

Лакомкин В. Л., Абрамов А. А., Грамович В. В., Выборов О. Н., Студнева И. М., Писаренко О. И., Капелько В. И.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва

СОКРАТИТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕРДЕЦ С СОХРАНЕННОЙ И СНИЖЕННОЙ ФРАКЦИЕЙ ИЗГНАНИЯ *IN VIVO*

Ключевые слова: доксорубин, сердечная недостаточность, миокард, сократимость, расслабимость, изолированное сердце.

Ссылка для цитирования: Лакомкин В. Л., Абрамов А. А., Грамович В. В., Выборов О. Н., Студнева И. М., Писаренко О. И., Капелько В. И. Сократительная функция изолированных сердец с сохраненной и сниженной фракцией изгнания *in vivo*. Кардиология. 2018;58(4):36–44.

РЕЗЮМЕ

Цель работы состояла в сравнении сократительной функции изолированного сердца крыс с доксорубициновым поражением миокарда, которые предварительно были разделены по величине фракции изгнания, определенной при эхокардиографии. Через 4 нед применения доксорубина (2 мг/кг подкожно 1 раз в неделю) у 60% животных имелась нормальная, а у других 40% – сниженная фракция изгнания. Первая группа была названа «диастолическая сердечная недостаточность (ДСН)», а другая – «систолическая сердечная недостаточность (ССН)». Максимальное давление, развиваемое изолированным сердцем в изоволюмическом режиме, было снижено в группе ДСН на 13%, а в группе ССН – на 34%. В обеих группах индекс расслабления был снижен на 22–24%. Обе группы характеризовались снижением способности повышать развиваемое давление при увеличении перфузионного коронарного давления, а также утратой способности коронарных сосудов поддерживать стабильную скорость потока при повышении перфузионного давления. Сердца контрольных животных были способны повышать показатель работы сердца (произведение частоты сокращений и развиваемого давления) при длительной стимуляции с высокой частотой (7–9 Гц), в то время как обе группы крыс, получавших доксорубин, снижали уровень этого показателя. При этом содержание основных энергетических метаболитов (АТФ, фосфокреатина, креатина) в обеих группах было снижено на 20–38%. Согласно полученным данным, сердца крыс в группах ДСН и ССН показали примерно одинаковый уровень снижения сократительной функции и энергетического метаболизма, и, следовательно, их различие *in vivo*, вероятно, обусловлено различной степенью мобилизации компенсаторных механизмов.

Lakomkin V. L., Abramov A. A., Gramovich V. V., Vyborov O. N., Studneva I. M., Pisarenko O. I., Kapelko V. I.

National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, Russia

CONTRACTILE FUNCTION OF ISOLATED HEARTS WITH PRESERVED AND REDUCED EJECTION FRACTION *IN VIVO*

Keywords: doxorubicin; heart failure; myocardium; contractility; relaxability; isolated heart.

For citation: Lakomkin V. L., Abramov A. A., Gramovich V. V., Vyborov O. N., Studneva I. M., Pisarenko O. I., Kapelko V. I. Contractile Function of Isolated Hearts With Preserved and Reduced Ejection Fraction *In Vivo*. *Kardiologiia*. 2018;58(4):36–44.

SUMMARY

The aim of the study was comparison of contractile function of isolated hearts of rats with doxorubicin-induced myocardial injury which were tentatively divided according to the level of ejection fraction determined by echocardiography *in vivo*. After 4 weeks of doxorubicin administration (2 mg/kg subcutaneously once a week) about half of animals had normal (86±1%) and the other half reduced (61±4%) ejection fraction. The first group was defined as diastolic heart failure (DHF) and the other as systolic (SHF). The maximal pressure developed by the isolated heart in isovolumic mode was reduced in DHF by 13%, and in SHF by 34%. The relaxation index in both groups was lowed by 22–24%. Both groups were characterized by a decline in the ability to raise developed pressure while increasing coronary perfusion pressure, as well as by the loss of the ability of coronary vessels to maintain a stable flow rate while increasing perfusion pressure. The hearts of control animals were able to raise the cardiac work index (the product of developed pressure and heart rate) during prolonged high frequency (7–9 Hz) stimulation, while the two groups treated with doxorubicin reduced the level of this index. The content of basic energy metabolites (ATP, phosphocreatine, creatine) in both groups was reduced by 20–38%. The results showed that the hearts in DHF and SHF groups showed approximately the same level of reduction of the contractile function and energy metabolism, and hence their difference *in vivo* was probably due to varying degrees of mobilization of compensatory mechanisms.

В XXI веке наряду с систолической сердечной недостаточностью со сниженной фракцией изгнания (ФИ) стали выделять диастолическую сердечную недостаточность (ДСН) с нормальной ФИ, но сниженным наполнением левого желудочка (ЛЖ). В последние годы такую форму патологии сердца стали называть «сердечная недостаточность с нормальной ФИ». Количество больных с этой формой сопоставимо с количеством больных с систолической сердечной недостаточностью, но в отличие от последней, для диастолической патологии не существует специфической терапии, так как неясна ее этиология.

Известно, что биоэнергетика сердца при хронической сердечной недостаточности (ХСН) претерпевает значительные изменения. Прежде всего это относится к генерации АТФ из субстратов. В экспериментальных работах обнаружено увеличение поглощения глюкозы и снижение потребления жирных кислот. Переключение на метаболизм углеводов при развитии тяжелой стадии ХСН совпадает с увеличением конечного диастолического давления ЛЖ и декомпенсацией ХСН [1]. При гипертрофии ЛЖ наблюдаются увеличение активности гликолитических ферментов и окисления глюкозы. Но при дальнейшем ремоделировании ЛЖ аэробный гликолиз ослабляется и происходит накопление лактата [2]. В эксперименте и в клинических исследованиях отмечены снижение активности комплексов дыхательной цепи и ферментов цикла трикарбоновых кислот, уменьшение экспрессии целого ряда митохондриальных белков. Вместе с нарушением морфологии и объема митохондрий такие сдвиги в метаболизме ограничивают генерацию АТФ, функцию креатинкиназных систем в митохондриях и цитозоле, и в целом работу сердца при нагрузках [3, 4]. Выявлены связи между клеточными показателями биоэнергетики (содержанием макроэргических фосфатов, отношением фосфокреатин (ФКр)/АТФ в сердце) и классами ХСН по NYHA или индексами систолической и диастолической функции. Считается, что отношение ФКр/АТФ может быть предиктором смерти от сердечно-сосудистых заболеваний [5]. Другим механизмом повреждения митохондрий, приводящим к нарушениям окислительного фосфорилирования при ХСН, является генерация активных форм кислорода [2, 6]. Принципиально важная роль окислительного стресса в развитии ХСН подтверждена результатами целого ряда экспериментальных и клинических исследований [7].

