

Ласукова
Татьяна Викторовна

**РОЛЬ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИИ СЕРДЦА
В УСЛОВИЯХ НОРМОКСИИ И ПОСТИШЕМИЧЕСКОЙ РЕПЕРФУЗИИ**

03.00. 13 – физиология

14.00. 25 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Работа выполнена в ГУ НИИ кардиологии Томского научного центра
СО РАМН

Научные консультанты: член-корреспондент РАМН
доктор медицинских наук,
профессор Лишманов Ю. Б.

доктор медицинских наук,
профессор Маслов Л. Н.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Замощина Т. А.

член-корреспондент РАМН
доктор медицинских наук,
профессор Киселев В. И.

доктор биологических наук,
профессор Плотников М.Б.

Ведущая организация: ГУ НИИ физиологии СО РАМН

Защита состоится "___" _____ 2005 г. в ___ часов на заседании
диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном
медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке
Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск,
проспект Ленина, 107)

Автореферат разослан "___" _____ 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Суханова Г. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Опиоидная система в организме представлена рецепторами, их пептидными агонистами и ферментами, осуществляющими посттрансляционный синтез и расщепление этих соединений до аминокислот [Панченко и др., 1999; Younes et al., 2000]. Эндogenous агонистами опиоидных рецепторов являются мет- и лей-энкефалины, эндорфины, эндоморфины, динорфины и ряд других пептидов [Dhawan et al., 1996; Meunier, 1997; Zadina et al., 1997]. Установлено, что в кардиомиоцитах синтезируются энкефалины, динорфины и эндорфины [Ventura et al., 1994; Zimlichman et al., 1996], а содержание опиоидных пептидов в миокарде сопоставимо с их уровнем в нейрональной ткани [Маслов 1992; Forman et al., 1994; Maslov et al., 1995]. Эти факты позволяли предполагать важную роль опиоидной системы в регуляции функционального состояния миокарда. Действительно, на сегодняшний день известно, что в ответ на стимуляцию опиоидных рецепторов происходит ослабление адренергического влияния на сердце [Xiao et al., 1997], снижение сердечного выброса [Clo et al., 1985; Vargish и Beamer, 1989], отмечаются инотропные, хронотропные и гемодинамические эффекты [Лишманов и Маслов, 2003; Шерман и Форманчук, 2004; Laurent et al., 1985]. Такое многообразие кардиоваскулярных эффектов опиоидных пептидов позволяет рассматривать их в качестве эндогенных модуляторов физиологических и патологических процессов в миокарде, открывая перспективы практического использования синтетических аналогов эндогенных опиоидов.

Опиоидные пептиды являются наиболее значимыми эндогенными медиаторами так называемого феномена «ишемического прекодиционирования» [Лишманов и др., 2000; Chien et al., 1999; Miki et al., 1998; Schultz et al., 1997]. Суть названного явления заключается в повышении адаптационной устойчивости сердца к действию длительной ишемии после нескольких предварительных сеансов кратковременной коронароокклюзии и реперфузии [Murry et al., 1986].

Актуальность исследований, направленных на изучение механизмов развития такой адаптации, обусловлена недостаточной эффективностью и наличием негативных побочных свойств у лекарственных средств, применяющихся для повышения устойчивости сердца к действию ишемии-реперфузии. Известно, что отрицательные гемодинамические эффекты, вызванные приемом антагонистов кальция [Метелица, 2002; Сыркин, 2003; Grover и Slep, 1989; Miyawaki и Ashraf, 1997], бета-адреноблокаторов [Мазур и Аб-

далла, 1995; Метелица, 1996; 2002; Закиров и др., 1998; Сыркин, 2003] и нитроглицерина [Беленков и др., 2003; Катцунг, 1998; Сыркин, 2003], существенно сужают сферу их использования с целью ограничения зоны некроза миокарда. Кроме того, практически любой антиаритмический препарат может, к сожалению, сам по себе вызывать или потенцировать нарушения ритма сердца [Машковский, 2002; Мазур и Абдалла, 1995; Метелица, 2002; Сыркин, 2003; Breithardt et al., 1995; Rosen, 1995; Roden, 2000]. Наконец, профилактика реперфузионных нарушений инотропной функции сердца с помощью адреномиметиков, ингибиторов фосфодиэстеразы или сердечных гликозидов нередко оказывается малоэффективной, поскольку общим недостатком большинства этих средств является их способность провоцировать нарушения ритма и увеличивать потребность миокарда в кислороде [Метелица, 2002; Сыркин, 2003]. В связи с вышесказанным, раскрытие эндогенных механизмов повышения адаптационной устойчивости сердца к повреждающему действию ишемии и реперфузии является одной из важных задач современной физиологии и фармакологии.

Важную роль в механизме «ишемического прекондиционирования» (адаптация сердца к ишемии) играют эндогенные опиоидные пептиды [Лишманов и др., 2000; Chien et al., 1999; Miki et al., 1998; Schultz et al., 1997]. Об этом свидетельствуют следующие факты. В экспериментах на изолированном сердце обнаружено увеличение содержания в миокарде лей- и мет-энкефалина после 5-минутной тотальной нормотермической ишемии [Лишманов и др., 2000]. Установлено, что в условиях блокады опиоидных рецепторов налоксоном адаптация сердца к ишемии не формируется [Fryer et al., 1999; Schultz et al., 1995; 1997; Chien et al., 1999; Miki et al., 1998; Schulz et al., 2001]. Предварительное селективное ингибирование δ -ОР налтриндолом также устраняло защитный эффект ишемического прекондиционирования [Schultz et al., 1997]. Предполагают, что в механизме адаптационного повышения устойчивости сердца к действию ишемии принимают участие опиоидные рецепторы, расположенные в миокарде [Chien et al., 1999; Miki et al., 1998; Romano et al., 2004; Schultz et al., 1997]. Однако на этот счет имеются лишь косвенные доказательства [Chien et al., 1999; Miki et al., 1998; Romano et al., 2004; Schultz et al., 1997].

Существуют данные о том, что агонисты опиоидных рецепторов (ОР) способны повышать устойчивость сердца к аритмогенному действию ишемии и реперфузии [Лишманов и др., 2000; Лишманов и Маслов, 2002; Соленкова и др., 2002; Fryer et al., 2000], а также устранять реперфузионную сокра-

тельную дисфункцию сердца [Ласукова и др., 2001; Лишманов и др., 2001; Pyle et al., 2000; 2001].

Вместе с тем, обсуждаемая проблема практического использования опиоидов еще далека от своего разрешения, поскольку значение различных субтипов ОР в адаптационной защите сердца от реперфузионных аритмий, необратимых повреждений кардиомиоцитов и сократительной дисфункции изучено пока далеко не полностью. В частности, оставалось неясным, какова роль эндогенных агонистов опиоидных рецепторов [Springhorn и Glaycomb, 1992] в формировании устойчивости сердца к действию ишемии и последующей реперфузии. Кроме того, согласно литературным данным, антиаритмическое действие агонистов ОР обнаружено только в условиях кратковременной коронароокклюзии и реперфузии [Лишманов и др., 1997; Соленкова и др., 2002], а исследования опиоидергического повышения устойчивости миокарда к аритмогенному действию более длительной ишемии-реперфузии никем не проводилось. Однако патологические изменения в миокарде при длительной ишемии, в отличие от таковых при кратковременной ишемии, являются необратимыми, и, соответственно, механизмы возникновения аритмий в обоих случаях могут существенно различаться [Russell et al., 1984; Wu и Zipes, 2001]. Следовательно, вопрос о роли опиоидных рецепторов в аритмогенезе в условиях продолжительной ишемии требовал отдельного изучения.

В ряде исследований были обнаружены кардиопротекторные свойства агонистов ОР [Aitchison et al., 2000; Kark et al., 2001; Schultz et al., 1998]. Однако указанные авторы либо использовали неселективные агонисты опиоидных рецепторов [Aitchison et al., 2000; Kark et al., 2001], либо применяли селективные агонисты в очень высоких дозах [Schultz et al., 1998], в сотни раз превышающих физиологический уровень эндогенных лигандов опиоидных рецепторов в крови [Younes et al., 2000]. В связи с этим, была неизвестна рецепторная специфичность обнаруженных эффектов [Llobell и Laorden, 1995].

Вопрос о локализации опиоидных рецепторов, участвующих в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии-реперфузии, также оставался открытым. Это связано с тем, что антиаритмическое и кардиопротекторное действие агонистов указанных рецепторов изучалось в экспериментах *in vivo* [Соленкова и др., 2002; Schultz et al., 1998]. При такой постановке опытов обнаруженные эффекты могли быть как результатом прямого действия препарата на сердце, так и следствием изменения тонической активности вегетативной нервной системы [Каверина и др., 2004; Розенштраух и др., 1994].

Убедительно ответить на эти вопросы можно было только с помощью экспериментов на изолированном перфузируемом сердце.

Известно, что опиоидные рецепторы участвуют регуляции сократительной функции сердца [Clo et al., 1985; Fujita et al., 2000; Pyle et al., 2000; Ventura et al., 1992]. В то же время, нет единого мнения относительно физиологического значения этих рецепторов в процессах сокращения-расслабления сердечной мышцы, поскольку существуют публикации как об опиоидергической стимуляции сократимости изолированных кардиомиоцитов [Huang et al., 1991; Fujita et al., 2000], так и об угнетении насосной функции изолированного сердца после перфузии миокарда агонистами опиоидных рецепторов [Clo et al., 1985; Pyle et al., 2000; Ventura et al., 1992]. Приведенные разночтения могут быть связаны с использованием авторами неселективных агонистов, в результате чего осталась неконкретизированной роль того или иного типа рецепторов в регуляции сократительной активности сердца. Не изучалась рецепторная специфичность отмеченных инотропных эффектов, в связи с чем не удалось установить, в какой мере выявленные феномены связаны с активацией опиоидных рецепторов, а в какой – их реализация зависит от иных механизмов [Llobell и Laorden, 1995].

Практически не исследована роль опиоидных рецепторов в регуляции сократимости сердца, подвергнутого ишемии-реперфузии. Инотропные эффекты агонистов этих рецепторов изучались на интактных препаратах изолированных кардиомиоцитов, полосок предсердий или изолированном перфузируемом сердце [Clo et al., 1985; Fujita et al., 2000; Ventura et al., 1992]. В связи с этим, в данной работе мы изучали опиоидергические изменения насосной функции сердца, подвергнутого действию ишемии-реперфузии.

Анализируя результаты приведенных исследований, нельзя обойти вниманием тот факт, что авторами работ не учитывался факт гетерогенности популяции опиоидных рецепторов. Известно, что существует несколько типов названных рецепторов: μ -, κ - и δ -, которые подразделяются на дополнительные субтипы [Cadet et al., 2003; Dhawan et al., 1996; Мако и Ronai, 2000; Narita, 2001; Ohsawa, 2000; 2001; Wu et al., 2000]. Активация того или иного типа рецепторов может оказывать прямо противоположное влияние на сердечно-сосудистую систему. Известны данные как о кардиопротекторном эффекте, сопровождающем их активацию [Peart et al., 2004; Wu et al., 1999], так и, наоборот, о потенцировании агонистами опиоидных рецепторов ишемических и реперфузионных повреждений [Aitchison et al., 2000]. Исходя из вышесказанного, работа была посвящена исследованию значения каждого из вышена-

званных типов рецепторов (μ -, κ - и δ_1 -) в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии.

