

# ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

## АГОНИСТЫ $\delta$ -ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРЕДУПРЕЖДАЮТ ПОЯВЛЕНИЕ НЕОБРАТИМЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ИШЕМИИ — РЕПЕРФУЗИИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА

А. А. Платонов<sup>1</sup>, Т. В. Ласукова<sup>1</sup>, Л. Н. Маслов<sup>1</sup>, Дж. М. Дауни<sup>2</sup>,  
Х. Нагазе<sup>3</sup>, М. В. Овчинников<sup>4</sup>

Обнаружено, что предварительное воздействие селективных агонистов  $\delta$ -опиоидных рецепторов (ОР) снижает уровень креатинкиназы в оттекающем от сердца перфузионном растворе во время тотальной 45-минутной ишемии и 30-минутной реперфузии изолированного сердца крысы. Этот эффект полностью исчезал после предварительного применения  $\delta$ -антагониста налтриндола. Предварительное воздействие агонистов  $\mu$ -ОР не влияло на уровень креатинкиназы в перфузионном растворе. Авторы предполагают, что стимуляция кардиальных  $\delta$ -ОР предупреждает появление необратимых повреждений клеток сердца во время ишемии и реперфузии *in vitro*. Напротив, кардиальные  $\mu$ -рецепторы не играют существенной роли в регуляции резистентности сердца к патогенному действию ишемии и реперфузии.

**Ключевые слова:** опиоидные рецепторы, ишемия и реперфузия изолированного сердца

### ВВЕДЕНИЕ

Ишемия — реперфузия приводит к появлению желудочковых аритмий, сократительной дисфункции миокарда и необратимым повреждениям кардиомиоцитов. Реперфузионное “оглушение сердца” и жизнеугрожающие желудочковые аритмии нередко “сводят на нет” усилия врачей в борьбе за жизнь пациента при остром инфаркте миокарда, трансплантации сердца, кардиохирургических вмешательствах, связанных с применением аппарата искусственного кровообращения [7]. Имеющиеся в распоряжении кардиологов медикаментозные средства для борьбы с этими осложнениями не всегда эффективны, поэтому продолжается поиск новых препаратов, способных предупредить появление тяжелых аритмий и сердечной недостаточности при возобновлении коронарной перфузии. В этом отношении заслуживают внимания агонисты опиоидных рецепторов (ОР), поскольку в экспериментах *in vivo* они проявляют антиаритмические свойства [5, 11], а в опытах *in vitro* способны предупредить появление реперфузионного оглушения миокарда [4]. Один из агонистов  $\delta$ -ОР (TAN-67) способен замедлять формирование зоны некроза при коронароокклюзии и после-

дующей реперфузии у наркотизированных животных [13]. Показано, что селективный пептидный агонист  $\mu$ -ОР DAMGO и преимущественный агонист  $\mu$ -ОР даларгин оказывают кардиопротекторный эффект при внутривенном введении [3]. Вместе с тем не известно, связан ли кардиопротекторный эффект  $\mu$ - и  $\delta$ -агонистов с активацией рецепторов, локализованных в миокарде или он зависит от стимуляции опиоидных рецепторов, расположенных в иных органах. Кроме того, не известно обладают ли агонисты  $\mu$ -ОР кардиопротекторной активностью в условиях ишемии и реперфузии изолированного сердца.

Цель работы: изучить кардиопротекторное действие агонистов опиоидных рецепторов в условиях ишемии и реперфузии изолированного сердца.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 300 г. После торакотомии сердца быстро извлекали и переносили в ванночку с охлажденным (4 °С) раствором Кребса-Хензелейта до прекращения спонтанных сокращений. После остановки сердца, освобожденное от жировой и соединительной ткани, помещали в термостабилизируемую увлажненную камеру. В восходящую дугу аорты вводили канюлю, через которую поступал изотонический раствор. Ретроградную перфузию сердца проводили по методу Лангендорфа по открытому контуру. Сократительную функцию сердца регистрировали при перфузии под постоянным давлением 52 мм рт.ст. раствором Кребса-Хензелейта, насыщенным карбогеном (37 °С,

<sup>1</sup> Лаборатория экспериментальной кардиологии (зав. — Л. Н. Маслов) НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН, Томск, 634050, ул. Шевченко 24.

