

## ВЛИЯНИЕ ДАЛАРГИНА И ДЕЗ-ТИР-ДАЛАРГИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ИНТАКТНОГО СЕРДЦА И МИОКАРДА ПОДВЕРГНУТОГО ВОЗДЕЙСТВИЮ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

Т. В. Ласукова<sup>1,2</sup>, Л. Н. Маслов<sup>1,2</sup>, Ю. Б. Лишманов<sup>1,2</sup>, М. В. Овчинников<sup>3</sup>,  
Ж. Д. Беспалова<sup>3</sup>, Ю. К. Подоксенов<sup>1</sup>, А. Ю. Подоксенов<sup>1</sup>

В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крыс установлено, что агонист  $\mu$ - и  $\delta$ -опиоидных рецепторов даларгин способствует снижению параметров сократимости интактного сердца и не влияет на насосную функцию реперфузируемого миокарда. Неопиоидный аналог даларгина — дез-Тир-даларгин угнетает сократимость как интактного миокарда, так и изолированного сердца, подвергшегося тотальной ишемии и реперфузии. Даларгин и дез-Тир-даларгин снижают частоту появления реперфузионных аритмий и не влияют на величину коронарного протока как до ишемии, так и после нее. Полагают, что действие даларгина может быть связано с активацией кардиальных  $\delta$ -рецепторов, а в реализации инотропного действия дез-Тир-даларгина задействованы иные рецепторные механизмы.

**Ключевые слова:** даларгин, дез-Тир-даларгин, ишемия, реперфузия, изолированное сердце крыс

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что пептидный агонист опиоидных рецепторов D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Arg<sup>6</sup>-энкефалин (даларгин) при введении перед коронароокклюзией способствует снижению частоты возникновения ишемических и реперфузионных аритмий [4, 9]. Более того, оказалось, что даларгин также эффективно предупреждает и появление реперфузионных нарушений сердечного ритма, если его ввести непосредственно перед возобновлением коронарного кровообращения [4]. В этом отношении D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Arg<sup>6</sup>-энкефалин выгодно отличается от других антиаритмических препаратов, большинство из которых подавляют реперфузионные аритмии только в ситуациях, связанных с их применением перед коронароокклюзией [8, 11]. Даларгин не только оказывает превентивное антиаритмическое действие, но и достаточно эффективно устраняет уже сформировавшуюся электрическую нестабильность сердца при постинфарктном кардиосклерозе [10]. Сопоставление литературных данных об антиаритмической активности известных препаратов, применяемых в клинической практике [6, 11], с результатами собственных исследований [4, 9] позволяет говорить о том, что даларгин по своей активности в 10–20 раз превосходит такие препараты, как верапамил и пропранолол.

В связи с этим есть основания полагать, что данный препарат может найти применение в кардиологии в ка-

честве антиаритмического средства. Вместе с тем общеизвестно, что большинство антиаритмиков угнетает сократимость миокарда, что создает определенные проблемы с их применением у больных с нарушениями ритма сердца в сочетании с сердечной недостаточностью. Есть основания предполагать, что даларгин также может проявлять отрицательные инотропные свойства. Однако исследований, посвященных влиянию D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Arg<sup>6</sup>-энкефалина на контрактильность сердца, до настоящего времени не проводилось. Остается без ответа и вопрос о том, как влияет этот пептид на коронарный кровоток, а также устойчивость кардиомиоцитов к ишемическим и реперфузионным повреждениям, и, наконец, неизвестно, как влияют на функциональное состояние миокарда продукты метаболизма даларгина, например, дез-Тир-даларгин, который не взаимодействует с опиоидными рецепторами [1, 2].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния даларгина и дез-Тир-даларгина на функциональное состояние интактного изолированного сердца крысы и миокарда, подвергнутого воздействию ишемии-реперфузии.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. После торакотомии сердце быстро извлекали из грудной клетки и помещали в охлажденный (4 °С) раствор Кребса-Хензелейта. После прекращения спонтанных сокращений в восходящую дугу аорты вводили канюлю, через которую подавали названный раствор. Ретроградную перфузию сердца проводили по методу Лангендорфа по открытому контуру. Запись кривой сократимости сердца проводили в изоволюмическом режиме при перфузии под постоян-

<sup>1</sup> Лаборатория экспериментальной кардиологии (зав. — Л. Н. Маслов) НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН, Томск, 634050, ул. Киевская, 111.