Создание новых кардиопротекторных и антиаритмических препаратов невозможно без знания того, как эти фармакологические агенты действуют на клетки миокарда. В связи с этим, не менее актуальной проблемой оставалось изучение внутриклеточных механизмов, опосредующих эффекты опиоидов. Известно, что опиоидные рецепторы принадлежат к семейству G-белок-сопряженных рецепторов [Eguchi, 2004; Levac et al., 2002; Pasternak, 2001], стимуляция которых модулирует состояние сигнальных систем клетки посредством образования или, наоборот, угнетения синтеза вторичных мессенджеров, таких как инозитолтрифосфат, цАМФ [Ikeda et al., 2000; Levac et al., 2002; Nevo et al., 2000; Pasternak, 2001; Schultz et al., 1998; Rubovitch et al., 2003]. Известно также об опиоидергическом увеличении уровня цГМФ в миокарде [Maslov и Lishmanov, 1993], а также о повышении активности протеинкиназы C [Schultz et al., 1998], тирозинкиназы [Schultz et al., 1998] и "открытия" АТФ-зависимых K^+ -каналов (K_{ATP} -каналов) [Gross, 2000]. Исходя из сказанного, в работе изучалось участие K_{ATP} -каналов, цАМФ, цГМФ, ионов Ca^{2+} в реализации кардиопротекторных, антиаритмических и инотропных эффектов агонистов опиоидных рецепторов. Это объясняется важным значением названных ионных каналов и вторичных посредников в развитии реперфузионных аритмий, необратимых повреждений кардиомиоцитов, постишемической сократительной дисфункции сердца [Реброва и др., 2001; Соленкова и др., 2002; Aitchison et al., 2000; Du Toit et al., 2001; Gross, 2000].

Сопоставление литературных данных и результатов собственных исследований позволило нам предположить, что опиоидные рецепторы могут играть ключевую роль в регуляции устойчивости сердца к патогенному действию ишемии и реперфузии.

Исследование выполнено в рамках основной темы НИР отдела экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН (шифр 005 "Роль опиатных рецепторов и K_{ATP} – каналов в регуляции устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям") и при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (Грант РФФИ 93-04-20357; Грант РФФИ 98-04-48010; Грант РФФИ 02-0450/04).

Цель работы: Изучить роль μ -, δ_1 - и κ -опиоидных рецепторов в регуляции функционального состояния миокарда в условиях нормоксии и постишемической реперфузии.

Задачи:

1. Оценить значение кардиальных μ - δ_1 - и κ -опиоидных рецепторов в регуляции сократимости интактного сердца в условиях нормоксии.
2. Исследовать роль эндогенных агонистов опиоидных рецепторов в формировании устойчивости сердечной мышцы к действию ишемии-реперфузии у неадаптированных животных.
3. Изучить влияние агонистов μ -опиоидных рецепторов на устойчивость изолированного сердца к действию ишемии и реперфузии.
4. Исследовать участие K_{ATP} -каналов в реализации эффектов, связанных со стимуляцией μ -опиоидных рецепторов.
5. Изучить вклад δ_1 -опиоидных рецепторов в формирование устойчивости миокарда к патогенному действию ишемии-реперфузии изолированного сердца.
6. Исследовать роль цАМФ, цГМФ и внутриклеточного кальция в механизмах реализации кардиотропных эффектов агонистов δ_1 -опиоидных рецепторов.
7. Оценить способность агонистов κ -опиоидных рецепторов изменять устойчивость миокарда к ишемическим и реперфузионным повреждениям.
8. Проанализировать значение циклических нуклеотидов в реализации кардиотропных эффектов агонистов κ -опиоидных рецепторов.

Научная новизна. Впервые изучена роль μ - δ_1 - и κ -опиоидных рецепторов в регуляции насосной функции миокарда в условиях нормоксии. Установлено, что активация кардиальных δ_1 - и κ -опиоидных рецепторов сопровождается развитием отрицательного инотропного эффекта, а внутривенное введение μ -агонистов способствует усилению сократимости изолированного сердца.

Новизну представляют данные о том, что в условиях изоляции сердца эндогенные агонисты опиоидных рецепторов не влияют на формирование повышенной устойчивости миокарда к ишемическим и реперфузионным воздействиям.

В работе впервые обнаружено кардиопротекторное действие агонистов μ -рецепторов. Перспективным является выдвинутое в работе положение о способности агонистов μ -опиоидных рецепторов эффективно предупреждать развитие реперфузионных аритмий и предотвращать появление реперфузионной сократительной дисфункции сердца. Принципиально новыми являются результаты о том, что защитные эффекты μ -агонистов связаны с активацией

АТФ-зависимых K^+ -каналов.

Впервые показано, что кардиопротекторный и антиаритмический эффект агонистов δ_1 -опиоидных рецепторов связан с активацией рецепторов, локализованных в сердце. Установлено, что в механизме отмеченных эффектов основную роль играет с δ_1 -рецептор-опосредованное изменение транспорта кальция на уровне саркоплазматического ретикулума.

Приоритетными являются данные о том, что с помощью активации кардиальных κ -рецепторов можно предотвратить появление необратимых повреждений кардиомиоцитов в условиях моделирования ишемии и реперфузии. Впервые показано, что кардиопротекторный эффект агонистов κ -опиоидных рецепторов может быть связан с изменением уровня циклического аденозинмонофосфата в ткани сердца.

На основании материалов диссертации сформулирована концепция о значении μ -, κ - и δ_1 -опиоидных рецепторов в реализации механизмов, формирующих повышенную устойчивость миокарда к действию ишемии-реперфузии.

Теоретическая и практическая значимость. Настоящая работа вносит вклад в развитие фундаментальных представлений о механизмах опиоидергической регуляции сократительной функции и метаболизма сердца в условиях нормальной перфузии и в условиях моделирования ишемических и реперфузионных повреждений сердца. Результаты исследования в значительной степени дополняют сведения о взаимодействии опиоидных рецепторов сердца с ионными каналами и внутриклеточными сигнальными системами кардиомиоцитов.

Говоря о возможностях практического использования полученных результатов, следует подчеркнуть впервые установленный факт наличия у агонистов μ -рецепторов антиаритмического действия и способности улучшать насосную функцию сердца в постишемическом периоде. Такое сочетание антиаритмического и положительного инотропного эффекта открывает перспективы для создания принципиально новой группы препаратов на основе этих соединений.

На основании полученных данных агонист опиоидных рецепторов далаггин предложен в качестве нового антиангинального препарата (патент на изобретение №200026 от 10 марта 2003г.). Другой пептидный агонист ноцицептин запатентован как антиаритмический препарат (патент №2171115 от 27 июля 2001г.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Стимуляция кардиальных δ_1 - и κ -опиоидных рецепторов сопровождается развитием отрицательного инотропного эффекта, в то время как внутривенное введение μ -агонистов способствует усилению сократимости изолированного сердца в условиях нормоксии.
2. Эндогенные агонисты опиоидных рецепторов не участвуют в регуляции устойчивости изолированного перфузируемого сердца к действию ишемии-реперфузии у неадаптированных животных.
3. Активация периферических μ -рецепторов способствует:
 - а) предупреждению реперфузионных аритмий;
 - б) снижению степени некротического повреждения кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии;
 - в) уменьшению реперфузионной сократительной дисфункции сердца.
 Перечисленные эффекты являются результатом μ -опиоидергической стимуляции K_{ATP} -каналов.
4. Стимуляция кардиальных δ_1 -рецепторов обеспечивает:
 - а) повышение устойчивости миокарда к аритмогенному влиянию реперфузии;
 - б) уменьшение степени ишемического и реперфузионного повреждения кардиомиоцитов;
 - в) снижение насосной функции сердца.
 Эти эффекты связаны с изменением транспорта кальция на уровне саркоплазматического ретикулума.
5. Активация кардиальных κ -рецепторов способствует снижению степени ишемического и реперфузионного повреждения кардиомиоцитов, которое сопровождается уменьшением уровня цАМФ в миокарде.

Апробация диссертации. Материалы диссертации обсуждались на I-й Всесоюзной конференции «Нейропептиды, их роль в физиологии и патологии» (Томск, 1986); VI-й Всероссийской конференции «Нейроэндокринология-95» (Санкт-Петербург, 1995); Региональной научно-практической конференции «Медикаментозное лечение нарушений ритма сердца» (Томск, 1997); конференции «Актуальные проблемы кардиологии» (Томск, 1997); II-й научной сессии «Актуальные проблемы кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии» (Кемерово, 1998); Региональной научно-практической конференции «Диагностика и лечение фибрилляции предсердий» (Томск, 1999); Региональной конференции Сибири и Дальнего Востока (Томск, 1999); Международной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения А.М. Уголева (Санкт-Петербург, 2001); Региональной конференции «Актуальные пробле-

мы экспериментальной и клинической фармакологии» (Томск, 2001); Региональной Научно-практической конференции «Проблемы детской кардиологии» (Томск, 2001); Российском национальном конгрессе кардиологов (Санкт-Петербург, 2002); 4-м съезде физиологов Сибири (Новосибирск, 2002); European Opioid Conference 2002 (Uppsala, Sweden, 2000); XIX-м съезде физиологического общества им. Павлова (Екатеринбург, 2004); 1-м съезде кардиологов Сибирского Федерального округа и 5-м Сибирском физиологическом съезде (Томск, 2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 41 печатная работа, из них – 20 статей в центральных реферируемых журналах, 8 публикаций – в материалах международных, всесоюзных, всероссийских конференций и 13 – региональных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 264 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 541 источник, из них 131 отечественный и 410 иностранных. Работа иллюстрирована 23 таблицами и 28 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на модели изолированного перфузируемого по Лангендорфу сердце крыс, на которой оценивали кардиопротекторные, инотропные и антиаритмические эффекты лигандов опиоидных рецепторов. Преимущество подобных исследований по сравнению с работами, выполняемыми *in vivo*, состоит в том, что миокард в такой модели выведен из-под влияния регуляторных систем целого организма. Это дает возможность обнаружить нарушения биохимических процессов и сократительной функции, зависящие только от нарушений структуры и метаболизма миокарда. В данной работе использовали модель тотальной (глобальной) ишемии, позволяющей полностью прекратить поступление кислорода и питательных субстратов к клеткам сердца, а также отток продуктов метаболизма.