<sup>2</sup> Отдел физиологии, Университет Южной Алабамы, Мобил, США.

<sup>3</sup> Компания Toray Industries, Канагава, Япония.

<sup>4</sup> Лаборатория синтеза пептидов Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ, Москва.

pH 7,4) и содержащим (в mM): NaCl — 120; KCl — 4,8; CaCl — 2; MgSO<sub>4</sub> — 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1,2; NaHCO<sub>3</sub> — 20; глюкоза — 10. Тотальную нормотермическую ишемию миокарда моделировали посредством полного прекращения подачи перфузионного раствора на 45 мин. После этого возобновляли перфузию и продолжали наблюдение в течение 30 мин.

Стимуляцию ОР *in vitro* осуществляли с помощью добавления агонистов этих рецепторов в перфузионный раствор. Селективный агонист  $\delta_1$ -рецепторов DPDPE (H-Tyr-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen-OH) [10] использовали в конечной концентрации 0,5 (778 нМ) и 0,1 мг/л (154 нМ). Селективный агонист  $\delta_1$ -рецепторов TAN-67 (2-Methyl-4aa-(3-hydroxyphenyl)-1,2,3,4,4a,5,12,12a $\alpha$ -octahydroquinolino[2,3,3-g]isoquinoline dihydrobromide) [10], представляющий производное изохинолина, применяли в концентрации 0,5 мг/л (178 нМ). Неселективный агонист  $\mu$ - и  $\delta$ -опиоидных рецепторов даларгин (H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) использовали в конечной концентрации 0,1 мг/л (137 нМ) [12]. Селективный пептидный агонист  $\mu$ -рецепторов DALDA (H-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) применяли в концентрации 0,5 мг/л (987 нМ) [10].

Сердца крыс после стабилизационного периода (45 мин) подвергали ишемии (45 мин) и реперфузии (30 мин). Активацию  $\delta_1$ -рецепторов *in vitro* проводили путем добавления агонистов в перфузионный раствор. Для этого по окончании 30-минутной адаптации к условиям нормоксической перфузии в раствор Кребса-Хензеляйта добавляли один из перечисленных агонистов в указанной концентрации и перфузировали в течение 10 мин, затем сердце “отмывали” от опиоида в течение 15 мин путем перфузии изотоническим раствором без препарата, после чего моделировали тотальную ишемию (45 мин) и реперфузию (30 мин). В качестве блокатора опиоидных рецепторов использовали антагонист  $\delta_1$ -рецепторов налтриндол в концентрации 1 нМ. После 20-минутного стабилизационного периода этим препаратом перфузировали изолированные сердца крыс в течение 10 мин, затем — 10 мин раствором, содержащим DPDPE, после чего миокард отмывали от лигандов ОР в течение 5 мин. При выборе доз веществ исходили из ранее опубликованных данных о кардиоваскулярных эффектах лигандов опиоидных рецепторов [1, 2, 4]. Лиганды ОР растворяли в изотоническом растворе Кребса-Хензеляйта непосредственно в день эксперимента. Контролем служили изолированные сердца интактных животных.

Степень необратимого повреждения кардиомиоцитов оценивали по уровню креатинфосфокиназы (КФК) в оттекающем от сердца перфузате [9]. Активность КФК определяли с помощью энзиматического набора “NAC-activated CK47-20 kit” (“Sigma”, США) и пересчитывали на 1 г ткани сердца за 30 мин реперфузии.

Даларгин был синтезирован в лаборатории синтеза пептидов Российского кардиологического комплекса

МЗ РФ (Россия), TAN-67 — компанией Toray Industries (Япония), DPDPE и DALDA — в компании Multiple Peptide Systems (США). Налтриндол приобретен в компания Tocris (Великобритания). Для приготовления перфузионного раствора применяли реактивы компании “ICN Biomedicals” (США).