<sup>2</sup> Томский государственный педагогический университет, Томск.

<sup>3</sup> Лаборатория синтеза пептидов Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ, Москва, 121552, ул. 3-я Черепковская, 15А.

ным давлением 52 мм рт.ст. Регистрацию параметров сократимости осуществляли с помощью электроманометра, сопряженного с латексным баллончиком, который помещали в полость левого желудочка.

В течение 20 мин сердце адаптировали к условиям нормоксической перфузии. Затем моделировали тотальную ишемию миокарда путём полного прекращения подачи перфузионного раствора на 45 мин, после чего перфузию возобновляли и продолжали наблюдение на протяжении 30 мин. В эксперимент брали только те сердца, у которых исходные параметры сократимости соответствовали стандартам, установленным в нашей лаборатории применительно к методике изолированного сердца. Контролем служили изолированные сердца интактных животных, подвергнутые тотальной ишемии и реперфузии.

В ходе эксперимента определяли следующие показатели: частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд. в минуту), давление, развиваемое левым желудочком (мм рт.ст.), конечное диастолическое давление (% от исходного), максимальную скорость сокращения (мм рт.ст./с), максимальную скорость расслабления (мм рт.ст./с), коронарный проток (мл/мин/г). Давление, развиваемое левым желудочком, вычисляли как разницу между систолическим и диастолическим давлением. В течение первых 10 мин реперфузии регистрировали ЭКГ с помощью электродов, расположенных на правом предсердии и левом желудочке. При анализе ЭКГ учитывали появление единичных и множественных (более 16 за 10 мин) желудочковых экстрасистол, желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков.

Кроме того, в перфузате, собранном за время 30-минутного реперфузионного периода, исследовали активность креатинфосфокиназы с помощью стандартных наборов “NAC-activated CK47 – 20 kit” (“Sigma”, St. Louis, США) и конечный результат выражали в мкмоль NADH/мин в пересчете на 1 г ткани сердца за 30 мин реперфузии.