Введение лабораторным животным доксорубицина – антибиотика антрациклинового ряда – инициирует окислительный стресс, нарушения энергетического обмена в миокарде, приводя к структурному и метаболическому ремоделированию сердца и развитию ХСН [8]. В наших последних экспериментальных работах уста-

новлено, что при длительном введении доксорубицина, как и под действием синтетического катехоламина изопротеренола, у крыс закономерно возникает ХСН с прогрессирующим снижением ФИ и постепенным развитием дилатации сердца [9, 10]. При применении меньших дозировок этих препаратов примерно 50% животных характеризовались нормальной ФИ. Однако при катеризации сердца у них обнаруживаются характерные признаки диастолической дисфункции – замедленное расслабление и повышенная диастолическая упругость миокарда. При увеличении кумулятивной дозы доксорубицина число крыс с ДСН сокращается, а с систолической СН неуклонно растет.

Роль энергетического обмена в патофизиологии ДСН мало изучена. В связи с этим целью данной работы было сопоставление сократительной функции и энергетического состояния изолированных сердец крыс с нормальной и сниженной ФИ *in vivo* в условиях функциональных нагрузок. Ранее выявлено, что введение доксорубицина в течение 10 нед вызывает нарушения окислительного фосфорилирования [11]. Наше исследование выполнено на более ранних сроках ведения доксорубицина (4–8 нед). Помимо оценки функциональной активности сердца, оно включало определение содержания адениннуклеотидов, фосфокреатина, креатина и лактата в миокарде, а также анализ корреляций между функциональными и метаболическими показателями.

Методика исследования

В работе использованы крысы-самцы популяции Wistar массой 300–350 г. Животные были разделены на 2 группы, 20 крыс получали подкожно доксорубицин 2 мг/кг еженедельно, а 12 – физиологический раствор. Контрольную группу составили 14 животных. В опыт крыс брали через 4 и 8 нед.

Эхокардиографическое исследование функции сердца наркотизированных кетамин (100 мг/кг) крыс выполняли на аппарате iE33 с использованием датчика S12–4 (12–4 МГц). Конечный диастолический и конечный систолический размеры ЛЖ, а также толщину задней стенки ЛЖ измеряли в М-режиме из парастернального доступа в проекции длинной оси сердца. Конечный диастолический объем (КДО) и конечный систолический объем (КСО) ЛЖ, фракцию изгнания определяли с использованием модифицированного алгоритма Симпсона из апикального доступа в трех проекциях (4- и 2-камерных и по длинной оси ЛЖ).

Ретроградную перфузию изолированных сердец крыс выполняли по стандартной методике в установке Hugo Saks под постоянным давлением 70 мм рт. ст., раствором Кребса–Хензелейта с добавлением 11 mM глюкозы. Раствор предварительно насыщали карбогеном

(95% O₂ и 5% CO₂). В ЛЖ сердца вводили латексный баллончик, заполненный таким количеством жидкости, чтобы диастолическое давление в нем составляло 10–12 мм рт. ст., при котором достигается оптимальное растяжение камеры желудочка. Для регистрации давления в баллончике и скорости коронарной перфузии использовали датчики и усилители, аналого-цифровой преобразователь (частота оцифровки 1000 Гц) и персональный компьютер. В качестве индекса расслабления использовали отношение между максимальной скоростью снижения давления в ЛЖ и максимальным развиваемым давлением (величину $-dP/dt \max/P$).

Протокол опыта состоял из трех этапов. На первом этапе после периода стабилизации измеряли исходные показатели функции сердца. На втором этапе осуществляли функциональный тест Грегга – повышение перфузионного давления с 80 до 90, 100 и 110 мм рт. ст., критерием в этом тесте была степень прироста развиваемого давления. После возвращения к обычному перфузионному давлению на третьем этапе опыта осуществляли функциональную пробу с повышением частоты стимуляции сердца с 5 до 7 и 9 Гц. Каждый уровень повышенной частоты сохраняли на протяжении 3 мин. Это позволяло оценить реакцию работы сердца, измеряемую производением развиваемого давления на частоту сокращений, как на максимальном, так и на стабильном уровне. Данный показатель обозначали как интенсивность сократительной функции (ИСФ). При данном функциональном тесте определяли также реакцию диастолического давления, динамика которого в данных условиях опыта характеризовала диастолическую упругость миокарда.

В конце опыта после возвращения к исходной частоте сокращений 5 Гц выполняли мгновенную заморозку сердца охлажденными в жидком азоте щипцами Волленбергера. Для изучения метаболического состояния сердца ЛЖ гомогенизировали в холодной 6% HClO₄ (10 мл/г ткани) в гомогенизаторе Ultra-Turrax T-25. Белки осаждали центрифугированием при 2800 g в течение 10 мин при температуре 4°C. Супернатанты нейтрализовали 5 M K₂CO₃ до pH 7,4. Осадок KClO₄ отделяли центрифугированием в тех же условиях. Безбелковые экстракты хранили при температуре –20°C до определения метаболитов. Сухую массу гомогенизированной ткани определяли после высушивания образцов в течение суток при температуре 110°C. АТФ и ФКр в тканевых экстрактах определяли спектрофотометрически, используя глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гексокиназу и креатинкиназу [12–15]. Содержание АДФ и АМФ в тканевых экстрактах определяли с помощью миокиназы, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы. Для определения креатина использовали сопряженные реакции с креатинкиназой, пируваткиназой и лактатдегидрогеназой. Лактат опреде-

ляли с помощью лактатдегидрогеназы. Содержание метаболитов выражали в микромолях на 1 г сухой массы.