Результаты экспериментов обработаны статистически с применением *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тотальная ишемия и реперфузия изолированного сердца сопровождались пятикратным повышением активности креатинкиназы в перфузате, оттекающем от сердца, по отношению к исходным “доишемическим” значениям, что, как известно, является показателем необратимого повреждения клеток миокарда [9] (рисунок).

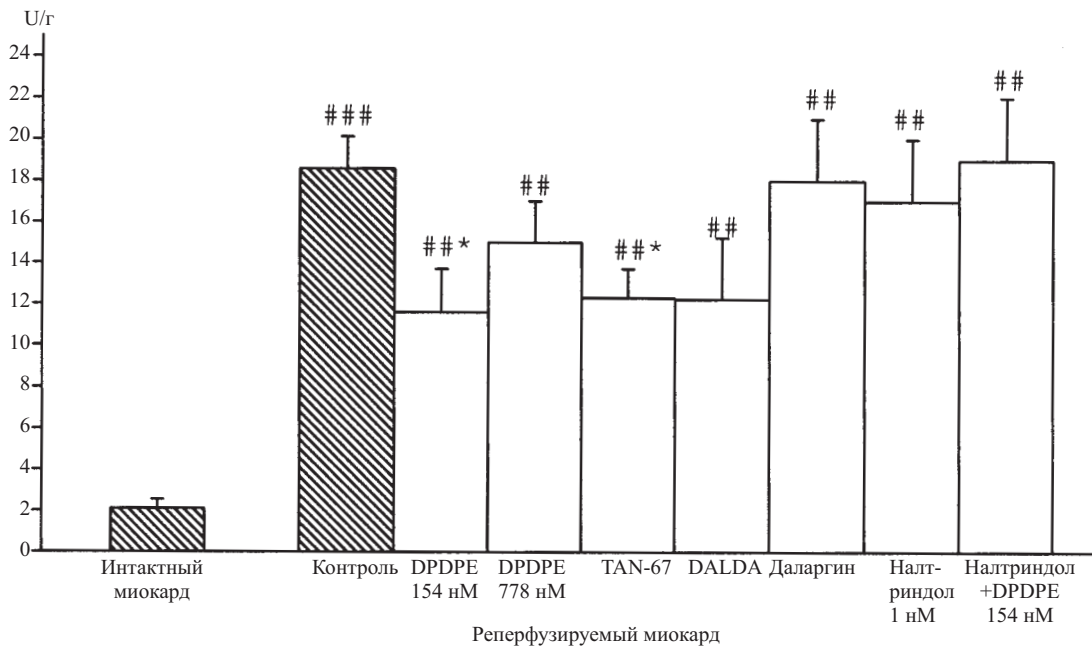
Как показано на рисунке, стимуляция кардиальных  $\delta_1$ -рецепторов путем добавления DPDPE в перфузат в концентрации 0,1 мг/л, обеспечивает снижение степени ишемического и реперфузионного повреждения клеток миокарда. Об этом свидетельствовало уменьшение активности КФК в перфузионном растворе на 40 % по отношению к соответствующим значениям контрольной серии. При повышении концентрации пептидного  $\delta_1$ -агониста до 0,5 мг/л, усиления кардиопротекторного эффекта не отметили, хотя прослеживалась тенденция к снижению постишемического выхода фермента из поврежденных клеток миокарда (рисунок).

В серии с добавлением в перфузионный раствор агониста  $\delta_1$ -рецепторов (TAN-67) также регистрировалось снижение (на 34 %) активности креатинкиназы в перфузионном растворе по сравнению с контролем (рисунок).

При исследовании кардиопротекторных свойств смешанного агониста  $\mu$ - и  $\delta$ -опиоидных рецепторов даларгина не было отмечено достоверных изменений постишемического уровня КФК по сравнению с контролем (рисунок).

Предварительная перфузия изолированного сердца раствором, содержащим  $\mu$ -агонист DALDA, так же, как и в случае применения даларгина, не оказала статистически значимого эффекта на уровень креатинкиназы в оттекающем от сердца растворе, хотя имелась тенденция к снижению активности этого маркера повреждения кардиомиоцитов (рисунок).