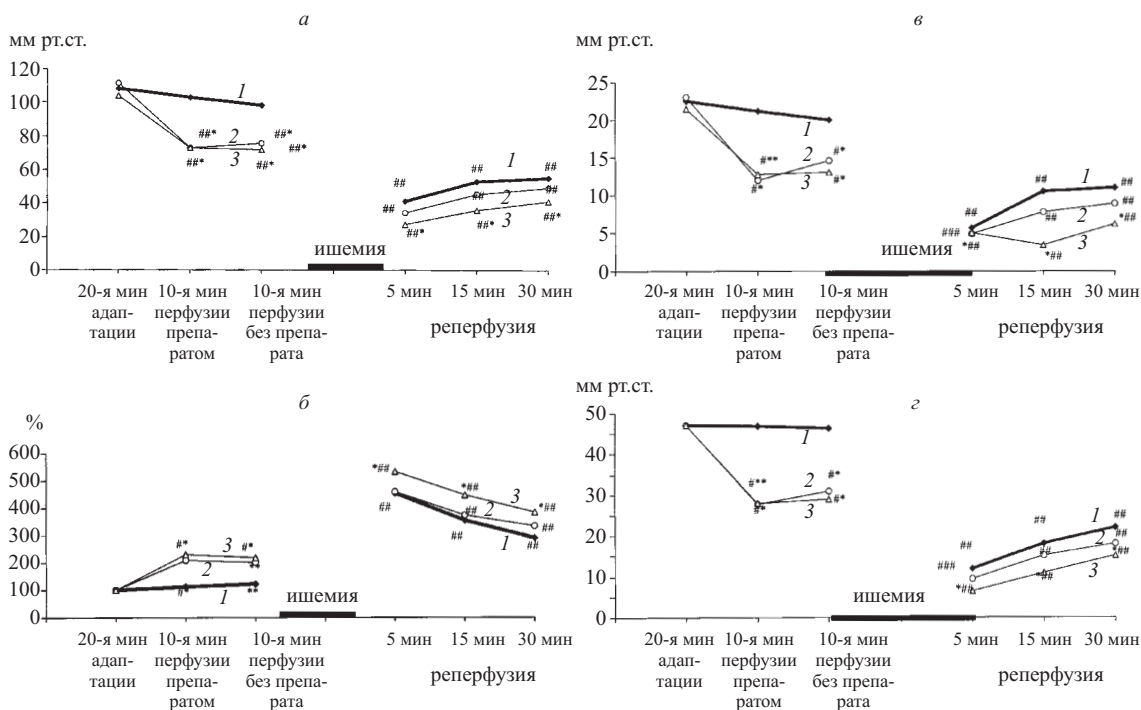
В работе были использованы: смешанный агонист  $\mu$ - и  $\delta$ -опиоидных рецепторов даларгин (H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) [12] и его аналог, лишенный аминокислоты тирозина, — дез-Тир-даларгин (H-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) [1, 2]. Оба лиганда синтезированы в лаборатории синтеза пептидов Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ. Эффекты обоих препаратов *in vitro* исследовали путем добавления в перфузионный раствор даларгина в концентрации 137 мкМ или дез-Тир-даларгина — 177 мкМ перед моделированием ишемии. Для этого по окончании 20-минутной адаптации к условиям нормоксической перфузии в раствор Кребса-Хензелейта добавляли тот или другой пептид в указанной концентрации и в течение 10 мин продолжали нормоксическую перфузию сердца, затем в течение 10 мин перфузировали раствором, не содержащим пептидов, после чего моделировали тотальную ишемию (45 мин) и реперфузию (30 мин). Используемые

препараты растворяли в физиологическом растворе непосредственно перед экспериментом и добавляли в перфузионный раствор. При выборе концентраций препаратов ориентировались на результаты ранее проведенных экспериментов, посвященных изучению антиаритмических и кардиопротекторных эффектов опиоидов [4, 9]. Результаты экспериментов обработаны статистически с применением *t*-критерия Стьюдента и критерия  $\chi^2$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной серии воздействие 45-минутной тотальной ишемии приводило к полной остановке изолированного сердца, которая наступала, как правило, в течение первых 10 мин. После возобновления аэробной перфузии частота и сила сердечных сокращений были ниже исходных показателей на 50 %, а конечное диастолическое давление возрастало в 2,5 раза (рисунок, *a, б*). Соответственно, скорости сокращения и расслабления сердечной мышцы на протяжении 30 мин реперфузии оставались ниже “доишемических” значений в 2, 5 раза (рисунок, *в, г*). Нарушения сердечного ритма были наиболее ярко выражены в первые 10 мин реперфузии. Так, в 60 % случаев нами регистрировалась множественная желудочковая экстрасистолия, у 2 препаратов сердец из 18 отмечены эпизоды желудочковой тахикардии и, наконец, в 16 % случаев — фибрилляция желудочков (таблица).

Как показано на рисунке, *a*, сила сокращений неишемизированного изолированного сердца после его 10-минутной перфузии раствором, содержащим даларгин, снижалась в среднем на 30 % по сравнению с соответствующими значениями в контрольной серии (рисунок, *a*). Кроме того, мы наблюдали значительное замедление ЧСС (с  $216 \pm 10$  в контроле до  $179 \pm 11$  уд. в минуту в опыте;  $p < 0,05$ ). Одновременно отмечался и рост конечного диастолического давления в 2 раза (рисунок, *б*) на фоне почти двукратного снижения скоростей сокращения/расслабления сердечной мышцы (рисунок, *в, г*). Снижение амплитуды сокращений и уменьшение скоростных параметров сокращения/расслабления изолированного перфузируемого сердца в ответ на стимуляцию опиоидных рецепторов отмечали и в других работах [5]. В предыдущих исследованиях было показано, что после селективной активации кардиальных  $\delta$ -опиоидных рецепторов сила и ЧСС снижается, а конечное диастолическое давление растет [3]. Даларгин, как известно, является агонистом как  $\mu$ -, так и  $\delta$ -рецепторов, не взаимодействующим с  $\kappa$ -рецепторами [12]. Мы полагаем, что отмеченное в наших экспериментах отрицательное инотропное действие этого опиоида обусловлено активацией  $\delta$ -рецепторов, поскольку в миокарде в настоящее время доказано существование только  $\delta$ - и  $\kappa$ -опиоидных рецепторов [7].



