

На правах рукописи

Коротаева Карина Николаевна

**ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ И НЕКОТОРЫХ
ЕЕ КОМПОНЕНТОВ НА СОКРАТИМОСТЬ
И АДРЕНО- И ХОЛИНОРЕАКТИВНОСТЬ
ИЗОЛИРОВАННОГО МИОКАРДА
ЧЕЛОВЕКА И КРЫСЫ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2011

Работа выполнена в лаборатории физиологии мышц
и биологически активных веществ кафедры биологии
естественно-географического факультета
в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении
высшего профессионального образования
«Вятский государственный гуманитарный университет»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Циркин Виктор Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Мухина Ирина Васильевна
доктор медицинских наук, профессор
Перетягин Сергей Петрович

Ведущая организация: Казанский (Приволжский) федеральный
университет

Защита состоится «__» _____ 2011 года в ____ часов на засе-
дании диссертационного совета Д.212.166.15 Нижегородского государствен-
ного университета им. Н. И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Нов-
город, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1, биологический факультет.

Факс: (8312) 465-82-92.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского
государственного университета им. Н. И. Лобачевского по адресу: 603950,
г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1.

Автореферат разослан «__» _____ 2011 г

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент



С. В. Копылова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Сердечно-сосудистые заболевания до настоящего времени являются одними из самых распространенных заболеваний и одной из самых частых причин смерти человека (Feola M. et al., 2004; Шаленкова М. А. и соавт., 2005; Гордеев И. Г. и соавт., 2009). Поэтому изучение физиологических свойств миокарда, и особенно, миокарда человека, представляет большой интерес. С этих позиций важным является изучение участия в процессах регуляции деятельности сердца человека и животных эндогенных модуляторов адрено- и холинореактивности срочного действия, в том числе эндогенного сенсibilизатора бета-адренорецепторов (ЭСБАР), эндогенного блокатора бета-адренорецепторов (ЭББАР) и эндогенного блокатора М-холинорецепторов (ЭБМХР). Гипотеза о существовании этих факторов была высказана на основе многочисленных исследований, проведенных, главным образом, на гладких мышцах матки крысы (Циркин В. И. и соавт., 1997, 2011; Туманова Т. В., 1998; Сизова Е. Н. и соавт., 2002, 2004; Мальчикова С. В. и соавт., 2003; Кононова Т. Н., 2004; Хлыбова С. В., 2007; Куншин А. А. и соавт., 2007; Торопов А. Л. и соавт., 2010). Вместе с тем, вопрос об участии этих факторов в регуляции адрено- и холинореактивности миокарда человека и животных остается открытым. Действительно, удалось лишь показать, что сыворотка крови человека как источник ЭСБАР усиливает положительный инотропный эффект адреналина на изолированном сердце лягушки (Трухин А. Н. и соавт., 2004; Демина Н. Л., и соавт., 2008; Пенкина Ю. А. и соавт., 2008) и крысы (Пенкина Ю. А. и соавт., 2008). В отношении же миокарда человека этот вопрос не исследовался. В опытах с гладкими мышцами было показано, что гистидин, триптофан, тирозин, а также милдронат и предуктал проявляют ЭСБАР-активность, т. е. подобно сыворотке крови повышают эффективность активации бета-АР (Ноздрачев А. Д. и соавт., 1998; Туманова Т. В., 1998; Сизова Е. Н., Циркин В. И., 2006; Сизова Е. Н. и соавт., 2008). Данные о способности этих веществ оказывать ЭСБАР-активность в отношении миокарда крысы оказались противоречивы (Пенкина Ю. А. и соавт., 2008), а в отношении миокарда человека они отсутствуют. Вместе с тем, изучение этого вопроса имеет не только теоретическое значение, но и практическое, так как считается, что при сердечной недостаточности возникает необходимость в повышении эффективности активации бета-адренорецепторов миокарда (Красникова Т. Л., Габрусенко С. А., 2000; Brodde O. et al., 2006). Способность сыворотки крови проявлять М-холинолитическую, или М-холиноблокирующую активность (за счет наличия в ней ЭБМХР) была исследована в отношении миокарда лягушки и кролика в лаборатории Турпаева Т. М. (Zvezdina N. D. et al., 1978; Сулова И. В., и соавт., 1995; Проказова Н. В. и соавт., 1998), а также в нашей лаборатории в отношении миокарда лягушки (Трухин А. Н. и соавт., 2004; Демина Н. Л., и соавт., 2008). Кроме того, в опытах с миокардом лягушки и кролика был исследован М-холинолитический эффект лизофосфатидилхолина, или ЛФХ (Zvezdina N. D. et al., 1978; Сулова И. В. и соавт., 1995; Проказова Н. В. и соавт., 1998), который, вероятно, можно рассматривать в качестве компонента ЭБМХР. В отношении миокарда крысы и человека данные о влиянии сыворотки крови и ЛФХ на проявление отрицательного инотропного эффекта ацетилхолина до настоящего времени отсутствуют. Следует отметить, что в литературе имеются лишь единичные работы, касающиеся физиологических свойств изолированного миокарда человека (Маак К. и соавт., 2004), но в них отсутствуют сведения о действии адрено- и холиномодуляторов. Учитывая важность вопроса о физиологических свойствах

миокарда человека и о возможном влиянии эндогенных модуляторов адрено- и холинореактивности на миокард человека, в работе сформулированы следующие цель и задачи.

Цель исследования – оценить изменение сократимости, бета-адренореактивности и М-холинореактивности изолированного миокарда человека и крысы под влиянием сыворотки крови человека и ряда веществ.

Задачи исследования:

1. Оценить сократимость и адренореактивность изолированного миокарда человека и влияние на них сыворотки крови человека, тирозина, гистидина, триптофана, милдроната.

2. Оценить сократимость и холинореактивность изолированного миокарда крысы и влияние на них сыворотки крови человека и лизофосфатидилхолина.

Положения, выносимые на защиту:

1. Сократимость изолированного миокарда человека и крысы повышается под влиянием сыворотки крови (за счет наличия в ней так называемого эндогенного активатора сократимости миоцитов, или ЭАСМ), а также тирозина, гистидина и триптофана (установлено в опытах с миокардом человека) и снижается под влиянием лизофосфатидилхолина (установлено в опытах с миокардом крысы).

2. Положительный инотропный эффект адреналина в отношении миокарда человека повышается под влиянием 1000-, 500- и 100- кратных разведений сыворотки крови человека (это объясняется наличием в ней эндогенного сенсibiliзатора бета-адренорецепторов, или ЭСБАР), но не изменяется под влиянием тирозина, гистидина, триптофана и милдроната, хотя эти вещества усиливают эффективность активации бета-адренорецепторов гладких мышц.

3. Отрицательный инотропный эффект ацетилхолина в отношении миокарда крысы снижается под влиянием 500-, 100-, 50-, 10- и 5-кратных разведений сыворотки крови человека (это объясняется наличием в ней эндогенного блокатора М-холинорецепторов, или ЭБМХР), а также лизофосфатидилхолина (2×10^{-6} – 2×10^{-4} М), который рассматривается в качестве термолабильного компонента ЭБМХР.

Научная новизна исследования. Впервые показано, что амплитуда вызванных сокращений полосок миокарда из ушка правого предсердия пациентов с сердечной недостаточностью III функционального класса находится в прямой зависимости от величины фракции выброса левого желудочка по Тейхольцу (ФВЛЖ_T), т. е. сократимость изолированного миокарда отражает сократимость левого желудочка сердца. В опытах с изолированным миокардом человека впервые установлено, что амплитуда сокращений миокарда возрастает под влиянием 10- и 5-кратных разведений сыворотки крови небеременных женщин, а также при действии тирозина ($5,5 \times 10^{-5}$ М и $5,5 \times 10^{-4}$ М), гистидина ($6,5 \times 10^{-5}$ М) и триптофана ($4,9 \times 10^{-4}$ М). Впервые оценена адренореактивность изолированного миокарда человека и установлена константа диссоциации для адреналина. Ее величина, равная 1100 ± 54 нМ, указывает на снижение адренореактивности у пациентов с сердечной недостаточностью. Впервые показано, что способность адреналина в концентрации $5,5 \times 10^{-8}$ М оказывать положительный инотропный эффект усиливают 1000-, 500- и 100-кратные разведения сыворотки крови человека, а при его использовании в концентрации $5,5 \times 10^{-6}$ М – усиливает 10-кратное и снижает 500-кратное разведение сыворотки крови, что объясняется наличием в крови эндогенных модуляторов адренорецепторов (ЭСБАР и ЭББАР). Впервые показано, что вещества, которые повышают эф-

