

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.12-008.318:616.13-004.6

РОЛЬ μ -, δ - И κ -ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ФОРМИРОВАНИИ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА АДАПТАЦИИ К ХРОНИЧЕСКОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Ю.Б. Лишманов^{1,2}, Н.В. Нарыжная^{1,2}, С.Ю. Цибульников^{1,2}, Л.Н. Маслов^{1,2}, Ф. Колар³, И. Жанг⁴, Х. Ванг⁵¹ФГБУ "НИИ кардиологии" СО РАМН, Томск²ГБОУ ВПО "Томский государственный педагогический университет"³Институт физиологии, Академия наук Чешской Республики, Прага⁴Медицинский университет Хебея, Шиджиажуанг, Китай⁵Медицинский колледж Лиаонинга, Жинжоу сити, Китай

E-mail: natalynar@yandex.ru

THE ROLE OF THE OPIOID RECEPTORS IN CARDIOPROTECTIVE ADAPTATION TO THE CHRONIC ISOBARIC HYPOXIA

Yu.B. Lishmanov^{1,2}, N.V. Naryzhnaya^{1,2}, S.Yu. Tsubulnikov^{1,2}, L.N. Maslov^{1,2}, F. Kolar³, Y. Zhang⁴, H. Wang⁵¹Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Cardiology" of Siberian Branch under the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk²Tomsk State Pedagogical University³Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague⁴Hebei Medical University, Shijiazhuang, China⁵Liaoning Medical College, Jinzhou city, China

Исследовали роль μ -, δ - и κ -опиоидных рецепторов (ОР) в формировании кардиопротекторного эффекта у крыс, находившихся в условиях хронической нормобарической гипоксии (12% O₂ в течение 21 дня). Ишемию (20 мин) моделировали путем перевязки левой нисходящей коронарной артерии с последующей реперфузией (180 мин). Антагонист всех типов ОР налтрексон в дозе 5 мг/кг вводили внутривенно за 25 мин до ишемии. Блокатор δ -ОР – ТИРР(ψ) (0,5 мг/кг внутривенно за 25 мин), блокатор μ -ОР – СТАР (0,5 мг/кг внутривенно за 25 мин) и блокатор κ -ОР норбиналторфимин вводили внутривенно в дозе 9 мг/кг за 90 мин перед началом ишемии. Адаптация к хронической нормобарической гипоксии достоверно в 2,6 раза уменьшала индекс "зона некроза/зона риска". Этот эффект полностью устранялся при введении налтрексона, ТИРР(ψ) и СТАР, но не норбиналторфимином. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что кардиопротекторный эффект адаптации к хронической нормобарической гипоксии опосредуется через активацию μ - и δ -ОР, а κ -ОР не участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте адаптации.

Ключевые слова: хроническая гипоксия, адаптация, сердце, ишемия-реперфузия, опиоидные рецепторы.

The role of μ , δ and κ opioid receptors (OR) in cardioprotective effect of chronic normobaric hypoxia (12% O₂ for 21 days) was investigated. Ischemia (20 min) was simulated by ligation of the left anterior descending coronary artery with the following reperfusion (180 min). The antagonist of all types of ORs naltrexone (5 mg/kg) was administered intravenously 25 min before ischemia. The selective δ OR antagonist TIPP(ψ) (0.5 mg/kg) was injected intravenously 25 min before ischemia, the selective μ OR blocker STAR was used at a dose of 0.5 mg/kg intravenously 25 min before coronary artery occlusion and the selective κ OR antagonist nor-binaltorphimine was injected intravenously in a dose of 9 mg/kg 90 min before ischemia. Adaptation to chronic normobaric hypoxia significantly reduced (2.6 fold) the zone of necrosis/area at risk ratio. This effect was completely eliminated by the injection of naltrexone, by administration of TIPP(ψ), or by injection of STAR, but not by nor-binaltorphimine. Based on these data we can conclude that the cardioprotective effect of adaptation to chronic normobaric hypoxia is mediated through δ and μ OR activation but κ opioid receptors are not involved in the infarct-reducing effect of adaptation.

Key words: chronic hypoxia, adaptation, heart, ischemia-reperfusion, opioid receptors.

Введение

Ишемические и реперфузионные повреждения сердца могут возникать при коронарной недостаточности, самым грозным осложнением которой является острый инфаркт миокарда [2].