Влияние даларгина и дез-Тир-даларгина на давление, развиваемое левым желудочком (а), конечное диастолическое давление (б), на максимальную скорость сокращения (в) и максимальную скорость расслабления (г), на максимальную скорость сокращения (в) и максимальную скорость расслабления (г).

Различия достоверны относительно аналогичных значений в контроле: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; относительно исходных значений: # —  $p < 0,05$ ; ## —  $p < 0,01$ . 1 — контроль, 2 — даларгин, 3 — дез-Тир-даларгин.

Исследование насосной функции миокарда, подвергнутого тотальной ишемии, показало, что после его предварительной перфузии раствором, содержащим даларгин, существенных изменений динамики параметров сократимости во время реперфузии по сравнению с контролем не происходит (рисунок, а, б). Следовательно, активация кардиальных опиоидных рецепторов даларгином в период, предшествующий ишемии, не влияет на инотропную функцию изолированного сердца во время реперфузии.

Изучение антиаритмических свойств этого пептида *in vitro* показало, что после его применения наблюдается достоверное снижение (в 3 раза по отношению к контролю) числа случаев множественной экстрасистолии и не отмечается ни одного эпизода желудочковой тахикардии (см. таблицу). Однако нельзя не отметить тот факт, что антиаритмическое действие даларгина оказалось не настолько эффективным, чтобы полно-

стью предотвратить возникновение фибрилляции желудочков (см. таблицу).

Мы полагаем, что антиаритмический эффект даларгина, так же, как и его отрицательное инотропное действие в доишемическом периоде, связано с активацией  $\delta$ -опиоидных рецепторов, расположенных в миокарде, поскольку, как отмечалось выше, указанный пептид является смешанным агонистом  $\mu$ - и  $\delta$ -рецепторов и не взаимодействует с  $\kappa$ -рецепторами [12], а в миокарде идентифицированы только  $\delta$ - и  $\kappa$ -рецепторы [7].

Надо сказать, что при исследовании кардиопротекторных свойств даларгина не было отмечено статистически достоверных изменений постишемического уровня креатинфосфокиназы по сравнению с контролем, хотя имелась явная тенденция к снижению активности этого фермента в собранном за время реперфузии растворе.

Влияние даларгина, дез-Тир-даларгина на частоту возникновения реперфузионных нарушений ритма после 45-минутной тотальной ишемии изолированного сердца крыс ( $\chi^2$ )

Группа	Реперфузия, %			
	n	Множественные желудочковые экстрасистолии	Желудочковая тахикардия	Желудочковая фибрилляция
Контроль	18	60 (10)	11 (2)	16 (3)
Даларгин 100 мкг/л, до тотальной ишемии	14	21* (3)	0	21 (3)
Дез-Тир-даларгин 100 мкг/л, до тотальной ишемии	14	14* (2)	0	7 (1)

Примечание. Отличия от контроля достоверны при \* —  $p < 0,05$  ( $\chi^2$ -критерий). В скобках — количество животных.

Результаты экспериментов с использованием дез-Тир-даларгина показали, что после 10-минутной перфузии изолированного сердца раствором, содержащим этот пептид, сократимость миокарда снижается практически так же, как и при использовании даларгина. Как видно из данных, представленных на рисунке, в конце 10-минутного периода перфузии сердца раствором, содержащим этот препарат, сила сокращений миокарда достоверно снижалась на 30 %, а конечное диастолическое давление возрастало вдвое. Под влиянием дез-Тир-даларгина отмечалось замедление ЧСС с  $216 \pm 10$  в контроле до  $181 \pm 14$  уд. в минуту в опытной серии ( $p < 0,05$ ). Изменения скоростей сокращения-расслабления в этих условиях почти не отличались от динамики соответствующих показателей в серии с даларгином (рисунок, в, з).