фективность активации бета-АР гладких мышц (тирозин, гистидин, триптофан и милдронат), не проявляют бета-адреносенсибилизирующую активность в отношении бета-АР миокарда человека. Тем самым поставлен вопрос о необходимости поиска селективных сенсибилизаторов бета-АР миокарда. В опытах с миокардом крысы впервые выявлена способность ЛФХ в концентрациях 2×10^{-9} М – 2×10^{-4} М уменьшать сократимость миокарда и одновременно (в концентрациях 2×10^{-6} – 2×10^{-4} М) снижать проявление отрицательного инотропного эффекта ацетилхолина, т. е. проявлять М-холиноблокирующую активность. В этих экспериментах также впервые выявлена подобная активность и для 1000-, 500-, 100-, 50-, 10- и 5-кратных разведений сыворотки крови человека, что объясняется наличием в ней эндогенного блокатора М-холинорецепторов (ЭБМХР), в качестве термолабильного компонента которого предложено рассматривать ЛФХ. Впервые проведен анализ природы положительного инотропного эффекта сыворотки крови, обусловленного наличием в ней эндогенного активатора сократимости миоцитов (ЭАСМ) – в экспериментах с полосками миокарда крысы показано, что этот эффект 5-кратного разведения сыворотки крови частично снижается при ее тепловой денатурации, не меняется при блокаде рецепторов ангиотензина II лозапом, но полностью снимается при воздействии верапамила. Это указывает на то, что ЭАСМ, не являясь ангиотензином II, повышает проницаемость Са-каналов L-типа кардиомиоцитов для ионов Ca^{2+} . В целом, результаты исследования позволили впервые доказать, что содержащиеся в крови человека эндогенные модуляторы адренореактивности (ЭСБАР и ЭББАР) и холинореактивности (ЭБМХР), а также эндогенный активатор сократимости миоцитов (ЭАСМ) способны влиять на сократимость миокарда человека, в том числе за счет модуляции эффективности адренергических и холинергических воздействий на сердце.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы дают первые сведения о физиологических свойствах миокарда человека, иссеченного у пациентов с сердечной недостаточностью. Они расширяют представление о факторах, влияющих на сократимость, адренореактивность и холинореактивность миокарда человека и животных, в том числе о способности свободных аминокислот – тирозина, гистидина, триптофана повышать сократимость миокарда человека. Внесено новое в изучении физиологической роли эндогенных модуляторов адренореактивности (ЭСБАР и ЭББАР) и холинореактивности (ЭБМХР). В частности, продемонстрирована способность ЭСБАР повышать эффективность активации бета-АР миокарда человека. Доказана возможность ЭБМХР существенно снижать эффективность активации М-холинорецепторов (М-ХР) миокарда млекопитающих. Расширено представление об ЛФХ как факторе, снижающем сократимость миокарда и эффективность активации М-ХР миокарда. Это необходимо учитывать при разработке вопросов патогенеза заболеваний сердца. Углублено представление о природе ЭАСМ и ЭБМХР. Все эти данные имеют значение для физиологии кровообращения, физиологии возбудимых тканей, патофизиологии, биохимии, фармакологии, терапии и кардиологии.

Результаты исследования важны и в практическом плане. В частности, они позволяют применять биоптаты из ушка правого предсердия человека, получаемые при оперативном лечении пациентов с ИБС, в экспериментах для поиска новых кардиотропных средств. Они также указывают на целесообразность проведения исследований, направленных на клиническое применение тирозина, гистидина и триптофана как кардиотропных средств, например, при сердечной недостаточности.

Результаты исследования указывают на необходимость поиска селективных сенсibilizаторов бета-АР миокарда. Данные, полученные в работе, могут быть использованы в учебной деятельности кафедр физиологии, патофизиологии и терапии. В настоящее время они внедрены в учебный процесс кафедры нормальной физиологии Кировской государственной медицинской академии и кафедры биологии Вятского государственного гуманитарного университета (ВятГГУ).

Апробация работы. Результаты исследования доложены на научных сессиях ВятГГУ (Киров, 2008, 2009, 2010), конференции «Молодежь и наука на севере» (Сыктывкар, 2008), VIII и IX Молодежной научных конференциях «Физиология человека и животных» (Сыктывкар, 2009, 2010), VIII всероссийской научной конференции «Реабилитация и вторичная профилактика в кардиологии» (Москва, 2009), конференции «Фундаментальная и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2010) и всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы трансфизиологии и клинической медицины» (Киров, 2010).

По материалам диссертации опубликована 22 работы, в числе которых 5 статей в журналах, рекомендованном ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 203 страницах компьютерного текста и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, методы исследования, результаты исследований и их обсуждения), заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы (150 источников на русском языке и 197 – на иностранных языках) и содержит 15 таблиц и 13 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовано 95 полосок миокарда правого ушка сердца 95 пациентов кардиохирургического отделения Кировской областной клинической больницы. Их возраст варьировал от 13 до 71 года и в среднем составил 55 ± 1 лет. Биоптаты ушка иссекали при постановке венозной канюли во время подключения аппарата искусственного кровообращения при аортокоронарном шунтировании (Бураковский В. И. и соавт., 1989). Шунтирование проводилось у 81 пациента с ишемической болезнью сердца (стенокардия I, II и III функционального класса, по классификации NYHA) и у 14 пациентов с пороками сердца различной этиологии при протезировании клапанов сердца.

В работе также использовали 89 белых беспородных крыс – самцов весом 450-500 г, у которых под эфирным наркозом извлекали сердце, а из его правого желудочка иссекали полоску размерами 5-8 мм x 3-4 мм x 1-2 мм). Полоски миокарда человека или крысы помещали в рабочую камеру (объемом 1 мл) «Миоцитографа» (фирмы «Норис», Россия) и соединяли с изометрическим датчиком силы (фирмы Honeywell, USA), сигнал с которого подавали на компьютер через аналого-цифровой преобразователь ЛА-70. Полоску растягивали микроманипулятором до длины, при которой сила сокращений была максимальной, и с помощью шприцевого дозатора «Миоцитографа» непрерывно перфузировали при 37°C со скоростью 2,0 мл/мин оксигенированным раствором Кребса, содержащим (мм) – NaCl – 136; KCl – 4,7; CaCl₂ – 2,52; MgCl₂ – 1,2; KH₂PO₄ – 0,6; NaHCO₃ – 4,7; C₆H₁₂O₆ – 11 (рН = 7,4). Сокращения полоски вызывали непрерывной стимуляцией от электростимулятора ЭСЛ-01 с частотой 1 Гц при длительности импульсов 5 мс и амплитуде 25–30 В через стальные электроды, погруженные в рабочую камеру. Исследования сократительной активности полосок начинали через 30–40 минут после забора материала. Схемы опытов приведены при описании результатов исследования. Длительность каждого этапа опытов была, как правило, в пределах 5 мин.

Кровь была получена от 102 доноров крови – женщин репродуктивного возраста (30 ± 1 лет). Забор крови (в объеме 7–8 мл) из локтевой вены осуществлялся на станции переливания крови в 8–9 ч. утра. Сыворотку получали путем 15-минутного центрифугирования (при 1000 об/мин) полностью свернувшейся крови. Перед опытом ее разводили раствором Кребса в 10000, 1000, 500, 100, 50, 10 и 5 раз и исследовали в течение 5–6 часов с момента забора крови. В работе использовали адреналина гидрохлорид (Московский эндокринный завод, Россия), ацетилхолина хлорид (Acros ORGANICS, Бельгия), лизофосфатидилхолин (Харьковский завод бактериальных препаратов, Украина), гистидин (SIGMA-ALDRICH, Япония), тирозин и триптофан (ACROS ORGANICS, Бельгия), милдронат (Grindex, Латвия) и прозерин («ДАЛЬХИМФАРМ», Россия), которые разводили раствором Кребса. Всего проведено 44 серии опытов, в том числе 24 – на миокарде человека и 20 на миокарде крысы.

Анализ результатов исследования проводили с помощью статистической программы BIOSTAT.Primer for Windows McGraw-Hill, рассчитывая среднее арифметическое (M) и ошибку среднего (m). Различия показателей оценивали по критерию Уилкоксона и считали их достоверными при $p < 0,05$ (Гланц С., 1999).

Автор выражает благодарность кардиохирургам Кировской областной клинической больницы профессору В. А. Вязникову и В. Р. Пинегину, зав. лабораторией консервирования крови Кировского НИИ гематологии и переливания крови, д. м. н. А. А. Костяеву, старшему научному сотруднику Института экспериментальной кардиологии РКНПК, к. х. н. Н. В. Проказовой за помощь в работе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Миокард человека

1.1. Общая характеристика сократимости миокарда правого ушка сердца человека. При непрерывной перфузии раствором Кребса и электростимуляции полоски миокарда человека генерировали сокращения, амплитуда которых была относительно постоянной для каждого опыта, но в среднем варьировала от $1,04 \pm 0,09$ мН до $2,40 \pm 0,32$ мН (рис. 1). Установлено, что амплитуда сокращений полосок миокарда коррелировала с величиной фракции выброса левого желудочка, рассчитанной по Тейхольцу ($FВЛЖ_T$) – коэффициент корреляции составил 0,37, $r = 0,0048$, а уравнение линейной регрессии имело вид $A = 0,06FВЛЖ_T - 1,75$. Это означает, что амплитуда сокращений миокарда тем ниже, чем ниже систолический объем крови, выбрасываемый им во время систолы.

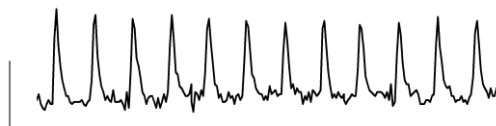


Рис. 1. Механограмма полоски миокарда из ушка правого предсердия сердца человека, демонстрирующая относительное постоянство амплитуды вызванных электростимулами сокращений при ее перфузии раствором Кребса. Калибровка – 1,5 мН, 2 сек.

1.2. Влияние адреналина на сократимость миокарда человека (серия 1). Опыты проводили по схеме: раствор Кребса (РК) → адреналин (Ад), $5,5 \times 10^{-9}$ М → РК → Ад, $5,5 \times 10^{-8}$ М → РК → ... → Ад, $5,5 \times 10^{-4}$ М → РК. Установлено (рис. 2), что адреналин в концентрации $5,5 \times 10^{-9}$ М и $5,5 \times 10^{-8}$ М, как правило, не изменяет амплитуду вызванных сокращений, а в концентрациях $5,5 \times 10^{-7}$ и $5,5 \times 10^{-6}$ М дозозависимо и обратимо повышает ее (соответственно до $177 \pm 34\%$ и $267 \pm 54\%$ от фонового

уровня). Инотропный эффект адреналина в концентрациях $5,5 \times 10^{-5}$ и $5,5 \times 10^{-4}$ М был не выше, чем эффект адреналина в концентрации $5,5 \times 10^{-6}$ М. Константа диссоциации для адреналина составила 1100 ± 54 нМ. Это указывает на низкую чувствительность миокарда к адреналину, что согласуется и с представлением Красниковой Т. Л., Габрусенко С. А. (2000) и Brodde O. et al. (2006) о снижении эффективности активации бета-АР при сердечной недостаточности. Это снижение авторы объясняют повышением активности киназы бета-АР и накоплением ЛФХ. По нашему мнению, помимо этих причин в основе снижения бета-адренореактивности миокарда лежит уменьшение экспрессии бета₁-АР при хронической сердечной недостаточности и повышение числа альфа-АР.

