

# КАРДИОЛОГИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

УДК 616.001.16-092.19

Т. В. Ласукова, Л. Н. Маслов, С. В. Низкодубова, А. С. Горбунов,  
Е. Жан, Т. Криз

## РОЛЬ МЮ-ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ СЕРДЦА К ДЕЙСТВИЮ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ

Исследовали эффект активации  $\mu$ -опиоидных рецепторов (ОР) *in vivo* и *in vitro* на толерантность изолированного перфузируемого сердца крыс к глобальной ишемии (45 мин) и реперфузии (30 мин). Стимуляция  $\mu$ -ОР *in vivo* путем внутривенного введения агониста DAMGO уменьшала реперфузионный выброс креатинкиназы по сравнению с контрольной группой. Кардиопротекторный эффект не проявлялся после блокады  $\mu$ -ОР. Активация  $\mu$ -ОР *in vitro* с помощью добавления в перфузионный раствор до ишемии селективных агонистов DAMGO или DALDA в концентрации 170 нМ существенно не отразилась на сохранении целостности мембран кардиомиоцитов. В то же время использование  $\mu$ -агониста DALDA в меньшей концентрации (33 нМ) сопровождалось выраженным цитопротекторным эффектом. Таким образом, активация  $\mu$ -рецепторов обеспечивает увеличение устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям, которое зависит от способа введения и используемой концентрации препарата.

**Ключевые слова:** *мю-опиоидные рецепторы, изолированное сердце, ишемия, реперфузия.*

К настоящему времени накопился достаточно большой фактический материал, свидетельствующий о способности агонистов опиоидных рецепторов (ОР) увеличить выживаемость кардиомиоцитов при инфаркте миокарда [1–4]. В частности, согласно результатам Лишманова с соавт. [2], введение животным с экспериментальным инфарктом миокарда опиоидных пептидов (лей-энкефалина, мет-энкефалина,  $\beta$ -эндорфина) способствует существенному снижению степени повреждения сердечной мышцы. В работах проф. G. Gross установлено, что активация  $\mu$ -опиоидных рецепторов с помощью морфина способствует ограничению размера зоны некроза при экспериментальной коронароокклюзии [3, 4]. Существуют данные о наличии цитопротекторных свойств лигандов  $\delta$ -ОР [5–8]. На изолированных кардиомиоцитах группой ученых под руководством Y. Takasaki обнаружен кардиопротекторный эффект  $\delta$ -агониста Met<sup>5</sup>-энкефалина [8]. На модели коронароокклюзии и реперфузии изолированного сердца крыс установлен защитный эффект другого неселективного  $\delta$ -агониста [5]. Другими зарубежными авторами [9] показано защитное действие агонистов  $\kappa$ -ОР. Таким образом, можно считать доказанным тот факт, что опиоидные рецепторы играют важную роль в регуляции устойчивости кардиомиоцитов к действию ишемии-реперфузии. Однако остается спорным вопрос о том, где – в миокарде или других органах – расположены эти ОР. Кроме того, роль того или иного типа ОР в этом процессе также не до конца понятна. В своей работе мы исследо-

вали значение  $\mu$ -опиоидных рецепторов в регуляции резистентности изолированного перфузируемого сердца к действию глобальной ишемии и реперфузии, а также локализацию опиоидных рецепторов, обеспечивающих устойчивость миокарда к патогенному действию ишемии и реперфузии.

Цель данной работы – изучить влияние активации  $\mu$ -опиоидных рецепторов *in vivo* и *in vitro* на степень развития некротических повреждений кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии сердца крыс.

### Методика

Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. После торакотомии сердце быстро извлекали и немедленно помещали в охлажденный (+40 °C) раствор Кребса–Хензелейта. После прекращения спонтанных сокращений сердце помещали в термостабилизируемую увлажненную камеру. В восходящую дугу аорты вводили канюлю, через которую поступал физиологический раствор. Ретроградную перфузию сердца проводили по методу Лангендорфа по открытому контуру раствором Кребса–Хензелейта, насыщенным карбогеном (+37 °C, pH=7.4) и содержащим (в mM): NaCl – 120; KCl – 4.8; CaCl<sub>2</sub> – 2.0; MgSO<sub>4</sub> – 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.2; NaHCO<sub>3</sub> – 20.0; глюкоза – 20.0. Для приготовления этого раствора применялись реагенты компании «Sigma» (St. Louis, США). Тотальную ишемию миокарда моделировали посредством полного прекращения подачи перфузионного раствора на 45 мин. После этого возобновляли перфузию и продолжали наблюдение в течение 30