Эвтаназию животных производили методом цервикальной дислокации, после чего быстро удаляли кожный покров с грудной клетки и вскрывали ее ножницами, делая три разреза: один – поперек грудины и два продольных. Пинцетом с резиновыми наконечниками на браншах захватывали подходящие к сердцу сосуды, после чего их отсекали выше места захвата. Выделенное сердце с целью остановки спонтанных сокращений переносили в охлажденный до +4°C раствор Кребса-Хензелята, после чего помещали в термостабилизированную увлажненную камеру и вводили канюлю в восходящую

дугу аорты, через которую поступал изотонический раствор [Doring и Dehnert, 1988]. В работе использовали изотонический раствор Кребса-Хензеля следующего состава (в ммоль/л): NaCl – 120; KCl – 4,8; CaCl₂ – 2,0; MgSO₄ – 1,2; KH₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 20; глюкоза – 10. Перфузионный раствор насыщали газовой смесью, содержащей 95% O₂ и 5% CO₂. Для приготовления раствора Кребса-Хензеля использовали реактивы компаний «Sigma» и «ICN». Перфузию сердца проводили по методу Лангендорфа по открытому контуру [Doring и Dehnert, 1988; Pepe et al., 1997]. Температура раствора была 37±0,5°C, перфузионное давление – 52 мм рт. ст., pH=7,5.

Сократительную функцию сердца регистрировали в изоволюмическом режиме с помощью введенного в полость левого желудочка латексного баллончика, соединенного с датчиком давления. Проводили запись кривой внутрижелудочкового давления, ее первой производной и электрокардиограммы (ЭКГ). Для регистрации ЭКГ электроды располагали на правом предсердии и левом желудочке сердца [Driscoll, 1981; Wong и Lee, 1987]. После 20 мин адаптации изолированного сердца к условиям перфузии проводили регистрацию исходных параметров сократимости и создавали условия тотальной нормотермической ишемии, прекращая подачу раствора Кребса-Хензеля на 45 мин с последующей 30-минутной реперфузией.

В нескольких сериях экспериментов крысам вводили лиганды опиоидных рецепторов (ОР) внутривенно за 15 мин до выделения сердца. Контрольным животным инъецировали физиологический раствор в том же объеме. В других группах непосредственно перед моделированием глобальной ишемии сразу после периода адаптации проводили 10-минутную перфузию изолированного сердца раствором, содержащим агонисты или блокаторы ОР, затем следовала 10-минутная перфузия без препарата и последующая 45-минутная ишемия и 30-мин реперфузия.

По данному разделу работы было проведено 23 серии экспериментов и использовано 349 животных.

Ниже представлена таблица с распределением животных по сериям экспериментов.

Таблица 1.

Распределение животных по сериям экспериментов

№ п/п	Название серий экспериментов	Число наблюдений
-------	------------------------------	------------------

1	Контроль: ишемия (45 мин)+ реперфузия (30) мин	25
2	Внутривенное введение DAMGO (0,1 мг/кг)+ ишемия+реперфузия	14
3	СТАР (0,1мг/кг)+ ишемия + реперфузия	14
4	СТАР +DAMGO + ишемия + реперфузия	14
5	Глибенкламид (0,3 мг/кг)+ишемия+реперфузия	14
6	Глибенкламид +DAMGO + ишемия + реперфузия	14
7	DPDPE(0,1 мг/кг)+ишемия+реперфузия	14
8	DPDPE(0,5 мг/кг)+ишемия+реперфузия	14
9	U-50,488(1 мг/кг)+ишемия+реперфузия	14
10	Контроль: нормоксическая перфузия без ишемии 20 мин + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин)	30
11	DAMGO (170 нМ) + ишемия + реперфузия	14
12	DALDA (163 нМ)+ ишемия+реперфузия	14
13	DALDA (850нМ)+ ишемия+реперфузия	14
14	DPDPE (154 нМ)+ ишемия (45 мин)+ реперфузия	14
15	DPDPE (778 нМ)+ ишемия (45 мин)+ реперфузия	14
16	TAN-67 (930 нМ) + ишемия (45 мин)+ реперфузия	14
17	Даларгин (137 мМ)+ишемия(45мин)+реперфузия	14
18	Налтриндол (1нМ) + ишемия + реперфузия	14
19	Налтриндол(1нМ)+DPDPE(0,1мг/л)+ишемия+реперфузия	14
20	Циклопиазоновая кислота(10^{-7} М)+ишемия+реперфузия	14
21	Циклопиазоновая кислота(10^{-7} М)+DPDPE (154 нМ)	14
22	U-50488 (1 мкМ) + ишемия + реперфузия	14
23	U-50488 (0, 1 мкМ) + ишемия + реперфузия	14

В перфузате, оттекающем от сердца, определяли активность креатин-фосфокиназы (КФК) – маркера необратимых повреждений кардиомиоцитов [Kark M., 2001]. По окончании эксперимента сердца быстро замораживали в жидком азоте для дальнейшего определения в них циклических нуклеотидов – цАМФ и цГМФ.

Запись параметров сократительной функции изолированного сердца производили в течение 10 с до моделирования ишемии и на 5-й, 15-й и 30-й минутах реперфузии. Во время перфузии препаратами и в начале реперфузионного периода осуществляли длинную запись в течение 10 мин. При анализе ЭКГ учитывали появление единичных и множественных (более 16 за 10 мин) желудочковых экстрасистол, желудочковой тахикардии и фибрилляции.

Для регистрации и обработки данных с установки изолированного сердца использовали оригинальную компьютерную программу «ANNA», разработанную совместно с научно-исследовательским институтом оптики и атмосферы. Программное обеспечение предполагает запись электрокардиограммы (ЭКГ), кривой сокращения (F) и ее первой производной (F').

В ходе экспериментов измеряли следующие показатели сократимости изолированного сердца:

ЧСС – частота сердечных сокращений (уд/мин) – число сокращений сердца в течение одной минуты;

FS – давление, развиваемое левым желудочком изолированного сердца (мм рт.ст.), вычисляется как разница между систолическим и диастолическим давлением [Sargent et al., 1994]. Уменьшение данного показателя при моделировании ишемии-реперфузии является одним из показателей тяжести повреждения сердечной мышцы;

FN – конечное диастолическое давление (выражали в % от исходного) служит для оценки степени расслабления миокарда и характеризует контрактуру сердца. Поскольку контрактура зависит от уровня Ca^{2+} в миоплазме, то конечное диастолическое давление можно расценивать как косвенный показатель концентрации Ca^{2+} в цитоплазме кардиомиоцитов [Капелько и Горина, 1987; Капелько и др., 1988].

МСС – максимальная скорость сокращения (мм рт.ст./сек) рассчитывается как максимум производной первого порядка от кривой развития давления в левом желудочке.

МСП – максимальная скорость расслабления (мм рт.ст./с) – характеризует состояние процесса расслабления миокарда рассчитывается как минимум производной первого порядка от кривой развития давления в левом желудочке [Меерсон и Капелько, 1978].

Степень необратимого повреждения мембран кардиомиоцитов изучали по активности креатинфосфокиназы (КФК) в оттекающем от сердца перфузате с использованием коммерческих энзиматических наборов фирмы «Sigma» (St. Louis, США) и «Bioson» (Германия). Оптическую плотность образцов

регистрировали на спектрофотометре SPECORD M-40 (Германия) при длине волны 340 нм. Метод основан на увеличении поглощения света длиной 340 нм, пропорциональном активности КФК в образце, вносимом в кювету с инкубационной смесью.

Уровень циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) в миокарде определяли радиоиммунологическим методом с помощью стандартных коммерческих наборов согласно инструкциям фирм-изготовителей для каждого РИА-комплекта. В своей работе мы использовали следующие наборы для проведения РИА-исследований: «RIA АМРс/сАМР» и «RIA сGMP» (компания «Immunotech», Марсель, Франция). Радиоиммунологическому определению уровня цАМФ и цГМФ предшествовала предварительная экстракция последних из ткани сердца этиловым спиртом [Maslov и Lishmanov, 1995].

Радиометрию проб и математическую обработку информации (перевод числа импульсов счета за минуту для каждой пробы в единицы концентрации) проводили на отечественном гамма-счетчике «Гамма-12», снабженном программой для обработки данных РИА-анализа. Конечный результат выражали в нмоль/г.

Используемые препараты. Примененные в работе пептидные лиганды опиоидных рецепторов синтезированы в компаниях «Multiple Peptide systems» и «Chiron Mimotopes Peptide Systems» (Сан-Диего, США) и предоставлены Dr. K. Gormley (NIDA, США). Агонист δ_1 -рецепторов TAN-67 был предоставлен Dr. H. Nagase из компании «Toray Industries» (Kanagawa, Япония). Даларгин синтезирован в лаборатории синтеза пептидов Российского кардиологического Научно-производственного комплекса МЗ РФ.

Применено 2 пути введения препаратов: внутривенная инъекция (*in vivo*) и добавление в перфузионный раствор (*in vitro*). При внутривенном введении лиганды опиоидных рецепторов (ОР) растворяли в 0,9% NaCl и вводили внутривенно болюсом. В сериях с применением лигандов ОР *in vitro* эти соединения добавляли в раствор Krebsa-Хензелята и перфузировали изолированное сердце в течение 10 минут, после чего следовала 10-мин «отмывка» тем же раствором, но без препарата, затем – ишемия-реперфузия.

Агонисты опиоидных рецепторов. В работе был использован смешанный агонист μ - и δ -ОР даларгин [Коробов, 1988]. Применялись высокоселективные агонисты δ_1 -рецепторов DPDPE [Ela et al., 1997] и TAN-67 [Varga et al., 1996]. При внутривенном введении DPDPE инъецировали в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг за 15 мин до изоляции сердца. В экспериментах *in vitro* DPDPE применяли в концентрации 154 и 778 нМ. Другой селективный агонист δ_1 -ОР

TAN-67 применяли в концентрации 0,5 мг/л (983 нМ).

Селективный агонист μ -ОР DAMGO (H-Tyr-D-Ala-Gly-N-Me-Phe-Gly-ol) [Dhawan et al., 1996; Onoprishvili, 1999] инъецировали внутривенно в дозе 0,1 мг/кг [Маслов и Лишманов, 1998; Наумова, 1998; Реброва, 2001] и *in vitro* в концентрациях 170 нМ (0,1 мг/л) и 850 нМ (0,5 мг/л). Другой селективный агонист μ -ОР – DALDA (NH₂-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂) [Shiller et al., 1990; 2000] применялся для внутривенного введения в дозе 0,1 мг/кг [Маслов и Лишманов, 1998] и *in vitro* в концентрации 163 нМ [Shiller et al., 2000].

Селективный агонист κ -ОР – trans(-)-3,4-Dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl] benze U-50,488 [Dhawan et al., 1996] использовали в экспериментах на изолированном сердце, применяя 2 пути введения: внутривенное за 15 мин до изоляции сердца (1 мг/кг) и добавление в перфузионный раствор в концентрациях 1 мкМ [Yu et al., 1998] и 100 нМ [Wu et al., 1999].

Антагонисты опиоидных рецепторов. Селективный антагонист δ -ОР налтриндол [Portogese, 1988; Dhawan et al., 1996] использовали с целью блокады δ -ОР. Препарат применяли в экспериментах на изолированном сердце в концентрации 1 нМ [Schiller et al., 1990; 2000].

Селективный антагонист μ -ОР СТАР (NH₂-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-L-Pen-Thr-NH₂) [Dhawan et al., 1996] применяли внутривенно в дозе 0,1 мг/кг [Наумова, 1998; Реброва, 2001] с целью блокады μ -ОР.