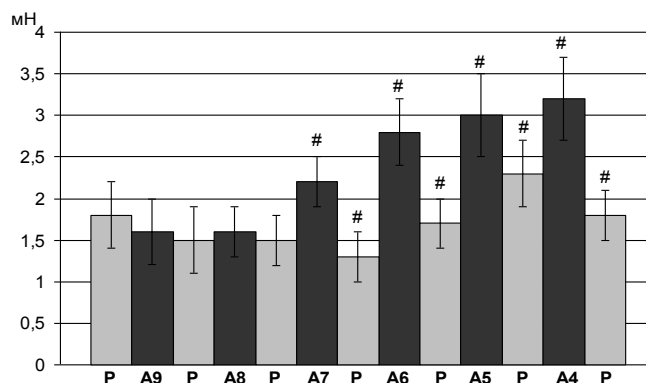


Рис. 2. Амплитуда вызванных сокращений миокарда человека (в мН) при пятиминутных воздействиях адреналина в концентрациях $5,5 \times 10^{-9}$, 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М (соответственно А9, ..., А4), чередующихся перфузией миокарда раствором Кребса (Р); # – различия с фоном, т. е. с предыдущим этапом, достоверно ($p < 0,05$) по критерию Уилкоксона.

1.3. Влияние сыворотки крови (1:10000, 1:1000, 1:500, 1:100, 1:50, 1:10, 1:5) небеременных женщин на сократимость миокарда человека и на проявление положительного инотропного эффекта адреналина в концентрациях $5,5 \times 10^{-8}$ М (серии 2–7) и $5,5 \times 10^{-6}$ М (серии 8–14). Все 13 серий этого раздела проводили по схеме: РК → Ад ($5,5 \times 10^{-8}$ М или $5,5 \times 10^{-6}$ М) → РК → одно из разведений сыворотки (Сыв) → Сыв + Ад → РК → Ад → РК.

Анализ результатов всех 13 серий показал, что в разведениях 1:10000, 1:1000, 1:500, 1:100 и 1:50 сыворотка крови небеременных женщин не влияет на амплитуду сокращений кардиомиоцитов человека, а в разведении 1:5 и 1:10 (рис. 3) достоверно повышает ее соответственно до $143,3 \pm 8,9\%$ и $133,0 \pm 12,4\%$ от фонового уровня (# – здесь и ниже означает, что изменения с фоном достоверно, $p < 0,05$ по критерию Уилкоксона). Величина этого инотропного эффекта составляет около 20% от максимального инотропного эффекта адреналина при его использовании в высокой концентрации ($5,5 \times 10^{-6}$ М). Подобно другим авторам (Демина Н. Л. и соавт., 2008; Циркин В. И. и соавт., 2008), полагаем, что положительный инотропный эффект сыворотки крови связан с наличием в ней эндогенного активатора сократимости миоцитов (ЭАСМ).

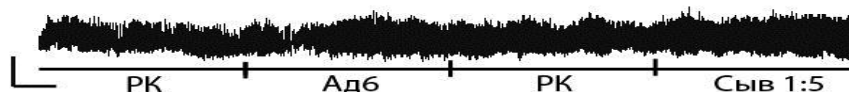


Рис. 3. Механограмма полоски миокарда человека, демонстрирующая положительные инотропные эффекты адреналина ($5,5 \times 10^{-6}$ М; Ад6) и 5-кратного разведения сыворотки крови небеременных женщин (Сыв 1:5). РК – раствор Кребса. Калибровка – 1,5 мН, 1 мин.

При анализе влияния указанных выше разведений сыворотки крови на положительный инотропный эффект адреналина в концентрации $5,5 \times 10^{-8} \text{M}$ (серии 2–7) установлено, что в этой концентрации при 1-м тестировании адреналин, как правило, не повышает амплитуду сокращений, и лишь при исследовании 50-кратного разведения (серия 6) он вызывает достоверный рост амплитуды сокращений, т. е. проявляет положительный инотропный эффект. При 2-м тестировании адреналином, т. е. совместно с сывороткой крови установлено, что 10000-, 50- и 10-кратные ее разведения не усиливают реакцию миокарда на адреналин, т. е. не проявляют адреносенсибилизирующую активность. В то же время 1000-, 500- и 100-кратные разведения проявляли ее, т. е. повышали способность адреналина вызывать положительный инотропный эффект (рис. 4, 5 и 9). Так, в опытах с 500-кратным разведением сыворотки крови при 1-м тестировании адреналина амплитуда вызванных сокращений составила $1,24 \pm 0,1 \text{ мН}$ или $105,2 \pm 9,0\%$ от фона, а при 2-м тестировании, т. е. совместно с сывороткой крови она возросла до $1,53 \pm 0,2 \text{ мН}^\#$, или до $155,3 \pm 14,0\%^\#$ от фона, или до $125,4 \pm 9,0\%^\#$ от 1-го тестирования (различия между ответами миокарда при 1-м и 2-м тестированиях адреналином носили достоверный характер, $p_{1-2} < 0,05$). Аналогично, в опытах со 100-кратным разведением при 1-м тестировании адреналином амплитуда сокращений составила $1,12 \pm 0,1 \text{ мН}$ или $108,8 \pm 8,9\%$ от фона, а при 2-м тестировании, т. е. совместно с сывороткой крови она возросла до $1,29 \pm 0,1 \text{ мН}^\#$, или до $127,5 \pm 5,8\%^\#$ от фона, или до $119,9 \pm 7,7\%^\#$ от 1-го тестирования. При этом различия между 1-м и 2-м тестированием носили достоверный характер ($p_{1-2} < 0,05$) для двух последних способов расчетов.

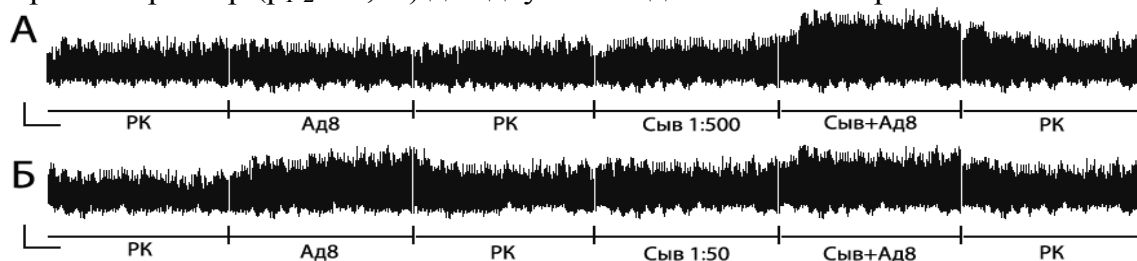


Рис. 4. Механограммы полосок миокарда человека, демонстрирующие влияние на амплитуду сокращений адреналина $5,5 \times 10^{-8} \text{M}$ (Ад8) и 500- и 50-кратных разведений сыворотки крови небеременных женщин (Сыв 1:500 или 1:50). На панели А исходно адреналин не изменяет амплитуду вызванных сокращений, а на фоне сыворотки в разведении 1:500 повышает ее; это доказывает наличие адреносенсибилизирующей активности сыворотки крови. На панели Б адреналин при 1-м тестировании проявляет положительный инотропный эффект, который, однако, не усиливается сывороткой крови в разведении 1:50. Горизонтальные линии под механограммами здесь и на других рисунках отражают момент воздействия растворов. Калибровка – 1 мН, 1 мин.

При анализе влияния сыворотки крови на положительный инотропный эффект адреналина в концентрации $5,5 \times 10^{-6} \text{M}$ (серии 8–14) установлено, что в этой концентрации адреналин при 1-м тестировании достоверно повышает амплитуду сокращений, т. е. проявляет положительный инотропный эффект. Установлено, что сыворотка крови в разведениях 1:10000, 1:1000, 1:100, 1:50 не влияет на этот эффект адреналина. В разведении 1:500 (рис. 6) сыворотка крови снижала положительный инотропный эффект адреналина, т. е. проявляла бета-адреноблокирующую активность. Действительно, при 1-м, 2-м и 3-м тестированиях адреналином амплитуда вызванных сокращений составила соответственно $140,9 \pm 6,5\%^\#$, $115,0 \pm 10,1\%$ и $161,9 \pm 20,2\%^\#$ от фона (различия между 1-м и 2-м тестированием носили достовер-

ный характер, $p_{2-3} < 0,05$). В разведении 1:10 сыворотка крови, наоборот, дополнительно повышала положительный инотропный эффект адреналина, т. е. проявляла бета-адреносенсибилизирующую активность. Действительно, при 1-м, 2-м и 3-м тестированиях адреналином амплитуда вызванных сокращений составила соответственно $160,2 \pm 23,8\%^{\#}$, $203,7 \pm 46,8\%^{\#}$ и $141,5 \pm 22,5\%^{\#}$ от фона ($p_{2-3} < 0,05$).

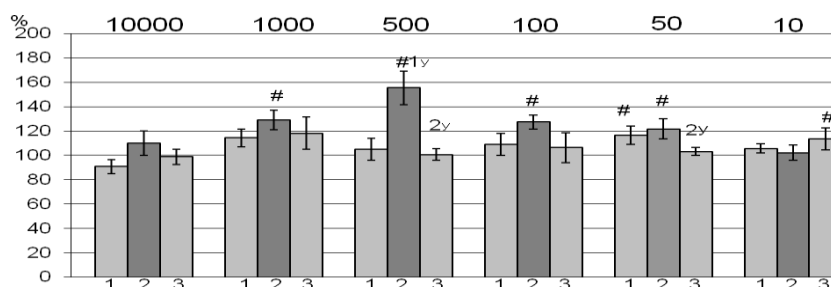


Рис. 5. Амплитуда вызванных сокращений миокарда человека (в % к фоновому уровню) при трех тестированиях адреналином ($5,5 \times 10^{-8}$ М) – до (1-е столбики), на фоне (2-е столбики) и после удаления (3-е столбики) сыворотки крови небеременных женщин. Цифры вверху отражают кратность разведения сыворотки, цифры над столбиками (1 и/или 2) означают, что различие с 1-м и/или 2-м тестированиями адреналином достоверно ($p < 0,05$) по критерию Уилкоксона (^y); # – отличие от фонового уровня достоверно ($p < 0,05$) по критерию Уилкоксона.

