

EKSPERIMENTINIAI TYRIMAI

Piruvato įtaka žmogaus miokardo elektromechaninio aktyvumo priklausomumui nuo dirginimo dažnio

Vida Gendvilienė¹, Danguolė Zablockaitė¹, Agnė Babušytė¹, Jonas Jurevičius¹, Rimantas Benetis^{1, 2}

¹Kauno medicinos universiteto Kardiologijos institutas

²Kauno medicinos universiteto klinikų Kardi chirurgijos klinika

Raktažodžiai: žmogaus miokardas, dirginimo dažnis, piruvatas, susitraukimo jėga, veikimo potencialai.

Santrauka. Darbo tikslas. Nustatyti energinio metabolizmo substrato piruvato įtaką žmogaus miokardo elektromechaninio aktyvumo priklausomumui nuo dirginimo dažnio. Eksperimentiniai tyrimai atlikti su žmoniu (5 moterys ir 8 vyrai, amžius – nuo 32 iki 83 metų) skilvelio preparatais, paimtais širdies operacijų metu Kauno medicinos universiteto Kardi chirurgijos klinikoje, naudojant standartinę miokardo elektromechaninio aktyvumo registravimo metodiką. Raumenėliai buvo dirginami 2–5 ms trukmės stačiakampiais impulsais 0,2, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ir 3 Hz dažniais. Duomenys buvo registruojami ir analizuojami kompiuteriu naudojant specializuotą programą.

Kontrolės sąlygomis, t. y., perfuzuojant raumenėlius Tyrodė tirpalu ir dirginant 1 Hz dažniu, vidutinė susitraukimo jėga buvo $0,94 \pm 0,18$ mN ($n=12$), pusinis atsipalaidavimo laikas – $178,88 \pm 9,31$ ms ($n=12$), veikimo potencialų trukmė, matuota esant 50 proc. repoliarizacijai – $294,75 \pm 27,95$ ms ($n=9$). Piruvatas (10 mM) padidino susitraukimo jėgą iki $159,9 \pm 13,4$ proc. ($p<0,001$), pusinį atsipalaidavimo laiką – $106,9 \pm 2,2$ proc. ($n=12$) ($p<0,001$), veikimo potencialų trukmę – $111,1 \pm 7,4$ proc. ($n=5$) ($p<0,05$) palyginti su kontrole. Tirpale be piruvato, dirginant raumenėlius 0,2 Hz ir 0,5 Hz dažniu susitraukimo jėga, atsipalaidavimo laikas bei veikimo potencialų trukmė buvo didesnė, kai dirginimo dažnis buvo 1 Hz. Didinant dirginimo dažnį iki 3,0 Hz, šie parametrai mažėjo. Veikiant piruvatui, tirtų parametų priklausomumas nuo dirginimo dažnio nepakito, tik susitraukimo jėga, atsipalaidavimo laikas bei veikimo potencialų trukmė buvo didesnė negu nesant piruvato. Tai rodo, kad, esant širdies nepakankamumui, piruvatas yra veiksmingas inotropinis agentas, pagerinantis miokardo susitraukimo funkciją plačiame dirginimo dažnių diapazone.

Išvadas

Miokardo ląstelių susitraukimo ir atsipalaidavimo procesui ir juos reguliuojančių sistemų, t. y. sarkolemos L-tipo Ca^{2+} kanalų, Ca^{2+} siurblio, Na^+-Ca^{2+} mainų sistemos, sarkoplazminio tinklo (ST) rianodino receptorių (RyR), Ca^{2+} -ATFazės ir fosfolambano funkcionavimui būtina adenozintrifosfato (ATF), kurio didžioji dalis gaminama mitochondrijose oksidacinio fosforilavimo metu, hidrolizės energija (1–3). Sumažėjus viduląstelinei ATF koncentracijai (pvz., miokardo išemijos metu), sutrinka nuo ATF priklausomų ląstelių sistemų funkcionavimas, dėl to padidėja viduląstelinė Na^+ ir Ca^{2+} jonų koncentracija, sumažėja mio-

kardo susitraukimo jėga, atsiranda Ca^{2+} perkrova, vystosi diastolinė kontraktūra, širdies nepakankamumas, aritmijos ir kardiomiocitų nekrozė (4–6).

Sistemų, reguliuojančių viduląstelinę Ca^{2+} koncentraciją, veiklos sutrikimas turi įtakos miokardo susitraukimo jėgai – dirginimo dažnio priklausomumo pobūdžiui. Nustatyta, kad sveiko žmogaus ar eksperimentinių gyvūnų miokardo susitraukimo jėga, didinant dirginimo dažnį net iki 3 Hz, didėja (7–11). Tai yra teigiamas jėgos ir dažnio priklausomumas, susijęs su Ca^{2+} pliūpsnio (trumpalaikiu viduląstelinės Ca^{2+} koncentracijos padidėjimu) (*“Ca²⁺ transient”*) ir ST Ca^{2+} kiekio padidėjimu (8). Esant širdies nepakanka-

mumui, miokardo dirginimas aukštais dažniais mažina susitraukimo jėgą (7, 11–13). Tokiam neigiamam jėgos ir dažnio priklausomumui įtakos gali turėti išskiriamas iš ST Ca^{2+} kiekis, trumpalaikė viduląstelinė Ca^{2+} koncentracija, miofilamentų jautrumo Ca^{2+} sumažėjimas bei Na^+ – Ca^{2+} mainų aktyvumo širdies ląstelėse padidėjimas (13, 14). Taigi miokardo susitraukimo jėgos ir dirginimo dažnio priklausomumo pobūdis yra informatyvus rodiklis, kuriuo remiantis galima įvertinti sistemų, reguliuojančių miokardo ląstelių susitraukimą, veiklą.

