

УДК 577.352

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ БЕТА-БЛОКАТОРОВ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

С. С. ОГАНЕСЯН, Ц. М. АВАКЯН, А. А. ШАГИНЯН,  
Л. Г. МИКАЕЛЯН, М. Х. МИНАСЯНЦ

В статье обсуждаются полученные в последние годы экспериментальные данные (при совместных исследованиях Ин-та кардиологии Мин. здрав. АрмССР, ЕрФИ, ЕрГУ и СКВ НКГСПС АН АрмССР) о взаимодействии катехоламинов, Са-антагонистов и тропонин-тропомозинового комплекса с модельными липидными мембранами и кардиомиоцитами. На основании этих данных делается вывод, что бета-блокаторы, антиритмики и Са-антагонисты при сочетанном применении в целях профилактики и ограничения размеров инфаркта миокарда оказывают значительное влияние на упорядоченность структуры липидов в биемембранах.

*Ключевые слова:* инфаркт миокарда, бета-блокаторы, фосфолипидные мембраны.

Рост сердечно-сосудистых заболеваний обусловил большой интерес к кардиоактивным бета-блокаторам и антагонистам Са-потока кардиомиоцитов, которые оказались способными предупреждать инфарктное поражение при ишемической болезни сердца [16, 17, 24, 25]. С тех пор как в 1964 г. Причард [23] предложил применять указанные средства для лечения гипертонии, накопилось много сведений об их влиянии на функцию Са-каналов и стабильность мембран, чем и объясняется их защитное действие при инфаркте миокарда [8, 21, 29]. Подобная точка зрения основана на представлении, что катехоламины, в больших концентрациях вызывающие повреждение миокарда, могут индуцировать нарушения в липидных структурах мембран кардиомиоцитов [1, 26], тогда как бета-блокаторы повышают стабильность клеточных мембран [11, 13]. Однако механизм защитного действия бета-блокаторов остается недостаточно ясным. Не решен ряд вопросов о локализации их эффекта на миокардиальной клетке.

Разработка указанных вопросов требует также уточнения внутриклеточных первичных нарушений, ведущих к повреждению миокарда. Наиболее распространенным в настоящее время является представление, согласно которому первичными могут быть изменения проницаемости цитоплазматических мембран. Естественно, что изменениям могут подвергаться как интегративные мембранные белки, так и липидные структуры. Во всяком случае, эти сдвиги могут привести не только к нарушениям энергообразовательных реакций, но и к так называемой Са-перегрузке миокардиальной клетки, вследствие проникновения катиона через мембраны с нарушенной проницаемостью. Са<sup>2+</sup> ведет уже к активированию фосфолипаз и нейтральных протеаз, которые «завершают» разрушение ультраструктур. В этой связи привлекают внимание полученные недавно данные о стабилизирующем действии бета-блокаторов на белковые компоненты клеточных мембран и об отсутствии подобного влияния (пропраналол) на липосомы [28].

Перед нами стояла задача выяснения возможности бета-блокаторов реагировать с белками, которые в мембранах могут участвовать в переносе ионов Са. Такими белками служат мышечные, так называемые регуляторные, белки, в частности тропонин-тропомиозиновый комплекс (ТН—ТМ), принадлежащий к семейству Са-связывающих белков, широко представленных в различных клеточных структурах [9, 10, 22] в виде регуляторных компонентов ряда мембранных и цитоплазматических ферментов, осуществляющих действие ионов Са на их каталитическую активность [5, 27, 30].

В последние годы сотрудниками лаборатории кардиологии НИИ кардиологии МЗ АрмССР удалось показать, что тропонин реагирует с катехоламинами по типу рецептор—активатор и претерпевает при этом конформационные изменения. Наблюдается повышение интенсивности УФ-флуоресценции, «голубое смещение» максимума квантовой эмиссии, изменение величины УФ-светопоглощения. Характерно, что такое взаимодействие имеет место в препаратах только Са-связывающих белков миофибрилл миокарда, а именно тропонина и легких полипептидных цепей сократительного белка миозина. Что касается очищенных препаратов миозина и тропомиозина, а также бычьего альбумина, то у них такие свойства не были обнаружены [4, 18, 19].

