

Сведения об авторах

Канев Александр Фёдорович, студент 6-го курса лечебного факультета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: alexkanev92@gmail.com.

Кондратьева Дина Степановна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии.

Адрес: 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а.

E-mail: dina@cardio-tomsk.ru.

УДК 612.172.1

СПОСОБНОСТЬ АГОНИСТА К-ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ U-50,488 ИМИТИРОВАТЬ ФЕНОМЕН ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ СЕРДЦА

А.В. Мухомедзянов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт кардиологии", Томск
E-mail: sasha_m91@mail.ru

THE ABILITY OF AGONIST K-OPIOID RECEPTOR U-50,488 TO SIMULATE THE PHENOMENON OF ISCHEMIC POSTCONDITIONING

A.V. Mukhomedzyanov

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Cardiology", Tomsk

Была исследована способность агониста к1-опиоидных рецепторов (ОР) U-50,488 в дозах 0,1 и 1 мг/кг имитировать ишемическое посткондиционирование сердца. Продолжительность ишемии составляла 10 или 45 мин, а реперфузии – 10 мин или 2 ч. Показано, что введение U-50,488 в дозе 1 мг/кг как до ишемии, так и за 5 мин до реперфузии оказывало выраженный антиаритмический эффект. Препарат U-50,488 при инъекции за 5 мин до реперфузии способствовал уменьшению соотношения "зона инфаркта/область риска" в 2 раза. Антиаритмический эффект агониста к-ОР зависел от активации к-ОР.

Ключевые слова: сердце, реперфузия, к-опиоидные рецепторы, посткондиционирование.

The study examined the ability of k1-opioid receptors (OR) agonist, U-50,488, in doses of 0.1 and 1 mg/kg to simulate ischemic postconditioning of the heart. Duration of ischemia was 10 or 45 min and duration of reperfusion was 10 min or 2 h. Data demonstrated that the introduction of U-50,488 in a dose of 1 mg/kg both before ischemia and 5 min before reperfusion had a pronounced antiarrhythmic effect. Injection of U-50,488 5 min before reperfusion facilitated a decrease in the ratio of infarct area/area at risk by 2 times. Antiarrhythmic effect of k-OR agonists depended on the activation of k-OR.

Key words: heart; reperfusion, k-opioid receptors, postconditioning.

Введение

Госпитальная летальность у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) довольно высока, в Европе она составляет 7,3%, а в России – 13,8% [1], что предопределяет актуальность поиска новых способов защиты сердца от ишемии и реперфузии. До 1986 г. было неизвестно, можно ли радикально повлиять на толерантность сердца к ишемическим и реперфузионным воздействиям. Ситуация изменилась после открытия феномена ишемического прекондиционирования (ischemic preconditioning) [4], суть которого заключается в том, что после одного или нескольких сеансов кратковременной ишемии-реперфузии миокард становится устойчивым к действию длительной ишемии с последующей реперфузией. Семнадцать лет спустя был открыт еще один феномен, на-

званный "ишемическим посткондиционированием" (ischemic postconditioning), который заключается в том, что несколько кратковременных сеансов повторной (после снятия лигатуры с коронарной артерии) ишемии и последующей реперфузии способны эффективно уменьшить размер формирующегося затем инфаркта миокарда (ИМ) [9]. Согласно данным литературы, перспективным для защиты миокарда от патогенного действия ишемии-реперфузии является использование фармакологической имитации феномена ишемического прекондиционирования и посткондиционирования (ИП) с помощью агонистов ОР [7].

Цель работы: выяснить, способен ли агонист к-опиоидных рецепторов U-50,488 имитировать феномен ишемического посткондиционирования.

Материал и методы

Исследования были проведены на 118 крысах-самцах линии Вистар массой 250-300 г. Перед моделированием коронароокклюзии крысы были наркотизированы б-хлоралозой (50 мг/кг, внутривенно, Sigma) и подключены к аппарату искусственной вентиляции легких "SAR-830 Series" (CWE Inc. США). Коронароокклюзию и реперфузию воспроизводили по методу группы проф. J.E.J. Schultz [8]. Лигатуру на левую нисходящую коронарную артерию накладывали на границе предсердия и желудочка под контролем электрокардиограммы (ЭКГ), для записи которой использовали аппарат для электрофизиологических исследований MP35 (Biorac System Inc., Goleta, США). После 45-минутной ишемии лигатуру ослабляли до появления эпикардиальной гиперемии. Продолжительность реперфузии составляла 2 ч. Выявление зоны инфаркта и зоны риска проводили по методу J. Neeska и соавт. [5]. Для этого после окончания реперфузии сердца извлекали из грудной клетки и промывали с помощью шприца через канюлированную аорту физиологическим раствором, содержащим 125 МЕ/мл гепарина. Для определения области риска лигатуру вновь затягивали, и миокард окрашивали струйно через аорту 5%-м перманганатом калия, затем промывали сердце физиологическим раствором. С помощью слайсера HSRA001-1 (Zivic Instruments, Pittsburgh, США) делали срезы сердца толщиной в 1 мм перпендикулярно к продольной оси. Областью риска принято называть миокард, подвергавшийся воздействию ишемии-реперфузии. Он остается неокрашенным после промывания перманганатом калия. Зону некроза идентифицировали после помещения срезов миокарда в 1%-й раствор 2,3,5-трифенил тетразолия хлорида на 30 мин при 37 °С. Инфарцированный миокард не окрашивался тетразолия хлоридом, поскольку не содержал дегидрогеназы. После окончания