С целью изучения роли саркоплазматического ретикулума (СПР) в реализации кардиотропных эффектов агонистов ОР использовали блокатор Ca²⁺-АТФ-азы СПР циклопиазоновую кислоту [Suzuki, 1992] в конечной концентрации 10⁻⁷М [Du Toit и Opie, 1994].

Для исследования роли K_{АТФ}-каналов в реализации кардиотропных эффектов агонистов опиоидных рецепторов применяли блокатор сарколеммальных и митохондриальных K_{АТР}-каналов глибенкламид [D'Alonzo et al., 1994], который вводили за 45 мин до начала эксперимента.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные обрабатывали с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6. В случае распределения, близкого к нормальному, для проверки гипотезы о равенстве групповых средних использовали t-критерий Стьюдента. При распределении полученных цифровых данных, не соответствующем нормальному, для выявления межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при p<0,05.

Статистическую обработку качественных признаков (частота возникно-

вения аритмий) осуществляли с помощью критерия χ^2 .

* РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используемая нами модель (45 мин тотальной ишемии и 30 мин реперфузии) адекватно отражала основные проявления ишемических и реперфузионных нарушений функции сердца, а именно: наличие необратимых повреждений мембран кардиомиоцитов, о которых свидетельствовал реперфузионный выброс креатинкиназы в перфузат [Kark et al., 2001], появление желудочковых нарушений ритма в первые 10 мин реперфузии в 75% случаев; сократительная дисфункция сердца.

Первоначальной задачей исследования было определение роли μ -опиоидных рецепторов в регуляции функции сердца при нормоксии и в условиях постишемической реперфузии.

Активация μ -рецепторов *in vivo* с помощью селективного агониста DAMGO (0,1 мг/кг) сопровождалась увеличением амплитуды и скорости сокращения изолированного сердца по сравнению с контролем (рис. 1). Кроме того, в реперфузионном периоде отмечалось μ -рецептор-стимулированное повышение давления, развиваемого левым желудочком (рис. 1), что свидетельствует о повышении устойчивости сократительного аппарата сердечной мышцы к ишемическим и реперфузионным воздействиям.

Таким образом, эффект стимуляции μ -ОР в отношении насосной функции миокарда сводился к достоверному увеличению силы сокращений как до моделирования тотальной ишемии, так и после возобновления коронарной перфузии (рис. 1). Таким образом, с помощью пептидного агониста μ -опиоидных рецепторов DAMGO в значительной степени удалось предупредить снижение сократимости миокарда в реперфузионном периоде.

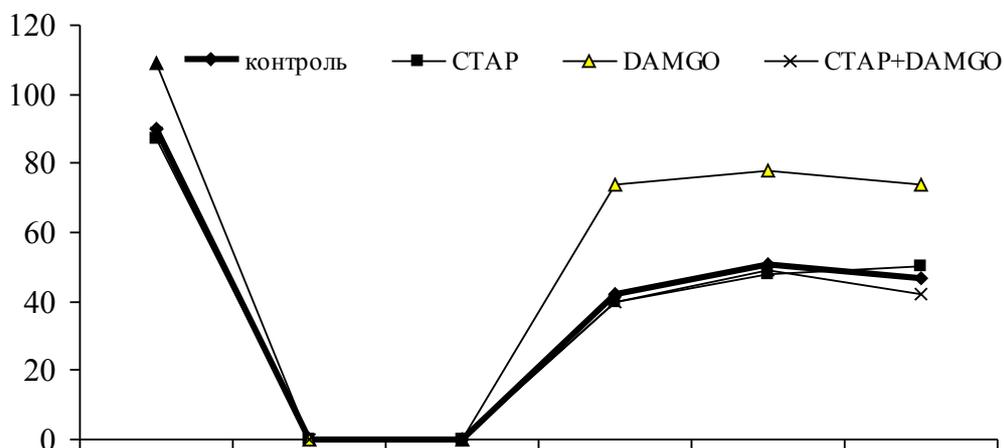


Рис.1. Влияние внутривенного введения μ -агониста DAMGO (0,1 мг/кг), блокатора μ -опиоидных рецепторов СТАР (0,1мг/кг) и их совместного введения на давление, развиваемое левым желудочком изолированного сердца. Примечание: * – $P<0,05$ – по сравнению с контролем; ## – $P<0,01$ – по отношению к исходным значениям до ишемии.

Как показано в таблице 2, предварительная стимуляции μ -рецепторов *in vivo* с помощью селективного агониста DAMGO (0,1 мг/кг) способствовала достоверному снижению частоты возникновения желудочковой тахикардии и полному устранению фибрилляции желудочков по сравнению с контролем.

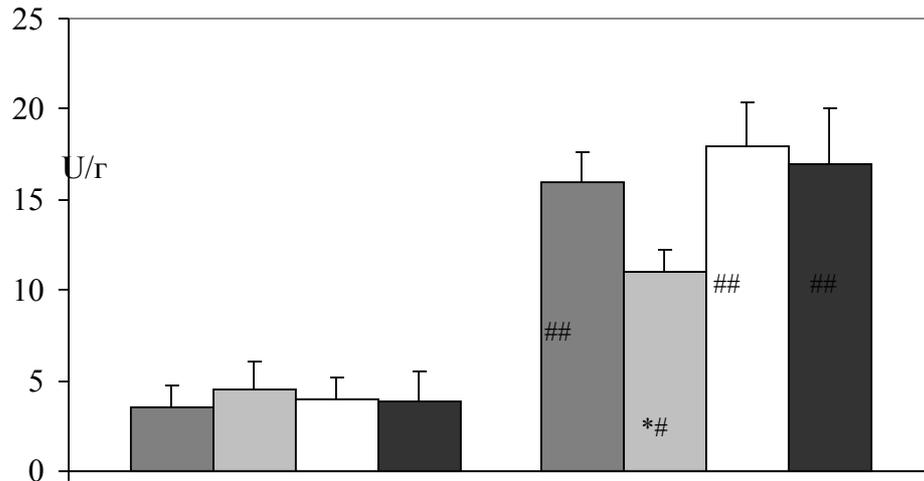
Таблица 2.

Влияние внутривенного введения μ -агониста DAMGO (0,1 мг/кг) на частоту возникновения реперфузионных нарушений ритма.

Серии экспериментов	число опытов (n)	множественные экстрасистолы	желудочковая тахикардия	фибрилляция желудочков
Контроль	16	8 (61%)	9 (56%)	5 (31%)
DAMGO (0,1 мг/кг)	14	9(64%)	* 1(7%)	* 0 (0%)
СТАР (0,1 мг/кг)	14	8(57%)	6(43%)	2(16%)
СТАР + DAMGO	14	8(57%)	6(43%)	2(16%)

* – $P<0,01$ – достоверность по отношению к группе контроля.

В этих же экспериментах предварительная активация μ -рецепторов с помощью DAMGO оказала кардиопротекторное действие, о котором свидетельствовало двукратное по отношению к контролю снижение активности креатинфосфокиназы в перфузате (рис. 2).



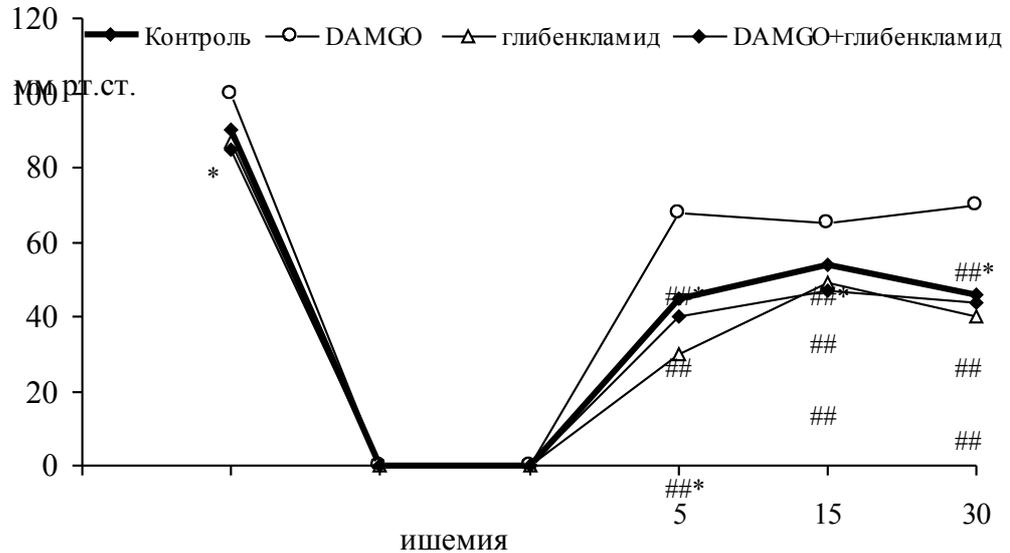
Контроль DAMGO СТАР СТАР+ Контроль DAMGO СТАР СТАР+
DAMGO DAMGO DAMGO

Рис. 2. Влияние внутривенного введения DAMGO (0,1 мг/кг), СТАР, СТАР и DAMGO 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.

Для того, чтобы убедиться в μ -рецепторной специфичности обнаруженных эффектов, были проведены эксперименты с использованием селективного блокатора этих рецепторов СТАР. В результате оказалось, что положительный инотропный, антиаритмический и кардиопротекторный эффекты DAMGO имеют специфический характер, поскольку предварительная селективная блокада μ -рецепторов с помощью СТАР (0,1 мг/кг) полностью их устраняла (рис. 1, 2, табл. 2). Сам блокатор не повлиял на исследуемые нами показатели. Следовательно, эндогенные пептидные агонисты μ -ОР, синтезирующиеся в кардиомиоцитах [Springhorn и Glaycomb, 1992], не участвуют в регуляции устойчивости изолированного сердца к действию ишемии-реперфузии.

Следующей задачей исследования было изучение механизмов реализации кардиотропных эффектов активации μ -ОР. На основании данных G. J. Gross с соавт. [Gross, 2000] об участии K_{ATP} -каналов в реализации кардиопротекторного эффекта морфина мы предположили, что в нашем случае эти ионные каналы участвуют в механизме μ -опиоидергической кардиопротекции.

Результаты экспериментов показали, что после блокады указанных каналов глибенкламидом положительный инотропный (рис. 3) эффект активации μ -ОР in vivo не проявляется.



Исходные значения
Рис. 3. Влияние DAMGO, глибенкламида и их совместного применения на давление, развиваемое левым желудочком изолированного сердца до ишемии и во время реперфузии.
* – $P < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $P < 0,05$; ## – $P < 0,01$ по сравнению с исходными значениями.

Было установлено, что блокада K_{ATP} -каналов не влияет на параметры сократимости в период, предшествующий ишемии, однако вызывает усиление реперфузионной сократительной дисфункции сердца в первые 5 мин после восстановления коронарной перфузии (рис. 3). В условиях «фармакологического выключения» K_{ATP} -каналов полностью устранялось положительное инотропное действие стимуляции μ -рецепторов (рис. 3). Как показано на рисунке 3, предварительная блокада K_{ATP} -каналов с помощью глибенкламида полностью устраняла положительный инотропный эффект DAMGO, что свидетельствует об участии K_{ATP} -каналов в его реализации.