Было также показано [20], что бета-блокаторы и катехоламины вызывают изменения в физико-химических свойствах Са-связывающих белков, сходные с теми, которые индуцируются  $\text{Ca}^{2+}$ . По-видимому, они взаимодействуют с низкочувствительными Са-связывающими участками на тропонине и на легких цепях миозина с  $K_d \sim 10^{-5}$  М. На основании полученных данных было сделано заключение [18, 19], что Са-связывающие белки одновременно являются адренорецепторами, способными также связывать альфа- и бета-блокаторы. Это заключение недавно было подтверждено другими авторами в опытах с применением радиолиганд на Са-переносящих каналах клеточных мембран [12]. С другой стороны, было установлено, что Са-антагонист  $\text{C}^{14}$ -фелодипин связывается с тропонином, а также с другим Са-регуляторным белком— кальмодулином именно на низкочувствительном участке связывания  $\text{Ca}^{2+}$  [25]. С помощью ЯМР-спектроскопии авторам удалось выявить изменение конформации кальмодулина в результате этого взаимодействия. Таким образом, по-видимому, белки мембран, ответственные за медленный компонент Са-потока, являются чувствительными к адренергическим агонистам и антагонистам и могут играть определенную роль в механизме защитного действия бета-блокаторов при инфарктном повреждении миокарда. В связи с этим представляло большой интерес создание белково-липидных моделей мембран с использованием этих белков при анализе механизма действия бета-блокаторов.

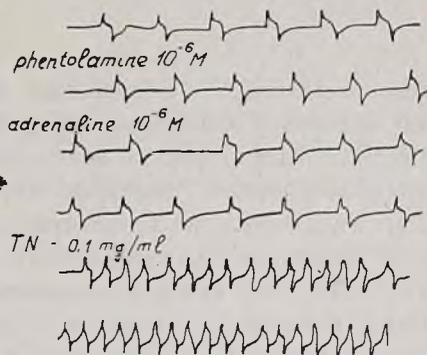
Отметим, что в специальных сериях экспериментов [20] удалось показать возможность включения тропонина, а также тропонин-тропомиозинового комплекса в мембраны кардиомиоцитов. На рис. 1 [20] видно, что после замедления частоты сокращения клеток в культуре миокардиальной ткани, вызванного внесением в среду блокато-

ров адренорецепторов и Са-антагонистов, последнюю можно восстановить внесением в среду тропонина. При этом восстанавливаются хромотропные эффекты катехоламинов и ионов Са. Недавно Бариян и Оганесян показали сходное действие тропонина на сокращения изолированного волокна полоски миокарда, используя метод микромеханографии.

Каким же образом Са-связывающие белки восстанавливают эффект катехоламинов? Могут ли они быстро встраиваться в мембрану и служить там дополнительными адренорецепторами или одновременно создавать новые адреночувствительные Са-каналы? Все эти вопросы весьма важны для дальнейшего исследования действия бета-блокаторов.

В лаборатории радиационной биофизики Ереванского физического института было изучено взаимодействие тропонин-тропомиозинового комплекса с искусственными бислойными мембранами (БЛМ). Мембранообразующий раствор состоял из 2%-ного общего липида мозга быка в смеси гептана с деканом. Конечная концентрация белка составляла  $1,8 \times 10^{-7}$  М, рН 7,25. Методом фиксации потенциала было показано, что внесение в среду белка приводит к образованию

Рис. 1. Фотоэлектрическая регистрация автоматических сокращений клеток в культуре эмбрионального миокарда. Снятие эффекта альфа-блокатора фентоламина и восстановление положительного хронотропного действия адреналина при внесении в среду Са-связывающего белка мышц — тропонина [20].



ионнеспецифических каналов, осуществляющих перенос ионов Са. Наблюдаемые скачки тока в этих условиях составляют от 1 до  $3 \times 10^{-12}$  а и длительность их существования достигала минуты и больше.

Из полученных результатов нетрудно заключить, что ТН-ТМ взаимодействует с бислойной мембраной, способствуя трансмембранному переносу ионов Са и других ионов, способных замещать его на Са-связывающих центрах. Характерно, что тропомиозин, который не может связывать  $\text{Ca}^{2+}$ , как и в модельных опытах на культуре клеток миокарда, не влияет на ионную проницаемость БЛМ.

В свете современных представлений о каналоформерах и роли ионофоров в функционировании клеточных мембран весьма важно было получить информацию о молекулярно-структурных аспектах взаимодействия Са-связывающих белков с липидными компонентами.

Шагиняном с сотр. [6] было исследовано влияние ТН-ТМ, полученного в НИИ кардиологии МЗ АрмССР, на структуру бимолекулярных слоев модельного липидоподобного вещества — пентадецилсульфоната натрия, а также лецитина в жидкокристаллической фазе. С этой

целью был использован метод дифракции рентгеновских лучей под малыми углами.