окраски срезы помещали в 10%-й раствор формальдегида на 1 сутки. Размер области риска и зоны инфаркта определяли планиметрическим методом, используя сканер HP Scanjet G4050 (HP Company, США) и программное обеспечение INSTBSL-W компании Biorac System Inc., (Goleta, США). Размер зоны инфаркта выражали в процентах от размера зоны гипоперфузии (области риска) как соотношение "зона инфаркта/область риска" (ЗИ/ОР).

После 45-минутной коронароокклюзии реперфузионные аритмии практически не возникают [4], поэтому для их моделирования мы в отдельной серии экспериментов использовали 10-минутную коронароокклюзию и последующую 10-минутную реперфузию [9].

Агонист $\kappa 1$ -опиоидных рецепторов U-50,488 вводили внутривенно в дозах 0,1 и 1 мг/кг за 15 мин до ишемии и в дозе 1 мг/кг за 2 и 5 мин до реперфузии. Неселективный антагонист периферических ОР налоксона метиодид вводили за 25 мин до коронароокклюзии в дозе 5 мг/кг.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 6.0. Рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (SEM, standard error of mean). Гипотезу о равенстве средних значений двух выборок проверяли с помощью критерия Вилкоксона-Манна-Уитни для определения достоверности влияния U-50,488 на соотношение ЗИ/ОР. Для статистического анализа нарушений сердечного ритма использовали критерий χ^2 .

Результаты

Моделирование острой 10-минутной ишемии в контрольной группе животных вызвало следующие нарушения сердечного ритма: у 95% крыс возникали множественные желудочковые экстрасистолы, переходящие в желудочковые тахикардии и фибрилляцию желудочков с пос-

Таблица 1

Антиаритмический эффект U-50,488 при введении за 15 мин до ишемии, n (%)

Группы	Ишемия (10 мин)				Реперфузия (10 мин)			
	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ
Контроль, n=20	1 (5)	19 (95)	18 (90)	2 (10)	1 (5)	19 (95)	17 (85)	2 (10)
(-) - U-50,488 за 15 мин до ишемии (0,1 мг/кг), n=15	2 (13)	13 (87)	8 (57)	1 (7)	2 (13)	13 (87)	11 (73)	3 (20)
U-50,488 за 15 мин до ишемии (1 мг/кг), n=19	**9 (47)	**10 (59)	*7 (37)	0 (0)	**8 (42)	**10 (53)	8 (42)	**0 (0)
Налоксона метиодид+(-) - U-50,488, n=14	2 (14)	12 (86)	8 (57)	0 (0)	3 (21)	7 (50)	9 (64)	0 (0)

Примечание: n – количество животных в группе. В скобках указан процент животных в группе. БЖА – без желудочковых аритмий, МЖЭ – множественные желудочковые аритмии, ЖТ – желудочковая тахикардия, ЖФ – желудочковая фибрилляция. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,025$ – достоверность по отношению к группе контроля.

Таблица 2

Антиаритмический эффект U-50,488 при введении за 2 и 5 мин до реперфузии

Группы	Ишемия (10 мин)				Реперфузия (10 мин)			
	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ
Контроль, n=20	1(5)	19(95)	18(90)	2(10)	1(5)	19(95)	17(85)	2(10)
U-50,488(1 мг/кг) За 2 мин до реперфузии, n=15	2 (13)	13(87)	13(87)	3(20)	1(7)	14(93)	10(66)	3(20)
U-50,488(1 мг/кг) за 5 мин до реперфузии, n=15	2(13)	13(87)	11(73)	2(13)	5(33)*	10(67)	9(60)	2(13)

Примечание: обозначения те же, что в таблице 1.

ледующим восстановлением синусного ритма соответственно в 90 и 10% случаев (табл. 1). У 5% особей контрольной группы желудочковых нарушений сердечного ритма не развивалось.

