

УЧАСТИЕ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ЦИТОПРОТЕКТОРНОМ ЭФФЕКТЕ АДАПТАЦИИ К ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ ПРИ ГИПОКСИИ— РЕОКСИГЕНАЦИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ

Н.В.Нарыжная^{*,**}, Л.Н.Маслов^{*,**}, Е.С.Прокудина^{*}, Ю.Б.Лишманов^{*,**}

**ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН, Томск, РФ; **Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, РФ*

Исследовали роль опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии на модели гипоксии—реоксигенации изолированных кардиомиоцитов. Адаптацию к гипоксии обеспечивали, помещая крыс на 21 сут в атмосферу с пониженным содержанием O_2 . Гипоксия—реоксигенация кардиомиоцитов интактных крыс вызывала гибель 23% клеток и повышение выброса ЛДГ из кардиомиоцитов. Гипоксия—реоксигенация кардиомиоцитов адаптированных крыс вызывала гибель только 2.5% клеток, а выброс ЛДГ снизился на 25%. Предварительная инкубация клеток в течение 25 мин с блокатором опиоидных рецепторов налоксоном (300 нМ) устраняла адаптивное снижение выживаемости клеток и снижение выброса ЛДГ. Следовательно, опиоидные рецепторы кардиомиоцитов участвуют в цитопротекторном эффекте хронической нормобарической гипоксии.

Ключевые слова: кардиомиоциты, гипоксия, реоксигенация, адаптация, опиоиды

Одним из перспективных путей немедикаментозного повышения толерантности сердца к действию ишемии и реперфузии является адаптация к гипоксии. Так, миокард животных, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ), становится устойчивым к повреждающему действию ишемии и реперфузии [6,8]. Однако механизмы этого эффекта до сих пор недостаточно изучены. Инфаркт—лимитирующий эффект хронической нормобарической гипоксии реализуется через активацию опиоидных рецепторов (ОР) [6]. Вместе с тем до настоящего времени остается неясной точная локализация ОР, опосредующих этот защитный эффект. Известно, что эти рецепторы могут располагаться непосредственно на сарколемме клеток сердца [3] и экстракардиально.

Адрес для корреспонденции: maslov@cardio-tomsk.ru. Маслов Л.Н.

Цель данной работы — проверка гипотезы об участии ОР, расположенных на сарколемме кардиомиоцитов, в реализации цитопротекторного эффекта ХННГ.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 24 крысах-самцах Вистар массой 280-320 г, произвольно распределенных на две группы. Интактные крысы содержались в стандартных условиях вивария. Животные опытной группы подвергались ХННГ при 12% O_2 , 0.3% CO_2 и нормальном атмосферном давлении в течение 21 сут [6,8]. Давление O_2 и CO_2 внутри гипоксической камеры постоянно поддерживали при помощи системы “Био-нова-204G4R1” (НТО “Био-нова”) и контролировали датчиками TCOD-IR и OLC 20 (“Oldham”) через блок управления MX32 (“Oldham”). Животных извлекали из гипоксической камеры за 24 ч до начала эксперимента.