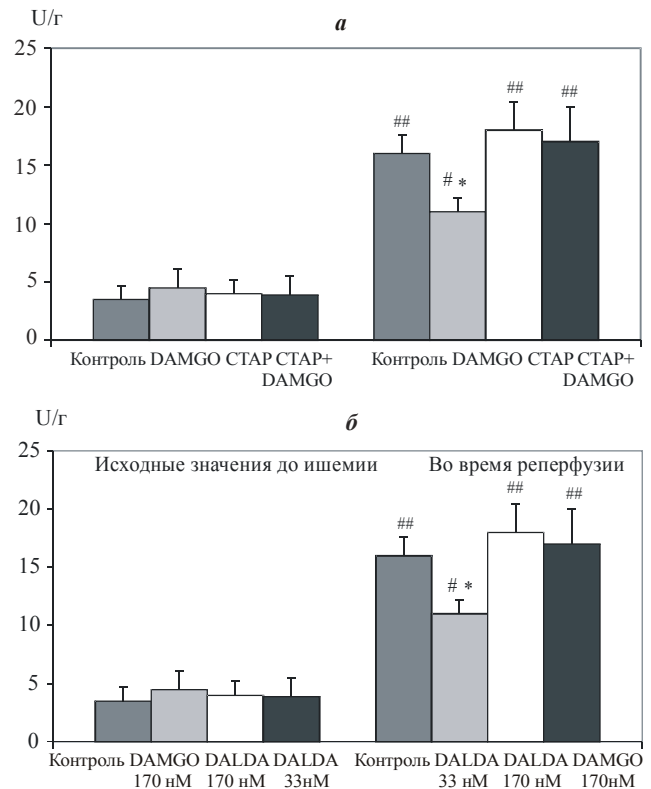
мин. Стимуляцию  $\mu$ -рецепторов *in vivo* осуществляли с помощью внутривенного введения селективного агониста этих рецепторов Н-Тур-D-Ala-Gly-N-Me-Phe-Gly-ol (DAMGO) в дозе 0,1 мг/кг за 15 мин до выделения сердца. Сердца этих крыс после стабилизационного периода (20 мин) подвергали ишемии (45 мин) и реперфузии (30 мин). Активацию  $\mu$ -рецепторов *in vitro* проводили путем добавления DAMGO или селективного  $\mu$ -агониста NH<sub>2</sub>-Тур-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (DALDA) в перфузионный раствор в конечной концентрации 170 и 33 нМ/л. По окончании 20 мин адаптации к условиям нормоксической перфузии сердца перфузировали в течение 15 мин раствором Кребса-Хензелейта, содержащим DAMGO или DALDA в указанной концентрации, затем – 15 мин без препаратов, после чего моделировали тотальную ишемию (45 мин) и реоксигенацию (30 мин). Опиоидные пептиды были синтезированы в компании Multiple Peptide Systems (США). Контролем служили изолированные сердца интактных животных. Степень повреждения кардиомиоцитов оценивали по уровню креатинфосфокиназы (КФК) в оттекающем от сердца перфузате. Активность КФК определяли с помощью энзиматического набора «NAC-activated CK47-20 kit» (Sigma, США) и пересчитывали на 1 г ткани сердца.

Результаты экспериментов обработаны статистически с применением критерия Манна-Уитни.

### Результаты исследования

В контрольной серии активность креатинкиназы в перфузате, оттекающем от сердца, при реперфузии возросла в 4.5 раза по сравнению с исходными доишемическими значениями (рисунок), что согласуется с литературными данными о повреждении сарколеммы кардиомиоцитов в реоксигенационном периоде [6]. Предварительная активация  $\mu$ -рецепторов с помощью внутривенной инъекции DAMGO никак не повлияла на исходный, фоновый уровень креатинфосфокиназы (КФК) в доишемическом периоде (рисунок), но при этом оказывала выраженный кардиопротекторный эффект при ишемии-реперфузии. Об этом свидетельствовало двукратное снижение активности данного маркера повреждения мембран кардиомиоцитов в перфузионном растворе, оттекающем от сердца в период реперфузии (рисунок).

Для того чтобы убедиться в  $\mu$ -рецепторной специфичности обнаруженных эффектов, были проведены эксперименты с использованием селективного блокатора этих рецепторов СТАР. В результате было установлено, что обнаруженный нами цитопротекторный эффект DAMGO имеет специфический характер, поскольку предварительная селективная блокада  $\mu$ -рецепторов полностью его устраняла (рисунок). Как видно из рисунка, кардиопротекторный эффект DAMGO не удавалось воспроизвести, если введение данного агониста  $\mu$ -ОР проводилось на фоне предварительной блокады  $\mu$ -ОР с помощью СТАР. Антаго-



Влияние стимуляции  $\mu$ -рецепторов *in vivo* (а) и *in vitro* (б) на активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе до ишемии и во время реперфузии. \* –  $P < 0.05$  по сравнению с контролем; # –  $P < 0.05$ ; ## –  $P < 0.01$  по сравнению с исходными значениями

нист  $\mu$ -ОР СТАР сам по себе не влиял на уровень КФК в перфузате (рисунок, а).