Per pastaruosius du dešimtmečius intensyviai tyrinėjami širdies nepakankamumo mechanizmai, ieškoma priemonių, šalinančių susitraukimą reguliuojančių sistemų sutrikimus, kurių randasi vystantis širdies nepakankamumui. Tyrimai atlikti su izoliuotais ir *in situ* širdies preparatais parodė, kad metabolizmo substratas piruvatas, natūralus alifatinis monokarboksilatas ir pagrindinis žinduolių ląstelėse metabolinis tarpininkas didina ATF fosforilavimo potencialą ir taip sustiprina, esant širdies nepakankamumui, jos kontraktinę funkciją (15–19). Be to, piruvatas sukelia žiurkės skilvelio ląstelių viduląstelinės Ca^{2+} koncentracijos bei susitraukimo jėgos trumpalaikį padidėjimą (15), izoliuotos perfuzuojamos triušio širdies sarkoplazminio tinklo sugeriamo bei išlaisvinamo Ca^{2+} jonų kiekio padidėjimą (18). Tačiau metabolizmo substrato piruvato įtaka žmogaus miokardo susitraukimo, atsipalaidavimo bei veikimo potencialų parametrų priklausomumui nuo dirginimo dažnio, esant širdies nepakankamumui, neištyrta. Šio tyrimo tikslas – nustatyti piruvato įtaką žmogaus miokardo elektromechaninio aktyvumo priklausomumui nuo dirginimo dažnio.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Eksperimentai atlikti su žmonių skilvelio preparatais, paimtais širdies operacijų (vainikinių arterijų šuntavimo, aortos ir mitralinio vožtuvų protezavimo arba plastikos operacijų) metu Kauno medicinos universiteto klinikų Kardiokirurgijos klinikoje. Tyrimams su žmogaus širdies preparatais gautas Kauno medicinos universiteto klinikų Nepriklausomos etikos komisijos leidimas (2000 m. vasario mėn. 29 d. protokolas Nr. 8a). Pacientų (5 moterys ir 8 vyrai) amžius – nuo 32 iki 83 metų. Dauguma šių pacientų iki operacijos vartojo kalcio kanalų, β -adrenoceptorių, angiotenziną konvertuojančių fermentų blokatorius, nitratus, diuretikus.

Transportavimui izoliuoti širdies preparatai buvo įdedami į atšaldytą (10°C) Šv. Tomo kardiopleginį tirpalą, kurio sudėtis (mM): NaCl 110, KCl 16, CaCl_2 1,2, MgCl_2 16, gliukozė 5, Hepes 10, pH 7,4. Rau-

menėliai (ilgis – 3–4 mm, storis – 1–1,5 mm) įdedami į eksperimentinę kamerą ir perfuzuojami 6 ml/min. greičiu oksigenuotu (pO_2 560–600 mmHg) Tyrodė fiziologiniu tirpalu, kurio sudėtis (mM): NaCl 137, KCl 5,4, CaCl_2 1,8, MgCl_2 0,9, gliukozė 5, Hepes 10, pH 7,4, temperatūra $36\pm 0,5^\circ\text{C}$. Raumenėliai buvo stimuliuojami 0,2, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ir 3 Hz dažniu, 2–5 ms trukmės stačiakampiais impulsais, du kartus viršijančiais slenkstį. Izometrinis susitraukimas registruotas mechanoelektriniu davikliu $6\text{M}\times 2\text{B}$. Veikimo potencialai registruoti mikroelektrodais, užpildytais 2,5 M KCl tirpalu. Duomenys buvo registruojami ir analizuojami kompiuteriu naudojant specializuotą programą.

Matuota susitraukimo jėga (P), laikas, per kurį raumenėlis atsipalaiduoja 50 proc., t. y. pusinis atsipalaidavimo laikas (t_a), veikimo potencialo trukmė, matuota esant 50 proc. repoliarizacijai (VP_{50}). Visų parametrų kitimai, lyginami su kontrole, kai raumenėlis perfuzuojamas Tyrodė fiziologiniu tirpalu ir dirginamas 1 Hz dažniu, ir apskaičiuoti procentais.

Pateikti duomenų vidurkiai plius/minus standartinė paklaida. Patikimumui įvertinti naudotas Stjudento (t) testas. Duomenys statistškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

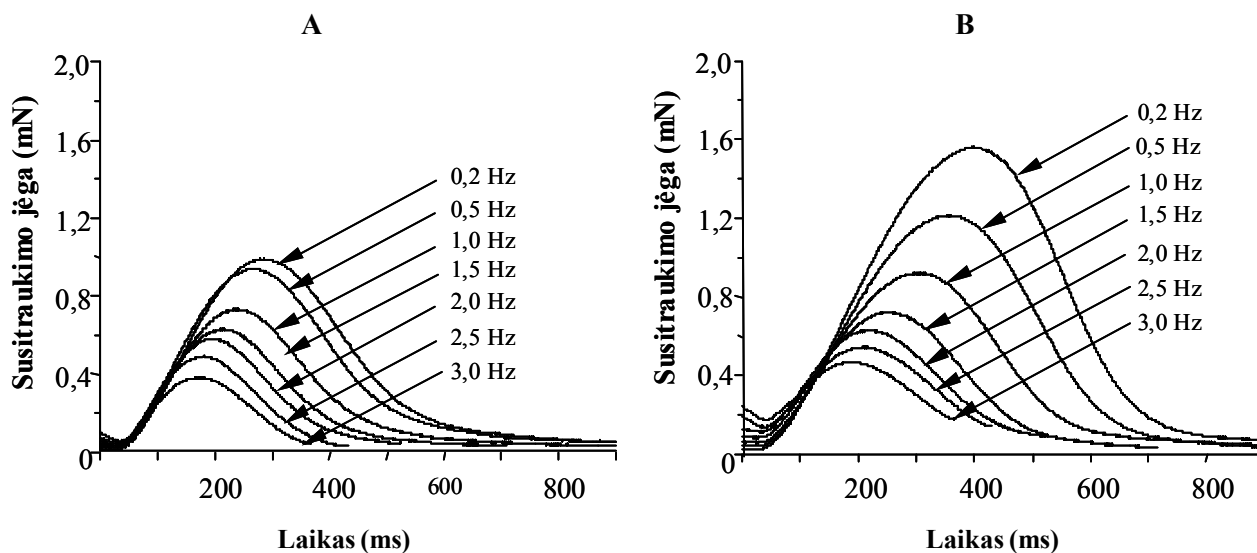
Piruvatas ($\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$) ir kitos eksperimentui vartotos cheminės medžiagos iš firmos „Sigma“ (JAV). Piruvato tirpalas (10 mM) buvo gaminamas ištirpinus atitinkamą kiekį natrio piruvato Tyrodė fiziologiniame tirpale.