Установлено, что адаптация к гипоксии способствует увеличению устойчивости сердца к повреждающему действию ишемии/реперфузии [11, 19]. Между тем, наши знания о молекулярных механизмах адаптационного повышения резистентности сердца к действию патогенных факторов нарушенного миокардиального кровообращения остаются недостаточными. Вся имеющаяся на сегодня информация по данному вопросу базируется, главным образом, на результатах исследований миокарда, адаптированного к "высокогорной" (гипобарической) гипоксии, и на сведениях о достаточно хорошо изученном адаптационном феномене, называемом "ischemic preconditioning" (ишемическое прекодиционирование) [11, 13]. Вместе с тем хроническое воздействие умеренной гипоксии при нормальном атмосферном давлении оказывает на сердце не менее выраженный защитный эффект [19]. Однако его молекулярные механизмы остаются малоизученными.

Основываясь на литературных данных об участии опиоидной системы в ишемическом прекодиционировании [17] и адаптации к гипобарической гипоксии [3], мы предположили, что адаптация к хронической гипоксии при нормальном атмосферном давлении также реализуется через активацию опиоидных рецепторов (ОР). Однако до настоящего времени остается неисследованным вклад ОР в кардиопротекцию при хронической нормобарической гипоксии, также как и рецепторная специфичность этого феномена.

Цель исследования: изучение роли μ -, δ - и κ -опиоидных рецепторов в формировании повышенной устойчивости миокарда к повреждающему действию острой ишемии и реперфузии при адаптации к хронической нормобарической гипоксии.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. Животные произвольно распределялись на 6 групп. Крысы первой (контрольной) группы за 25 мин до перевязки коронарной артерии получали 0,2 мл физиологического раствора внутривенно.

Животные 2–6-й групп подвергались предварительной адаптации, постоянно находясь в гипоксической камере при 12% O_2 и нормальном атмосферном давлении на протяжении 21 дня [15]. Объем гипоксической камеры составил 1,5 м³, концентрацию O_2 поддерживали на уровне 11,75–12,25%, концентрацию CO_2 – на уровне 0,03% системой "Био-нова-204G4R1" (НТО Био-нова, Москва, Россия). Давление O_2 и CO_2 внутри камеры постоянно контролировали датчиками TCO₂-IR и OLC 20 (Oldham, Франция) через блок управления MX32 (Oldham, Франция).

Адаптированным животным перед началом ишемии внутривенно вводили один из следующих препаратов: 0,2 мл физиологического раствора (2-я группа); блокатор

всех субтипов опиоидных рецепторов налтрексон (5 мг/кг за 25 мин до ишемии) [20] (3-я группа); блокатор δ -рецепторов TIPP(ψ) (N-Tyr-TicPyr-[CH₂NH]-Phe-Phe-OH) [16] в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин до коронароокклюзии (4-я группа); антагонист μ -рецепторов СТАР (N-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂) [5] в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин до ишемии (5-я группа); блокатор κ -рецепторов норбиналторфимин [7] в дозе 9 мг/кг за 90 мин до начала ишемии (6-я группа). При выборе доз препаратов мы руководствовались полученными нами ранее результатами и данными других авторов [12, 16]. Ранее нами было показано, что блокада опиоидных рецепторов у неадаптированных крыс не влияет на соотношение зона некроза/зона риска (ЗН/ЗР) [12].

Ишемию миокарда (20 мин) моделировали путем перевязки левой коронарной артерии у животных, наркотизированных с помощью пентобарбитала натрия (60 мг/кг внутривенно, Sanofi-Aventis, Франция) [15] с последующей реперфузией, продолжительность которой составляла 180 мин. Во время выполнения процедуры крысы находились на искусственной вентиляции, которую осуществляли с помощью модифицированного аппарата "РО-6" (ОАО "Красногвардеец", Санкт-Петербург, Россия).

Регистрацию ЭКГ in vivo осуществляли в первом (V_1) и во втором грудном (V_2) отведениях в течение всего периода ишемии и первого часа реперфузии с помощью компьютеризированного электрокардиографа "Поли-Спектр 8/В" (Нейрософт, Иваново, Россия). Запись и обработка полученных данных проводилась полуавтоматическим способом при помощи оригинального пакета прикладных программ, разработанного фирмой "Нейрософт". При оценке нарушений ритма сердца принимали во внимание только желудочковые формы аритмий: множественные желудочковые экстрасистолы; желудочковую тахикардию, желудочковую фибрилляцию.