Известно, что в высококонцентрированных водных растворах амфифильных веществ, в том числе и полярных липидов, из-за гидрофобно-гидрофильных взаимодействий реализуются различные жидкокристаллические фазы: ламеллярная и гексагональная [31].

На рис. 2 представлены кривые зависимости межплоскостного расстояния ламеллярной фазы от отношения концентрации воды к концентрации вещества, образующего жидкий кристалл. Кривые расчи-

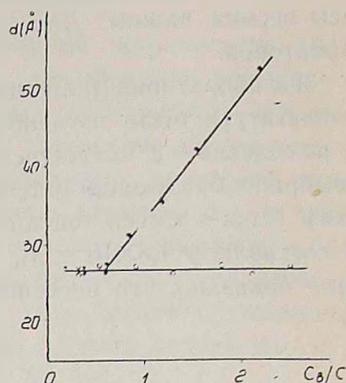


Рис. 2. Зависимость межплоскостного расстояния от отношения концентрации воды (С) к концентрации ПДСН+добавка (С<sub>0</sub>). Пентадецилсульфонат+вода (1). Пентадецилсульфонат+вода+тропонин-тропомиозинный комплекс мышц (2) [6].

таны на основании полученных дифракционных картин. Концентрацию белкового комплекса ТН-ТМ в системе варьировали в пределах 0—1,2%. Максимальная интенсивность рефлексов ламеллярной фазы мономолекулярной толщины наблюдалась при концентрации белка 1,1%. Увеличение же концентрации воды в системе в присутствии белка не изменяло межплоскостного расстояния, находящегося в пределах 27 Å°. Это явление возможно при предположении, что молекулы ТН-ТМ комплекса, внедряясь в пространства между БЛМ, как бы мешают молекулам воды проникнуть туда, приводя к «сшиванию» БЛМ. Такой эффект не наблюдается при действии глобулярного белка—сывороточного альбумина. Лишь в больших концентрациях, выше 5%, этот белок начинает влиять на надмолекулярную структуру жидкокристаллической системы липид—вода. Нужно полагать, что действие Са-связывающего комплекса ТН-ТМ характеризуется гидрофобным взаимодействием с липидной фазой и ведет к усилению контакта между соседними БЛМ.

Таким образом, на основании полученных данных можно допустить, что, несмотря на полианионный характер тропонина и ему подобных Са-связывающих белков, он достаточно сильно взаимодействует с липидами, стимулируя процесс переноса Са<sup>2+</sup> и сходных с ним катионов через клеточные мембраны. Учитывая их способность служить рецепторами катехоламинов и бета-блокаторов, а также рецепторами фармакологических ингибиторов медленного компонента входящего тока Са<sup>2+</sup> в миокардиальные клетки, можно допустить, что в фармакологическом и профилактическом эффекте бета-блокаторов Са-связывающие белки мембран играют ключевую роль. Однако остается неясным удельное значение этих белков в механизме их действия, ибо такое заключе-

ние не исключает предположения о прямом влиянии бета-блокаторов на липидные компоненты мембран миокардиальных клеток.

В литературе имеются указания на то, что ингибирование автоматических сокращений клеток в миокардиальной культуре скорее зависит от липофильности данного бета-блокатора, чем от вызванного им уменьшения внутриклеточной концентрации цАМФ [15]. Сравнение двух из них, атенолола и пропраналола, показало, что более эффективным является пропраналол, который почти в 1000 раз липофильнее [14]. Однако влияние указанных веществ на упорядоченность молекулярной структуры и ионную проницаемость липидных слоев изучено весьма недостаточно. Фактически направление исследований в этой области диктуется ставшим традиционным представлением, что влияние бета-блокаторов осуществляется главным образом через адренорецепторные молекулы мембран, в частности, через аденилатциклазу цАМФ.

С целью изучения вероятности непосредственного взаимодействия катехоламинов и их антагонистов на липидные мембраны было испытано влияние  $\alpha$ -адреналина,  $\alpha$ -норадреналина и dL-пропраналола на электрические характеристики мембран и на молекулярную организацию лиотропных жидких кристаллов.