На фоне ингибирования K_{ATP} -каналов глибенкламидом не проявлялся антиаритмический эффект DAMGO (табл. 3). Следует сказать, что глибенкламид не влиял на характер реперфузионных аритмий (табл. 3). Эти данные позволили утверждать, что K_{ATP} -каналы вносят значительный вклад в механизм антиаритмического эффекта активации μ -опиоидных рецепторов.

Влияние блокатора K_{ATP} -каналов глибенкламида (0, 3 мг/кг), агониста μ -опиоидных рецепторов DAMGO (0,1 мг/кг) и их совместного применения на частоту возникновения реперфузионных нарушений ритма

Серии экспериментов	число опытов (n)	множественные экстрасистолы	желудочковая тахикардия	фибрилляция желудочков
Контроль	16	8 (61%)	9 (56%)	5 (31%)
DAMGO (0,1 мг/кг)	14	9(64%)	* 1(7%)	* 0 (0%)
Глибенкламид (0,3 мг/кг)	14	6(42%)	6(42%)	3(21%)
Глибенкламид +DAMGO	13	8(69%)	5(38%)	4(30%)

Примечание: * – $P < 0,05$ – достоверные отличия по отношению к контролю.

Блокада K_{ATP} -каналов глибенкламидом устраняла кардиопротекторный эффект DAMGO (рис. 4). Глибенкламид сам по себе не влиял на уровень КФК в перфузате (рис. 4). Полученные данные позволили нам сделать вывод о том, что выявленное нами защитное действие активации μ -опиоидных рецепторов связано с усилением ионного тока через K_{ATP} -каналы.

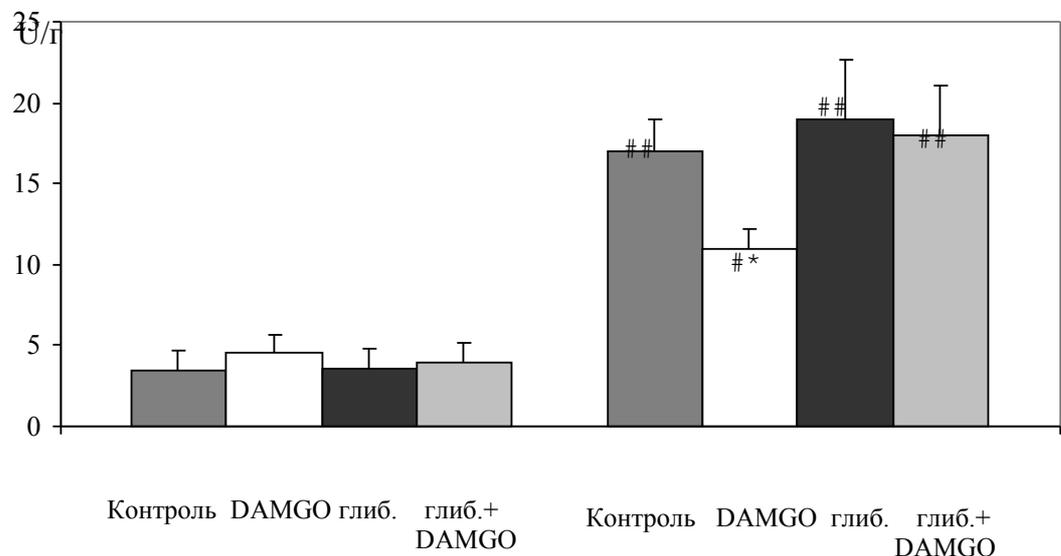


Рис. 4. Влияние DAMGO, глибенкламида (глиб.), их совместного применения на активность креатинфосфокиназы в перфузате до ишемии и во время реперфузии. * – $P < 0,05$ по отношению к контролю; # – $P < 0,05$; ## – $P < 0,01$ в сравнении с исходными данными.

Таким образом, активация периферических μ -рецепторов способствует предупреждению реперфузионных аритмий, снижению степени необратимого повреждения кардиомиоцитов, уменьшению реперфузионной сократительной дисфункции сердца. Перечисленные эффекты являются результатом стимуляции K_{ATP} -каналов.

Следующий этап работы заключался в изучении роли δ_1 -ОР в регуляции функции сердца в условиях нормоксии и постишемической реперфузии.

Исследование участия названных рецепторов в регуляции насосной функции миокарда показало, что δ_1 -агонисты (DPDPE и TAN-67) в периоде, предшествующем ишемии, индуцируют достоверное снижение силы сердечных сокращений (рис. 5а), замедление процессов сокращения (рис. 5б), и расслабления.

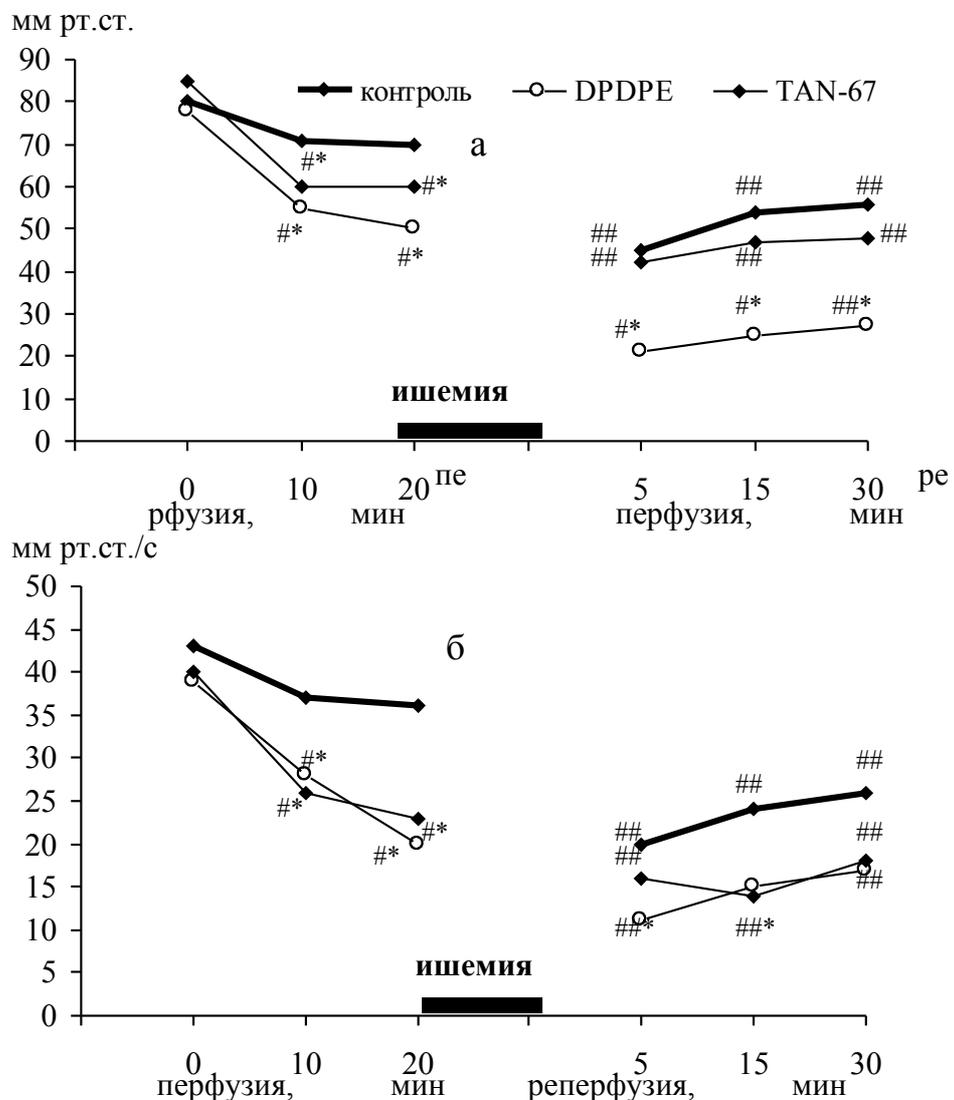


Рис. 5. Влияние агонистов δ_1 -опиоидных рецепторов DPDPE (154нМ) и TAN-67 (930нМ) на давление, развиваемое левым желудочком (а), скорость сокращений (б). * $p < 0,05$ – достоверные отличия от контроля; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ – отличия от значений до ишемии.

Отрицательный инотропный эффект непептидного агониста TAN-67 был менее продолжительным по сравнению с DPDPE. На рисунке 4 показано, что после применения DPDPE отмечалось усиление сократительной дисфункции во время реперфузии, а в серии с TAN-67 эти параметры не отличались от контрольных (рис. 5).

После активации кардиальных δ_1 -рецепторов с помощью добавления в перфузионный раствор селективного агониста DPDPE мы отмечали антиаритмический эффект (табл. 4). Наблюдалось уменьшение числа случаев желудочковой тахикардии и полное предупреждение желудочковой фибрилляции (табл. 4).

Таблица 4.

Влияние активации δ_1 -опиоидных рецепторов на частоту возникновения реперфузионных нарушений ритма в экспериментах на изолированном сердце

Серии экспериментов	n	желудочковые экстрасистолы	желудочковая тахикардия	фибрилляция желудочков
Контроль	16	8 (61%)	9 (56%)	5 (31%)
DPDPE	14	4 (31%)	2 (14%)	0 (0%)
налтриндол	14	9 (63%)	4 (28%)	4 (28%)
налтриндол + DPDPE	14	7 (50%)	5 (35%)	3 (21%)

* – $p < 0,05$ – достоверные отличия по сравнению с контролем.

Как показано на рисунке 6, предварительная перфузия препаратов изолированного сердца раствором, содержащим селективные δ_1 -агонисты DPDPE (154 нМ) или TAN-67 (930 нМ), не влияла на базальный уровень креатинкиназы до ишемии (рис. 6). Стимуляция кардиальных δ_1 -ОР с помощью названных препаратов вызвала достоверное снижение степени повреждения клеток миокарда после 45-мин ишемии и 30-мин реперфузии (рис. 6). Об этом свидетельствовало уменьшение активности фермента в оттекающем от сердца в период реперфузии растворе по отношению к соответствующим значениям контрольной серии (рис. 6), что говорит об уменьшении количества необратимо поврежденных кардиомиоцитов.