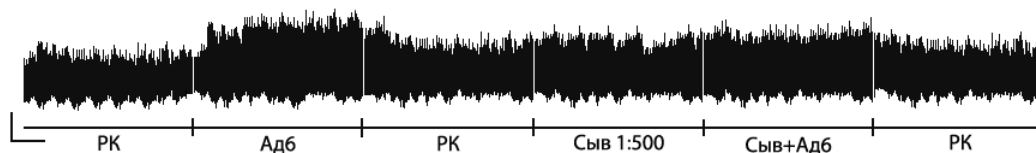


Рис. 6. Механограмма миокарда человека, демонстрирующая положительный инотропный эффект адреналина ($5,5 \times 10^{-6}$ М, Адб) и бета-адреноблокирующую активность 500-кратного разведения сыворотки крови небеременных женщин (Сыв 1:500). РК – раствор Кребса. Калибровка – 1,5 мН, 1 мин.

Таким образом, результаты серий 2–14 позволили впервые показать, что сыворотка крови человека способна проявлять бета-адреносенсибилизирующую и бета-адреноблокирующую активность в отношении миокарда человека. Как и другие авторы (Циркин В. И. и соавт., 1997, 2011; Сизова Е. Н., Циркин В. И., 2006, Хлыбова С. В., 2007, Торопов А. Л. и соавт., 2010), мы объясняем эту активность наличием в крови соответственно ЭСБАР и ЭББАР. Полагаем, что эти модуляторы выполняют важную функцию – усиливают эффект низких концентраций катехоламинов и, в определенной степени, ограничивают действие их высоких концентраций.

1.4. Влияние тирозина ($5,5 \times 10^{-5}$ и 1×10^{-4} М), гистидина ($6,5 \times 10^{-9}$, 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-5} и 1×10^{-4} М), триптофана ($4,9 \times 10^{-5}$ и 1×10^{-4} М) и милдроната ($6,9 \times 10^{-6}$ М) на сократимость миокарда человека и на проявление положительного инотропного эффекта адреналина в концентрациях $5,5 \times 10^{-8}$ М (серии 15–23) или $5,5 \times 10^{-6}$ М (серии 24). Серии 15–23 проводили по схеме: РК → адреналин ($5,5 \times 10^{-8}$ М, Ад8) → РК → одна из аминокислот (АК) → АК + Ад8 → РК → Ад8 → РК. Серию 24 проводили по схеме: РК → адреналин ($5,5 \times 10^{-6}$ М, Ад6) → РК → милдронат → милдронат + Ад6 → РК → Ад6 → РК.

Показано, что тирозин ($5,5 \times 10^{-5}$ и $5,5 \times 10^{-4}$ М), гистидин ($6,5 \times 10^{-5}$ М) и триптофан ($4,9 \times 10^{-4}$ М) проявляют положительный инотропный эффект (см. рис. 7 и 8), ко-

торый сравним с инотропным эффектом адреналина ($5,5 \times 10^{-8}$ М). Так, тирозин (рис. 7) в концентрации $5,5 \times 10^{-5}$ М достоверно повышал амплитуду вызванных сокращений до $148,4 \pm 13,0\%^{\#}$ от фонового уровня, а адреналин – до $147,9 \pm 13,8\%^{\#}$; в концентрации $5,5 \times 10^{-4}$ М тирозин повышал ее до $150,0 \pm 12,0\%^{\#}$ (адреналин – до $137,6 \pm 15,0\%^{\#}$). Гистидин в концентрации $6,5 \times 10^{-5}$ М повышал амплитуду сокращений до $133,1 \pm 14,0\%^{\#}$ (адреналин – до $118,2 \pm 6,6\%^{\#}$), а в остальных концентрациях ($6,5 \times 10^{-9}$, 10^{-8} , 10^{-7} и 10^{-4} М) гистидин не влиял на нее. Триптофан в концентрации $4,9 \times 10^{-4}$ М повышал амплитуду сокращений до $116,7 \pm 6,9\%^{\#}$ (адреналин – до $112,3 \pm 7,4\%$), а в концентрации $4,9 \times 10^{-5}$ М не влияли на нее (рис.7). Предполагаем, что в основе положительного инотропного эффекта аминокислот лежит их способность связываться со специфическими рецепторами (их роль, вероятно, выполняют транспортеры этих АК). Это активирует Са-каналы L-типа, что в итоге приводит к росту концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитоплазме кардиомиоцитов. В целом, результаты наших исследований ставят вопрос о возможности клинического применения этих трех аминокислот для повышения сократимости миокарда у пациентов с сердечной недостаточностью. В то же время нами установлено, что милдронат ($6,9 \times 10^{-6}$ М) не изменял амплитуду вызванных сокращений.

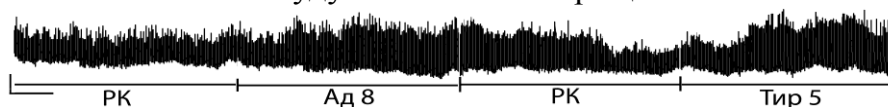


Рис. 7. Механограмма полоски миокарда человека, отражающая положительный инотропный эффект адреналина ($5,5 \times 10^{-8}$ М; Ад8) и тирозина ($5,5 \times 10^{-5}$ М, Тир 5). РК – раствора Кребса. Калибровка – 1,5 мН, 1 мин.

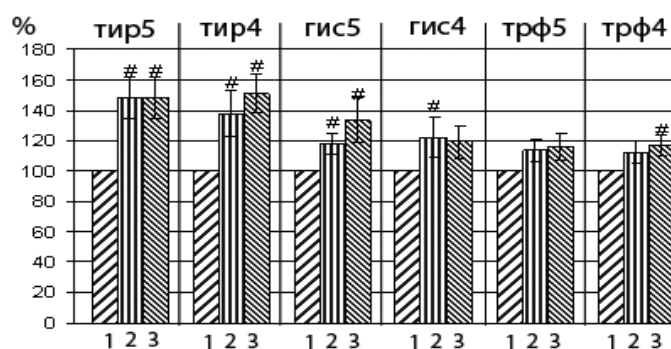


Рис. 8. Амплитуда сокращений миокарда человека (в % к фоновому уровню) при воздействии тирозина ($5,5 \times 10^{-5}$ М, тир5; $5,5 \times 10^{-4}$ М, тир4), гистидина ($6,5 \times 10^{-5}$ М, гис5; $6,5 \times 10^{-4}$ М, гис4) и триптофана ($4,9 \times 10^{-5}$ М, трф5; $4,9 \times 10^{-4}$ М, трф4). Цифры 1, 2 и 3 – под столбиками – амплитуда сокращений на фоне раствора Кребса (1), на фоне адреналина ($5,5 \times 10^{-8}$ М; 2) или на фоне указанной аминокислоты (3). # – отличие от фонового уровня достоверно ($p < 0,05$) по критерию Уилкоксона.

При оценке влияния аминокислот на проявление адреналином ($5,5 \times 10^{-8}$ М) положительного инотропного эффекта установлено, что адреналин при 1-м тестировании достоверно повышает амплитуду сокращений только в опытах с тирозином ($5,5 \times 10^{-5}$ М и $5,5 \times 10^{-4}$ М) и гистидином ($6,5 \times 10^{-5}$ и $6,5 \times 10^{-4}$ М), в остальных же сериях он не влияет на амплитуду сокращений (см. рис. 9 и 10). Гистидин, триптофан и тирозин в исследованных нами концентрациях не проявляли адреносенсибилизирующую активность, независимо от концентрации адреналина и его эффектов. Так, в опытах с триптофаном в концентрации $4,9 \times 10^{-5}$ М при 1-м, 2-м и 3-м тестировании адреналином в концентрации $5,5 \times 10^{-8}$ М амплитуда вызванных сокращений со-

ставила соответственно $113,7 \pm 7,2\%$, $121,0 \pm 11,4\%$, $107,5 \pm 8,4\%$ от фона. Более того, в тех случаях, когда при 1-м тестировании адреналин проявлял положительный инотропный эффект, на фоне аминокислоты этот эффект не проявлялся, но вновь восстанавливался после удаления аминокислоты. В опытах с тирозином в концентрации $5,5 \times 10^{-5} \text{ М}$ при 1-м, 2-м и 3-м тестированиях адреналином в концентрации $5,5 \times 10^{-8} \text{ М}$ амплитуда вызванных сокращений составила соответственно $147,9 \pm 13,9\%^{\#}$, $95,9 \pm 7,6$ и $133,7 \pm 9,4\%^{\#}$ от фона. Аналогично, в опытах с гистидином в концентрации $6,5 \times 10^{-5} \text{ М}$ эти значения составили соответственно $118,2 \pm 6,7\%^{\#}$, $107,1 \pm 9,9$ и $125,6 \pm 10,8\%^{\#}$ от фона. В опытах с милдронатом (рис. 9), в которых адреналин применялся в концентрации $5,5 \times 10^{-6} \text{ М}$, также не наблюдалась способность этого вещества повышать инотропный эффект адреналина. Действительно, при 1-м, 2-м и 3-м тестированиях адреналином амплитуда сокращений составили соответственно $211,8 \pm 34,8\%^{\#}$, $164,1 \pm 25,5\%^{\#}$, $180,5 \pm 27,3\%^{\#}$ (различия между тестированиями недостоверны, $p > 0,1$).