Перед перфузией сердца у наркотизированных крыс отбирали около 0,5 мл крови и выполняли определение продуктов перекисного окисления липидов по содержанию в плазме малонового диальдегида. Его оценивали по образованию окрашенного комплекса в реакции с тиобарбитуровой кислотой, который экстрагировали из реакционной смеси бутанолом. Оптическую плотность образцов оценивали против холостой пробы при $\lambda=535$ и 570 нм [16].

Статистическая обработка результатов выполнена с применением t-теста Стьюдента.

Результаты

Сократительная функция изолированных сердец после 4-недельного применения доксорубицина

По результатам эхокардиографии *in vivo* крысы через 4 нед введения доксорубицина четко разделились на 2 группы – 60% сердец имели нормальную фракцию изгнания (ФИ, от 76 до 94%), 40% – сниженную ФИ (40–75%). Соответственно группа сердец с нормальной ФИ получила название «диастолическая сердечная недостаточность (ДСН)», а со сниженной ФИ – «систолическая сердечная недостаточность (ССН)».

Сердца крыс в группе ДСН отличались сниженной силой сокращения по сравнению с контрольной группой – развиваемое давление было снижено на 13%, еще больше были снижены скорость развития и падение давления, а индекс расслабления ЛЖ был снижен на 24% (табл. 1). Изолированные сердца крыс в группе ССН характеризовались еще более глубоким снижением указанных показателей, за исключением индекса расслабления. Скорость коронарной перфузии была повышена в сердцах крыс, получавших доксорубицин, на 26–30%. Если отнести развиваемое давление к единице скорости перфузии миокарда, то оказывается, что эта величина в группе ДСН составляет 8,6 мм рт. ст./мл/мин, в группе ССН – 6,7 мм рт. ст./мл/мин, что составляет 68 и 53% соответственно от контрольной величины (12,6 мм рт. ст./мл/мин). Это позволяет предполагать наличие энергетической недостаточности миокарда в обеих группах. Таким образом, сократительная способность изолированного сердца снижается уже через 4 нед приема доксорубицина при любой ФИ. Еще более глубокое снижение происходит через 8 нед, когда развиваемое давление снижается более чем в 2 раза.

Реакция сердца на увеличение перфузионного давления

Данный тест используется для оценки способности сердца повышать силу сокращений при увеличении перфузионного давления (феномен Грегга). На рис. 1

Таблица 1. Сократительная функция изолированных сердец крыс, получавших доксорубицин

Показатель	Контроль (n=14)	ДСН – 4 нед (n=6)	ССН – 4 нед (n=5)	ССН – 8 нед (n=5)
ФИ, % <i>in vivo</i>	86±1	86±1	61±4***	56±5***
ЧСС, уд/мин	253±7	251±13	244±22	227±30
Развиваемое давление, мм рт. ст.	211±5	183±5**	168±9**	93±15***
Диастолическое давление, мм рт. ст.	10±1	11±1	12±1	10±0,4
Максимальная скорость развития давления, мм рт. ст./с	5000±196	4140±117**	3590±700*	2540±416**
Максимальная скорость снижения давления, мм рт. ст./с	3020±127	2000±28**	1850±334**	1920±214**
Скорость коронарного потока, мл/мин	16,4±0,4	21,4±1,2**	20,6±0,9**	–
Индекс расслабления, с ⁻¹	14,4±0,7	11,0±0,4**	11,1±1,0*	–

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 по сравнению с контролем.

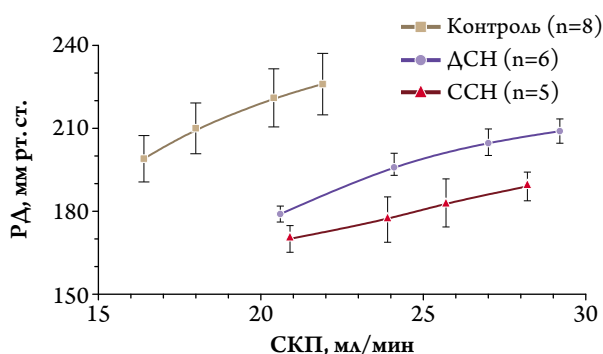


Рис. 1. Соотношение между скоростью коронарного потока (СКП) и развиваемым давлением (РА) при повышении перфузионного давления с 80 до 90, 100 и 110 мм рт. ст.

Здесь и на рис. 2 указаны группы: контроль (квадраты, n=8), ДСН (кружочки, n=6), ССН (треугольники, n=5). Данные представлены как M±SEM.

Здесь и на рис. 2–7: ДСН – диастолическая сердечная недостаточность; ССН – систолическая сердечная недостаточность.

видно, что сердца крыс, получавших доксорубицин в течение 4 нед, отличались меньшей крутизной подъема развиваемого давления, и из-за исходно повышенной скорости потока это соотношение сдвинуто вправо. При равной скорости потока развиваемое давление снижено более чем на 20%. Данный тест позволяет также оценить регуляторную реакцию коронарного русла. Известно, что *in vivo* коронарные сосуды в ответ на увеличение артериального давления компенсаторно снижают тонус для поддержания нормальной скорости потока в капиллярах. Эта способность в значительной мере сохранена в условиях перфузии контрольных сердец солевым раствором, что выражается небольшим увеличением скорости потока при значительном повышении перфузионного давления (рис. 2). В отличие от этого, сердца крыс, получавших доксорубицин в течение 4 нед, увеличивали скорость потока пропорционально возрастанию давления, что свидетельствует об утрате этой компенсаторной реакции.

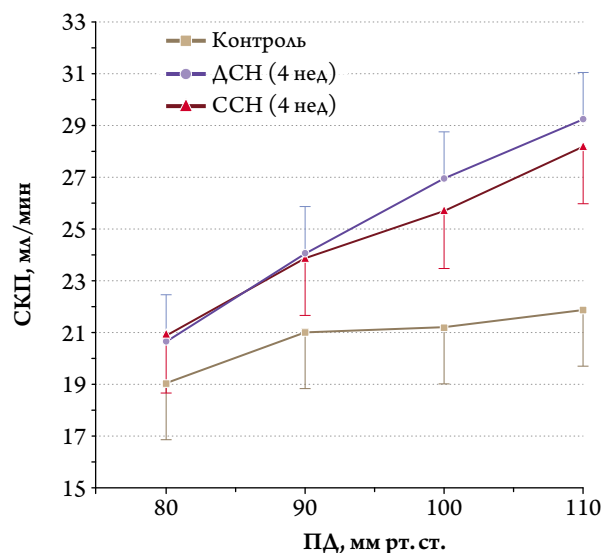


Рис. 2. Соотношение между перфузионным давлением (ПА) и скоростью коронарного потока (СКП) в контроле (квадраты), подгруппах ДСН и ССН крыс, получавших доксорубицин в течение 4 нед.