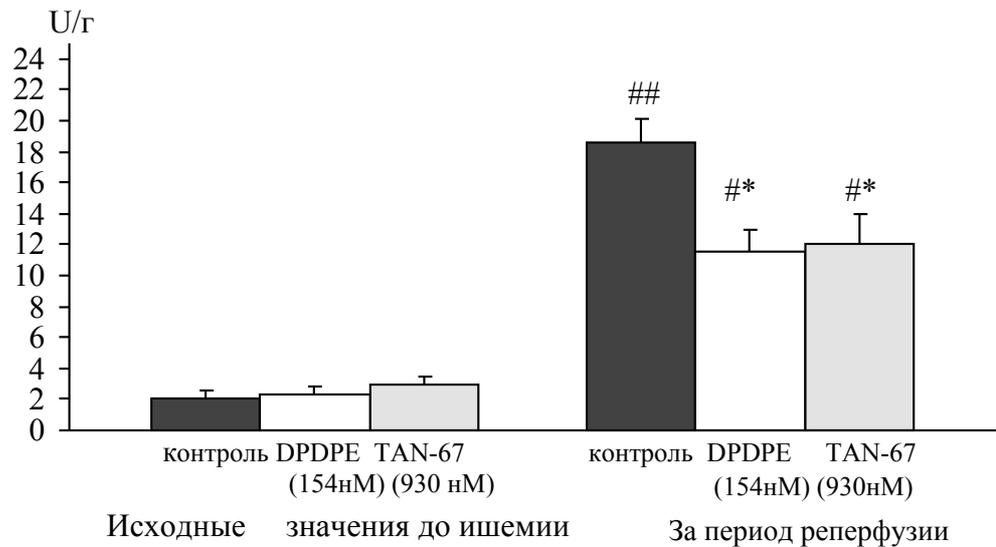


Рис. 6. Активность креатинфосфокиназы после стимуляции δ_1 -ОР *in vitro* с помощью DPDPE (154 нМ) и TAN-67 (930нМ).

* – $P < 0,05$ – по сравнению с контролем;

– $P < 0,01$ – по отношению к исходным значениям.

На фоне блокады миокардиальных δ_1 -ОР налтриндолом защитное действие δ_1 -агонистов не проявилось. Это означает, что отмеченные нами эффекты являются результатом активации δ_1 -рецепторов. Поскольку в наших экспериментах налтриндол никак не повлиял на изучаемые показатели, можно заключить, что эндогенные агонисты δ_1 -ОР не играют решающей роли в регуляции устойчивости изолированного миокарда к ишемии и реперфузии.

Оставалось выяснить механизм, посредством которого активация δ_1 -ОР обеспечивала повышение резистентности сердца к действию тотальной ишемии и последующей реперфузии. Литературные данные давали основания предполагать, что в реализации эффектов δ_1 -агонистов могли быть задействованы сигнальные системы, включающие цАМФ, цГМФ [Aitchison et al., 2000; Maslov и Lishmanov, 1993; Clo et al., 1985; Lubbe et al., 1992], инозитолтрифосфат [Smart и Lambert, 1996; Ventura et al., 1992], ионы кальция [Allouche et al., 1996].

Однако после стимуляции δ_1 -ОР существенных различий по уровню цАМФ и цГМФ в миокарде между контролем и опытом обнаружено не было. Исходя из этого, мы заключили, что в реализации исследуемых эффектов δ_1 -

агонистов определяющую роль играют другие сигнальных системы. Приняв во внимание данные S. Allouche с соавт. и С. Ventura с соавт. об участии δ -ОР в регуляции транспорта кальция на уровне саркоплазматического ретикулума [Allouche et al., 1996; Ventura et al., 1992], мы исследовали кардиотропные эффекты DPDPE на фоне блокады Ca^{2+} -АТФ-азы СПР с помощью циклопиазоновой кислоты. В этом случае антиаритмический, цитопротекторный и инотропный эффекты агониста δ_1 -рецепторов DPDPE не проявлялись (табл. 5, рис. 7).

Таблица 5.

Влияние активации δ_1 -опиоидных рецепторов на частоту возникновения реперфузионных аритмий в экспериментах на изолированном сердце

Серии экспериментов	n	желудочковые экстрасистолы	желудочковая тахикардия	фибрилляция желудочков
Контроль	16	8 (61%)	9 (56%)	5 (31%)
DPDPE	14	4 (31%)	2 (14%)	0 (0%)
ЦПК	14	7(50%)	4 (28%)	3 (21%)
ЦПК + DPDPE	14	5 (36%)	5 (35%)	4 (28%)

U/г

Примечание: * $p < 0,05$ – достоверные отличия по сравнению с контролем; ЦПК – циклопиазоновая кислота.

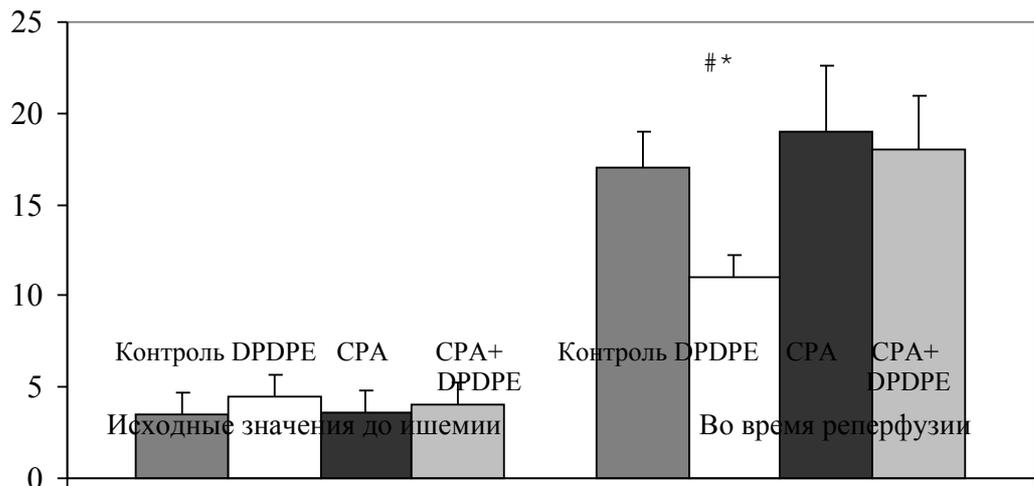


Рис. 7. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после предварительной активации δ_1 -опиоидных рецепторов с помощью DPDPE, на фоне блокады Ca^{2+} -АТФ-азы циклопиазоновой кис-

лотой (СРА). * – $p < 0,05$ – достоверные отличия от контроля;
– $P < 0,05$ и ## – $P < 0,01$ по отношению к исходным значениям.

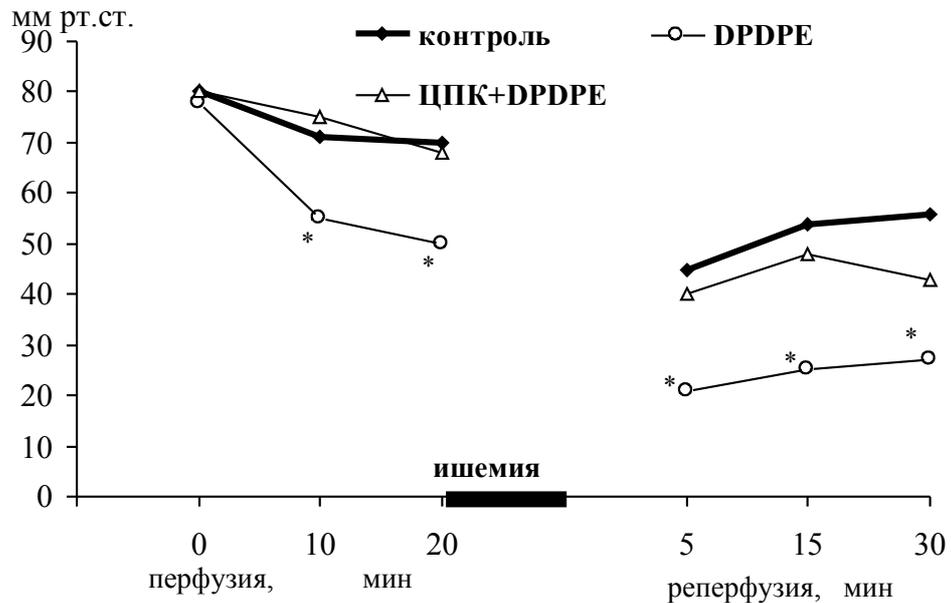


Рис. 8. Влияние δ_1 -агониста DPDPE, DPDPE и циклопиазоновой кислоты (ЦПК) на давление, развиваемое левым желудочком;
* – $p < 0,05$ – достоверные отличия от контроля.

Полученные результаты дали основания заключить, что в реализации изученных эффектов δ_1 -рецепторов основную роль играет участие последних в регуляции уровня внутриклеточного кальция. Сопоставление их с литературными данными позволило выдвинуть гипотезу, объясняющую вышеизложенный механизм кардиотропного действия δ_1 -агонистов. Стимуляция δ_1 -рецепторов, сопряженных с фосфолипазой C, сопровождается увеличением синтеза инозитолтрифосфата [Ventura et al., 1992], который инициирует выброс $[Ca^{2+}]_i$ из саркоплазматического ретикулума (СПР). В результате такой фармакологически индуцированной мобилизации Ca^{2+} из цистерн СПР в период, предшествующий ишемии, происходит значительное сокращение запасов Ca^{2+} , депонированных в этой внутриклеточной структуре. Как следствие, в миоплазме сначала происходит увеличение концентрации ионизированного Ca^{2+} , а затем его избыток удаляется из клетки с помощью Ca^{2+} -насосов сарколеммы [Du Toit и Opie, 1993]. Такое уменьшение запасов внутриклеточного Ca^{2+} в период, предшествующий ишемии, обеспечивает эффективную защиту миокарда от ишемических и реперфузионных повреждений, снижая вероятность Ca^{2+} -перегрузки кардиомиоцитов [Du Toit и Opie, 1994; Miyawaki и Ashraf, 1997]. Поскольку в наших экспериментах после блокады Ca^{2+} -АТФ-

азы антиаритмическое, кардиопротекторное и инотропное действие DPDPE не проявилось, мы считаем, что эти эффекты могли быть связаны с δ_1 -опиоидергическим изменением транспорта кальция в клетке.

Таким образом, активация кардиальных δ_1 -рецепторов обеспечивает повышение устойчивости миокарда к аритмогенному влиянию реперфузии, снижение степени ишемического и реперфузионного повреждения кардиомиоцитов, снижение насосной функции сердца. Перечисленные эффекты являются следствием изменения транспорта кальция на уровне саркоплазматического ретикулума.

Завершающий фрагмент работы был посвящен изучению вклада κ -опиоидных рецепторов в формирование резистентности сердца к ишемии-реперфузии. В ходе экспериментов удалось установить, что активация кардиальных κ -рецепторов значительно повышает устойчивость мембран кардиомиоцитов к ишемическим и реперфузионным воздействиям. Данный факт подтверждался достоверным снижением активности креатинкиназы в оттекающем от сердца растворе после применения селективного κ -агониста U-50,488H (рис. 9).