Таким образом, активация  $\mu$ -рецепторов *in vivo* эффективно предупреждает возникновение реперфузионного «оглушения» сердца *in vitro*. Исходя из сказанного логично было предположить, что отмеченные нами эффекты обусловлены активацией кардиальных  $\mu$ -рецепторов. Для того чтобы подтвердить или опровергнуть это предположение, мы провели серии экспериментов с добавлением селективных лигандов этих рецепторов DAMGO и DALDA в перфузионный раствор перед моделированием ишемии.

После 10 мин перфузии изолированного сердца раствором, содержащим DAMGO в конечной концентрации 170 нМ, кардиопротекторного эффекта мы не отметили. В этой серии экспериментов уровень реперфузионного выхода креатинкиназы в оттекающий от сердца раствор достоверно не отличался от такового в контроле, хотя имелась тенденция к снижению активности этого показателя (рисунок, б). Применение другого селективного агониста  $\mu$ -рецепторов DALDA *in vitro* в конечной концентрации 170 нМ также не оказало кардиопротекторного действия (рисунок, б). Однако совершенно иная картина наблюдалась при использовании DALDA в меньшей концентрации – 33 нМ. В этой серии экспериментов предва-

рительная перфузия изолированного сердца раствором, содержащим пептид в указанной концентрации, способствовала значительному снижению степени ишемического и реперфузионного повреждения кардиомиоцитов. Как показано на рисунке, активность креатинкиназы в оттекающем от сердца во время реперфузии растворе оказалась в 1.5 раза меньшей соответствующих величин в контроле (рисунок, б).

#### Обсуждение результатов

Результаты проведенных экспериментов позволяют заключить, что активация  $\mu$ -рецепторов *in vivo* и *in vitro* способствует повышению устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным воздействиям. Об этом свидетельствует снижение степени повреждения кардиомиоцитов во время реперфузии по сравнению с контролем. Отмеченное в наших экспериментах кардиопротекторное действие DAMGO при его внутривенном применении, можно, на наш взгляд, объяснить следующим образом.

Известно, что предварительное введение опиоидов (*in vivo*) способствует «ингибированию» процессов перекисидации липидов в изолированных сердцах [10]. Основываясь на литературных данных о роли свободных радикалов в формировании ишемических и реперфузионных повреждений миокарда [11], можно предположить, что подавление процессов свободнорадикального окисления липидов вносит существенный вклад в кардиопротекторное действие опиоидов. С другой стороны, доказана тесная взаимосвязь свободнорадикального окисления липидов с циклооксигеназным обменом арахидоновой кислоты [12]. Опубликованные нами ранее данные свидетельствуют о том, что стимуляция  $\mu$ -рецепторов *in vivo* способствует увеличению содержания простаглицлина в плазме крови и миокарде [13]. Одновременно отмечалось снижение содержания тромбксана в крови и ткани сердца [13]. Такое изменение баланса простаглицлинов способствует повышению толерантности сердца к ишемическим и реперфузионным воздействиям. В пользу высказанной точки зрения свидетельствуют данные о кардиопротекторной активности простаглицлина в условиях ишемии и реперфузии сердца [14, 15] и о кардиопатогенной роли тромбксана в генезе ишемических и реперфузионных повреждений сердца [16]. С другой стороны, существуют данные о том, что опиоиды способны модулировать секрецию ряда гормонов и биологически активных соединений, в частности предсердного натрийуретического пептида [17]. Показано, что стимуляция  $\mu$ -рецепторов способствует многократному увеличению уровня предсердного натрийуретического пептида в крови [17]. Важно отметить, что этот пептид способен

повышать толерантность миокарда к ишемии [18]. Возможно, что натрийуретический пептид принимает участие в механизме кардиопротекторного действия  $\mu$ -агониста DAMGO *in vitro*.