Выделение изолированных кардиомиоцитов и воздействие на них гипоксии—реоксигенации проводили по протоколу [13]. Животных гепаринизировали (1500 МЕ внутривенно) и выводили из эксперимента методом шейной дислокации под эфирным наркозом. После стернотомии сердца быстро извлекали из грудной клетки и помещали в раствор Тироде (4°) до прекращения сердцебиений. Состав использованного раствора: 140 мМ NaCl, 5.4 мМ KCl, 1 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ MgCl₂•6H₂O, 10 мМ глюкозы, 5 мМ HEPES, 1 мМ CaCl₂. Аорту канюлировали и закрепляли для ретроградной перфузии со скоростью 10 мл/мин при 37°C. Все растворы предварительно насыщали смесью газов 95% O₂ и 5% CO₂ и доводили до pH 7.4. Ретроградную перфузию миокарда осуществляли в течение 3 мин раствором Тироде, затем в течение 3 мин перфузировали бескальциевым раствором Тироде. Последующую перфузию осуществляли раствором коллагеназы, содержащим 140 мМ NaCl, 5.4 мМ KCl, 1 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ MgCl₂•6H₂O, 10 мМ глюкозы, 5 мМ HEPES, 1.6 г/л БСА, II 335 Ед/мл коллагеназы (“Worthington”) и 0.230 г/л протеазы XIV (“Sigma”), в течение 15-25 мин до размягчения миокарда. Для удаления коллагеназы сердце перфузировали бескальциевым раствором Тироде в течение 4 мин, после чего отсекали его от аорты и диспергировали путем перемешивания в 10 мл бескальциевого раствора Тироде, содержащего 10 мг/мл БСА. Полученную суспензию клеток фильтровали через марлю и осаждали при комнатной температуре в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а кардиомиоциты суспензировали в бескальциевом растворе Тироде в конечном содержании 350-400 тыс. клеток в 1 мл. Количество клеток контролировали микроскопически. Выделенные клетки инкубировали в течение 1 ч при 28°C в атмосфере 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе MCO-5AC (“Sanyo”).

После окончания инкубации проводили контроль выживаемости клеток по их окрашиванию трипановым синим, который включает только в погибшие клетки. Процент погибших (окрашенных) клеток и жизнеспособных палочковидных кардиомиоцитов (соотношение длина:ширина не менее 3:1) подсчитывали в микроскопе “Axio Observer Z1” (“Carl Zeiss”). Исходную выживаемость палочковидных кардиомиоцитов 50% и более считали пригодной для дальнейшего исследования. В инкубационной среде клеток исходно, после аноксии и после реоксигенации определяли содержание маркера некроза кардиомиоцитов — ЛДГ (наборы Fluitest LDH-L, “Analytical biotechnologies AG”; спектрофотометр “Infinite

200M”, “Tecan”). Выход из клеток ЛДГ вычисляли в процентах от общего содержания ЛДГ, которое измеряли в образцах с предварительно лизированными кардиомиоцитами (45-минутное инкубирование с Тритоном X-100 в концентрации 12 мкл/мл при 37°C и последующее центрифугирование в течение 1 мин при 10 000g).

Перед моделированием аноксии суспензию клеток делили на две части. К одной из них за 25 мин до начала аноксии добавляли блокатор ОР налоксон в концентрации 300 нМ [1], клетки без налоксона служили контролем.

Для моделирования аноксии клетки инкубировали в модифицированном буфере Кребса (аноксическом буфере), содержащем: 118 мМ NaCl, 25 мМ NaHCO₃, 4.7 мМ KCl, 1.2 мМ MgSO₄, 1.2 мМ KH₂PO₄, 5 мМ 2-дезоксиглюкозы pH 7.4. Для предотвращения доступа кислорода на поверхность суспензии наслаивали 5-6 капель минерального масла (“Sigma”) [11]. Клетки подвергали гипоксии в течение 20 мин при комнатной температуре, а затем аккуратно извлекали микропипеткой, проведенной через масло, и центрифугировали 1 мин при 800g. Надосадочную жидкость использовали для определения ЛДГ.

Реоксигенацию кардиомиоцитов осуществляли, помещая их в бескальциевый раствор Тироде на 30 мин. По окончании реоксигенации проводили контроль выживаемости клеток и оценивали выход из них ЛДГ.

Нормоксическим контролем служили клетки, ресуспензированные в оксигенированном бескальциевом буфере Кребса, содержащем 118 мМ NaCl, 25 мМ NaHCO₃, 11 мМ глюкозы, 4.7 мМ KCl, 1.2 мМ MgSO₄, 1.2 мМ KH₂PO₄ pH 7.4. Гибель клеток и выход ЛДГ при аноксии—реоксигенации вычисляли в процентах от нормоксии (инкубация с буфером Кребса). Для приготовления растворов использовали реактивы “Sigma-Aldrich” и “MP Biomedicals”.