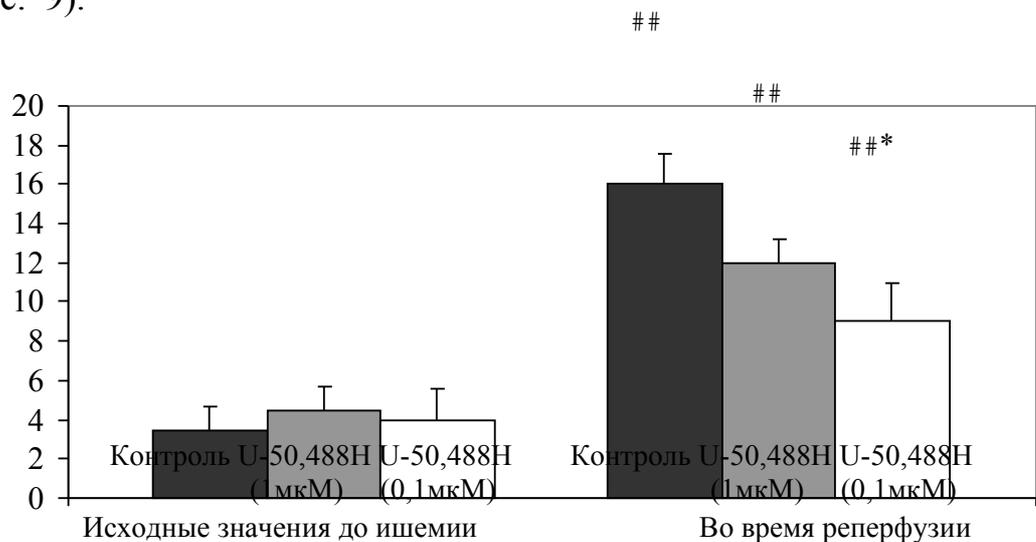


Рис. 9. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после предварительной *in vitro* активации κ -опиоидных рецепторов с помощью U-50,488H (1 мкМ и 0,1 мкМ).

* – $P < 0,05$ – по сравнению с контролем. ## – $P < 0,01$; ### – $P < 0,001$ по отношению к исходным значениям.

Стимуляция кардиальных κ -ОР с помощью U-50,488 (100 нМ) в период, предшествующем ишемии, сопровождалась достоверным снижением исходной силы сердечных сокращений (табл. 6), замедлением процессов сокраще-

ния и расслабления по сравнению с контролем. При этом частота сердечных сокращений и конечное диастолическое давление достоверно не изменялись (табл. 6). В период реперфузии мы наблюдали выраженный отрицательный хронотропный и инотропный эффекты U-50,488 (табл. 6).

Таблица 6.

Влияние агониста к-ОР U-50,488 (0,1 мкМ) на частоту сердечных сокращений (уд/мин), давление развиваемое левым желудочком (мм рт.ст.) и конечное диастолическое давление (%)

Частота сердечных сокращений		Давление, развиваемое левым желудочком		Конечное диастолическое давление		
		Контроль n=14	U-50,488 n=14	Контроль n=14	U-50,488 n=14	Контроль n=14
20-я мин адаптации	241±23,6	266,5±27,1	80,4±4,2	66,9±4,8	100±17,2	100±15,3
перфузия U-50,488	201±13,8	# 180,6±20,6	66,5±4,8	*# 35,4±3,7	111±9	105±11
перфузия без препарата	208±20,5	## 165,1±21,9	67,45±5,4	*# 37,3±5,4	110±8	106±13
Реперфузия						
5 мин	219,8±27,7	*# 159,2±22,6	55,5±6,1	*## 27,3±4,8	149,6±16	## 184±10
15 мин	213,7±22,3	*# 167,9±17,6	51,5±5,0	## 32,8±4,4	144,7±17	# 158±13
30 мин	214,0±17,9	*# 161,3±20,7	48,7±4,5	## 35,3±4,9	128±16,5	# 146±15

Примечание: # – P<0,05; ## – P<0,01 – достоверность относительно исходных значений; * – P<0,05 – достоверность относительно контрольной серии.

Учитывая то, что гиперпродукция цАМФ может быть причиной Ca²⁺-перегрузки и гибели кардиомиоцитов во время ишемии и реперфузии [Aitchison et al., 2000], а к-агонисты ингибируют активность аденилатциклазы [Yu et al., 1998], мы предположили, что кардиопротекторный эффект U-50,488Н может быть следствием снижения уровня цАМФ в миокарде. Для

проверки этой гипотезы проведено определение уровня цАМФ в миокарде после активации кардиальных к-ОР. После применения к-агониста U-50,488H содержание этого циклонуклеотида в сердце оказалось достоверно ниже, чем в контроле (таблица 7).

Таблица 7.

Уровень цАМФ в ткани миокарда в экспериментах, проведенных с U-50488 (при добавлении в перфузат в концентрации 0,1 и 1 мкМ).

Серии экспериментов	n	цАМФ (nM/g)
Нормоксический контроль	10	23,2±0,9
U-50488 (1 мкМ)	10	19,9±2,7
U-50488 (0,1 мкМ)	10	17,4±2,1
30-я мин реперфузии		
Контроль на ишемию (45 мин) и реперфузию (30 мин)	10	23,1±1,1
U-50488 (1 мкМ) ишемия+реперфузия	10	18,2±2,1
U-50488 (0,1 мкМ) ишемия+реперфузия	10	* 12±0,9

* – $P < 0,05$ – по отношению к нормоксическому контролю;
n – количество препаратов изолированных сердец.

Основываясь на полученных нами и литературных данных [Aitchison et al., 2000; Yu et al., 1998], мы предполагаем, что возможный механизм кардиопротекторного действия U-50488 может быть следующим: стимуляция к-рецепторов и сопряженных с ними G_i -белков ведет к ингибированию аденилатциклазы и, соответственно, к снижению в клетке уровня цАМФ и $[Ca^{2+}]_i$, что обеспечивает повышение устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии.

Таким образом, активация кардиальных к-рецепторов способствует уменьшению степени ишемического и реперфузионного повреждения кардиомиоцитов и оказывает отрицательный инотропный эффект. Цитопротекторный эффект агонистов к-ОР реализуется параллельно со снижением

уровня цАМФ в миокарде, в то время как κ-опиоидергическое уменьшение сократимости изолированного сердца происходит независимо от изменения уровня этого циклонуклеотида.

ВЫВОДЫ

1. В интактном миокарде стимуляция кардиальных δ_1 - и κ-опиоидных рецепторов сопровождается развитием отрицательного инотропного эффекта, а внутривенное введение μ -агонистов способствует усилению сократимости сердца в условиях нормоксии.
2. Эндогенные агонисты опиоидных рецепторов не играют существенной роли в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии у неадаптированных животных.
3. Применение селективных агонистов μ -опиоидных рецепторов обеспечивает сохранение целостности мембран кардиомиоцитов в условиях ишемии-реперфузии изолированного сердца, способствует повышению его устойчивости к аритмогенному влиянию реперфузии и усиливает сократимость миокарда в процессе постишемической реоксигенации.
4. Кардиопротекторное, антиаритмическое и положительное инотропное действие μ -агонистов при ишемии-реперфузии связано с активацией K_{ATP} -каналов.
5. Активация кардиальных δ_1 -опиоидных рецепторов сопровождается антиаритмическим и кардиопротекторным эффектами в условиях тотальной ишемии-реперфузии изолированного сердца, но приводит к снижению силы и частоты сердечных сокращений до ишемии и во время реперфузии.
6. Кардиопротекторный, антиаритмический и отрицательный инотропный эффекты, наблюдаемые при стимуляции кардиальных δ_1 -ОР, связаны с изменением транспорта кальция на уровне саркоплазматического ретикулума и не зависят от динамики уровня цАМФ и цГМФ в миокарде.
7. Каппа-агонисты оказывают кардиопротекторный и отрицательный инотропный эффекты, реализуемые на уровне кардиальных κ-опио-

идных рецепторов, не влияют на частоту возникновения реперфузионных аритмий.

8. Цитопротекторный эффект агонистов κ-ОР реализуется параллельно со снижением уровня цАМФ, а κ-опиоидергическое снижение сократимости происходит независимо от изменения этого циклонуклеотида.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. The role of enkephalins of acute myocardial infarction//Exp. Pathology. – 1988. – Vol. 35, N 2. – P. 129 – 131 (Slepushkin W. D., Pavlenko V. S., Zoloev G. K.).
2. О роли энкефалинов в регуляции функции надпочечников//Мат. I Всесоюз. конф. «Нейропептиды, их роль в физиологии и патологии». – Томск. – 1986. – С. 90 – 91.
3. Участие опиоидных пептидов в регуляции углеводного обмена при остром холодном воздействии//Мат. VI Всеросс. конф. «Нейроэндокринология-95». – С-Петербург. – 1995. – С. 76 (в соавт. с Лишмановым Ю. Б.).
4. Роль опиоидной системы в адаптации организма и защите сердца при стрессе//Успехи физиол. наук. – 1997. – № 1. – С. 75– 96 (в соавт. с Лишмановым Ю. Б., Масловым Л. Н.).
5. Опосредуют ли эндогенные лиганды периферических мю- и дельта-опиатных рецепторов антиаритмические и кардиопротекторные эффекты экстракта родиолы розовой?//Бюлл. эксп. биол. мед. – 1997. – Т. 124, № 8. – С. 151– 153 (в соавт. с Масловым Л. Н., Лишмановым Ю. Б., Наумовой А. В.).
6. Участие эндогенных лигандов опиатных рецепторов в защите сердца от ишемических и реперфузионных повреждений//Мат. рег. научно-практической конф. «Медикаментозное лечение нарушений ритма сердца». – Томск. – 1997. – С. 44–46 (в соавт. с Наумовой А. В.).
7. Об антиаритмическом и кардиопротекторном действии эндогенных лигандов мю- и дельта-опиатных рецепторов в условиях реоксигенационного повреждения миокарда//Мат. конф. «Актуальные проблемы кардиологии» Томск. – 1997 – С. 180–181 (в соавт. с Наумовой А. В.).
8. Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции устойчивости миокарда к реперфузионному повреждению//Рос. физиол. журн. – 1998. – Т. 84, № 5. – С. 490 – 499 (в соавт. с Лишмановым Ю. Б., Масловым Л. Н.).