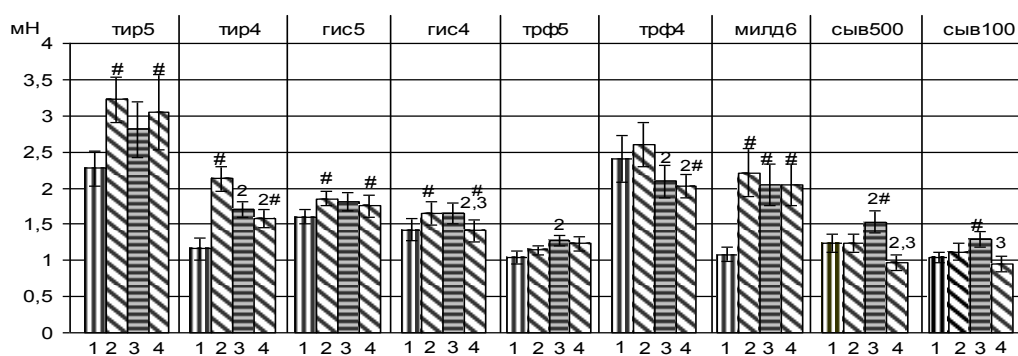


Рис. 9. Амплитуда сокращений полосок миокарда человека (в мН) при их перфузии раствором Кребса (столбики под цифрой 1) и при трех тестированиях адреналином в концентрации $5,5 \times 10^{-8} \text{ М}$ (или $5,5 \times 10^{-6} \text{ М}$ в опытах с милдронатом) – до (2), на фоне (3) и после удаления (4) исследуемого фактора.

Подписи над диаграммами: тир4, тир5, гис5, гис4, трф5, трф4 – соответственно тирозин, гистидин и триптофан в концентрациях 10^{-5} или 10^{-4} М ; милд6 – милдронат ($6,9 \times 10^{-6} \text{ М}$), сыв500 и сыв100 – сыворотка крови небеременных женщин в разведениях 1:500 и 1:100. Символ # – различие с фоновым уровнем достоверно ($p < 0,05$) по критерию Уилкоксона; цифры 2 и/или 3 над столбиками – различие с 2-м и/или 3-м тестированиями адреналином достоверно ($p < 0,05$) по критерию Уилкоксона.

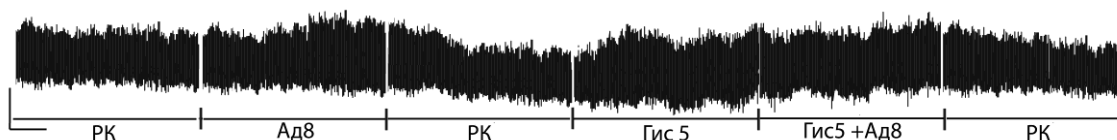


Рис. 10. Механограмма полоски миокарда человека, демонстрирующая наличие у гистидина ($6,5 \times 10^{-5} \text{ М}$; Гис 5) положительного инотропного эффекта и отсутствие у него бета-адреносенсибилизирующей активности.

РК – раствор Кребса, Ад8 – адреналин ($5,5 \times 10^{-8} \text{ М}$). Калибровка – 1,5 мН, 1 мин.

Результаты этих исследований существенно отличаются от данных, полученных в опытах с гладкими мышцами матки крысы и других органов, согласно которым гистидин, триптофан, тирозин и милдронат повышают эффективность активации бета-АР (Ноздрачев А. Д. и соавт., 1998; Туманова Т. В., 1998; Сизова Е. Н. и соавт., 2008; Торопов А. Л. и соавт., 2011). Возможны несколько вариантов объяснения таких различий: 1) исходно, присоединяясь к сайту бета-АР, эти аминокислоты активи-

вируют бета-АР и тем самым вызывают положительный инотропный эффект; поэтому последующая активация бета-АР адреналином не приводит к повышению силы сокращения; 2) при сердечной недостаточности настолько изменены свойства бета-АР миокарда и система передачи сигнала от этого рецептора внутрь кардиомиоцитов, что аналоги ЭСБАР не способны проявить бета-адреносенсибилизирующую активность; 3) бета-АР миокарда человека (и других представителей млекопитающих) отличаются по своим свойствам от бета-АР гладких мышц, в том числе в отношении чувствительности к аналогам ЭСБАР. Мы в большей степени склоняемся к третьему варианту объяснения, из которого следует, что гистидин, триптофан, тирозин и милдронат являются селективными сенсибилизаторами бета-АР гладких мышц и поэтому они не способны повышать эффективность активации бета-АР миокарда человека. Это означает, что необходим поиск новых аналогов ЭСБАР, тропных к бета-АР миокарда человека. О наличии таких веществ косвенно свидетельствуют наши данные о способности сыворотки крови человека проявлять бета-адреносенсибилизирующую активность по отношению к миокарду человека.

2. Миокард крысы

2.1. Общая характеристика сократимости миокарда крысы. Нами подтверждены данные Пенкиной Ю. А. и соавт. (2008) о том, что в ответ на постоянную электростимуляцию с частотой 1 Гц миокард крысы генерирует сокращения. Амплитуда этих сокращений в разных сериях варьировала от 1,8 мН до 4,8 мН и оставалась в каждом опыте относительно постоянной длительное время (рис. 11).

2.2. Зависимость отрицательного инотропного эффекта ацетилхолина (АХ) от его концентрации в среде (серия 25). Эти опыты проводили по схеме: РК → АХ; $5,5 \times 10^{-9}$ М → РК → АХ; $5,5 \times 10^{-8}$ М → РК → ... → АХ; $5,5 \times 10^{-4}$ М → РК. Показано (рис. 11), что АХ в концентрациях $5,5 \times 10^{-9}$ М и $5,5 \times 10^{-8}$ М не изменяет амплитуду вызванных сокращений, а в более высоких концентрациях ($5,5 \times 10^{-7}$, $5,5 \times 10^{-6}$, $5,5 \times 10^{-5}$ и $5,5 \times 10^{-4}$ М) дозозависимо понижает ее соответственно до 82,1%[#], 72,5%[#], 71,9%[#] и 64,4%[#] от фона. Константа диссоциации для АХ составила 904 ± 15 нг/мл или $(5,0 \pm 0,1) \times 10^{-6}$ М.

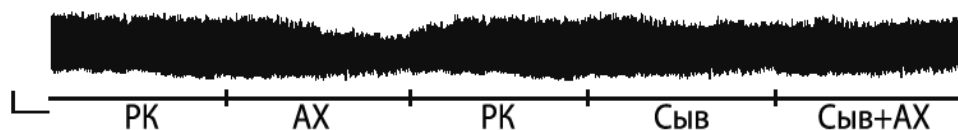


Рис. 11. Механограмма полоски миокарда крысы, демонстрирующая отрицательный инотропный эффект ацетилхолина (АХ) в концентрации $5,5 \times 10^{-6}$ М и способность 100-кратного разведения сыворотки крови (Сыв) небеременных женщин блокировать этот эффект. РК – раствор Кребса. Калибровка – 1 мН, 1 мин.

2.3. Влияние сыворотки крови (1:10000, 1:1000, 1:500, 1:100, 1:50, 1:10, 1:5) небеременных женщин на сократимость миокарда крысы и проявление отрицательного инотропного эффекта ацетилхолина в концентрации $5,5 \times 10^{-6}$ М (серии 26-32). Все эти серии проводили по схеме: РК → АХ ($5,5 \times 10^{-6}$ М) → РК → одно из разведений сыворотки крови (Сыв) → это же разведение Сыв + АХ → РК → АХ → РК. Установлено (рис. 11, табл.), что сыворотка крови в разведениях 1:10000, 1:1000, 1:100, 1:50 и 1:10 не влияет на амплитуду вызванных сокращений. Однако в разведении 1:500 она достоверно снижала ее до 85,7%[#] от фонового уровня, что мы объясняем наличием в сыворотке эндогенного ингибитора сократимости миоцитов (ЭИСМ). В разведении 1:5 сыворотка крови, как и в опытах с миокардом человека, наоборот, повышала амплитуду сокращений до $134,5 \pm 8,1\%$ [#] от фонового уровня.

Это объясняется нами наличием в ней эндогенного активатора сократимости миоцитов (ЭАСМ). В дополнительных сериях опытов (33-37), проведенных с целью изучения природы положительного инотропного эффекта сыворотки крови человека, было показано (рис. 12), что этот эффект у 5-кратного разведения сыворотки исчезает при блокаде Ca^{2+} -рецепторов верапамилом (2×10^{-6} М). Так, исходно при 1-м воздействии 5-кратного разведения сыворотки крови амплитуда сокращений достоверно возросла до $112,5 \pm 5,2\%^\#$ от фона, а при 2-м воздействии, т. е. совместно с верапамилом она не менялась и составила $103,2 \pm 5,7\%$ от фона. Тепловая 40-минутная денатурация в водяной бане при $80^\circ C$ также снижала проявление положительного инотропного эффекта сыворотки крови и даже сопровождалась появлением способности сыворотки крови снижать амплитуду сокращений, что было показано при исследовании 500- и 10-кратных разведений. Например, при воздействии 10-кратного разведения нативной сыворотки амплитуда сокращений составила $107,4 \pm 5,1\%$ от фона, а при действии инактивированного разведения она достоверно снизилась до $72,8 \pm 2,7\%^\#$ от фона. С другой стороны, показано, что положительный инотропный эффект сыворотки крови не изменяется в присутствии лозапа ($2,2 \times 10^{-6}$ М), являющегося блокатором рецепторов ангиотензина II. Так, исходно 5-кратное разведение сыворотки повышало амплитуду сокращений до $113,6 \pm 6,9\%^\#$ от фона, а совместно с лозапом – до $128,9 \pm 6,5\%^\#$ от фона. Все это позволяет заключить, что ЭАСМ является термолабильным соединением (наиболее вероятно, полипептидом, отличающимся от ангиотензина II), а его положительный инотропный эффект связан с повышением проницаемости Ca-каналов L-типа.