Чтобы найти ответ на вопрос о рецепторной специфичности полученных эффектов DPDPE, мы провели эксперименты с использованием блокатора  $\delta$ -опиоидных рецепторов налтриндолола. Предварительная блокада кардиальных  $\delta$ -ОР налтриндололом полностью устраняла кардиопротекторный эффект DPDPE (рисунок). Добавление в изотонический раствор одного налтриндолола не влияло на реперфузионный выброс КФК из миокарда (рисунок).



Эффект DPDPE (154 и 778 нМ), TAN-67 (178 нМ), даларгина (137 нМ), DALDA (987 нМ) и налтриндола (1 нМ) на активность креатинфосфокиназы (U/g) в перфузате, собранном за 30 мин реперфузии после 45-минутной тотальной ишемии на изолированном сердце.

Контроль — ишемия 45 мин + реперфузия 30 мин. Различия достоверны: # —  $p < 0,05$ ; ## —  $p < 0,01$  — по отношению к исходным значениям; \* —  $p < 0,05$  — от контроля.

Полученные данные показали, что агонисты  $\delta_1$ -рецепторов, DPDPE в концентрации 0,1 мг/л (154 нМ/л) и TAN-67 в концентрации 0,5 мг/л (178 нМ) оказывают кардиопротекторный эффект, о чем свидетельствует снижение уровня КФК в перфузионном растворе, оттекающем от миокарда. Однако при увеличении концентрации DPDPE до 0,5 мг/л (770 нМ/л) указанный эффект исчезал. Мы предположили, что защитное действие DPDPE и TAN-67 связано с активацией кардиальных  $\delta$ -рецепторов, к которым эти пептиды проявляют высокое сродство (DPDPE:  $K_i = 19$  нМ, TAN-67:  $K_i = 1,1$  нМ), [8, 10], а исчезновение защитного эффекта при увеличении концентрации агониста, возможно, является результатом активации иных подтипов опиоидных рецепторов, например,  $\mu$ - или  $\kappa$ -ОР, к которым эти лиганды проявляют низкое сродство [8, 10]. В пользу нашей гипотезы служат данные К. А. Aitchison и соавт. [6]. В аналогичных экспериментах этим авторам также удалось обнаружить кардиопротекторное действие преимущественного агониста  $\delta$ -рецепторов DADLE в низких концентрациях и исчезновение данного эффекта при увеличении содержания пептида в перфузионном растворе, которое они объясняют активацией  $\kappa$ -рецепторов [6].

Мы полагаем, что обнаруженный нами эффект обусловлен активацией именно  $\delta_1$ -рецепторов, поскольку DPDPE и TAN-67 являются селективными агонистами этих рецепторов, кроме того, на фоне блокады опиоидных рецепторов  $\delta$ -антагонистом налтриндолом кардиопротекторный эффект DPDPE обнаружить не удает-

ся.  $\delta_1$ -Рецепторы, по всей видимости, локализованы в миокарде, поскольку названный эффект отмечается при добавлении DPDPE и TAN-67 в раствор, которым перфузируют изолированное сердце.

Изучение кардиопротекторных свойств даларгина и DALDA показало, что после их применения достоверного изменения уровня КФК по сравнению с контролем не наблюдается. Отсутствие кардиопротекторного эффекта этих пептидов, возможно, связано с тем, что они являются  $\mu$ -агонистами, а  $\mu$ -опиоидные рецепторы в кардиомиоцитах до сих пор не идентифицированы. Отрицательный результат экспериментов с использованием даларгина и DALDA может служить косвенным доказательством участия  $\delta$ -ОР в реализации кардиопротекторного действия DPDPE и TAN-67. Обнаруженный нами ранее кардиопротекторный эффект даларгина и селективного  $\mu$ -агониста DAMGO в опытах *in vivo* [3], по всей видимости, является следствием активации  $\mu$ -рецепторов, расположенных экстракардиально.

## ВЫВОДЫ

1. Селективные агонисты  $\delta_1$ -опиоидных рецепторов DPDPE и TAN-67 предупреждают появление необратимых повреждений кардиомиоцитов изолированного сердца, подвергнутого воздействию тотальной ишемии и реперфузии.