9. Блокада опиатных рецепторов и реакция сердца на повреждение при ишемии и реперфузии//Кардиология. – 1998. – № 11. – С. 38 – 42 (в соавт. с Масловым Л. Н., Лишмановым Ю. Б., Наумовой А. В.).
10. О значении мю-опиатных рецепторов в регуляции устойчивости сердца к реоксигенационным повреждениям и окислительному стрессу//Мат. II научной сессии «Актуальные проблемы кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии» – Кемерово. – 1998. – С. 94–95 (в соавт. с Наумовой А. В., Ребровой Т. Ю.).
11. Об антиаритмическом действии лигандов мю-опиатных рецепторов в условиях реоксигенационного повреждения миокарда//Сб. тез. Региональной научно-практической конф. «Диагностика и лечение фибрилляции предсердий» – Томск– 1999. – №1. – С. 34.
12. К механизму кардиопротекторного действия лигандов мю-опиатных рецепторов в условиях ишемического и реперфузионного повреждения миокарда//Мат. Рег. Конф. Сибири и Дальнего Востока. – Томск – 1999. – С. 205–206 (в соавт. с Кротенко Н. М., Ласуковой О. В., Подоксеновым Ю. К.).
13. Активация мю-опиатных рецепторов как фактор регуляции устойчивости сердца к воздействию ишемии-реперфузии и окислительного стресса//Бюлл. эксперим. биол. мед. – 2000. – Т. 130, № 8. – С. 163 – 167 (в соавт. с Ребровой Т. Ю., Масловым Л. Н.).
14. Активация кардиальных мю-опиатных рецепторов как фактор повышения устойчивости миокарда к реперфузионным нарушениям ритма//Сб. Трудов «Актуальные вопросы кардиологии» – Томск. – 2000. – С. 245.
15. Активация μ -опиатных рецепторов и устойчивость кардиомиоцитов к свободнорадикальному повреждению//Патол. Физиол. Эксперим. тер. – 2001. – № 2. – С. 15 – 17 (в соавт. с Ребровой Т. Ю., Масловым Л. Н.).
16. Влияние стимуляции мю-опиатных рецепторов на сократимость изолированного сердца крыс в условиях нормоксии и ишемии-реперфузии//Рос. Физиол. Жур. – 2001.– Т. 87, № 5. – С. 649 – 658 (в соавт. с Масловым Л. Н., Лишмановым Ю. Б., Там С. В., Гросс Г. Дж.).
17. Роль K_{ATP} -каналов в реализации кардиопротекторного действия агонистов мю-опиоидных рецепторов при острой ишемии и реперфузии изолированного сердца//Экспер. клин. фармакол. – 2001. – Т. 64, № 5. – С. 23–27 (в соавт. с Лишмановым Ю. Б., Масловым Л. Н., Соленковой Н. В., Там С. В., Гросс Г. Дж., Богомаз С. А.).
18. Мю-опиатергическая стимуляция K_{ATP} -каналов как способ профилактики реперфузионного повреждения сердца в эксперименте//Кардиология. – 2001. – № 2. – С. 39– 45 (в соавт. с Лишмановым Ю. Б., Масловым Л. Н., Там С. В.).
19. Влияние активации периферических мю-опиатных рецепторов и K_{ATP} -каналов на устойчивость сердца к аритмогенному действию ишемии/реперфузии *in vivo* и *in vitro*//Тез. Докл. Рег. Научно-практической конф. – 2001. – Томск – С. 95–98 (в соавт. с Масловым Л. Н., Крылатовым А. В., Соленковой Н. В.).

20. Профилактика ишемических и реперфузионных повреждений сердца с помощью агонистов мю-опиатных рецепторов//Тез. Докл. Междунар. конф., посв. 75-летию со дня рождения А. М.Уголева С-Петербург. – 2001. – С. 215–216 (в соавт. с Кротенко Н. М., Ласуковой О. В.).
21. Пептидные агонисты опиатных рецепторов – новая группа препаратов с антиангинальным, антиишемическим и антиаритмическим действием//Тез. Докл. «Острый коронарный синдром: проблемы патогенеза, профилактики, диагностики» – Томск. – 2001. – С. 95–96 (в соавт. с Масловым Л. Н., Крылатовым А. В., Федоровой Н. А., Соколовым А. А.).
22. Участие мю- и дельта₁-опиатных рецепторов в формировании устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям//Тез. Докл. Региональной конф. «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии». –Томск. – 2001. – С. 91–93 (в соавт. с Кротенко Н. М., Ласуковой О. В.).
23. Активация кардиальных мю- и дельта-опиатных рецепторов как способ защиты сердца от реперфузионных аритмий//Тез. Докл. Рег. Научно-практич. Конф. «Проблемы детской кардиологии» – Вестник СГМУ. – Томск. – 2001. – С. 70– 71 (в соавт. С Кротенко Н. М., Ласуковой О.В.).
24. Вклад δ_1 -опиатных рецепторов в регуляцию устойчивости изолированного сердца к воздействию ишемии-реперфузии//Рос. Физиол. Жур. – 2002. – Т. 88, № 5. – С. 568 – 580 (в соавт. с Масловым Л. Н., Лишмановым Ю. Б., Гросс Г. Дж.).
25. Влияние стимуляции δ_1 опиатных рецепторов *in vivo* и *in vitro* на устойчивость миокарда к аритмогенному действию ишемии и реперфузии//Бюл. exper. биол. мед. – 2002. – Т. 134. – № 10. – С. 418– 422 (в соавт. с Крылатовым А. В., Масловым Л. Н., Лишмановым Ю. Б., Гросс Г. Дж., Стефано Дж. Б.).
26. Использование агонистов мю- и дельта-опиатных рецепторов для профилактики ишемических и реперфузионных повреждений сердца//Сб. тезисов Российского национального конгресса кардиологов. – Санкт-Петербург. – 2002. – С. 233.
27. Роль мю- и дельта-опиатных рецепторов в регуляции сократимости изолированного сердца крыс в условиях нормальной оксигенации и ишемии-реперфузии//Тез. докл. 4-го съезда физиологов Сибири. – Новосибирск. –2002. –С. 150 (в соавт. с Масловым Л. Н.).
28. An interaction between Mu-opioid receptors and ATP-sensitive K⁺-channels in the regulation of cardiac resistance to ischemic and reperfusion damage// European Opioid Conference 2002, Uppsala, Sweden, 7th-9th April 2002. – Abstract P32.(Lishmanov A.Yu., Maslov L. N., Wong T. M., Gross G. J.).
29. Opioid receptors and heart tolerance to ischemic and reperfusion damages//European Opioid Conference 2002 – Uppsala, Sweden, 7th-9th April 2002, Abstract P35. (Maslov L. N., Lishmanov A.Yu., Wong T. M., Gross G. J.).
30. Role of delta-1 opioid receptors in the regulation of contractility of isolated

- rat heart at normal condition and during reperfusion//European Opioid Conference 2002, Uppsala, Sweden, 7th-9th April 2002, Abstract P36.(Maslov L.N., Lishmanov A.Yu., Wong T. M., Gross G. J.).
31. Значение дельта₁-опиоидных рецепторов в регуляции устойчивости изолированного сердца к воздействию ишемии реперфузии//Кардиология. – 2003. – № 11. – С. 38 – 39 (в соавт. с Масловым Л. Н., Лишмановым Ю. Б., Платоновым А. А.).
 32. Активация дельта₁-опиоидных рецепторов предупреждает появление аритмий и необратимых повреждений кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии сердца: роль внутриклеточного кальция//Вестник аритмологии – 2003. – № 33. – С. 52 – 56 (в соавт. с Масловым Л. Н., Лишмановым Ю. Б., Платоновым А. А., Подоксеновым А. Ю., Олтжен П.).
 33. Влияние опиоидного пептида даларгина и дез-тир-даларгина на насосную функцию сердца в условиях ишемии-реперфузии//Бюл. эксперим. биол. мед. – 2004. – Т. 137. – № 1. – С. 35 – 38 (в соавт. с Масловым Л. Н., Лишмановым Ю. Б., Платоновым А. А., Подоксеновым Ю. К., Подоксеновым А. Ю., Овчинниковым М. В., Беспаловой Ж. Д.).
 34. Роль дельта₁-опиоидных рецепторов в регуляции сократимости изолированного сердца крыс в условиях нормальной оксигенации и ишемии-реперфузии//Изв. РАН, серия биологическая. – 2004. – № 1. – С. 92– 99 (в соавт. с Масловым Л. Н., Лишмановым Ю. Б.).
 35. Антиаритмический и кардиопротекторный эффект стимуляции дельта₁-опиоидных рецепторов в условиях ишемии и реперфузии//Патол. Физиол. экспер. тер. – 2004. – № 3. – С. 12 – 15 (в соавт. с Крылатовым А. В., Масловым Л. Н., Лишмановым Ю. Б., Гросс Г. Дж., Подоксеновым Ю. К., Подоксеновым А. Ю.).
 36. Антагонисты дельта-опиоидных рецепторов в экспериментах на изолированном сердце проявляют свойства парциальных агонистов дельта-рецепторов//Бюлл. экспер. биол. и мед., 2004. – Т. 138. № 10. – С. 424 – 426 (в соавт. с Масловым Л. Н., Беспаловой Ж. Д.).
 37. Агонисты дельта₁-опиоидных рецепторов предупреждают появление необратимых повреждений кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии изолированного сердца//Экспер. клин. фармакол. – 2004. – Т. 67, № 6. – С. 26– 29 (в соавт. с Платоновым А. А., Масловым Л. Н., Дауни Дж. М., Нагазе Х., Овчинниковым М. В.).
 38. Опиатергическая регуляция сократимости миокарда//Тез. докл. XIX-го съезда физиологического общества им. Павлова. – Екатеринбург. –2004. – С. 440 (в соавт. с Масловым Л. Н.).
 39. Активация δ-опиоидных рецепторов повышает устойчивость изолированного сердца к действию ишемии-реперфузии: роль цАМФ и внутриклеточного кальция//Изв. РАН, серия биологическая. – 2005. – № 1. – С. 55– 62 (в соавт. с Лишмановым Ю. Б., Масловым Л. Н., Платоновым А. А., Олтжен П.).
 40. Вклад кардиальных опиоидных рецепторов в формирование резистентности сердца к действию ишемии-реперфузии//Тез. докл. 1-го

- съезда кардиологов Сибирского федерального округа. – Томск. – 2005. – С. 129 (в соавт. с Платоновым А. А., Паньковой А. Н., Беляевой Н. В.).
41. Роль опиоидных рецепторов в регуляции сократимости миокарда в норме и в условиях ишемии-реперфузии//Тез. Докл. 5-го Сибирского физиологического съезда. – 2005. – С. 17–18.

Патенты

1. Карпов Р. С., Лишманов Ю. Б., Маслов Л. Н., Ласукова Т. В., Федорова Н. А. «Антиангинальное средство» патент №200026 от 10 марта 2003 года.
2. Ласукова Т. В., Крылатов А. В., Маслов Л. Н., Лишманов Ю. Б. «Антиаритмическое средство» патент № 2171115 от 19 февраля 1998 года.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
 АЦ – аденилатциклаза
 ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
 Даларгин – D-Ala²-Leu⁵-Arg⁶-enkephalin
 ЖФ – фибрилляция желудочков
 ЖТ – желудочковая тахикардия
 ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком
 ИБС – ишемическая болезнь сердца
 ИМ – инфаркт миокарда
 КДД – конечное диастолическое давление
 КФ – креатинфосфат
 КФК – креатинфосфокиназа
 K_{АТФ}-канал – АТФ-зависимый K⁺-канал
 МЖЭ – множественные желудочковые экстрасистолы
 НАД – никотинамиддинуклеотид
 ОИМ – острый инфаркт миокарда
 ОП – опиоидные пептиды
 ОР – опиоидные рецепторы
 РП – реперфузия
 СПР – саркоплазматический ретикулум
 ТИ – тотальная ишемия
 цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
 цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат
 ЦПК – циклопиазоновая кислота
 ФЖ – фибрилляция желудочков
 ЧСС – частота сердечных сокращений
 ЭКГ – электрокардиограмма
 Ca²⁺-АТФаза – кальциевая АТФаза
 Ca²⁺-каналы – кальциевые каналы
 СТАР – NH₂-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-L-Phe-Thr-NH₂
 DALDA – NH₂-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂
 DPDPE – H-Tyr-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen-OH

DMSO – диметилсульфоксид

TAN-67 – 2-methyl-4 α -(3-hydroxyphenyl)-1,2,3,4,4a,5,12,12a-octahydro-quinolino
[2,3,3-g] isoquinoline