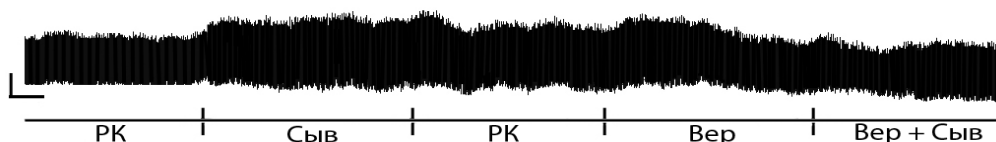


Рис. 12. Механограмма полоски миокарда крысы, демонстрирующая положительный инотропный эффект 5-кратного разведения сыворотки крови небеременных женщин (Сыв) и его блокаду верапамилом (2×10^{-6} М, Вер). РК – раствор Кребса, калибровка – 1,5 мН, 1 мин.

Амплитуда вызванных сокращений (% к фону) полосок миокарда крысы на 8 этапах экспериментов, в которых изучалось влияние нативной (серии 26–32) и инактивированной (инакт; серии 36–37) сыворотки (Сыв) крови на проявление отрицательного инотропного эффекта ацетилхолина (АХ, $5,5 \times 10^{-6}$ М)

Разведение сыворотки	N	Этапы эксперимента							
		1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й
		РК	АХ	РК	Сыв	Сыв+АХ	РК	АХ	РК
10000	11	100	$84,0 \pm 5,8^{(1)}$	100	$95,5 \pm 6,1$	$81,8 \pm 3,5^{(4)}$	100	$87,9 \pm 7,6$	100
1000	10	100	$81,9 \pm 6,1^{(1)}$	100	$88,6 \pm 6,7$	$78,2 \pm 4,4^{(4)}$	100	$83,9 \pm 3,9^{(6)}$	100
500	11	100	$75,3 \pm 5,2^{(1)}$	100	$85,7 \pm 4,7^{(3)}$	$91,2 \pm 4,6^{(2)}$	100	$93,8 \pm 3,1^{(2)}$	100
100	10	100	$70,7 \pm 1,9^{(1)}$	100	$96,9 \pm 5,9$	$85,8 \pm 4,3^{(2,4)}$	100	$92,7 \pm 4,2^{(2)}$	100
50	10	100	$75,9 \pm 3,1^{(1)}$	100	$84,5 \pm 5,2$	$91,2 \pm 4,9^{(2)}$	100	$85,9 \pm 5,3^{(6)}$	100
10	10	100	$80,3 \pm 3,2^{(1)}$	100	$107,4 \pm 5,1$	$95,4 \pm 5,5^{(2)}$	100	$82,1 \pm 4,8^{(6)}$	100
5	12	100	$83,5 \pm 4,5^{(1)}$	100	$134,5 \pm 8,1^{(3)}$	$89,2 \pm 2,4^{(4)}$	100	$94,8 \pm 6,8$	100
10 (инакт.)	10	100	$80,3 \pm 2,4^{(1)}$	100	$72,8 \pm 2,7^{(3)}$	$87,9 \pm 3,8^{(4)}$	100	$100,4 \pm 4,1$	100
500(инакт.)	10	100	$81,7 \pm 3,6^{(1)}$	100	$59,0 \pm 2,3^{(3)}$	$82,3 \pm 5,9^{(4)}$	100	$87,6 \pm 4,3^{(6)}$	100

Примечание: ^(1,2,3...7) – отличие от соответствующего этапа достоверно ($p < 0,05$) по критерию Уилкоксона. Для значений 5-го этапа за 100% принята величина амплитуды на 4-м этапе. РК – раствор Кребса.

При исследовании влияния сыворотки крови небеременных женщин на проявление отрицательного инотропного эффекта ацетилхолина установлено (см. таблицу), что в разведениях 1:10000 и 1:1000 сыворотка не влияла на него. Так, в опытах с 1000-кратным разведением АХ при всех трех воздействиях, т. е. исходно, совместно с сывороткой и после ее удаления достоверно снижал амплитуду сокращений соответственно до 81,9%[#], 78,2%[#] и 83,9%[#] от фонового уровня ($p_{1-2-3} > 0,1$). В разведениях 1:500, 1:100, 1:50 и 1:10 сыворотка крови достоверно снижала отрицательный инотропный эффект АХ, т. е. проявляла М-холиноблокирующую активность, что отмечено и в момент ее воздействия (в опытах с 500- и 100-кратными разведениями) и после ее удаления. Так, в опытах с 500-кратным разведением исходно АХ снижал амплитуду сокращений (до 75,3%[#] от фона), а при воздействии совместно с сывороткой или после ее удаления не влиял на нее (амплитуда сокращений составила соответственно 91,2% и 93,8% от фона). В целом, эти данные показывают, что сыворотка крови человека при ее разведении в 500, 100, 50 и 10 раз за счет наличия в ней ЭБМХР снижает эффективность активации М-ХР. Подобный эффект ранее был выявлен в опытах с сердцем лягушки (Zvezdina N. D. et al., 1978; Сулова И. В. и соавт., 1995; Трухин А. Н., 2003, Демина Н. Л. и соавт., 2008) и сердцем кролика (Zvezdina N. D. et al., 1978; Сулова И. В. и соавт., 1995). Это означает, что эффект ЭБМХР, т. е. комплекса веществ, снижающего эффективность передачи сигнала от М-ХР внутрь кардиомиоцитов, характерен для миокарда всех животных и, вероятно, человека.

Данные, представленные в таблице, указывают на то, что 5-кратное разведение сыворотки не проявляет М-холиноблокирующую активность в момент воздействия, но вызывает снижение реакции на АХ после удаления сыворотки. Эти данные говорят о том, что сыворотка крови наряду с ЭБМХР содержит в небольших количествах и ЭСМХР, наличие которого постулировано ранее (Сизова Е. Н., Циркин В. И., 2006).

Как известно (Ветров В. В., Маслова М. Н., 2000; Северин Е. С., 2003), в крови человека находится холинэстераза (ХЭ), которая быстро разрушает АХ. Поэтому возникает предположение о том, что М-холиноблокирующий эффект сыворотки крови может быть следствием наличия в ней ХЭ. Для проверки этой гипотезы мы провели серию 38, в которой изучали влияние сыворотки крови человека на проявление отрицательного инотропного эффекта АХ на фоне ингибитора ХЭ прозерина ($2,9 \times 10^{-6}$ М). Опыты проводили по схеме: РК → АХ ($5,5 \times 10^{-6}$ М) → РК → сыворотка 1:500 → сыворотка 1:500 + АХ + прозерин → РК → АХ → РК (n=10). Нами установлено, что исходно АХ достоверно ($p < 0,05$) проявляет отрицательный инотропный эффект – он снижал амплитуду сокращений до $69,8 \pm 2,9\%^{\#}$ от фона. При 2-м воздействии, т. е. совместно с сывороткой и прозеринем АХ также достоверно ($p < 0,05$) снижал амплитуду сокращений (до $80,0 \pm 3,9\%^{\#}$), но величина этого снижения в определенной степени была ниже, чем при 1-м тестировании ($p > 0,054$). При 3-м тестировании, т. е. после удаления сыворотки и прозерина, АХ также достоверно ($p < 0,05$) снижал амплитуду сокращений (до $82,2 \pm 5,1\%^{\#}$ от фона), но это снижение было достоверно ($p < 0,05$) меньше, чем при 1-м тестировании. Эти данные позволили утверждать, что, несмотря на ингибирование ХЭ, 500-кратное разведение сыворотки крови сохранило способность снижать эффективность активации М-ХР, что проявилось и в период воздействия сыворотки, и после ее удаления. Это означает, что М-холиноблокирующая активность сыворотки крови, действительно, обусловлена наличием в ней ЭБМХР, а не ХЭ.

Нами также выполнены серии 36 и 37, в которых оценивалось влияние тепловой 40-минутной денатурации 500- и 10-кратных разведений сыворотки крови на проявление М-холиноблокирующей активности. Опыты проводили по схеме РК → АХ ($5,5 \times 10^{-6}$ М) → РК → сыворотка крови (СК, в одном из разведений) → СК (в этом же разведении) + АХ → РК → АХ → РК. Показано (табл.), что денатурация снижает способность сыворотки крови проявлять М-холиноблокирующую активность. Так, в опытах с 500-кратным разведением сыворотки крови АХ при 1-м, 2-м и 3-м тестированиях снижал амплитуду вызванных сокращений соответственно до 81,7%[#], 82,3%[#] и 87,6%[#] от фона, т. е. сыворотка утрачивала способность блокировать М-холинорецепторы. В опытах с 10-кратным разведением амплитуда сокращений при трех тестированиях составила соответственно 80,3%[#], 87,9%[#] и 100,4% от фона. Это означает, что тепловая денатурация частично препятствует проявлению М-холиноблокирующей активности сыворотки крови. Нами сделан вывод о том, что в составе ЭБМХР имеется два компонента – термостабильный и термолабильный. Наиболее вероятно, что в качестве термолабильного компонента выступает лизофосфатидилхолин. Эта гипотеза основана на данных лаборатории Турпаева Т. М. (Zvezdina N. D. et al., 1978; Сулова И. В. и соавт., 1995; Проказова Н. В. и соавт., 1998) и результатах наших исследований (серии 40-44), изложенных ниже.

2.4. Влияние лизофосфатидилхолина (ЛФХ, $2,0 \times 10^{-9}$ – $2,0 \times 10^{-4}$ М) на сократимость миокарда крысы и проявление отрицательного инотропного эффекта ацетилхолина в концентрациях $5,5 \cdot 10^{-7}$ М и $5,5 \cdot 10^{-6}$ М (серии 39–44). Оценку влияния ЛФХ на сократимость мы провели в сериях 39-42. Серию 39 проводили по схеме РК → ЛФХ; $5,5 \times 10^{-9}$ М → РК → ЛФХ; $5,5 \times 10^{-8}$ М → РК → ... → ЛФХ; $5,5 \times 10^{-4}$ М → РК. Серии 40, 41 и 42 проводили по схеме РК → АХ ($5,5 \times 10^{-7}$ М) → РК → ЛФХ (в одной из трех концентраций – 2×10^{-6} , 2×10^{-5} или 2×10^{-4} М) → ЛФХ (в этой же концентрации) + АХ → РК → АХ → РК.