Rezultatai

Žmogaus skilvelio raumeninės juostelės 40–50 min. buvo perfuzuojamos Tyrodė fiziologiniu tirpalu ir dirginamos 1 Hz dažniu (kontrolės sąlygos) iki susitraukimo jėga (P) pasiekdavo pradinį lygį. Po to dirginimo dažnis (f) buvo keičiamas pradedant nuo 0,2 Hz ir didinant iki 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 ir 3 Hz. Kontrolės sąlygomis vidutinė susitraukimo jėga buvo $0,94\pm 0,18$ mN ($n=12$), pusinis atsipalaidavimo laikas (t_a) – $178,88\pm 9,31$ ms ($n=12$), veikimo potencialų trukmė, matuota esant 50 proc. repoliarizacijai (VP_{50}) – $294,75\pm 27,95$ ms ($n=9$).

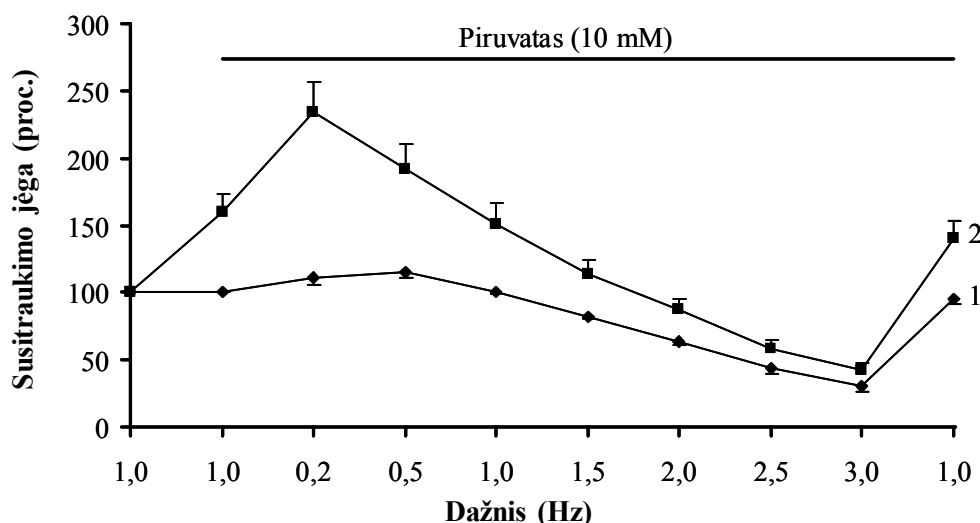
Susitraukimo jėgos kitimo nuo dirginimo dažnio eksperimentiniai pavyzdžiai pateikiami pirmame pav. (A), o duomenų vidurkių kitimas ($n=12$) pateikiamas 2 pav. (1 kreivė).

Dirginant raumenėlius 0,2 Hz ir 0,5 Hz dažniais, susitraukimo jėga nežymiai padidėjo iki $111,6\pm 5,9$ proc. ir $115,1\pm 4,6$ proc., atitinkamai ($p < 0,001$), dirginimo dažnį didinant iki 3 Hz, sumažėjo P iki $29,8\pm 3,9$ proc. ($p < 0,001$) palyginus su kontrole. Gražinus dirginimo dažnį iki 1 Hz, P padidėjo beveik iki pradinio



1 pav. Žmogaus miokardo eksperimentinės susitraukimo kreivės registruotos dirginant raumenėlius įvairiais dažniais

A – perfuzuojant raumenėlį fiziologiniu tirpalu be piruvato; B – su piruvatu (10 mM). Strėlės nurodo dirginimo dažnį (Hz).



2 pav. Žmogaus miokardo susitraukimo jėgos priklausomumas nuo dirginimo dažnio

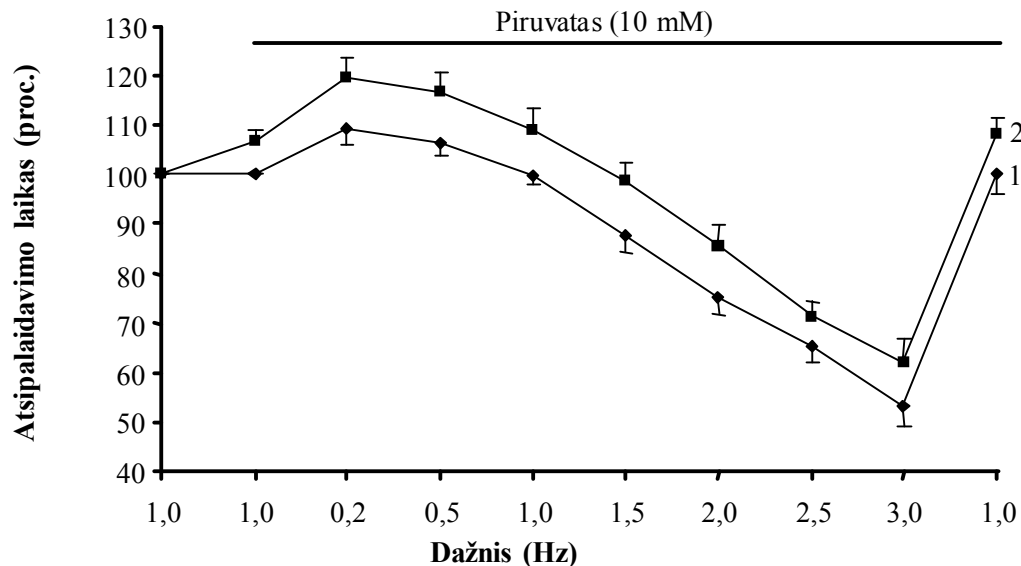
1 kreivė – perfuzuojant raumenėlį fiziologiniu tirpalu be piruvato; 2 kreivė – su piruvatu (10 mM). Abscisių ašyje – dirginimo dažnis (Hz), ordinacių – susitraukimo jėga (apskaičiuota procentais) palyginus su kontrole.