Реакция сердца на длительное увеличение частоты стимуляции

В конце каждого опыта исследовали реакцию сократительной функции на ступенчатое увеличение частоты электростимуляции с 5 до 7 и до 9 Гц. Как отражено на рис. 3, сердца контрольных крыс были способны повышать ИСФ (произведение развиваемого давления на частоту сокращений) не только в начальной стадии, когда величины максимальны, но и при стабильной работе в течение 3 мин. Сердца крыс, получавших доксорубицин, не смогли повысить ИСФ даже в начальном периоде, а при частоте 9 Гц стабильный уровень ИСФ снижался по сравнению с таковым при частоте 5 Гц. Это позволяет предполагать, что интенсивная работа сердца ведет к снижению энергетических резервов миокарда животных, получавших доксорубицин.

С таким предположением хорошо согласуются результаты измерения диастолического давления в ЛЖ

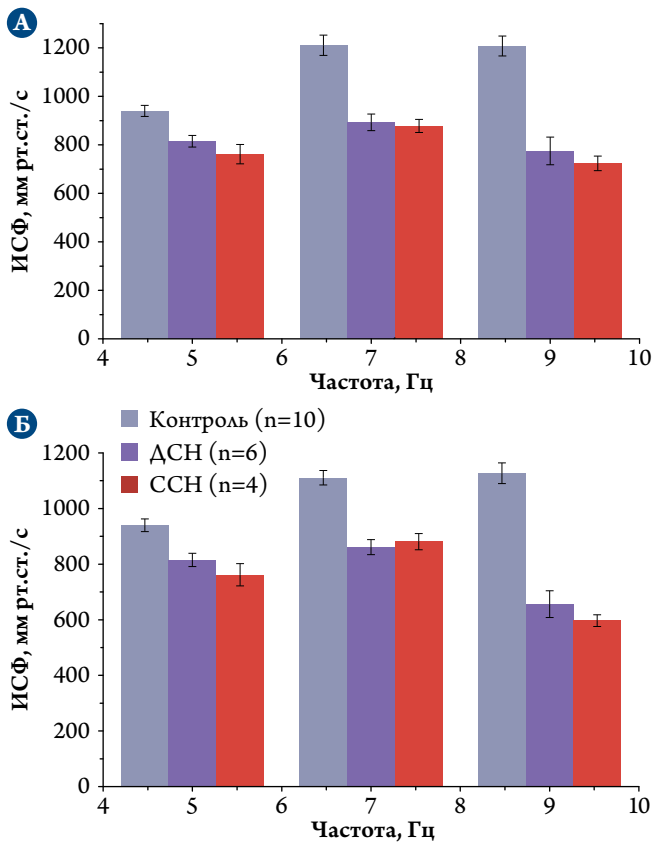


Рис. 3. Максимальная (А) и стабильная (Б) реакция показателя работы сердца (ИСФ, произведение развиваемого давления на частоту сокращений) на ступенчатое увеличение частоты стимуляции с 5 до 7 и 9 Гц.

ИСФ – интенсивность сократительной функции.

Здесь указаны группы: контроль (горизонтальная штриховка, n=10), ДСН (косая штриховка, n=6), ССН (штриховка в клетку, n=4). Данные представлены как $M \pm SEM$.

при повышенной частоте сокращений сердца (рис. 4). Уже при частоте 7 Гц диастолическое давление в ЛЖ сердец крыс, получавших доксорубицин, достоверно возросло, а при частоте 9 Гц более чем в 2 раза превышало контрольную величину. Принимая во внимание, что диастолическое давление при наполненном баллончике постоянного объема почти полностью отражает напряжение миокарда, можно полагать, что данные результаты отражают повышенную диастолическую упругость миокарда.

Энергетический метаболизм

Под влиянием доксорубицина происходило увеличение содержания малонового диальдегида в плазме крови крыс. Через 4 нед после введения доксорубицина этот показатель был достоверно увеличен в среднем в 1,5 раза, а через 8 нед – в 4 раза по сравнению с контролем (3,0 мкМ/мл). Эти данные указывали на развитие окислительного стресса у животных, получавших доксорубицин.

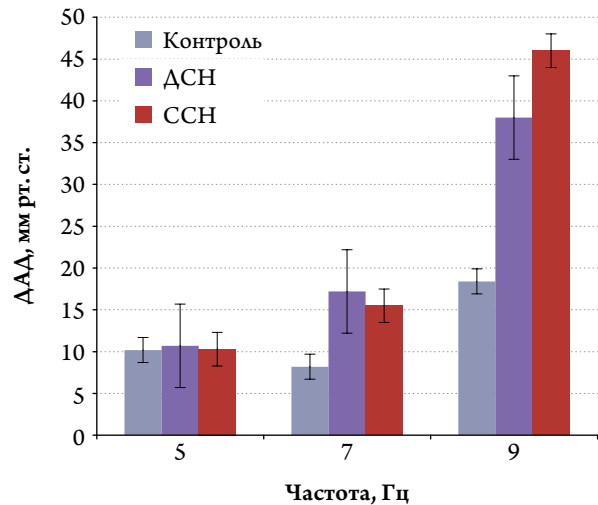


Рис. 4. Реакция диастолического давления в ЛЖ на увеличение частоты сокращений сердца.