В экспериментах с добавлением  $\mu$ -агонистов в перфузионный раствор мы получили достаточно неоднозначные результаты. Так, применение селективных агонистов  $\mu$ -OP DAMGO или DALDA в концентрации 170 нМ, существенно не отразилось на сохранении целостности мембран кардиомиоцитов. В этом случае нами была зарегистрирована лишь тенденция к снижению выхода креатинкиназы в перфузионный раствор. Данный факт хорошо согласуется с результатами исследований, проведенных нами ранее [10], в которых было показано, что более выраженное «антиоксидантное» действие на изолированное сердце энкефалины проявляли не при введении в перфузионный раствор, а только при их предварительном внутривенном введении [10]. Кроме того, уровень простаглицлина в миокарде также увеличивался лишь при *in vivo*-активации опиоидных рецепторов [10]. В то же время использование агониста  $\mu$ -рецепторов DALDA в меньшей концентрации (33 нМ) сопровождалось выраженным цитопротекторным эффектом. Можно предположить, что кардиопротекторный эффект этого пептида связан с активацией кардиальных  $\mu$ -рецепторов, а исчезновение этого защитного эффекта при увеличении концентрации агониста могло быть результатом активации неопиоидных рецепторов опиоидных пептидов [19, 20]. В пользу подобной точки зрения свидетельствуют данные о том, что некоторые эффекты  $\mu$ -агонистов являются результатом их взаимодействия с неопиоидными рецепторами [19, 20]. С аналогичной ситуацией столкнулась группа исследователей, возглавляемых L. H. Orie, которым в экспериментах на изолированном сердце также удалось обнаружить кардиопротекторное действие  $\mu$ -агониста DADLE в низких концентрациях и исчезновение данного эффекта при увеличении содержания этого пептида в перфузионном растворе [5].

Таким образом, активация  $\mu$ -рецепторов обеспечивает увеличение устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям, которая характеризуется снижением степени постишемической деструкции кардиомиоцитов. Агонисты  $\mu$ -OP, в зависимости от способа введения и используемой концентрации, оказывают неоднозначные эффекты на степень повреждения миокарда при ишемии и реперфузии.

*Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки РФ (рег. № 2.1.1/210), Российского фонда фундаментальных исследований, Федерального агентства по науке и инновациям.*

#### Список литературы

1. Slepishkin W. D., Pavlenko V. S., Zoloev G. K., Lasukova T. V. The role of enkephalins of acute myocardial infarction // *Exp. Pathology*. 1988. V. 35. No 2.
2. Лишманов Ю. Б., Маслов Л. Н. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. Томск, 1994. 352 с.

3. Schultz J. J. et al. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart // *Circ. Res.* 1996. V. 78.
4. Schultz J. J. et al. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by  $\delta_1$ - but not  $\mu$ - or  $\kappa$ -opioid receptors // *Circ. Res.* 1998. V. 97.
5. Aitchison K. A., Baxter G. F., Awan M. M. et al. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning // *Basic Res. Cardiol.* 2000. V. 95.
6. Kark M. et al. Myocardial protection by ischemic preconditioning and delta opioid receptor activation in the isolated working rat heart // *J. of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 2001. V. 91.
7. Fryer R. M., Wang Y., Hsu A. K., Gross G.J. Essential activation of PKC-d in opioid-initiated cardioprotection // *Am. J. Physiol.* 2001. V. 280. No 3.
8. Takasaki Y., Wolf R. A., Chien G. L., Van Winkle D. M. Met<sup>5</sup>-enkephalin protects isolated adult rabbit cardiomyocytes via d-opioid receptors // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277.
9. Peart J. N. et al. Effect of exogenous kappa-opioid receptor activation in rat model of myocardial infarction // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004. V. 43. No 3.
10. Лишманов Ю. Б., Реброва Т. Ю., Афанасьев С. А., Кравченко А. И. Влияние синтетических энкефалинов на синтез простагландинов и перекисное окисление липидов в изолированном сердце при активации свободнорадикальных процессов // *Бюл. exper. биол. мед.* 1993. № 11.
11. Levraut J., Iwase H., Shao Z-H. et al. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation // *Am. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003. V. 284.
12. Herbaczynska-Cedro K., Cordon-Majszak W. Attenuation by prostacyclin of adrenaline-stimulated lipid peroxidation in the myocardium // *Pharmacol. Res. Commun.* 1986. V. 18. No 4.
13. Маслов Л. Н., Нарыжная Н. В., Барбараш Н. Л., Лишманов Ю. Б. Механизмы устойчивости сердца к стресс-индуцированным повреждениям // *Рос. Физиол. журн.* 1997. Т. 3. № 3.
14. Darius H., Osborne J. A., Reibel D. K., Lefer A. M. Protective actions of a stable prostacyclin analog in ischemia induced membrane damage in rat myocardium // *Mol. Cell. Cardiol.* 1987. No 3.
15. Ledda F. et al. Indirect evidence for a role prostaglandins as second messengers of the prejunctional effect of opioids in guinea-pig ventricular preparations // *Eur. J. of Pharmacol.* 1989. V. 162.
16. Wanlinsky P., Smith J. B., Lefer A. M. et al. Thromboxane A<sub>2</sub> in acute myocardial infarction // *Heart J.* 1984. V. 108.
17. Vollmar A. M. et al. The effect of opioids on plasma atrial natriuretic peptide // *Eur. J. of Pharmacol.* 1987. V. 143.
18. Takata Y., Hirayama Y., Kiyomi S., Ogawa T. The beneficial effects of atrial natriuretic peptide on arrhythmias and myocardial high-energy phosphates after reperfusion // *Cardiovasc. Res.* 1996. V. 32.
19. Llobell F., Laorden L. Characterization of the opioid receptor subtypes mediating the negative inotropic effects of DAMGO, DPDPE and U-50, 488H in isolated human right atria strips // *Neuropeptides.* 1995. V. 29.
20. Wu D., Soong Y., Zhao G-M., Szeto H. H. A highly peptide analgesic that protects against ischemia-reperfusion-induced myocardial stunning // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002. V. 283.