После 20-минутной ишемии и 180-минутной реперфузии сердце выделяли и промывали физиологическим раствором через канюлированную аорту. Для определения размера зоны риска (ЗР, зона гипоперфузии) осуществляли окраску сердца насыщенным раствором перманганата калия, перфузируя миокард через канюлированную аорту, правый желудочек удаляли и взвешивали. Срезы сердец толщиной в 1 мм производили перпендикулярно их продольной оси [15]. Для определения зоны некроза (ЗН) срезы окрашивали 1%-м раствором 2,3,5-трифенил тетразолия хлорида (30 мин, 37 °C) и помещали в 10%-й раствор формальдегида на 1 сут. На следующий день после окрашивания срезы сканировали с обеих сторон (сканер HP Scanjet G2710), используя оригинальную прикладную программу. Зону риска и размер некроза определяли компьютеризированным планиметрическим методом. Величина очага инфаркта была выражена в процентах от зоны гипоперфузии.

Статистическую обработку результатов производили в программе Statistica 6.0 с помощью критериев χ^2 и Манна–Уитни. Данные о соотношении ЗН/ЗР выражены в процентах, остальные данные выражены в миллиграммах. За уровень статистической значимости различий принимали $p \leq 0,01$.

Результаты

Острая коронароокклюзия во всех сериях экспериментов вызывала образование зоны гипоперфузии (ЗР) размером 37,3–45,4% от массы левого желудочка без достоверных межгрупповых различий. Одинаковая величина зоны риска указывает на хорошую воспроизводимость результатов и отсутствие изменения коллатерального кровотока под влиянием использованных воздействий и препаратов. Из таблицы видно, что у животных контрольной группы после окончания реперфузии зона некроза составляла 56,5% от массы зоны риска.

Под действием хронической нормобарической гипоксии у крыс значительно возрастала масса правого желудочка с 207 ± 15 мг в контрольной группе до $256 \pm 12,6$ мг у адаптированных животных, то есть прирост массы составил 20% ($p < 0,05$). Зона некроза у таких животных составляла 20,4% от зоны риска, что статистически значимо ($p < 0,01$) отличалось от показателя контрольной группы (56,5%). Следовательно, при адаптации к хронической нормобарической гипоксии соотношение зоны некроза к зоне риска уменьшалось на 36% по отношению к контролю. Эти результаты свидетельствовали о том, что адаптация к хронической нормобарической гипоксии оказывает выраженный инфаркт-лимитирующий эффект.

Предварительная блокада ОР неселективным антагонистом налтрексом в дозе 5 мг/кг за 25 мин до ишемии приводила к увеличению размеров зоны некроза с 21,1 до 52,8%, что идентично показателю контрольной группы. Следовательно, блокада всех типов ОР устраняла кардиопротекторный эффект адаптации к хронической нормобарической гипоксии.

Блокада δ -ОР селективным антагонистом TIPP(ψ) в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин до ишемии приводила к увеличению соотношения ЗН/ЗР более, чем на 30% по отношению к таковым показателям группы адаптированных животных. В результате соотношение “зона некроза/зона риска” оказалось равным таковой в контрольной группе. Предварительная блокада μ -ОР селективным блокатором СТАР в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин до коронароокклюзии приводила к увеличению соотношения ЗН/ЗР на 28%, что также указывало на полное устранение кардиопротекторного эффекта адаптации. Премедикация антагонистом κ -ОР норбиналторфимином в дозе 9 мг/кг за 90 мин до ишемии не изменяла соотношение ЗН/ЗР у адаптирован-

ных особей. Следовательно, κ -ОР не принимали участия в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к хронической нормобарической гипоксии. Адаптация к хронической нормобарической гипоксии не влияла на частоту возникновения ишемических и реперфузионных аритмий (данные не представлены).

Обсуждение

В наших исследованиях был подтвержден известный постулат, что адаптация способствует увеличению устойчивости сердца к повреждающему действию ишемии и реперфузии [19]. При этом гипертрофия правого желудочка у крыс, адаптированных к хронической гипоксии, обнаруживалась в большинстве исследований и являлась показателем приспособления организма к условиям гипоксии [14]. Тот факт, что блокада ОР полностью устраняла кардиопротекторный эффект адаптации, доказывает наше предположение об участии эндогенной опиоидной системы в формировании повышенной устойчивости миокарда к ишемии/реперфузии у животных, прошедших курс предварительного воздействия хронической гипоксией.