Введение доксорубицина снизило содержание основных показателей энергетического метаболизма в миокарде (рис. 5, Б). После 4 нед введения доксорубицина содержание АТФ в сердце животных с ДСН и ССН было снижено в равной степени – в среднем до $72 \pm 7\%$ от контроля. Содержание общего фонда адениннуклеотидов ($\Sigma АН = АТФ + АДФ + АМФ$) в сердце в этих группах составляло в среднем $78 \pm 3\%$ (см. рис. 5, Б, В). Содержание ФКр, свободного и общего креатина ($\Sigma Кр = ФКр + Кр$) было снижено в среднем на 20–25% по сравнению с таковым в контроле. При этом достоверных различий между группами с ДСН и ССН через 4 нед введения доксорубицина не обнаружено (см. рис. 5, Г, рис. 6, А, Б). Отношение ФКр/АТФ (показатель энергообеспечения сердца) в группах с ДСН и ССН также достоверно не отличалось от значения в контроле (см. рис. 6, В). В этих группах не выявлено различий по содержанию лактата в миокарде по сравнению с контролем (см. рис. 6, Г).

У животных, получавших доксорубицин в течение 8 нед, содержание АТФ и $\Sigma АН$ оставило $73 \pm 7\%$ и $72 \pm 2\%$ от величин в контрольной группе (см. рис. 5, Б, В), что сопоставимо с величинами после 4-недельного введения доксорубицина. Содержание ФКр, Кр и $\Sigma Кр$ в миокарде снижалось еще в большей степени (см. рис. 5, Г, рис. 6, А, Б). Содержание этих показателей составило 61 ± 7 , 56 ± 5 и $60 \pm 4\%$ от значений в контроле, соответственно, что было достоверно ниже, чем после 4-недельного введения доксорубицина. Это привело к достоверному снижению отношения ФКр/АТФ. Содержание лактата было недостоверно выше, чем в контроле (см. рис. 6, В, Г).

Измерение метаболитов энергетического обмена позволило оценить взаимосвязь между функциональными и энергетическими показателями сердца в конце опытов (табл. 2). Высокие коэффициенты корреляции

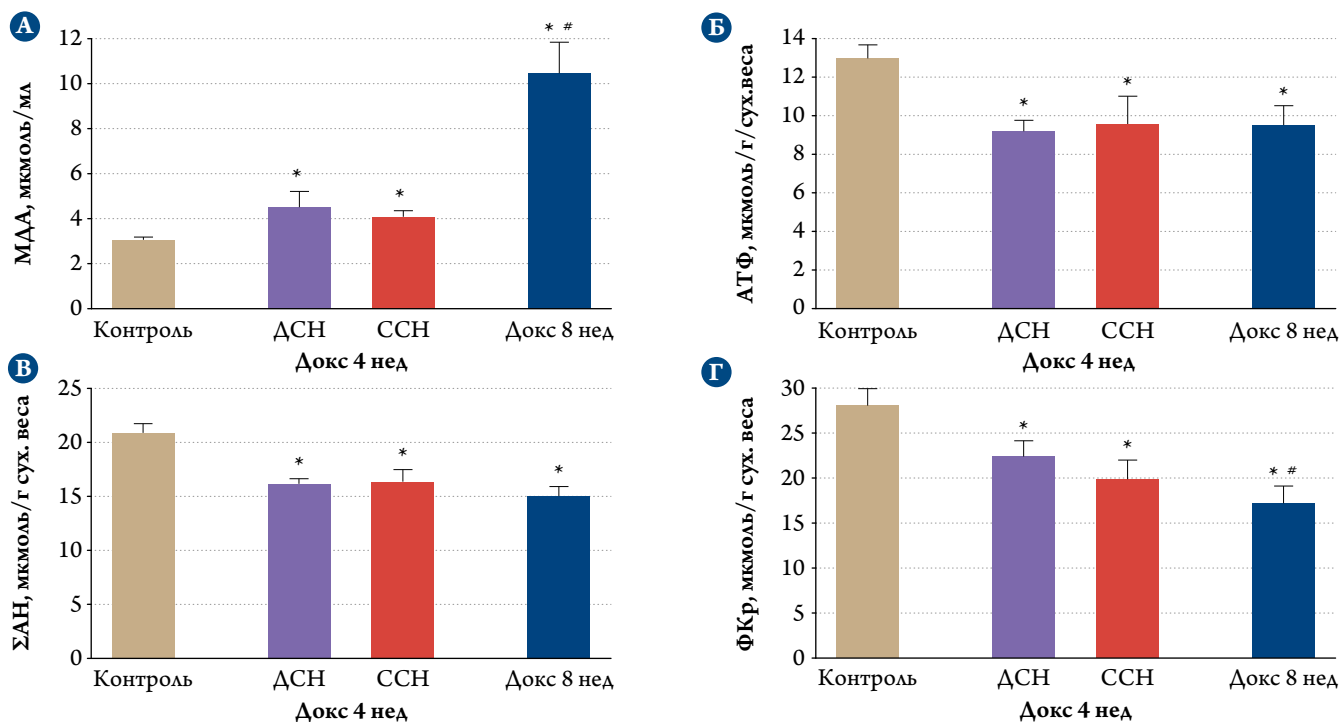


Рис. 5. Влияние введения доксорубина в течение 4 и 8 нед крысам на концентрацию в плазме крови малонового диальдегида – МДА (А) и содержание АТФ (Б), общего фонда адениннуклеотидов (В) и фосфокреатина – ФКр (Г) в сердце.

Здесь и на рис. 6 данные представлены как $M \pm SEM$ для серий из 5–6 опытов; $p < 0,05$ по сравнению с * – контролем, # – ДСН и ССН; Докс – доксорубин; сух. веса – сухого веса.