В течение 10-минутного периода после восстановления кровотока у 95% животных также были зарегистрированы множественные желудочковые экстрасистолы, которые переходили в желудочковые тахикардии и фибрилляцию желудочков в 85 и 10% случаев соответственно (табл. 1). У 5% животных контрольной группы желудочковые аритмии не развивались. Как показано в таблице 1, предварительное введение селективного агониста к1-ОР U-50,488 в дозе 0,1 мг/кг за 15 мин до ишемии не оказывало антиаритмического действия. В то же время инъекция U-50,488 за 15 мин до ишемии в более высокой дозе (1 мг/кг) способствовала достоверному снижению частоты возникновения желудочковых экстрасистол и желудочковой тахикардии во время острой ишемии. После применения U-50,488 (1 мг/кг) крысы в 47% случаев приобретали устойчивость и к аритмогенному действию в условиях восстановления коронарного кровотока. Так, частота появления реперфузионных желудочковых экстрасистол в этой серии уменьшалась в 1,8 раза, а желудочковая фибрилляция вообще не возникала. Предварительное введение блокатора периферических ОР налоксона метиодида полностью устраняло антиаритмический эффект U-50,488 (табл. 1). Следовательно, повышение электрической стабильности сердца после инъекции U-50,488 является результатом активации периферических ОР.

Как показано в таблице 2, внутривенное введение U-50,488 в дозе 1 мг/кг за 5 мин до снятия лигатуры с коронарной артерии также оказывало антиаритмическое действие. Количество животных без желудочковых аритмий возрастало с 5% в контроле до 33% в серии с введением опиоида. Вместе с тем этот эффект был слабее, чем при введении агониста к-ОР за 15 мин до коронароокклюзии. Так, нам не удалось обнаружить достоверного снижения частоты возникновения желудочковых экстрасистол и желудочковой тахикардии. Предварительное введение U-50,488 в дозе 1 мг/кг за 2 мин до реперфузии не оказало влияния на частоту и характер реперфузионных аритмий.

Полученные результаты согласуются с данными J.N. Peart и соавт. [6], которые показали, что введение агониста к-ОР U-50,488 в дозе 0,1 мг/кг за 10 мин до реперфузии оказывает антиаритмический эффект. В нашем случае эффекта удалось добиться в дозе 1 мг/кг. Кроме того, мы смогли показать, что U-50,488 имитирует антиаритмический эффект посткондиционирования.

Из рисунка 1 видно, что у животных контрольной группы после окончания реперфузии индекс ЗИ/ОР составлял 43%. Внутривенное введение U-50,488 в дозе 1 мг/кг за 5 мин до реперфузии способствовало уменьшению соотношения ЗИ/ОР с 43 до 25% (рис. 1). Эти данные согласуются с результатами, полученными J.N. Peart и соавт. [7] о способности U-50,488 имитировать феномен посткондиционирования сердца. Предварительное введение U-50,488 в дозе 1 мг/кг за 2 мин до реперфузии не повлияло на соотношение ЗИ/ОР.

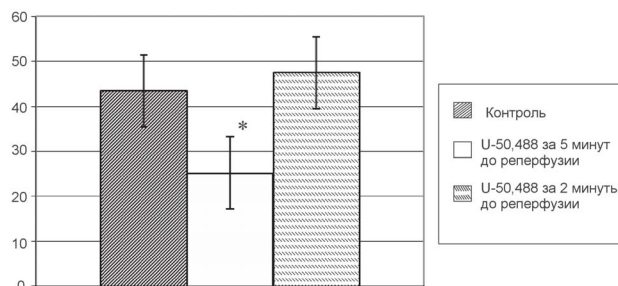


Рис. 1. Кардиопротекторный эффект U-50,488 при введении за 5 мин до реперфузии. Примечание: U-50,488 1 мг/кг за 5 мин до реперфузии, U-50,488 1 мг/кг за 2 мин до реперфузии. * – $p < 0,05$ – достоверность относительно контроля

Как известно, даже при длительной и глубокой ишемии кровотока в зоне инфаркта никогда не падает до нулевых значений [2], то есть во время коронароокклюзии остаточный кровоток в зоне ишемии сохраняется, и лекарственные препараты могут поступать в ишемизированный миокард. Этим можно объяснить тот факт, что введение агонистов к-опиоидных рецепторов за 5 мин до реперфузии оказало защитный эффект. Видимо, препарат, введенный за 2 мин до реперфузии, не успевает накопиться в зоне риска в достаточном количестве, чтобы активировать нужное количество ОР в ткани миокарда. Однако при введении за 5 мин до начала реперфузии нужное количество опиоида накапливается в зоне ишемии, что обеспечивает стимуляцию ОР и повышение толерантности сердца к патогенному действию ишемии.

Заключение

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что агонист к-опиоидных рецепторов U-50,488 способен не только оказывать антиаритмический эффект при профилактическом применении, но также может имитировать феномен ишемического посткондиционирования, то есть оказывать инфаркт-лимитирующий и антиаритмический эффекты после того, как ишемическое повреждение сердца уже произошло. Защитные эффекты U-50,488 связаны с активацией периферических ОР.