lygio ($95,1 \pm 3,7$ proc.) ($p < 0,05$). Pusinio atsipalaidavimo laikas, dirginant raumenėlius 0,2 ir 0,5 Hz dažniu, padidėjo palyginus su kontrole, tačiau, f didinant iki 3 Hz, t_a sumažėjo (3 pav., 1 kreivė).

Žmogaus skilvelio preparatų eksperimentinis veikimo potencialų kreivių kitimas, priklausomai nuo dirginimo dažnio, pateikiamas ketvirtame paveiksle (A), o jų trukmės vidurkių kitimas pateikiamas penktame paveiksle (1 kreivė) ($n=5$). VP_{50} padidėjusi, dirginant raumenėlį nedideliais 0,2 ir 0,5 Hz dažniais (atitinkamai – iki $147,4 \pm 7,1$ ir $132,9 \pm 4,1$ proc.

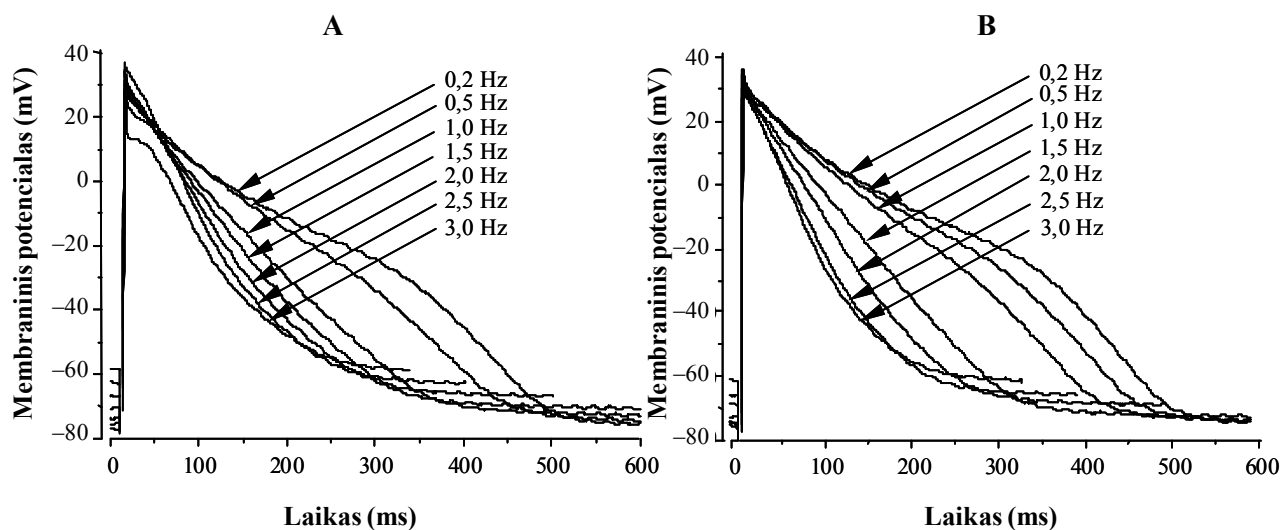
($p < 0,001$)), sumažėjo dažnį didinant iki 3,0 Hz ir buvo lygi $42,2 \pm 7,4$ proc. ($p < 0,001$) palyginus su kontrole. Grąžinus 1,0 Hz dirginimo dažnį, VP_{50} padidėjo beveik iki kontrolės, t. y. $115,8 \pm 15,1$ proc. ($p < 0,05$).

Tiriant piruvato įtaką žmogaus miokardo susitraukimo jėgos priklausomumui nuo dirginimo dažnio, nustatyta, kad piruvatas (10 mM), esant 1 Hz dirginimo dažniui, padidino P iki $159,9 \pm 13,4$ proc. ($n=12$) ($p < 0,001$) palyginus su kontrole. Žmogaus skilvelio preparatų susitraukimo eksperimentinės kreivės pateikiamos pirmame paveiksle (B), o P kitimo duomenų



3 pav. Žmogaus miokardo atsipalaidavimo laiko priklausomumas nuo dirginimo dažnio

1 kreivė – nesant fiziologiniame tirpale piruvato; 2 kreivė – su piruvatu (10 mM). Abscisių ašyje – stimuliacijos dažnis (Hz), ordinačių – atsipalaidavimo laikas (apskaičiuotas procentais) palyginus su kontrole.