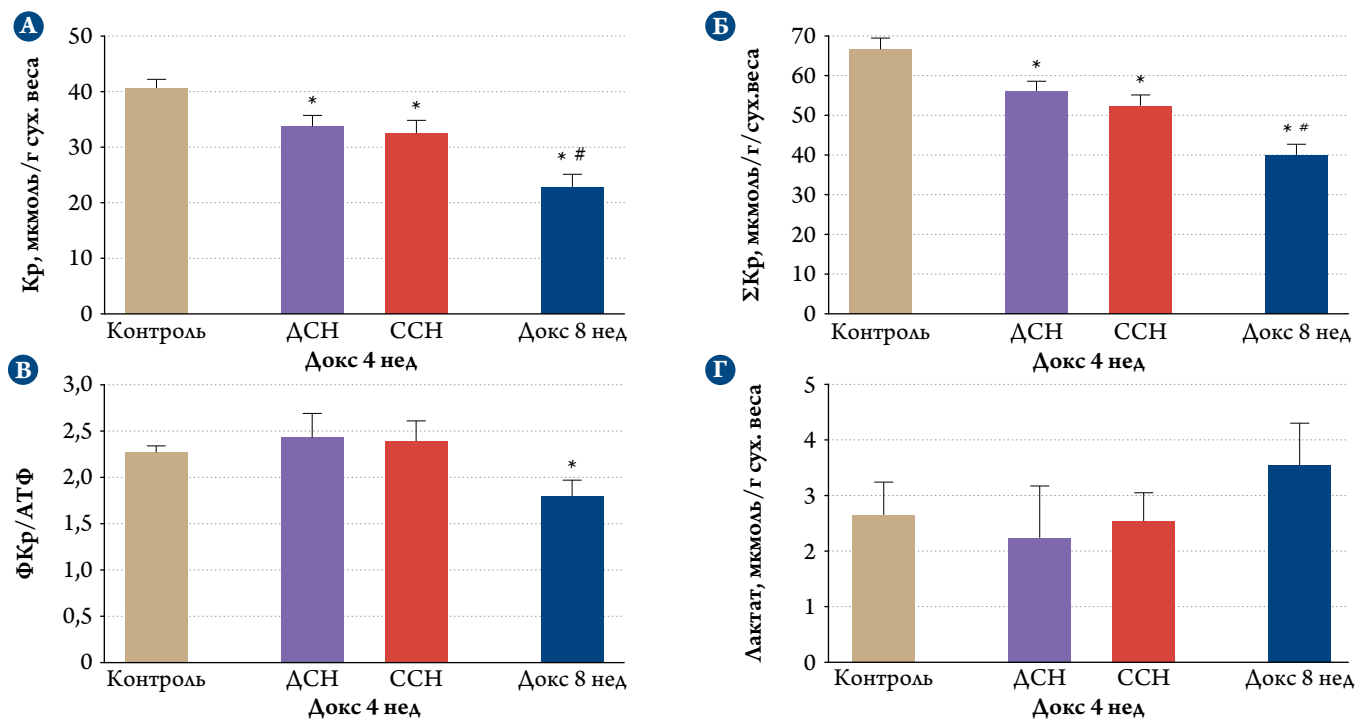


Рис. 6. Влияние введения крысам доксорубина в течение 4 и 8 нед на содержание креатина (А), общего креатина (Б), отношение ФКр/АТФ (В) и содержание лактата (Г) в сердце.

получены при сравнении функциональных показателей с АТФ и суммой адениннуклеотидов, и несколько меньше – с содержанием фосфокреатина.

Помимо этого, было рассчитано соотношение между уровнем развиваемого давления в конце опыта, непосредственно перед заморозкой сердца (рис. 7, А), и содержа-

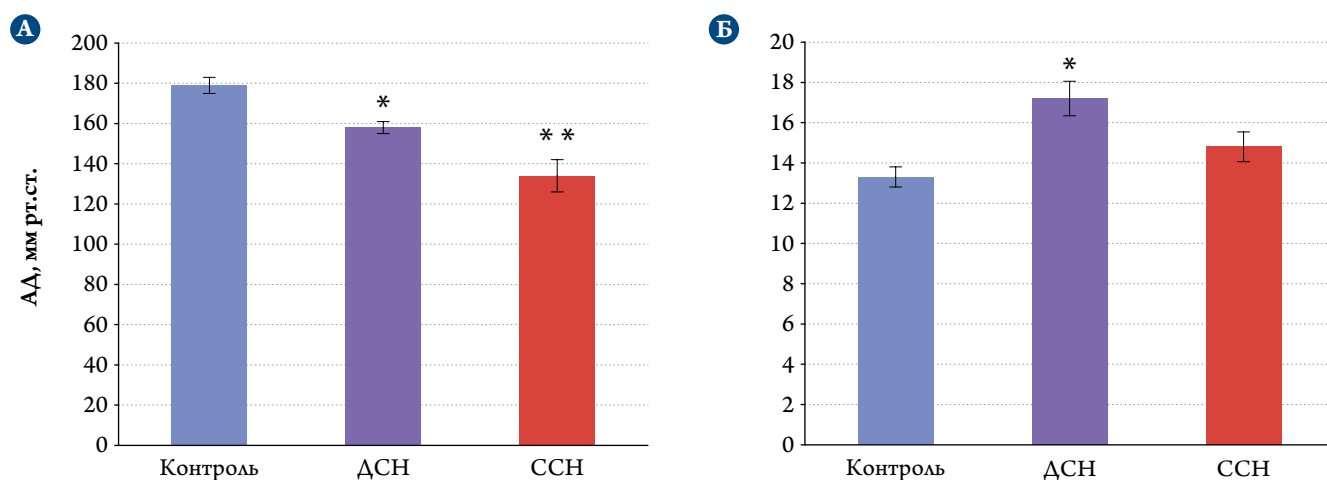


Рис. 7. Развиваемое давление перед заморозкой сердца (частота 5 Гц) в группах контроля, ДСН и ССН – 4 нед (А) и отношение развиваемого давления к уровню АТФ в миокарде, величина в группе ДСН достоверно повышена по сравнению с контролем (Б) ($p < 0,05$).

Таблица 2. Корреляция функциональных и энергетических показателей

Показатель	АТФ	ΣАН	ФКр
Развиваемое давление при ЧС 9 Гц	0,78	0,80	0,43
Развиваемое давление при ЧС 5 Гц, конец опыта	0,79	0,82	0,67
ИСФ при ЧС 5 Гц, конец опыта	0,70	0,69	0,63

ЧС – частота сокращений; ИСФ – интенсивность сократительной функции (произведение развиваемого давления на частоту сокращений); ФКр – фосфокреатин.

нием АТФ. Выявлено, что это соотношение в миокарде крыс, получавших доксорубицин, имеет тенденцию к повышению по сравнению с контрольной величиной (рис. 7, Б), причем в группе ДСН это повышение статистически значимо (29%; $p < 0,05$). Это позволяет предполагать, что эффективность преобразования энергии АТФ в развиваемое давление в данной группе повышается.