Однако отрицательный инотропный эффект названного пептида, в отличие от даларгина, сохранился и в постишемическом периоде. Так, реперфузионное давление, развиваемое левым желудочком, после применения дез-Тир-даларгина оказалось на 15 % более низким, а уровень диастолического давления — на 25 % более высоким, чем в контроле (рисунок, а, б). ЧСС в серии с применением дез-Тир-даларгина ( $124 \pm 13$  уд. в минуту) также оставалась на всем протяжении 30-минутной реоксигенации ниже соответствующих показателей в контрольной группе ( $167 \pm 11$  уд. в минуту;  $p < 0,05$ ). Средние значения скоростей сокращения/расслабления в экспериментах с дез-Тир-даларгином были на 40 – 50 % достоверно меньшими по сравнению с соответствующими контрольными показателями (рисунок, в, з).

Резюмируя полученные данные, можно сказать, что под влиянием дез-Тир-даларгина происходит стойкое угнетение насосной функции изолированного сердца как в доишемическом, так и реперфузионном периоде, тогда как даларгин, оказывает отрицательное инотропное влияние только на интактный миокард.

Причина обнаруженного нами различия инотропно-го эффекта исследуемых пептидов, по всей видимости, кроется в их различной рецепторной специфичности. Эффект D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Arg<sup>6</sup>-энкефалина, скорее всего, обусловлен активацией опиоидных рецепторов, а действие дез-Тир-даларгина, по-видимому, связано с активацией других (неопиоидных) рецепторов, поскольку опиоидные пептиды, лишённые тирозила в первом положении полипептидной цепочки, неспособны взаимодействовать с опиоидными рецепторами [13].

Изучение антиаритмического действия дез-Тир-даларгина показало, что он оказывает несколько более выраженный, по сравнению с даларгином, антиаритмический эффект (см. таблицу). Так, после предварительной “обработки” изолированных сердец дез-Тир-даларгином всего в 2 случаях были зарегистрированы множественные экстрасистолы во время реперфузии и полностью отсутствовали эпизоды желудочковой тахикардии (см. таблицу). Кроме того, в 14 опытах этой

серии был зарегистрирован всего 1 случай фибрилляции желудочков, в то время как в контрольной серии их было 3 из 18 наблюдений (см. таблицу).

Исследование кардиопротекторных свойств дез-Тир-даларгина показало, что этот пептид, подобно даларгину, не обладает защитным действием в отношении мембран кардиомиоцитов, поскольку статистически достоверных изменений активности креатинфосфокиназы в перфузате, собранном за весь реоксигенационный период, по сравнению с контролем, мы не обнаружили.

Известно, что одним из проявлений реперфузионного повреждения сердца является снижение коронарного протока. Результаты данной работы показали, что оба изучаемых пептида не повлияли на процесс снижения коронарной перфузии в постишемическом периоде. Так, в контрольной серии скорость коронарной перфузии составила  $4,82 \pm 0,3$  мл/мин/г, в серии с даларгином —  $4,71 \pm 0,3$  мл/мин/г ( $p > 0,05$ ), с дез-Тир-даларгином —  $4,34 \pm 0,67$  мл/мин/г ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют заключить, что оба препарата — D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Arg<sup>6</sup>-энкефалин и дез-Тир-даларгин оказывают отрицательное инотропное и хронотропное действие на миокард в период, предшествующий ишемии. Однако после возобновления коронарной перфузии только дез-Тир-даларгин усугубляет реперфузионную брадикардию и сократительную дисфункцию миокарда. Такая неоднозначная реакция миокарда на применение даларгина и дез-Тир-даларгина, скорее всего, обусловлена различными механизмами, с помощью которых реализуются инотропные и хронотропные эффекты этих пептидов. Можно предположить, что эффекты даларгина связаны с активацией кардиальных δ-рецепторов, в то время как в реализации инотропного действия дез-Тир-даларгина задействованы иные рецепторные механизмы. Из результатов данной работы можно сделать вывод о том, что как даларгин, так и дез-Тир-даларгин оказывают антиаритмический эффект.