4 pav. Žmogaus miokardo eksperimentinės veikimo potencialų kreivės, registruotos dirginant raumenėlius įvairiais dažniais

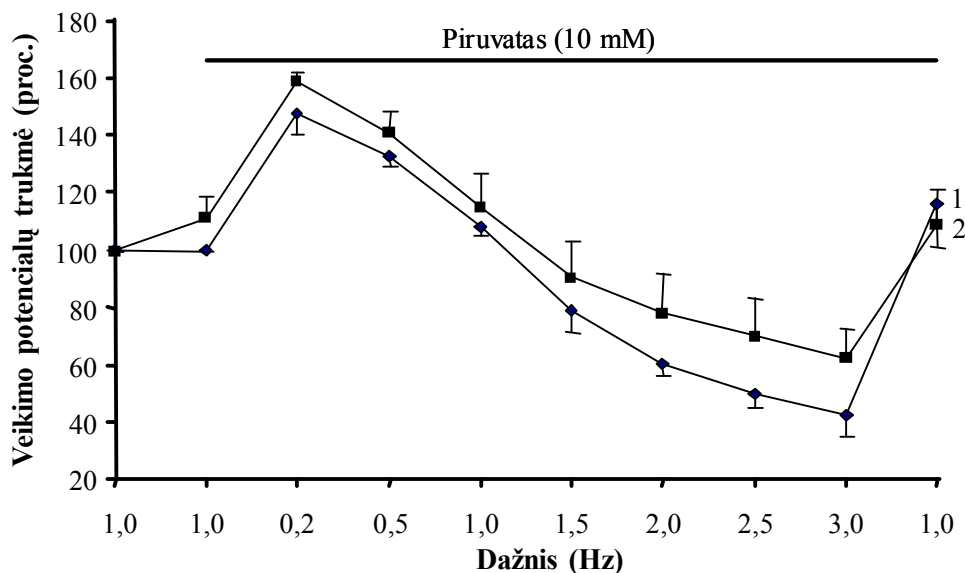
A – nesant fiziologiniame tirpale piruvato, B – su piruvatu (10 mM). Strėlės nurodo dirginimo dažnį (Hz).

vidurkiai, veikiant piruvatui, antrame paveiksle (2 kreivė). Dirginant raumenėlius 0,2 Hz ir 0,5 Hz dažniu, P žymiai padidėjo ir buvo atitinkamai – $234,1 \pm 22,5$ ir $191,8 \pm 17,9$ proc. ($n=12$) ($p<0,001$), palyginus su kontrole. Toliau, didinant f iki 3,0 Hz, P mažėjo, tačiau išliko didesnė visam dirginimo dažnių diapazone lyginant su jos kitimu, kai fiziologiniame tirpale nebuvo piruvato. Grąžinus pradinį 1,0 Hz dirginimo dažnį, P normalizavosi iki $140,2 \pm 13,6$ proc. ($p<0,05$).

Piruvatas (10 mM) nežymiai padidino raumenėlio, dirginamo 1,0 Hz dažniu, atsipalaidavimo laiką iki $106,9 \pm 2,2$ proc. ($n=12$) ($p<0,05$). Raumenėlio atsipal-

aidavimo laiko priklausomumas nuo dirginimo dažnio, veikiant piruvatui, pateikiamas trečiame paveiksle (2 kreivė). Dirginant 0,2 Hz ir 0,5 Hz dažniais, t_a reikšmės buvo didesnės palyginus su kontrole. Didinant f iki 3,0 Hz, atsipalaidavimo laikas sutrumpėjo iki $62,2 \pm 4,7$ proc. ($p<0,001$). Grąžinus 1,0 Hz dažnį, t_a padidėjo beveik iki pradinio lygio, t. y. $108,3 \pm 3,3$ proc. ($n=12$) ($p<0,05$).

Ketvirtame paveiksle (B) pateikiamos eksperimentinės veikimo potencialų kreivės dirginant raumenėlius įvairiais dažniais ir veikiant piruvatui (10 mM). Veikimo potencialų trukmė, veikiant piruvatui ir esant



5 pav. Žmogaus miokardo veikimo potencialų trukmės priklausomumas nuo dirginimo dažnio

1 kreivė – nesant fiziologiniame tirpale piruvato, 2 kreivė – su piruvatu (10 mM). Abscisių ašyje – stimuliavimo dažnis (Hz), ordinačių – veikimo potencialų trukmė (VP_{50}) (apskaičiuota procentais), palyginus su kontrole.

1 Hz dirginimo dažniui, padidėjo iki $111,1 \pm 7,4$ proc. ($n=5$) ($p>0,05$) (5 pav., 2 kreivė). Preparatų dirginimas 0,2 Hz ir 0,5 Hz dažniais padidino VP_{50} iki $159,1 \pm 3,1$ ir $141,1 \pm 6,9$ proc., atitinkamai ($n=5$; $p>0,05$) palyginus su kontrole. Didinant dirginimo dažnius iki 3 Hz, VP_{50} mažėjo, tačiau išliko didesnė negu perfuzuojant raumenėlius tirpalu be piruvato (5 pav., 2 kreivė).

Rezultatų aptarimas

Tiriant žmonių, sergančių širdies nepakankamumu (dažniausiai miokardo išemija ir aortos ar mitralinio vožtuvo patologija), miokardo elektromechaninio aktyvumo priklausomumą nuo dirginimo dažnio, nustatyta, kad susitraukimo jėga, atsipalaidavimo laikas ir veikimo potencialų trukmė padidėja mažų dirginimo dažnių diapazone (0,2 Hz–0,5 Hz), o dirginimo dažnį didinant iki 3 Hz, sumažėjo palyginus su kontrole (1 Hz). Panašų skilvelio ir prieširdžio susitraukimo jėgos, atsipalaidavimo laiko bei veikimo potencialų trukmės priklausomumo nuo dirginimo dažnio pobūdį nustatė ir kiti mokslininkai, tiriantys širdies nepakankamumo mechanizmus (8, 20, 21).