Установлено, что ЛФХ в концентрациях 2×10^{-9} М – 2×10^{-4} М проявляет отрицательный инотропный эффект, выраженность которого, однако, не зависит от концентрации ЛФХ. Например, ЛФХ в концентрации 2×10^{-9} М снижал амплитуду сокращений до 77,6±3,5%[#] от фонового уровня, а в концентрациях 2×10^{-8} М, 2×10^{-7} М, 2×10^{-6} М, 2×10^{-5} М и 2×10^{-4} М соответственно до 85,1±4,2%[#], 78,9±6,0%[#], 80,5±4,9%[#], 80,0±7,4%[#] и 74,2±7,1%[#] от фона. При длительном воздействии ЛФХ наблюдается десенситизация, т. е. снижение проявления отрицательного инотропного эффекта ЛФХ. В ряде опытов помимо этого эффекта ЛФХ вызывал подъем изолинии механограммы, что косвенно указывало на снижение скорости расслабления кардиомиоцитов. В целом, эти два эффекта ЛФХ, которые ранее в опытах с изолированным сердцем крысы наблюдали Биленко М. В. и соавт. (1989) и Ноуе Е. et al. (1997), мы объясняем тем, что ЛФХ, взаимодействуя с орфановыми рецепторами типа GPR4 и G2A, о наличии которых указывают данные литературы (Lum H. et al, 2003; Matsumoto T. et al. 2007), повышает проницаемость Са-каналов кардиомиоцитов, что уменьшает длину саркомеров. Это приводит к снижению силы сокращения и к замедлению скорости расслабления кардиомиоцитов. Полагаем, что подобная ситуация может иметь место и в условиях целостного организма при накоплении ЛФХ, которое нередко возникает при стрессе (Fuchs B., Schiller J., 2009), гипоксии (Hashizume H. et al., 1997), инфаркте миокарда (Торкунов П. А. и соавт., 1997) и других критических состояниях.

При оценке влияния ЛФХ на проявление отрицательного инотропного эффекта ацетилхолина установлено (рис.13), что ЛФХ препятствует проявлению этого

эффекта либо уже в момент воздействия (установлено при исследовании ЛФХ в концентрации 2×10^{-5} М), либо в первые 10 минут после удаления ЛФХ (2×10^{-6} и 2×10^{-4} М). Так, при исследовании ЛФХ в концентрации 2×10^{-5} М ацетилхолин исходного достоверно снижал амплитуду сокращений до $69,3 \pm 4,6\%$ от фона, а совместно с ЛФХ или после удаления ЛФХ ацетилхолин не снижал ее (она составила соответственно $88,6 \pm 6,7\%$ и $89,1 \pm 5,9\%$ от фона). А в опытах с ЛФХ в концентрации 2×10^{-6} М исходно АХ достоверно снижал амплитуду сокращений до $78,7 \pm 5,7\%$ от фона, при воздействии совместно с ЛФХ он также достоверно снижал ее до $87,4 \pm 4,8\%$ от фона, а после удаления ЛФХ он не изменял амплитуду сокращений (она составила $91,1 \pm 7,1\%$ от фона). Это говорит о том, что ЛФХ снижает эффективность активации М-ХР, но не в момент воздействия, а после удаления ЛФХ. В целом, результаты наших исследований согласуются с данными, полученными в лаборатории Турпаева Т. М. в опытах с сердцем лягушки и кролика (Суслова И. В. и соавт., 1995; Проказова Н. В. и соавт., 1998) и позволяют рассматривать ЛФХ в качестве одного из возможных компонентов ЭБМХР. Об этом свидетельствует аналогия М-холиноблокирующей активности сыворотки крови и ЛФХ. Расчеты также подтверждают данное предположение. Действительно, если учитывать, что в сыворотке крови концентрация ЛФХ достигает $2-8 \times 10^{-5}$ М, т. е. 20–80 мкМ (Суслова И. В. и соавт., 1995), или в среднем 50 мкМ, то минимальная концентрация ЛФХ в среде при разведении сыворотки крови в 500, 100, 50 и 10 раз должна составлять соответственно 10^{-7} М, 5×10^{-7} М, 10^{-6} М, 5×10^{-6} М. Исходя из этого, можно полагать, что М-холиноблокирующая активность 100-, 50- и 10-кратных кратных (и вероятно, и 500-кратных разведений) разведений может быть следствием наличия в крови ЛФХ. Не исключено, что помимо ЛФХ в составе ЭБМХР могут быть и другие вещества. Наиболее вероятно, что механизм М-холиноблокирующей активности ЛФХ связан с тем, что при его воздействии повышается активность протеинкиназы С, следствием чего является повышение фосфорилирования М-ХР, что снижает эффективность их активации.

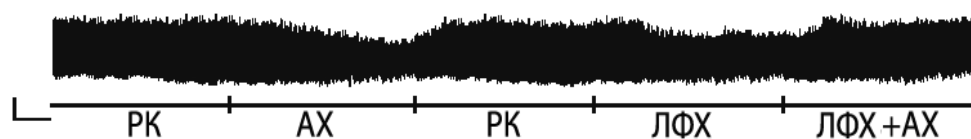


Рис. 13. Механограмма полоски миокарда крысы, отражающая способность лизофосфатидилхолина (ЛФХ) в концентрации 2×10^{-5} М блокировать отрицательный инотропный эффект ацетилхолина (АХ), используемого в концентрации $5,5 \times 10^{-7}$ М. РК – раствор Кребса. Калибровка – 1 мН, 1 мин.

Ранее было показано, что ЛФХ проявляет бета-адреноблокирующее влияние на миокарде крысы (Пенкина Ю. А. и соавт., 2008) и на миометрии крысы (Торопов А. Л., и соавт., 2011), а также проявляет альфа-адреноблокирующее влияние на гладких мышцах почечной артерии коровы (Циркин В. И. и соавт., 2009; Кашина Р. Ю. и соавт., 2010). Во всех этих случаях гистидин и другие аналоги ЭСБАР восстанавливали эффективность активации указанных рецепторов. Мы проверили способность гистидина восстанавливать эффективность активации М-ХР миокарда крысы, сниженную под влиянием 50-кратного разведения куриного яичного желтка как источника ЛФХ. В серии 44, которую проводили по схеме: РК → АХ ($5,5 \times 10^{-6}$ М) → РК → желток, 1:50 → желток, 1:50 + АХ → желток, 1:50 + АХ + ги-

стидин ($6,5 \times 10^{-4}$ М) \rightarrow РК \rightarrow АХ \rightarrow РК, мы показали, что желток снижает способность АХ проявлять отрицательный инотропный эффект, но гистидин ($6,5 \times 10^{-4}$ М) не восстанавливает эту способность. Действительно, амплитуда сокращений при 1-м (исходно), 2-м (совместно с яичным желтком), при 3-м (совместно с яичным желтком и гистидином) и 4-м (после удаления желтка и гистидина) тестированиях ацетилхолином составила соответственно $90,7 \pm 2,1\%^{\#}$, $92,9 \pm 3,6\%^{\#}$, $120,0 \pm 3,4\%^{\#}$, $93,4 \pm 3,2\%$ от фона. Косвенно эти данные указывают на то, что механизм нарушения эффективности передачи сигнала от М-ХР внутрь клетки под влиянием ЛФХ может отличаться от подобного механизма в отношении других клеточных рецепторов. Так как в организме ЛФХ может накапливаться в больших количествах и тем самым снижать влияния вагуса на сердце, результаты наших исследований ставят вопрос о поиске веществ, способных предотвратить М-холиноблокирующий эффект ЛФХ.

Исследование, проведенные на изолированном миокарде человека и крысы, указывает на наличие в крови факторов, способных существенно изменять сократимость миокарда (например, ЭАСМ) и его реактивность в отношении агонистов бета-адренорецепторов (ЭСБАР, ЭББАР) и М-холинорецепторов (например, ЭБМХР). Их дальнейшее изучение является весьма перспективным, так как понимание механизма действия этих модуляторов, установление их природы и выявление экзогенных аналогов откроет новые пути для создания эффективных методов лечения заболеваний сердца.

ВЫВОДЫ

1. Амплитуда вызванных сокращений полосок миокарда из ушка правого предсердия пациентов с сердечной недостаточностью III функционального класса находится в прямой зависимости от величины фракции выброса левого желудочка по Тейхольцу (FVJ_T), т. е. сократимость изолированного миокарда отражает сократимость левого желудочка сердца.

2. Амплитуда сокращений полосок миокарда человека возрастает под влиянием 10- и 5-кратных разведений сыворотки крови небеременных женщин (более кратные разведения не влияют на нее), а также при действии тирозина ($5,5 \times 10^{-5}$ и $5,5 \times 10^{-4}$ М), гистидина ($6,5 \times 10^{-5}$ М) и триптофана ($4,9 \times 10^{-4}$ М).

3. Адреналин в концентрациях $5,5 \times 10^{-9}$ М и $5,5 \times 10^{-8}$ М не влияет на амплитуду сокращений полосок миокарда человека, а в концентрациях $5,5 \times 10^{-7}$, 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М дозозависимо повышает ее (константа диссоциации равна 1100 ± 54 нМ). Способность адреналина в концентрации $5,5 \times 10^{-8}$ М оказывать положительный инотропный эффект усиливают 1000-, 500- и 100-кратные разведения сыворотки крови небеременных женщин, а способность адреналина в концентрации $5,5 \times 10^{-6}$ М усиливает 10-кратное разведение и снижает 500-кратное разведение сыворотки крови. Бета-адреносенсибилизирующая и бета-адреноблокирующая активность сыворотки крови объясняется наличием в ней соответственно эндогенного сенсибилизатора бета-АР (ЭСБАР) и эндогенного блокатора бета-АР (ЭББАР).

4. Тирозин, гистидин, триптофан и милдронат как аналоги ЭСБАР, способные усиливать влияние адреналина на бета-адренорецепторы гладких мышц, не повышают положительный инотропный эффект адреналина в опытах с изолированным миокардом человека. Это говорит о селективности действия аналогов ЭСБАР по отношению к бета-АР гладких мышц.