## ВЫВОДЫ

1. Даларгин способствует снижению силы и частоты сокращений интактного миокарда и не влияет на насосную функцию реперфузируемого сердца. Дез-Тир-даларгин, не связывающийся с опиоидными рецепторами, вызывает угнетение сократимости как интактного, так и подвергнутого тотальной ишемии изолированного сердца.

2. Даларгин и дез-Тир-даларгин снижают частоту возникновения реперфузионных аритмий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. И. Каленикова, О. Ф. Дмитриева, Н. В. Коробов и др., *Вопр. мед. химии*, № 1, 75 – 83 (1988).
2. Н. В. Коробов, *Фармакол. и токсикол.*, № 4, 35 – 38 (1988).

3. Т. В. Ласукова, Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, Г. Дж. Гросс, *Рос. физиол. ж.*, **88**(5), 568 – 580 (2000).
4. Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, Г. Дж. Гросс, *Бюл. экпер. биол.*, № 4, 391 – 393 (2002).
5. C. Clo, C. Muscari, B. Tantini, et al., *Life Sci.*, **37**(14), 1327 – 1333 (1985).
6. M. J. Janse and A. L. Wit, *Physiol. Rev.*, **69**(4), 1049 – 1169 (1989).
7. C. Ela, J. Barg, Z. Vogel, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 711 – 720 (1997).
8. K. H. Kuck, B. Jannasch, M. Schlueter, et al., *Z. Kardiol.*, **74**, 185 – 190 (1985).
9. L. N. Maslov and Yu. B. Lishmanov, *Int. J. Cardiology*, **40**(2), 89 – 94 (1993).
10. Yu. B. Lishmanov, L. N. Maslov, N. V. Naryzhnaya, and S. W. Tam, *Life Sci.*, **65**(1), PL13 – PL17 (1999).
11. M. Naito, E. L. Michelson, J. J. Kmetzo, et al., *Circulation*, **63**(1), 70 – 79 (1981).
12. N. Pencheva, J. Pospisek, L. Hauzerova, et al., *Brit. J. of Pharmacology*, **128**, 569 – 576 (1999).
13. D. De Wied, G. L. Kovacs, B. Bohus, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **49**(4), 427 – 436 (1978).

Поступила 28.04.03.

## THE EFFECT OF DALARGIN AND DES-TYR-DALARGIN ON THE FUNCTIONAL STATE OF INTACT AND ISCHEMIZED-REPERFUSED MYOCARDIUM

T. V. Lasukova<sup>1,2</sup>, L. N. Maslov<sup>1,2</sup>, Yu. B. Lishmanov<sup>1,2</sup>, M. V. Ovchinnikov<sup>3</sup>, Zh. D. Bespalova<sup>3</sup>, Yu. K. Podoksenov<sup>1</sup>, and A. Yu. Podoksenov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Experimental Cardiology, Institute of Cardiology, Tomsk Scientific Center, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Kievskaya 111, Tomsk, 634050 Russia

<sup>2</sup> Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, 634050 Russia

<sup>3</sup> Laboratory of Peptide Synthesis, State Cardiology Research and Production Complex, Ministry of Public Health, ul. Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia

Experiments on isolated perfused rat heart showed that dalargin, an antagonist of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors, favors a decrease in the parameters of contractility of intact myocardium, while not influencing the pumping function (systolic and diastolic contractility) of reperfused myocardium. At the same time, des-Tyr-dalargin (the non-opioid analog of dalargin) suppresses the contractility of both the intact heart and the isolated myocardium subjected to global ischemia and reperfusion. Both dalargin and des-Tyr-dalargin reduced the incidence of reperfusion-induced arrhythmia, but did not affect the coronary flow before ischemia and after restoration of the coronary flow. It is suggested that the effect of dalargin is related to activation of the cardiac  $\delta$ -opioid receptors, while the inotropic action of des-Tyr-dalargin involves other receptor mechanisms.