Miokardo susitraukimo jėgos – dirginimo dažnio priklausomumo pobūdį sąlygoja susitraukimą reguliuojančių ląstelės sistemų, t.y., sarkolemos L-tipo Ca^{2+} kanalų, Na^+ - Ca^{2+} mainų sistemos, sarkoplazminio tinklo rianodino kanalų (RyR), Ca^{2+} -ATFazės ir fosfolambano, funkcionavimas. Vartojant bioluminescentinį fotoproteiną ekvioriną miocituose, paimtuose iš sveikų žmonių širdžių, nustatyta koreliacija tarp teigiamo susitraukimo jėgos ir dažnio priklausomumo

bei trumpalaikio Ca^{2+} padidėjimo (13). O kardiomiopatija sergančiųjų širdžių miocituose nustatytas sumažėjęs Ca^{2+} pliūpsnio dydis ir miofilamentų jautrumas Ca^{2+} bei padidėjęs Na^+ - Ca^{2+} mainų aktyvumas (13, 22, 23). Naudojant eksperimentinių gyvūnų širdies nepakankamumo modelius, nustatyta koreliacija tarp sarkoplazminio tinklo Ca^{2+} -ATFazės kiekio sumažėjimo bei padidėjusio Na^+ - Ca^{2+} mainų sistemos aktyvumo bei neigiamo jėgos ir dažnio priklausomumo (24). Sumažėjusį ST baltymo Ca^{2+} -ATFazės kiekį sergančiųjų širdies nepakankamumu miokarde taip pat nustatė G. Hasenfuss ir bendraautorai (25). Tačiau kitų autorių tyrimų duomenys nepatvirtino Ca^{2+} -ATFazės kiekio pakitimo, bet užfiksavo šio baltymo aktyvumo sumažėjimą esant širdies nepakankamumui (26). G. Munch ir kt. nustatė koreliaciją tarp sergančiųjų širdies nepakankamumu miokardo neigiamo susitraukimo jėgos ir dažnio priklausomumo ir ST Ca^{2+} -ATFazės aktyvumo, priklausančio nuo regulatorinio baltymo fosfolambano fosforilinimo, sumažėjimo (26). Defosforilintas fosfolambanas yra Ca^{2+} -ATFazės inhibitorius (27). Mes nustatėme sumažėjusį fosfolambano serino¹⁶ ir treonino¹⁷ liekanų fosforilinimą, šios baltymo liekanos fosforilinamos dalyvaujant proteinkinazei A ir kalcio-kalmodulino kinazei (27). Neseniai atlikti tyrimai, naudojant žiurkės širdies nepakankamumo modelį, patvirtino sumažėjusį fosfolambano serino¹⁶ fosforilinimą ir su tuo susijusį ST Ca^{2+} -ATFazės aktyvumo sumažėjimą (28). Dėl Ca^{2+} -ATFazės aktyvumo arba jos kiekio sumažėjimo, taip pat ir dėl padidėjusio Na^+ - Ca^{2+} mainų sistemos aktyvumo kiekvieno kito stimulo metu iš ST „išme-

tamas“ vis mažesnis Ca^{2+} kiekis, sumažėja viduląstelinė Ca^{2+} jonų koncentracija, reikalinga susitraukimo procesui. Tą patvirtina duomenys, jog širdies nepakankamumu sergančiųjų miokardo atsipalaidavimo laikas yra daug ilgesnis negu sveikų žmonių širdyse (20). Daugumos mūsų atliktų eksperimentų, didinant dirginimo dažnį daugiau 2,0 Hz, raumenėliai nespėdavo atsipalaiduoti, nes tam reikalingas laikas buvo daug ilgesnis už dirginimo laiką, dėl to susitraukimo jėga taip pat mažėjo.

Dar viena susitraukimo jėgos ir dažnio neigiamo priklausomumo priežastis gali būti ir veikimo potencialo trukmės sumažėjimas didinant dirginimo dažnį. Literatūros duomenimis, sveikose širdyse didinant dirginimo dažnį, veikimo potencialų trukmė taip pat mažėja (29), tačiau pažeistose širdyse, kur veikimo potencialo trukmė yra padidėjusi (14), o išskiriamo Ca^{2+} kiekis iš ST yra mažesnis negu sveikose širdyse (13, 20), veikimo potencialo trukmės sumažėjimas galėjo turėti didesnės įtakos susitraukimo jėgos mažėjimui.

Tiriant metabolizmo substrato piruvato įtaką miokardo elektromechaniniam aktyvumui, nustatyta, kad piruvatas, pavertęs didesnę jo koncentraciją (10 mM) negu fiziologinė (piruvato koncentracija plazmoje ir citozolyje yra apie 80–100 μM), didina žmonių, sergančių širdies nepakankamumu, miokardo susitraukimo jėgą bei prailgino atsipalaidavimo laiką ir veikimo potencialų trukmę. Panašų piruvato veikimą, tirdami sveikos širdies ir sergančiųjų širdies nepakankamumu miokardą, nurodo ir kiti autoriai (17, 18). Nustatėme, kad, veikiant piruvatui, susitraukimo jėga žymiai padidėjo esant nedideliams dirginimo dažniams (0,2–0,5 Hz), dirginimo dažnių didinimas sąlygojo susitraukimo jėgos mažėjimą, tačiau ji išliko didesnė negu perfuzuojant raumenėlius tirpalu be piruvato. Veikimo potencialo trukmės kitimo pobūdis priklausomai nuo dirginimo dažnio, veikiant piruvatui, buvo toks pats kaip ir be šio substrato, tačiau VP trukmė išliko didesnė visame tirtų dažnių diapazone.