Обсуждение

Измерение сократительной функции изолированного сердца показало, что сердца животных, получавших доксорубицин в течение 4 нед и имевших нормальную ФИ *in vivo* (ДСН), характеризовались сниженным на 13% максимальным развиваемым давлением и сниженным индексом расслабления на 24% (см. табл. 1). При анализе этого факта следует иметь в виду условия опыта. Во-первых, изолированное сердце работает против постоянного давления в аорте, в то время как *in vivo* возможно использование сниженного периферического сопротивления. Во-вторых, в перфузате отсутствовали жирные кислоты, являющиеся основным энергетическим субстратом миокарда *in vivo*. В-третьих, в изолированном сердце оценивался максимальный уровень развиваемого давления, в то время как *in vivo* – некий средний уровень нагрузки.

Наряду со снижением сократимости и расслабимости миокарда при ДСН теряется естественная регуляторная

реакция коронарных сосудов, обеспечивающая относительную стабилизацию скорости потока при повышении перфузионного давления. Действительно, в группе ДСН скорость коронарного потока при увеличении перфузионного давления возрастала линейно более чем на 8 мл/мин, в то время как в контроле ее прирост составлял около 3 мл/мин (см. рис. 2). Повышенная скорость коронарной перфузии при одинаковом перфузионном давлении позволяет предполагать, что расширение сосудов могло быть вызвано действием аденозина, покидающего кардиомиоциты вследствие деградации АТФ. Вероятным следствием утраты этой регуляторной реакции было ускорение потока в капиллярах с последующим ограничением поглощения кислорода, что могло послужить причиной сниженного прироста развиваемого давления при стимуляции сердца с высокой частотой (см. рис. 3).

Исследование энергетического метаболизма через 4 нед дало ожидаемый результат – содержание АТФ, ΣАН, ФКр и креатина было снижено в сердцах крыс с нормальной или сниженной фракции изгнания практически в равной степени. Это соответствует сведениям о нарушении энергетического метаболизма под влиянием доксорубицина [11]. Сердца из групп ДСН и ССН практически одинаково реагировали на повышение перфузионного давления, частоты сокращений, они показали одинаковый прирост диастолического давления при высокой частоте сокраще-

ний. Таким образом, содержание энергетических запасов в миокарде, по-видимому, является основным детерминантом сократительной функции миокарда. Это подтверждается и высокой корреляцией между содержанием энергетических метаболитов и уровнем сократительной функции миокарда, и одинаковым приростом диастолического давления при высокой частоте сокращений, отражающим энергодефицитную контрактуру миокарда.

Анализ изменений энергетических метаболитов позволяет предполагать, что снижение уровня АТФ в кардиомиоцитах обусловлено лишь частично снижением синтеза АТФ в митохондриях, поскольку содержание лактата в сердце животных, получавших доксорубин, оставалось практически неизменным, а скорее повреждением мембран и, прежде всего, мембранного белка – переносчика креатина. Об этом свидетельствует примерно одинаковая степень снижения содержания ФКр и свободного креатина; иными словами, вероятно, недостаток свободного креатина ограничивает функцию митохондриальной креатинфосфокиназы, и, следовательно, уменьшает поток ФКр в миофибриллы. Такое предположение хорошо согласуется с результатами работы с конкурентным ингибированием транспорта креатина в кардиомиоциты [17, 18], в которых показано, что возникающее повышение диастолической упругости миокарда способствует развитию силы, но существенно ограничивает насосную функцию изолированного сердца.

В связи с этим обнаруженное повышение отношения индекса развиваемого давления к уровню АТФ в миокарде в группе ДСН (см. рис. 7, Б) означает, что развитие давления в сердцах крыс с ДСН происходит более экономно. Такая ситуация характерна для умеренного энергодефицита в миокарде, при котором повышается диастолическая упругость миокарда, что связано с дефосфорилированием молекул титина. Титин является наибольшим по массе белком кардиомиоцитов, его пружиноподобная структура располагается в каждой половине саркомера между линиями Z и M, сжимается при укорочении саркомера, а после завершения сокращения титин распрямляется и восстанавливает прежнюю ширину диска I. Именно титин определяет пассивное сопротивление саркомеров при растяжении.

В скелетных мышцах содержится упругая изоформа титина N2B, но в миокарде, саркомеры которого должны растягиваться, содержится менее упругая форма N2BA. Нормальное соотношение N2BA и N2B в миокарде человека составляет примерно 30:70 [19]. Это соотношение регулируется протеинкиназами A и G, а также кальций-кальмодулинкиназой (CaMKII), снижающими упругость титина [20], и протеинфосфатазами, осуществляющими дефосфорилирование и повышающими его упругость. Дефосфорилирование титина происходит при ограни-

чении ресинтеза АТФ, в результате повышаются упругость миофибрилл и диастолическая упругость миокарда в целом. Сниженное отношение N2BA:N2B представляет общий признак ХСН у людей с сохраненной ФИ [19, 20]. Упругость титина может также возрасти при действии активных форм кислорода, когда в молекуле титина образуются дисульфидные связи, они разрушаются при глутатионилировании [20].

Повышение упругости молекул титина при его дефосфорилировании или повышенная чувствительность миофибрилл к Ca^{2+} , с одной стороны, затрудняет растяжение саркомеров, но с другой стороны, облегчает развитие силы. В опытах на изолированном волокне кальциевый сенситайзер EMD 57033 уменьшил диастолическую длину саркомера всего на 2%, но зато увеличил степень укорочения в 2,5 раза [21]. Активируемая Ca^{2+} максимальная сила изолированных кардиомиоцитов у больных с ХСН с сохраненной или сниженной ФИ [22] была одинаковой, но только в миокарде больных с сохраненной ФИ это сочеталось с повышенной чувствительностью к Ca^{2+} . Пассивное напряжение скинированных кардиомиоцитов (skinned cardiomyocytes), т.е. волокон с полупроницаемой сарколеммой, было повышено при диастолической дисфункции на 34%, что сочеталось со снижением содержания растяжимой изоформы титина в 2 раза. В эксперименте на крысах с нормальной ФИ установлено, что при выполнении крысами чрезмерных беговых нагрузок отношение E/A, характеризующее скорость быстрого наполнения ЛЖ, снижалось в 2 раза, что свидетельствует о повышенной диастолической упругости миокарда [23]. На изолированных ненагруженных кардиомиоцитах наблюдали повышенное укорочение при сниженной амплитуде сигнала Ca^{2+} , но нормальном диастолическом уровне Ca^{2+} и константе его удаления из миоплазмы [23]. Причиной усиленного укорочения была повышенная чувствительность миофибрилл к кальцию.