Ласукова Т. В., доктор биологических наук, профессор.

**Томский государственный педагогический университет.**

ул. Киевская, 60, 634061, г. Томск, Россия, 634061.

E-mail: ivay@tspu.edu.ru

Маслов Л. Н., доктор медицинских наук, зав. лабораторией.

**НИИ кардиологии СО РАМН.**

ул. Киевская, 111а, г. Томск, Россия, 634012.

E-mail: tvk@cardio.tsu.ru, mng@cardio.tsu.ru

Низкодубова С. В., доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой медико-биологических дисциплин.

**Томский государственный педагогический университет.**

ул. Киевская, 60, г. Томск, Россия, 634061.

E-mail: ivay@tspu.edu.ru

Горбунов А. С., студент.

**Томский государственный педагогический университет.**

ул. Киевская, 60, г. Томск, Россия, 634061.

E-mail: ivay@tspu.edu.ru

Жан Е., руководитель отдела анестезиологии.

**Анхуйский медицинский университет.**

Мейшан Роад, 81, Хефей, Китай, 230032

Криг Т., профессор.

**Грейфсвальдский университет Эрнста Моритца Арндта.**

Домштрассе 11, D-17487, Грейфсвальд, Германия.

E-mail: pressestelle@uni-greifswald.de

Материал поступил в редакцию 12.01.2009

*T. V. Lasukova, L. N. Maslov, S. W. Nizkodubowa, A. S. Gorbunov, Ye. Zhan, T. Krieg*

## **ROLE OF $\mu$ -OPIOID RECEPTORS IN THE REGULATION OF ISOLATED HEART RESISTANCE TO ISCHEMIA AND REPERFUSION**

It was studied effect of activation of m-opioid receptor (OR) on the tolerance of isolated perfused rat heart to global 45 min ischemia and 30 min reperfusion. In vivo pretreatment with selective m-opioid receptor agonist DAMGO (0.1mg/kg intravenously) increased tolerance of isolated perfused rat heart to ischemia and reperfusion. This effect was completely abolished by pretreatment with the m-antagonist CTAP. Addition of DAMGO and DALDA to the perfusion solution in a final concentration of 170 nM before ischemia had no cardioprotective effect. However, addition of DALDA to the perfusion solution in a final concentration of 33 nM also decreased creatine kinase levels in the coronary sinus effluent.

**Key words:**  *$\mu$ -opioid receptors, isolated heart, ischemia, reperfusion.*

Lasukova T. V.

**Tomsk state pedagogical university.**

ul. Kievskaya, 60, Tomsk, Russia, 634061.

E-mail: lov-81@list.ru

Maslov L. N.

**SI RI for cardiology SB RAMS.**

ul. Kievskaya, 111a, Tomsk, Russia, 634012.

E-mail: maslov@cardio.tsu.ru, tvk@cardio.tsu.ru, mng@cardio.tsu.ru

Nizkodubowa S. W.

**Tomsk state pedagogical university.**

ul. Kievskaya, 60, Tomsk, Russia, 634061.

Gorbunov A. S.

**Tomsk state pedagogical university.**

ul. Kievskaya, 60, Tomsk, Russia, 634061.

Zhan Ye.

**Anhui Medical University.**

Meishan Road, 81, Hefei, China, 230032.

Krieg T.

**Department of cardiology university of Greifswald.**

Domstrabe 11, 17487 Greifswald, Germany.

E-mail: pressestelle@uni-greifswald.de