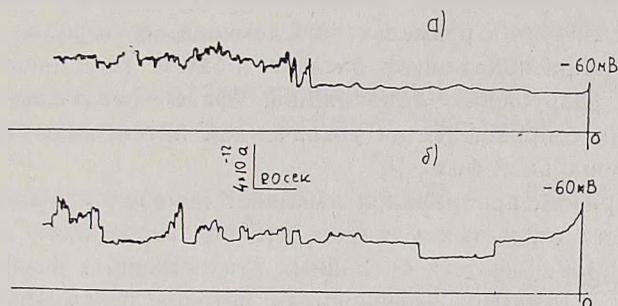


Рис. 3. Запись тока через БЛМ в присутствии  $1,6 \times 10^{-5}$  М а) пропраналола и б) лидокаина. Видны спонтанные переходы уровней проводимости БЛМ и флуктуации тока.

Из рис. 3 видно, что бета-блокатор пропраналол ( $1,6 \times 10^{-5}$  М) в бислоиных искусственных мембранах индуцирует образование короткоживущих ионных каналов, флуктуирующих в течение нескольких секунд. Величина скачка тока при этом составляет около  $2-5 \times 10^{-13}$  а. С другой стороны, пропраналол уменьшает длительность жизни открытых каналов (одноканальное проведение) и удлиняет время жизни двух проводимых каналов. Более высокие дозы пропраналола вызывают четкое снижение омического сопротивления липидных бислоев.

Весьма характерно, что сами катехоламины в тех же концентрациях не оказывают значительного влияния на электрические характеристики искусственных фосфолипидных мембран в сходных условиях измерений.

Следовательно, можно было утверждать, что бета-блокаторы не только способны индуцировать конформационные изменения в ионтран-

каином в структуре БЛМ, делают их более чувствительными к электрическому полю. В зависимости от концентрации они могут как стабилизировать, так и дестабилизировать структуру мембраны. Влияние их на физико-химические свойства липидных мембран проявляется уже при очень низких концентрациях. Механизм их стабилизирующего действия на БЛМ требует дальнейших исследований.

Резюмируя полученные экспериментальные данные, можно заключить, что бета-блокаторы, антиритмики и Са-антагонисты (ингибиторы медленного входа тока  $Ca^{2+}$ ) при сочетанном применении как для профилактики, так и в целях ограничения размеров инфаркта миокарда оказывают значительное влияние на упорядоченность структуры липидных слоев биомембран. Вызывая определенные изменения в их структуре, они также влияют на чувствительность мембран к различным ионам. В частности, определенную роль может играть их влияние на состояние Са-связывающих белков, которые, являясь адренорецепторами, по-видимому, в то же время представляют собой структурные компоненты Na- и Са-каналов в мембранах миокардиальной клетки.

Авторы благодарны Акопу Азаряну за большую помощь в работе.

Институт кардиологии МЗ Армянской ССР,  
Ереванский физический институт, ГКИАЭ СССР,  
СКБ НКГСПС АН Армянской ССР,  
Ереванский государственный университет

Поступило 12.V 1983 г.

## ՄԻՈԿԱՐԴԻ ԻՆՖԱՐԿՏԻ ԴԵՊՐԵՍԻՄ ԲԵՏԱ-ԲԼՈԿԱՏՈՐՆԵՐԻ ՊԱՇՏՊԱՆԻՉ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՖԻԶԻԿԱ-ՔԻՄԻԱԿԱՆ ԱՍՊԵԿՏՆԵՐԸ

Ս. Ս. ՂՈՎԱՆՆԵՍՅԱՆ, Ծ. Մ. ԱՎԱԳՅԱՆ, Ա. Ա. ՇԱՀԻՅԱՆ, Լ. Գ. ՄԻՔԱԵԼՅԱՆ,  
Մ. Խ. ՄԻՆԱՍՅԱՆՑ

Ուսումնասիրվել է բետա-բլոկատորների ազդեցությունը Са-ին կապող սպիտակուցների, ճարպերի և ֆոսֆոլիպիդային արհեստական երկշերտ թաղանթների հատկությունների, ինչպես նաև վերամոլեկուլային կառուցվածքի վրա: Ճարպային թաղանթների էլեկտրահաղորդականությունը, իոնական թափանցելիությունը և ուսումնասիրված ճանապարհների փոքր անկյան տակ դիֆրակցիայի ունակությունը կրում են զգալի փոփոխություններ բետա-բլոկատորների ներկայության հետևանքով: Այսպիսով, բետա-բլոկատորները ցուցաբերում են ճարպային թաղանթների վիճակի վրա ազդելու ունակություն, ձևափոխելով նրանց: Այս փաստը մեծ դեր է խաղում նման կարդիոակտիվ միացությունների ներգործության մեխանիզմում:

## PHYSICO-CHEMICAL ASPECTS OF THE BETA-BLOCKERS PROTECTIVE ACTION DURING THE MYOCARDIAL INFARKTS

S. S. OGANESSYAN, Ts. M. AVAKYAN, A. A. SCHAHYNYAN,  
L. G. MYKAELYAN, M. Ch. MYNASYANTZ

The influence of beta-blockers on the properties of Ca-tying proteins, fats, phospholipid artificial bilayer membranes and also on overmolecule structure has been investigated. Beta-blockers have significant effect on electric conduction, ion penetration and x-ray diffraction

ability of fatty membranes. Thus, beta-blockers can influence on fatty membranes and change their regularity, which plays a great role in the mechanism of action of such cardioactive combinations.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Амелин Д. В., Анжелевич И. В. Архив патол., 25, 25—30, 1963.
2. Баринян С. Б., Кайфаджян М. А., Тикунов Б. А. Тез. I Всесоюзн. биофиз. съезда, 2, 1982.
3. Микаелян Л. Г., Аджян С. А. Тез. III респ. научн. сессии по вопросам биофизики, 1982.
4. Оганесян С. С., Баринян С. Б., Давтян Ж. С. Всесоюзн. конф. «Физиол. и биохим. медиаторных процессов». 196, М., 1976.
5. Перцова М. Н. Успехи совр. биологии, 93, 382—396, 1982.
6. Саркисян А. Г., Минасянц М. Х., Шагиян А. А., Оганесян С. С. Биофизика, 26, 375, 1981.
7. Boström S. L., Ljung B. et al. Nature, 292, 777—778, 1981.
8. Bush L., Vogel W. et al. J. Molec. Cell. Cardiol., 11, 1, 12, 1979.
9. Cheung W. Y. Science, 207, 19—27, 1980.
10. Collins J. H. Biochem. Biophys. Res. Commun., 58, 301—308, 1974.
11. Fitzeratd J. D. Acta Cardiol. Suppl., 15, 199—216, 1972.
12. Frelin C., Vigna P., Lanzaunski M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 106, 967—973, 1982.
13. Godin T., Au T., Garnett M. J. Molec. Cell. Cardiol., 11, 261—274, 1979.
14. Hansch C., Fujita T. J. Amer. Chem. Soc., 86, 1616—1624, 1964.
15. Higgins T. C., Allsop D., Bailey P. J. Molec. Cell. Cardiol., 11, 101—107, 1979.
16. Jasmok G. J., Warltier D. C., Gross C. et al. Basic Resear. Cardiol., 73, 559—570, 1978.
17. Lossnitzer K. Symposium Advances in Cardiovascular Care, 17, London, 1981.
18. Oganessyan S. S., Barinyan S. B. et al. J. Molec. Cell. Cardiol., 10, 1, 71, 1978.
19. Oganessyan S. S., Barinyan S. B. et al. Ibid., 12, 1, 115, 1980.
20. Oganessyan S. S., Barinyan S. B., Gevorkyan R. A. et al. Advances in Myocardiology, 3, 439—454, N. Y., 1982.
21. Opie L. H. J. Molec. Cell. Cardiol., 11, 1073—1094, 1979.
22. Pechère J., Capony I., Ryden L. Europ. J. Biochem., 23, 421—430, 1971.
23. Prichard B. N. Brit. Med., J., 1, 1227—1228, 1964.
24. Prichard B. N. Betablocker; Betadrenol Symposium, 126—146, Frankfurt, 1977.
25. Reimer K. R., Rasmussen M., Jenings R. B. Amer. J. Cardiol., 37, 500—527, 1976.
26. Rona G., Chappel C. et al. Arch. Pathol., 67, 443—450, 1959.
27. Seamon K. S., Daly J. W. Life Science, 30, 1457—1464, 1982.
28. Surewičz K., Fijałkowska I., Leyko W. Biochem. Pharm., 30, 839—842, 1981.
29. Tomotke H., Ross I., Franklin D. Amer. J. Cardiol., 41, 689—696, 1978.
30. Wetaker R., Klinger R., Cumme G. et al. Biochem. Intern., 4, 385—390, 1982.
31. Zuzzati V., Mistacchi H., Skoulios A. Nature, 180, 600—602, 1967.