Literatūros duomenimis, egzogeninis piruvatas didina citozolio fosforilimo potencialą ($[\text{ATF}]/[\text{ADF}][\text{P}_i]$ ir $[\text{PCr}]/[\text{P}_i]$), t. y. citozolio laisvųjų metabolitų koncentracijų santykius (PCr yra fosfokreatinas ir P_i yra neorganinis fosfatas) bei laisvąją energiją, gaunamą ATF hidrolizės metu (DG_{ATP}) (16–18). Taigi miokardo susitraukimo jėgos padidėjimas, veikiant piruvatui, gali būti dėl padidėjusio Ca^{2+} jonų susikaupimo sarkoplazminiame tinkle, kurį lemia padidėjęs dėl fosfolambano fosforilavimo Ca^{2+} -ATFazės aktyvumas. Fosfolambano fosforilinimas, dalyvaujant ATF ir kalmodulino valdomai proteinkinazei bei proteinkinazei A,

stimuliuoja Ca^{2+} -ATPazę (28) ir didina ST Ca^{2+} „sugėrimą“. Be to, fosfokreatino koncentracijos padidėjimas sąlygoja neorganinio fosfato, inhibuojančio aktino-miozino ATFazės aktyvumą, sumažėjimą, dėl to padidėja skersinių tiltelių tarp aktino ir miozino skaičius ir miokardo susitraukimo jėga. Padidėjus viduląstelinei ATF ir fosfokreatino koncentracijoms, veikimo potencialų prailgėjimas gali būti sąlygotas padidėjusios L-tipo Ca^{2+} srovės, padidėjus L-tipo Ca^{2+} kanalų fosforilinimui, o tai padidina „išmetamo“ Ca^{2+} kiekį iš ST per RyR kanalus bei susitraukimo jėgą. Nežymus atsipalaidavimo laiko sulėtėjimas, veikiant piruvatui, gali būti dėl padidėjusio miofilamentų jautrumo Ca^{2+} jonams ir skersinių tiltelių ryšio (25).

Taigi nustatėme, kad sergančiųjų širdies nepakankamumu miokardo susitraukimo jėga, dirginant jį dideliais dažniais, labai sumažėja, o metabolizmo substratas piruvatas didina miokardo susitraukimo jėgą plačiame dirginimo dažnių diapazone. Tai rodo, kad piruvatas gali būti vartojamas kaip veiksmingas inotropinis agentas, pagerinantis miokardo susitraukimo funkciją sergant širdies nepakankamumu. Apie pirmą piruvato skyrimą pacientams, sergantiems NYHA III klasės širdies nepakankamumu, pranešė H. P. Hermann ir bendraautoriai (30). Jie nustatė, kad piruvato (3–6 mM) intrakoronarinė infuzija žymiai padidino tokių ligonių kairiojo skilvelio išstūmimo frakciją ir širdies indeksą, sumažino spaudimą plaučių arterijoje. Manoma, kad tokių pacientų širdies veikla pagerėjo dėl miokardo ląstelių energijos ir nuo jos priklausomų bei širdies ląstelių susitraukimą reguliuojančių sistemų aktyvinimo piruvatu.

Išvados

1. Žmonių, sergančių širdies nepakankamumu, miokardo susitraukimo jėga, atsipalaidavimo laikas ir veikimo potencialų trukmė padidėję mažų dirginimo dažnių diapazone, žymiai sumažėjo dirginant dideliais dažniais.

2. Energinio metabolizmo substratas piruvatas padidino žmonių, sergančių širdies nepakankamumu, miokardo susitraukimo jėgą, prailgino atsipalaidavimo laiką ir veikimo potencialų trukmę. Šių parametrų priklausomumo nuo dirginimo dažnio pobūdis, veikiant piruvatui, nepakito, tačiau jie išliko didesni visame dirginimo dažnių (0,2–3 Hz) diapazone.

3. Piruvatas yra veiksmingas inotropinis agentas, kuris pagerina miokardo ląstelių susitraukimo funkciją, esant širdies nepakankamumui, plačiame dirginimo dažnių diapazone.

Effect of pyruvate on the dependence of electromechanical activity on stimulation frequency in human myocardium

Vida Gendvilienė¹, Danguolė Zablockaitė¹, Agnė Babušytė¹, Jonas Jurevičius¹, Rimantas Benetis^{1, 2}

¹Institute of Cardiology, Kaunas University of Medicine

²Clinic of Cardiac Surgery, Kaunas University of Medicine Hospital, Lithuania

Key words: human myocardium, stimulation frequency, pyruvate, contraction force, relaxation time, action potentials.

Summary. The aim of the study was to determine the effect of pyruvate, a substrate of energetic metabolism, on the dependence of electromechanical activity on stimulation frequency in human myocardium.

The experiments were performed on human ventricle myocardium from patients undergoing cardiac corrective open heart surgery at Clinic of Cardiac Surgery in Kaunas University of Medicine by using standard method of registration of myocardium electromechanical activity. The stimulation frequency of myocardial strips were 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3 Hz, duration of pulses –2–5 ms. In control, i.e. at perfusion of myocardial strips by Tyrode solution and stimulation frequency 1 Hz, an average of contraction force (P) was 0.94 ± 0.18 mN (n=12), half time of relaxation (t_a) – 178.88 ± 9.31 ms (n=12), and action potential duration measured at 50% repolarization level (VP_{50}) – 294.75 ± 27.95 ms (n=9). Pyruvate (10 mM) increased P to $159.9 \pm 13.4\%$ (p<0.00), t_a – $106.9 \pm 2.2\%$ (n=12) (p<0.001), and VP_{50} – $111.1 \pm 7.4\%$ (n=5) (p<0.05), as compared to control.

In the absence of pyruvate values of P, t_a and VP_{50} of myocardial strips were higher at 0.2 Hz and 0.5 Hz and lower at 3 Hz compared with those at 1 Hz of stimulation frequency. Although the dependence of these parameters on stimulation frequency in the presence of pyruvate (10 mM) was not altered but their values were persistently increased at all stimulation frequencies. The present data indicate that pyruvate is an effective inotropic agent, which can improve contractility function in wide-ranging diapason of stimulation frequency in failing human heart.