Таким образом, данный механизм саморегуляции миокарда может быть использован в ситуациях, когда сократительная активность миокарда должна быть повышена, но не за счет увеличения растяжимости, а при ослаблении сократимости вследствие нарушения энергообразования. Полученные результаты также указывают на целесообразность более детального изучения энергетического обмена и Ca^{2+} гомеостаза при диастолической сердечной недостаточности. Они должны включать оценку изменений в функциональном состоянии дыхательной цепи митохондрий, активности изоферментов креатинкиназы и регуляторных белков, и особенностей транспорта Ca^{2+} в кардиомиоцитах.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-06571.

Сведения об авторах:

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва

Лаборатория экспериментальной патологии сердца Института экспериментальной кардиологии

Лакомкин В. Л. – к.м.н., вед.н.с. лаборатории.

Абрамов А. А. – н.с. лаборатории.

Капелько В. И. – д.м.н., проф., руков. лаборатории.

Лаборатория метаболизма сердца Института экспериментальной кардиологии

Студнева И. М. – вед.н.с. лаборатории.

Писаренко О. И. – д.биол.н., проф., зав. лабораторией.

Отделение хронической ишемической болезни сердца Института клинической кардиологии им. А. Л. Мясникова

Грамович В. В. – к.м.н., ст. н.с. отделения.

Выборов О. Н. – к.м.н., н.с. отделения.

E-mail: v.lakomkin@yandex.ru

Information about the author:

National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, Russia

Vladimir L. Lakomkin – PhD.

E-mail: v.lakomkin@yandex.ru

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ingwall J.S. Energy metabolism in heart failure and remodeling. *Cardiovascular Research* 2009;81:412–419.
2. Doenst T., Dung Nguyen T., Dale Abel E. Cardiac Metabolism in Heart Failure – Implications beyond ATP production. *Circ Res* 2013;113 (6):709–724. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300376.
3. Ventura-Clapier R., Garnier A., Veksler V. Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 2004;555:1–13.
4. Huss J.M., Kelly D.P. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest* 2005;115:547–555.
5. Lygate C.A. and Neubauer S. Metabolic flux as a predictor of heart failure prognosis. *Circ Res* 2014;114 (8):1228–1230. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.114.303551
6. Hafstad A. D., Nabebaccus A. A., Ajay M. Shah A. M. Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Basic Res Cardiol* 2013;108:359. DOI: 10.1007/s00395-013-0359-8
7. Giordano F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:500–558.
8. Practical methods in cardiovascular research. S. Dhein, F.W. Mohr, M. Delmar (Eds). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2005.
9. Kapelko V.I., Lakomkin V.L., Lakoshkova E. V. et al. Complex study of the rat heart at Isoproterenol damage. *Kardiologiya* 2014;54 (3):46–56. Russian (Капелько В. И., Лакомкин В. Л., Лукошкова Е. В. и др. Комплексное исследование сердца крыс при поражении изопротеренолом. *Кардиология* 2014;54 (3):46–56).
10. Lakomkin V.L., Abramov A.A., Gramovich V.V. et al. The time course of formation of systolic dysfunction of the heart in doxorubicin cardiomyopathy. *Kardiologiya* 2017;57 (1):59–64. Russian (Лакомкин В. Л., Абрамов А. А., Грамович В. В. и др. Динамика формирования систолической дисфункции сердца при доксорубициновой кардиомиопатии. *Кардиология* 2017;57 (1):59–64).
11. Pelikan P. C. D., Weisfeldt M. L., Jacobus W.E. et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity: functional, metabolic and morphologic alteration in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986;8:1058–1066.
12. Lamprecht W., Stein P., Heinz F. et al. Creatine Phosphate. Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer H. U. 2nd ed. N. Y.: Academic Press, 1974. V. 4. P. 1777–1781.
13. Jaworek D., Gruber W., Bergmeyer H. U. Adenosine-5'-diphosphate and Adenosine-5'-monophosphate. Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer H. U. 2nd ed. N. Y.: Academic Press, 1974. V. 4. P. 2127–2131.
14. Bernt E., Bergmeyer H. U., Mollering H. Creatine. Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer H. U. 2nd ed. N. Y.: Academic Press, 1974. V. 4. P. 1772–1776.
15. Gutman I., Wahlenfeld A.W. L. L-(+)-Lactate. Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer H. U. 2nd ed. N. Y.: Academic Press, 1974. V. 3. P. 1464–1467.
16. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analyt Biochem* 1978;23:271–278.
17. Kapelko V.I., Saks V.A., Novikova N.A. et al. Adaptation of the cardiac contractile function to conditions of chronic energy deficiency. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21 (suppl 1):79–83.
18. Kapel'ko V. I., Novikova N.A., Kupriianov V.V., Sake V.A. Role of creatine phosphokinase in the energy supply of the pumping function of the heart. *Fiziol Zh* 1991;37 (6):3–9. Russian (Капелько В. И., Новикова Н. А., Куприянов В. В., Сакс В. А. Ключевая роль креатинфосфокиназы в энергобеспечении насосной функции сердца. *Физиол жур* 1991;37 (6):3–9).
19. Kruger M., Linke W.A. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:490–498.
20. Hamdani N., Herwig M., Linke W.A. Tampering with springs: phosphorylation of titin affecting the mechanical function of cardiomyocytes. *Biophys Rev* 2017;9 (3):225–237.
21. Sequeira V., Najafi A., McConnell M. et al. Synergistic role of ADP and Ca⁽²⁺⁾ in diastolic myocardial stiffness. *J Physiol* 2015;593 (17):3899–3916.
22. Makarenko I., Opitz C.A., Leake M.C. et al. Passive Stiffness Changes Caused by Upregulation of Compliant Titin Isoforms in Human Dilated Cardiomyopathy Hearts. *Circul Res* 2004;95:708–716.
23. Farah C., Nascimento A., Bolea G. et al. Key role of endothelium in the eNOS-dependent cardioprotection with exercise training. *J Mol Cell Cardiol* 2017;102:26–30.)

Поступила 22.08.17 (Received 22.08.17)