2. Кардиопротекторный эффект DPDPE связан с активацией кардиальных  $\delta$ -рецепторов.

3. Агонисты  $\mu$ -опиоидных рецепторов даларгин и DALDA не оказывают кардиопротекторного эффекта в условиях ишемии-реперфузии изолированного сердца.

Авторы благодарят Dr. Kevin J. Gormley (NIDA, США) за предоставленные лиганды опиоидных рецепторов. Исследование выполнено при поддержке РФФИ, Регионального общественного фонда содействия отечественной медицине.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Б. Лишманов, А. В. Крылатов, Л. Н. Маслов, Е. В. Ускина., *Физиол. ж.*, **82**(5 – 6), 48 – 52 (1996).
2. Ю. Б. Лишманов, А. В. Крылатов, Л. Н. Маслов., *Рос. физиол. ж.*, **83**(7), 80 – 87 (1997).
3. Ю. Б. Лишманов, С. А. Богомаз, Л. Н. Маслов, С. В. Там., *Рос. физиол. ж.*, **86**(2), 164 – 173 (2000).
4. Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов., *Кардиология*, № 12, 25 – 30 (1998).
5. Н. В. Соленкова, А. В. Крылатов, Л. Н. Маслов, А. Ю. Лишманов, В. Ю. Серебров., *Бюл. эксперим. биологии*, Приложение: 23 – 25 (2001).
6. K. A. Aitchison, M. M. Awan, G. F. Baxter et al, *Basic Res. Cardiol.*, **95**, 1 – 10 (2000).
7. J. T. Bigger, J. T. Fleiss, L. M. Rolnitzky, et al., *Am. J. Cardiol.*, **55**, 623 – 630 (1985).
8. P. Delay-Goyet, P. Rigaudy, J. M. Zajac et. al., *FEBSLet.*, **183**(2), 439 – 443 (1985).
9. G. J. Grover, St. Dzwonczuk and P. G. Sleph., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **16**(5), 783 – 789 (1990).
10. B. N. Dhawan, F. Cesselin, P. B. Bradley et. al., *Pharmacol.*, **48**(4), 567 – 592 (1996).
11. R. M. Fryer, A. K. Hsu, H. Nagase, and G. J. Gross., *J. Pharmacol Exp Ther.*, **294**(2), 451 – 457 (2000).
12. N. Pencheva, J. Pospisek, L. Hauzerova et. al., *Br. J. Pharmacology.*, 128, 569 – 576 (1999).
13. J. E. J. Schultz, A. K. Hsu, H. Nagase, and G. J. Gross., *Am. J. Physiol.*, **274**, 909 – 914 (1998).

Поступила 15.09.03

## $\delta$ -OPIOID RECEPTOR AGONISTS PREVENT THE IRREVERSIBLE DAMAGE OF CARDIOMYOCYTES IN ISCHEMIZED-REPERFUSED ISOLATED RAT HEART

A. A. Platonov<sup>1</sup>, T. V. Lasukova<sup>1</sup>, L. N. Maslov<sup>1</sup>, J. M. Downey<sup>2</sup>, H. Nagaze<sup>3</sup>, and M. V. Ovchinnikov<sup>4</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> Department of Physiology, University of South Alabama, Mobile, USA;

<sup>3</sup> Toray Industries, Kanagawa, Japan;

<sup>4</sup> Laboratory of Peptide Synthesis, State Cardiology Research and Production Complex, ul. Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia

Pretreatment with selective  $\delta$ -opioid receptor ( $\delta$ -OR) agonists decreased the level of creatine kinase in the coronary effluent of isolated rat heart during a 45-min global ischemia and a 30-min reperfusion. The effect was completely abolished after pretreatment of the  $\delta$ -OR antagonist nitrindole. At the same time, pretreatment with  $\mu$ -OR antagonists did not affect the level of creatine kinase in the coronary effluent. It is suggested that stimulation of the cardiac  $\delta$ -OR prevents the irreversible cardiac cell damage during global ischemia and reperfusion *in vitro*. In contrast, the cardiac  $\mu$ -OR do not play any significant role in regulation of the cardiac resistance to the pathogenic action of ischemia and reperfusion.