Correspondence to V. Gendvilienė, Institute of Cardiology, Kaunas University of Medicine, Sukilėlių 17, LT-50009 Kaunas, Lithuania. E-mail: membiof@kmu.lt

Literatūra

1. Richard S, Leclercq F, Lemaire S, Piot C, Nargeot J. Ca^{2+} currents in compensated hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;37:300-11.
2. Maier LS, Barckhausen JW, Baryalei M, Pieske B. Ca^{2+} handling in isolated human atrial myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H952-8.
3. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415:198-205.
4. Katoh H., Satoh H., Nakamura T. The role of Na^+/H^+ exchange and the Na^+/K^+ pump in the regulation of $[Na^+]_i$ during metabolic inhibition in guinea pig myocytes. *Biochem Biophys Research Comm* 1994;203:93-8.
5. Lancaster MK, Harrison SM. Changes in contraction, cytosolic Ca^{2+} and pH during metabolic inhibition and upon restoration of mitochondrial respiration in rat ventricular myocytes. *Exp Physiol* 1998;83:349-60.
6. Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Moe GW. Mitochondrial pathology in cardiac failure. *Cardiovasc Res* 2001;49:17-26.
7. Inagaki M, Yokota M, Izawa H, Ishiki R, Nagata K, Iwase M, et al. Impaired force-frequency relations in patients with hypertensive left ventricular hypertrophy. A possible physiological marker of the transition from physiological to pathological hypertrophy. *Circulation* 1999;99:1822-30.
8. Pieske B, Maier LS, Bers DM., Hasenfuss G. Ca^{2+} handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 1999;85:38-46.
9. Reuter H, Zobel C, Brizius K, Bolck B, Schwinger RHG. Effect of inotropic interventions on the force-frequency relation in the human heart. *Basic Res Cardiol* 1998;93:76-85.
10. Bavendiek U, Brixius K, Munch G, Zobel C, Muller-Ehmsen J, Schwinger R. Effect of inotropic interventions on the force-frequency relation in the human heart. *Basic Res Cardiol* 1998; 93 Suppl 1:76-5.
11. Crozatier B. Force-frequency relations in nonfailing and failing animal myocardium. *Res Cardiol* 1998;93:46-50.
12. Izawa H, Yokota M, Takeichi Y, Inagaki M, Nagata, Iwase M, et al. Adrenergic control of the force-frequency and relaxation-frequency relations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1997;96:2959-68.
13. Schlotthauer K, Schattmann J, Bers DM, Minan K, Just H, Hasenfuss G, Pieske B. Frequency-dependent changes in contribution of SR Ca^{2+} to Ca^{2+} transients in failing human myocardium assessed with ryanodine. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30:1285-94.
14. Priebe L, Beuckelman D. Stimulation study of cellular electric properties in heart failure. *Circ Res* 1998;82:1206-23.
15. Martin BJ, Valdivia HH, Bünger R, Lasley RD, Mentzer RM. Pyruvate augments calcium transients and cell shortening in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*

- 1998;274(43):H8-17.
16. Mallet RT, Sun J. Mitochondrial metabolism of pyruvate is required for its enhancement of cardiac function and energetics. *Cardiovasc Res* 1999;42:149-61.
 17. Mallet RT. Pyruvate: Metabolic protector of cardiac performance. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223(2):136-48.
 18. Hermann HP, Zeitz O, Lehnart SE, Keweloh B, Datz N, Hasenfuss G, et al. Pyruvate potentiates inotropic effects of isoproterenol and Ca^{2+} in rabbit cardiac muscle preparations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H702-8.
 19. Hermann HP, Zeitz O, Lehnart SE, Keweloh B, Datz N, Hasenfuss G, et al. Potentiation of beta-adrenergic inotropic response by pyruvate in failing human myocardium. *Cardiovasc Res* 2002;53:116-23.
 20. Hasenfuss G, Holubarsch C, Hermann H, Astheimer K, Pieske B, Just H. Influence of the force-frequency relation on hemodynamics and left ventricular function in patients with non-failing hearts and in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1994;15:164-70.
 21. Piot C, Lemaire S, Albat B, Seguin J, Nargeot J, Richard S. High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents. *Circulation* 1996;93:120-8.
 22. Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch Ch, Weirich J, Posival H, et al. Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995;92:1169-78.
 23. O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kaab S, Tunin R, Marban E. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure. *Circ Res* 1999;84:562-70.
 24. Piacentino V, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas R, Margulies KB, Bers DM, et al. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* 2003;92(6):651-8.
 25. Hasenfuss G, Maier L, Hermann HP, Lüers C, Hünlich M, Zeitz O, et al. Influence of pyruvate on contractile performance and Ca^{2+} cycling in isolated failing human myocardium. *Circulation* 2002;105:194-9.
 26. Munch G, Bolck B, Brixius K, Reuter H, Mehlhorn U, Bloch W, et al. SERCA2a activity correlates with the force-frequency relationship in human myocardium. *Am J Physiol* 2000;278:H1924-32.
 27. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature* 2003;4:566-77.
 28. Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, Bükenes J, Tønnessen T, Holt E, et al. Reduced level of serine¹⁶ phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium; a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res* 2002;53:382-91.
 29. Li GR, Yang B, Feng J, Bosch RF, Nattel S. Transmembrane I_{Ca} contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1999;276:98-106.
 30. Hermann HP, Pieske B, Schwarzmüller E, Keul J, Just H, Hasenfuss G. Haemodynamic effects of intracoronary pyruvate in patients with congestive heart failure: An open study. *Lancet* 1999;353:1321-3.

Straipsnis gautas 2004 05 14, priimtas 2004 10 01
Received 14 May 2004, accepted 1 October 2004