5. Амплитуда вызванных сокращений изолированного миокарда правого желудочка сердца крысы снижается под влиянием лизофосфатидилхолина (2×10^{-9} – 2×10^{-4} М), но возрастает под влиянием 5-кратного разведения сыворотки крови человека. Положительный инотропный эффект сыворотки крови человека, наблюдаемый на изолированном миокарде человека и крысы, частично снижается при ее тепловой денатурации, не меняется при блокаде рецепторов ангиотензина II лозапом ($2,2 \times 10^{-6}$ и $2,2 \times 10^{-4}$ М), но полностью снимается при воздействии верапамила (2×10^{-6} М). В целом, этот эффект объясняется наличием в крови эндогенного активатора сократимости (ЭАСМ), отличного от ангиотензина II и действие которого связано с повышением проницаемости Са-каналов L-типа кардиомиоцитов для ионов Ca^{2+} .

6. Ацетилхолин в концентрациях $5,5 \times 10^{-9}$ и $5,5 \times 10^{-8}$ М не изменяет амплитуду вызванных сокращений изолированного миокарда крысы, а в концентрациях $5,5 \times 10^{-7}$, $5,5 \times 10^{-6}$, $5,5 \times 10^{-5}$ и $5,5 \times 10^{-4}$ М дозозависимо и обратимо понижает ее (константа диссоциации – $5,0 \pm 0,1$ мкМ). Способность ацетилхолина вызывать отрицательный инотропный эффект уменьшается под влиянием 500-, 100-, 50-, 10- и 5-кратных разведений сыворотки крови, что объясняется наличием в ней эндогенного блокатора М-холинорецепторов (ЭБМХР).

7. В опытах с полосками миокарда крысы М-холиноблокирующий эффект 500-кратного разведения сыворотки крови не снижается под влиянием прозерина ($2,9 \times 10^{-6}$ М), но полностью утрачивается при тепловой денатурации; подобный эффект 10-кратного разведения сыворотки частично сохраняется при тепловой денатурации. Лизофосфатидилхолин (ЛФХ) в концентрациях 2×10^{-6} , 2×10^{-5} и 2×10^{-4} М, а также 50-кратное разведение куриного яичного желтка (как источник ЛФХ) подобно сыворотке крови проявляет М-холиноблокирующую активность, которая не снимается гистидином ($6,5 \times 10^{-4}$ М). Все эти данные указывают на то, что ЭБМХР по своей природе отличается от ацетилхолинэстеразы, состоит из термостабильного и термолабильного компонентов, роль которого выполняет ЛФХ.

8. Сыворотка крови человека содержит эндогенный сенсibilизатор и эндогенный блокатор бета-адренорецепторов (ЭСБАР и ЭББАР), эндогенный блокатор М-холинорецепторов (ЭБМХР) и эндогенный активатор сократимости миоцитов (ЭАСМ). Они способны влиять на сократимость миокарда, в том числе за счет модуляции эффективности адренергических и холинергических воздействий на сердце.

Практические рекомендации

1. Изолированный миокард ушка правого предсердия человека можно использовать в экспериментах для поиска новых кардиотропных веществ.

2. Целесообразно провести исследования, направленные на клиническое применение данных о способности тирозина, гистидина и триптофана повышать сократимость миокарда.

3. Необходим поиск селективных сенсibilизаторов бета-адренорецепторов миокарда, так как известные аналоги ЭСБАР (тирозин, гистидин, триптофан и милдронат) не повышают эффективность активации бета-адренорецепторов миокарда человека.

4. Рекомендуются при рассмотрении вопросов патогенеза заболеваний сердца учитывать способность лизофосфатидилхолина, накапливающегося при стрессе, гипоксии, ПОЛ и в других ситуациях, снижать сократимость, адрено- и холинореактивность миокарда.

Список основных работ по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных перечнем ВАК РФ

1. Торопов А. Л., Коротаева К. Н., Самоделкина Е. О., Циркин В. И., Вязников В. А. Влияние лизофосфатидилхолина на адreno- и М-холинореактивность гладких мышц и миокарда // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия биология, клиническая медицина. – 2010. – Т. 8. – Вып. 3. – С. 18–26.

2. Коротаева К. Н., Вязников В. А., Циркин В. И., Костяев А. А. Влияние сыворотки крови человека на сократимость и β -адренореактивность изолированного миокарда человека // Физиология человека. – 2011. – Т. 37, № 3. – С. 83–91.

3. Коротаева К. Н., Циркин В. И. Влияние лизофосфатидилхолина и яичного желтка на амплитуду вызванных сокращений миокарда крысы // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского. Сер. биология. 2011. – № 1. – С. 110–116.

4. Коротаева К. Н., Ноздрачев А. Д., Вязников В. А., Циркин В. И. Влияние тирозина, гистидина, триптофана, милдроната и сыворотки крови человека на амплитуду вызванных сокращений кардиомиоцитов человека и инотропный эффект адреналина // Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 3. – 2011 (биология). – Вып. 2. – С. 45–57.

5. Коротаева К. Н., Ноздрачев А. Д., Циркин В. И. Влияние сыворотки небеременных женщин и лизофосфатидилхолина на эффективность активации М-холинорецепторов миокарда крысы // Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 3 (биология). – 2011. – Вып. 3. – С. 57–65.

Статьи в журналах

6. Торопов А. Л., Коротаева К. Н., Самоделкина Е. О., Циркин В. И., Вязников В. А., Проказова Н. В. Влияние лизофосфатидилхолина, яичного желтка и гистидина на адreno- и М-холинореактивность мышц // Вятский медицинский вестник. – 2010. – № 1. – С. 69–75.

7. Попова О. В., Коротаева К. Н., Пенкина Ю. А., Вязников В. А., Циркин В. И., Трухина С. И. Влияние гистидина на амплитуду сокращений изолированного миокарда человека и показатели кардиоинтервалографии и электроэнцефалографии // Вятский медицинский вестник. – 2010. – № 2. – С. 32–35.

Тезисы материалов конференций

8. Коротаева К. Н. Влияние лизофосфатидилхолина на эффективность активации М-холинорецепторов изолированного миокарда крысы // Молодежь и наука на Севере: Материалы VII молодежной науч. конф. II т. – Сыктывкар: ИФ Коми НЦ УрО РАН, 2008. С. 226–228.

9. Коротаева К. Н., Куншин А. А., Самоделкина Е. О., Сизова Е. Н., Торопов А. Л. Миоцитстимулирующая активность сыворотки крови – ее природа и изменение при артериальной гипертензии // Реабилитация и вторичная профилактика в кардиологии: Тезисы VIII юбилейной рос. науч. конф. – М., 2009. – С. 52–53.

10. Коротаева К. Н., Циркин В. И., Вязников В. А., Костяев А. А. Влияние сыворотки крови человека на инотропный эффект адреналина в опытах с изолированным миокардом человека // Там же. – С. 99–100.

11. Коротаева К. Н. Характеристика сократимости биоптатов изолированного миокарда человека // Фундаментальная наука и клиническая медицина: Тезисы 11-й всерос. медико-биол. конф. молодых исследователей «Человек и его здоровье». – СПб.: СПбГУ, 2010. – С. 94–95.

12. Попова О. В., Коротаева К. Н. Изменение амплитуды вызванных сокращений изолированного миокарда человека, показателей ВСР и ЭЭГ под влиянием L-гистидина // Там же. – С. 158–159.

13. Коротаева К. Н., Вязников В. А., Костяев А. А., Циркин В. И. Бета-адренормодулирующая активность сыворотки крови человека в опытах с изолированным миокардом человека. // Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины: Материалы всерос. науч.-практ. конф. – Киров: КНИИГПК, 2010. – С. 334–335.

14. Попова О. В., Коротаева К. Н. Пенкина Ю. А. Влияние гистидина, триптофана и тирозина на сократимость изолированного миокарда и вариабельность сердечного ритма человека // Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике: Материалы IX всерос. молодежной науч. конф. Сыктывкар: ИФ КомиНЦ УрО РАН, 2010. – С. 136–138.

15. Коротаева К. Н., Циркин В. И. Положительный инотропный эффект сыворотки крови человека и его природа // Науке нового века – знание молодых: Материалы всерос. научно-практ. конф. молодых ученых, аспирантов и соискателей. – Ч. II. Биологические науки, ветеринарные науки, технические науки. – Киров: ВГСХА, 2010. – С. 21–26.

16. Коротаева К. Н., Циркин В. И., Вязников В. А. Влияние аминокислот, милдроната и сыворотки крови человека на сократимость и бета-адренореактивность миокарда человека // Актуальные вопросы современной физиологии и медицины: Материалы межрегион. науч.-практ. конф. – Ижевск: ИГМА, 2010. – С. 56–58.

Список сокращений:

Ад – адреналин

АК – аминокислота

АР – адренорецептор

АХ – ацетилхолин

Вер – верапамил

Гис – гистидин

ЛФХ – лизофосфатидилхолин

Милд – милдронат

РК – раствор Кребса

Сыв – сыворотка крови

Тир – тирозин

Трф – триптофан

ФВЛЖ_т – фракция выброса левого желудочка по Тейхольцу

ХЭ – холинэстераза

ЭАСМ – эндогенный активатор сократимости миоцитов

ЭББАР – эндогенный блокатор бета-адренорецепторов

ЭБМХР – эндогенный блокатор М-холинорецепторов

ЭИСМ – эндогенный ингибитор сократимости миоцитов

ЭСБАР – эндогенный сенсibilизатор бета-адренорецепторов

ЭСМХР – эндогенный сенсibilизатор М-холинорецепторов

Подписано в печать 20.10.2011 г.

Формат 64x80/16.

Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 1,5.

Тираж 100 экз.

Заказ № 1855.

Издательство

Вятского государственного гуманитарного университета,
610002, г. Киров, ул. Красноармейская, 26, т. (8332) 673674