В последующих опытах мы провели исследование рецепторной специфичности указанного эффекта путем поочередного ингибирования различных типов ОР селективными антагонистами.

Данные о полном устранении инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к хронической нормобарической гипоксии при селективной блокаде δ -ОР свидетельствуют о ключевой роли этого рецепторного пула в реализации вышеуказанного эффекта. Это согласуется с ранее полученными представлениями об участии δ -ОР в механизме реализации ишемического прекоиндиционирования и адаптации к гипобарической гипоксии [18].

Сведения о полном устранении кардиопротекторного эффекта адаптации к хронической нормобарической гипоксии при селективной блокаде μ -ОР, полученные в ходе нашего исследования, являются аргументом в пользу аналогичной роли этого рецепторного пула в реализации кардиопротекторного эффекта адаптации. Эти результаты выглядят логичными, если принять во внимание тот факт, что эндогенные энкефалины обладают высоким сродством как к μ -, так и к δ -опиоидным рецепто-

Таблица

Размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс после курса адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии (M \pm m)

Серии	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	15	207 \pm 15,0	861,9 \pm 44,9	337,5 \pm 27,6	142,3 \pm 21,2	56,5 \pm 2,9
Адаптация к гипоксии	18	256,1 \pm 12,8 $p < 0,05$	760,5 \pm 28,2	360,4 \pm 23,6	142,9 \pm 23,5	20,4 \pm 1,7 $p < 0,01$
Адаптация+налтрексон	12	277,5 \pm 12,5	828,8 \pm 26,1	376,5 \pm 21,1	198,9 \pm 23,7	52,8 \pm 5,7 $p_1 < 0,01$
Адаптация+TIPP (ψ)	13	293,2 \pm 12,6	831,4 \pm 32,8	372,9 \pm 17,5	209,1 \pm 13,8	56,1 \pm 4,1 $p_1 < 0,01$
Адаптация+СТАР	12	307,5 \pm 8,8	896,8 \pm 33,7	369,6 \pm 32,5	181,7 \pm 36,9	49 \pm 9,3 $p_1 < 0,01$
Адаптация+норбиналторфимин	12	240,1 \pm 11,3	805,7 \pm 35,8	312,9 \pm 50,9	50,5 \pm 9,5	18,7 \pm 3,8

Примечание: МПЖ – масса правого желудочка; МЛЖ – масса левого желудочка; ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска. Налтрексон вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг за 25 мин до ишемии; TIPP – внутривенно в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин; СТАР – внутривенно в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин; норбиналторфимин – в дозе 9 мг/кг за 90 мин до начала ишемии. p – уровень достоверности относительно контроля; p_1 – уровень статистической значимости относительно адаптации, критерий Манна–Уитни.

рам [6]. Информация, полученная в ходе экспериментов с блокадой κ -ОР у адаптированных крыс, подтвердила, что в механизме развития инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к хронической нормобарической гипоксии κ -ОР участия не принимают.

К сожалению, изменения, происходящие в опиоидной системе в процессе адаптации к хронической нормобарической гипоксии и приводящие к увеличению устойчивости миокарда при последующем воздействии ишемии и реперфузии, не изучены. Возможно, при адаптации к гипоксии, так же как и при адаптации к стрессу [4], увеличивается уровень эндогенных опиоидных пептидов. Помимо этого, возможно изменение аффинности и количества ОР, как это показано при хронических стрессовых нагрузках [1]. Однако эти факты нуждаются в дальнейшем изучении.

Механизм участия эндогенных опиоидов в инфаркт-лимитирующем действии адаптации к хронической нормобарической гипоксии, с нашей точки зрения, может выглядеть следующим образом. Известно, что μ - и δ -ОР присутствуют на мембранах кардиомиоцитов и связаны с $G_{i/o}$ -белками [10]. Возможно, что подобно ишемическому preconditionированию в данном случае кардиопротекторный эффект реализуется через запуск внутриклеточного регуляторного каскада, включающего последовательно протеинкиназу C [14] \rightarrow митохондриальные АТФ-зависимые K^+ -каналы [8] \rightarrow МРТ-поры [9].

