
4. Tani M., Hasegawa H., Suganuma Y., Shinmura K., Kayashi Y., Nakamura Y. (1996) *Am. J. Physiol.*, **271**, H2515-H2519.
5. Vanoverschelde J., Janier M.F., Bergmann S.R. (1994) *Circ. Res.*, **74**, 817-828.
6. Dorman B.H., Cavallo M.J., Hinton R.B., Roy R.C., Spinale F.G. (1996) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **111**, 621-629.
7. Stowe D.F., Boban M., Graf B.M., Kampine J.P., Bosnjak Z.J. (1994) *Circulation*, **89**, 2412-2420.
8. Bauza G., Le Moyec L., Eugene M. (1995) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**(8), 1703-1713.
9. Garcia-Dorado D., Theroux P., Solares J., Alonso J., Sanz E., Munoz R., Elizaga J., Botas J., Soriano J., Esteban E. (1992) *Circulation* **85**, 1160-1174.
10. Spapleton M.T., Fuchsbaue C.M., Allshire A.P. (1998) *Am. J. Physiol.*, **275**, H1260-H1266.
11. Armstrong S.C., Ganote C.E. (1991) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **23**, 1001-1014.
12. Scaudo R.C., Grotyohann L.W. (2000) *Am. J. Physiol.*, **279**, H1839-H1848.
13. Писаренко О.И., Шульженко В.С., Студнева И.М., Тимошин А.А. (2004) *Кардиология*, **43** (4), 65-70.
14. Lamprecht W., Trautschold I. (1974) in: *Methods of enzymatic analysis* (H.U. Bergmeyer ed.) Academic Press, NY., pp. 2101-2110.
15. Bernt E., Bergmeyer H.U., Mollering H. (1974) in: *Methods of enzymatic analysis* (H.U. Bergmeyer ed.) Academic Press, NY., pp. 1772-1776.
16. Gutman I., Wahlenfeld A.W.L. (1974) in: *Methods of enzymatic analysis* (H.U. Bergmeyer ed.) Academic Press, NY., pp. 1464-1467.
17. Bergmeyer H.U., Bernt E. (1974) in: *Methods of enzymatic analysis* (H.U. Bergmeyer ed.) Academic Press, NY., pp. 574-578.
18. Zimmermann N., Boknik P., Gams E., Gsell S., Jones L.R., Maas R., Neumann J., Scholz H. (1996) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **345**, 431-436.
19. Venema R.C., Raynor T.A., Noland T.A., Kuo J.E. (1993) *Biochem. J.*, **294**, 401-403.
20. Weinbrenner C., Baines C.P., Liu G.S., Armstrong S.C., Ganote C.E., Walsh A.H., Honkanen R.E., Cohen M.V., Downey J.M. (1998). *Circulation* **98** 899-905.
21. Kido M., Otani H., Kyo S., Sumuda T., Fujiwara H., Okada T., Imamura H. (2004) *Am. J. Physiol.* **287**, H81-H90.
22. Hebisch S., Bischoff E., Soboll S. (1993) *Basic Res. Cardiol.*, **88**, 566-575.
23. Fagbeni O.S., Northover B.J. (1995) *Transplantation* **59**, 947-951.
24. Stringham J.C., Paulsen K.L., Southard J.H., Fields B.L., Belzer F.O. (1992) *Ann. Thorac. Surg.*, **54**, 852-860.
25. Perrault C.L., Mulieri L.A., Alpert N.R., Ransil B.J., Allen P.D., Morgan J.P. (1992) *Am. J. Physiol.*, **270**, H1398-H1406.

26. Watanabe Y., Iwamoto T., Matsuoka I., Ohkubo S., Ono T., Watano T., Shigekawa M., Kimura J. (2001) Br. J. Pharmacol., **132**, 1317–1325.
27. Gwathmey J.K., Hajjar R.J., Solaro R.J. (1991) Circ. Res. **69**, 1280-1292.
28. Milner R.E., Busaan J.L., Holmes C.F., Wang J.H., Michalak M. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 21901–21905.
29. Gross G.J., Peart J.N. (2003) Am. J. Physiol., **285**, H921–H930.
30. Borlak J., Zwadlo C. (2004) Mol. Pharmacol., **66**, 708-717.

Поступила: 10. 10. 2007.

#### THE EFFECT OF MYOSIN ATPASE INHIBITION ON METABOLIC AND FUNCTIONAL RECOVERY OF ISOLATED RAT HEART AFTER GLOBAL ISCHEMIA

*O.I. Pisarenko, V.S. Shulzhenko, I.M. Studneva*

Russian Cardiology Scientific Production and Complex of Rosmedtechnology,  
3-ya Cherepkovskaya ul., 15a, Moscow, 121552 Russia; tel.: (495) 414-67-37; fax: (495)149-0559;  
e-mail: olpi@cardio.ru

The effect of myosin ATPase inhibitor, 2,3-butanedione monoxime (BDM; used in the range of concentrations 1.25-10.0 mM), on recovery of functions of isolated rat heart subjected to normothermic (37°C) total ischemia for 35 min has been investigated. BDM perfusion was performed at a flow rate of 4 ml/min during 5 min before ischemia (BDM-I) or before 25-min reperfusion (BDM-R). Control hearts were perfused with Krebs solution at the same flow rate. The highest functional recovery of heart and coronary vessels was observed during infusion of 2.5 mM BDM before ischemia. At the end of reperfusion ATP and phosphocreatine (PCr) content in hearts of this group was significantly higher whereas the level of lactate was two times lower than in control; total creatine content ( $\Sigma$ Cr) did not differ from the initial level. Similar but less pronounced changes in the improvement of aerobic metabolism and maintenance of  $\Sigma$ Cr after reperfusion were also observed in the case of infusion of 2.5 mM BDM before reperfusion. They were consistent with reduced recovery of functions of heart and coronary flow compared with these parameters observed in the BDM-I group. 2.5 mM BDM caused almost 2-fold decrease in release of cardiac lactate dehydrogenase into myocardial perfusate in the BDM-I and BDM-R groups (compared with control); this suggests lower damage of cell membranes. These results suggest that improvement of energy supply of postischemic cardiomyocytes may be a key factor determining cardioprotector effectiveness of short-term administration of BDM before ischemia.

**Key words:** ischemia and reperfusion, 2,3-butanedione monoxime, macroergic phosphates, lactate, cardiomyocyte membranes, function of heart and coronary vessels.