Литература

1. Марков В.А., Рябов В.В., Максимов И.В. и др. // Сибирский медицинский журнал (Томск). – 2011. – Т. 26, № 2, вып.1. – С. 8–14.
2. Bolli R., Triana J.F., Jeroudi M.O. // Circ. Res. – 1990. – Vol. 67, No. 2. – P. 332–343.
3. Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Oeltgen P.R. et al. // Life Sci. – 2009. – Vol. 84, No. 19–20. – P. 657–663.
4. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. // Circulation. – 1986. – Vol. 74, No. 5. – P. 1124–1136.
5. Neckar J., Szarszoi O., Hergert J. et al. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia // Physiol. Res. – 2003. – Vol. 52, No. 2. – P. 171–175.
6. Peart J.N., Gross E.R., Gross G.J. // J. Cardiovasc. Pharm. – 2004. – Vol. 43(3). – P. 410–415.

7. Peart J.N., Gross E.R., Reichelt M.E. et al. // Basic Res. Cardiol. – 2008. – Vol. 103, No. 5. – P. 454–463.
8. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J.J. // Mol. Cell. Cardiol. – 1997. – Vol. 29, No. 8. – P. 2187–2195.
9. Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E. et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – Vol. 285, No. 2. – P. H579–H588.

Поступила 16.02.2016

Сведения об авторе

Мухомедзянов Александр Валерьевич, лаборант лаборатории экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии.

Адрес: 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а.

E-mail: sasha_m91@mail.ru.

УДК 612.176.2

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА К ИШЕМИЧЕСКОМУ-РЕПЕРFUЗИОННОМУ ПОВРЕЖДЕНИЮ СЕРДЦА У КРЫС, АДАПТИРОВАННЫХ К ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Е.С. Прокудина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт кардиологии", Томск
E-mail: goddess27@mail.ru

RESISTANCE OF MYOCARDIAL MITOCHONDRIA IN ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY OF THE HEART IN RATS ADAPTED TO CHRONIC HYPOXIA

E.S. Prokudina

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Cardiology", Tomsk

Исследованы параметры дыхания, величина трансмембранного потенциала и Ca_2^+ -связывающая способность митохондрий, выделенных из миокарда перфузируемых по методу Лангендорфа сердец крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Моделирование ишемии и реперфузии как у интактных, так и у адаптированных животных приводило к снижению Ca_2^+ -связывающей способности митохондрий, что указывает на увеличение чувствительности МРТ-пор (mitochondrial permeability transition pore) к ионам кальция. В то же время зафиксировано: снижение трансмембранного потенциала, уменьшение коэффициента АДФ/О (соотношение количественных величин добавленного АДФ и поглощенного в течение состояния 3 кислорода) и замедление дыхания митохондрий в состоянии 3. Вместе с тем наблюдалось, что адаптация животных к хронической гипоксии способствует повышению устойчивости митохондрий миокарда к негативному влиянию ишемии и реперфузии.

Ключевые слова: сердце, ишемия, митохондрии, адаптация к гипоксии.

The parameters of respiration, the value of the transmembrane potential, and Ca_2^+ -binding capacity of the mitochondria isolated from the Langendorff-perfused hearts of rats adapted to chronic continuous normobaric hypoxia were analyzed. Modeling of ischemia and reperfusion in intact and adapted animals resulted in reduced Ca_2^+ -binding capacity of mitochondria, indicating an increase in the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore (MPT-pore) to calcium ions. At the same time, reduction in transmembrane potential, reduction in ADP/O ratio (the ratio of added ADP to oxygen consumption in State 3), and inhibition of mitochondrial state 3 respiration were observed. Along with that, the study demonstrated that the adaptation of animals to chronic hypoxia promotes the resistance of myocardial mitochondria to the negative effects of ischemia and reperfusion.

Key words: heart, ischemia, mitochondria, adaptation to hypoxia.

Введение

Внутригоспитальная летальность от острого инфаркта миокарда (ОИМ) в НИИ кардиологии составляет 13,8% [3], а в европейских странах достигает 7% [10]. Такой высокий показатель летальности во многом объясняется отсутствием патогенетически обоснованных методов повышения толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии. Определенные перспективы в этом направлении может иметь адаптация организма к гипоксии,

стрессу, холоду и другим экстремальным воздействиям [13]. Однако механизмы формирования повышенной устойчивости сердца при адаптации к хронической гипоксии остаются недостаточно изученными. Согласно общепринятому мнению, ключевым звеном гипоксической адаптации является перестройка энергетического метаболизма [2]. Вместе с тем взаимосвязь функционального состояния митохондрий с механизмами инициации клеточной гибели или, напротив, повышения резистентности кардиомиоцитов к гипоксии-реоксигенации остается