На основании полученных данных мы можем сделать вывод о том, что опиоидная система играет важную роль в повышении устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии при адаптации к хронической нормобарической гипоксии. При этом эффект опосредуется через активацию μ - и δ -ОР, а κ -опиоидные рецепторы не принимают участие в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к нормобарической гипоксии.

Литература

1. Варфоломеев С.О. Опиатные рецепторы у крыс с различной адаптацией к эмоциональному стрессу // Клинические и орг. вопр. общей и судебной психиатрии. – М., 1986. – С. 76–80.
2. Гафарова А.В., Гафаров В.В. Инфаркт миокарда: смертность и сопутствующие ей факторы (эпидемиологическое исследование на основе программ ВОЗ “Регистр острого инфаркта миокарда”, “МОНИКА”) // Сибирский медицинский журнал (Томск). – 2009. – Т. 24, № 1. – С. 12–15.
3. Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В., Крылатов А.В. и др. Роль опиатных рецепторов и АТФ-зависимых калиевых каналов митохондрий в формировании адаптационной устойчивости миокарда к аритмогенному действию ишемии и реперфузии // Известия РАН. Серия биологическая. – 2003. – № 6. – С. 720–727.
4. Лишманов Ю.Б., Трифонова Ж.В., Цибин А.Н. Бета-эндорфин и стресс-гормоны плазмы крови при состояниях напряжения и адаптации // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1987. – № 4. – С. 422–424.
5. Abbruscato T.J., Thomas S.A., Hrubby V.J. et al. Blood-brain barrier permeability and bioavailability of a highly potent and mu-selective opioid receptor antagonist, CTAP: comparison with morphine // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1997. – Vol. 280, No. 1. – P. 402–409.
6. Dhawan B.N., Cesselin F., Raghurir R. et al. International union of pharmacology. XII. Classification of opioid receptors // Pharmacol. Rev. – 1996. – Vol. 48, No. 4. – P. 567–592.
7. Endoh T., Matsuura H., Tanaka C. et al. Nor-binaltorphimine: a potent and selective kappa-opioid receptor antagonist with long-lasting activity in vivo // Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. – 1992. – Vol. 316. – P. 30–42.
8. Fryer R.M., Hsu A.K., Nagase H. et al. Opioid-induced cardioprotection against myocardial infarction and arrhythmias: mitochondrial versus sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2000. – Vol. 294, No. 2. – P. 451–457.
9. Hausenloy D.J., Maddock H.L., Baxter G.F. et al. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? // Cardiovasc. Res. – 2002. – Vol. 55, No. 3. – P. 534–543.
10. Head B.P., Patel H.H., Roth D.M. et al. G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280, No. 35. – P. 31036–31044.
11. Kolar F., Ostadal B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia // Physiol. Res. – 2004. – Vol. 53. – P. S3–S13.
12. Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Oeltgen P.R. et al. Activation of peripheral $\delta 2$ opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury: Involvement of protein kinase C, NO-synthase, KATP channels and the autonomic nervous system // Life Sci. – 2009. – Vol. 84, No. 19–20. – P. 657–663.
13. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // Circulation. – 1986. – Vol. 74. – P. 1124–1136.
14. Neckar J., Markova I., Novak F. et al. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC- δ in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. – Vol. 288. – P. 566–572.
15. Neckar J., Szarszoi O., Herget J. et al. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia // Physiol. Res. – 2003. – Vol. 52. – P. 171–175.
16. Schiller P.W., Weltrowska G., Nguyen T.M. et al. TIPP[ψ]: a highly potent and stable pseudopeptide δ opioid receptor agonist with extraordinary δ selectivity // J. Med. Chem. – 1993. – Vol. 36, No. 21. – P. 3182–3187.
17. Schultz J.E., Rose E., Yao Z. et al. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 1995. – Vol. 268. – P. H2157–H2161.
18. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by $\delta 1$ - but not μ - or κ -opioid receptors // Circulation. – 1998. – Vol. 97. – P. 1282–1289.
19. Tajima M., Katajose D., Bessho M. et al. Acute ischemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischemia // Cardiovasc. Res. – 1994. – Vol. 28. – P. 312–319.
20. Takemori A.E., Portoghese P.S. Selective naltrexone-derived opioid receptor antagonists // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. Annual Reviews Inc. – 1992. – Vol. 32. – P. 239–269.

Поступила 11.05.2011