Статистическую обработку данных проводили в программе “Statistica 6.0”. Рассчитывали среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего. Гипотезу о равенстве средних значений двух выборок проверяли при помощи *t* критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходная выживаемость палочковидных кардиомиоцитов интактных крыс и крыс группы ХННГ составила 65 и 66% соответственно, что свидетельствует о сопоставимости изначальных параметров клеток. Исходный выброс ЛДГ в обеих группах также не различался (данные не представлены).

При моделировании 20-минутной гипоксия кардиомиоцитов интактных крыс и их последующей 30-минутной реоксигенации гибель клеток составила 23% (табл. 1). Гипоксия — реоксигенация кардиомиоцитов адаптированных крыс вызвала гибель 2.5% клеток, следовательно, адаптация снизила гибель кардиомиоцитов в 9 раз. Выброс ЛДГ из кардиомиоцитов интактных крыс составил при гипоксии 11.36% относительно периода нормоксии (табл. 2). В группе ХННГ этот показатель при гипоксии составил 6.91% (на 40% ниже, чем в кардиомиоцитов интактных крыс, $p < 0.05$). После окончания реоксигенации выброс ЛДГ из кардиомиоцитов интактных крыс составил 18.62% от нормоксии, в то время как для кардиомиоцитов крыс, подвергнутых ХННГ, выброс ЛДГ составил только 8.68% ($p < 0.05$; табл. 2). Эти данные свидетельствуют о выраженном кардиопротективном эффекте ХННГ.

Защитное действие ХННГ показано ранее на модели метаболического ингибирования дыхания изолированных кардиомиоцитов [2] и при острой коронароокклюзии—реперфузии *in vivo* [6,8]. Кроме того, в экспериментах *in vivo* выявлена важная роль ОР в реализации инфарктлимитирующего эффекта ХННГ [6]. В связи с этим следующим этапом нашей работы стало изучение роли ОР в механизме цитопротекторного действия ХННГ.

Нами установлено, что при добавлении блокатора ОР налоксона в среду инкубации кардиомиоцитов интактных крыс наблюдалась отчетливая тенденция к уменьшению числа погибших кардиомиоцитов и тенденция к снижению уровня ЛДГ после воздействия аноксии—реоксигенации. Однако этот эффект был недостоверен. Эти

данные согласуются с результатами исследований [5] о том, что налоксон в концентрации 1.1 мМ снижает выброс креатинфосфокиназы в перфузионный раствор, оттекающий от сердца, в ответ на ишемию—реперфузию последнего. Вполне очевидно, что кардиопротекторный эффект налоксона в данном случае не связан с блокадой ОР, а является неспецифическим, поскольку константа ингибирования у налоксона по отношению к δ -ОР составляет всего 50 нМ [10], что в 22 тыс. раз меньше, чем в работе [5]. Некоторые исследователи рекомендуют использовать агонисты и антагонисты рецепторов в концентрации, превышающей константу ингибирования в 10 раз [7], т.е. для налоксона это концентрация 500 нМ. Однако подобное увеличение концентрации налоксона в перфузионном растворе может, на наш взгляд, привести к усилению неспецифического цитопротекторного эффекта, поэтому налоксон следует использовать только в концентрации 300 нМ или меньше.

При инкубации кардиомиоцитов крыс группы ХННГ с налоксоном число погибших клеток при гипоксии—реоксигенации составило 13%, что оказалось в 5 раз выше аналогичного показателя в группе ХННГ без налоксона и не отличалось от группы “интактные крысы+налоксон” (табл. 2). Статистически значимого влияния налоксона на выброс ЛДГ из кардиомиоцитов при их аноксии не наблюдалось. Однако при реоксигенации клеток, инкубированных с налоксоном, выброс ЛДГ из кардиомиоцитов адаптированных крыс был на 60% выше, чем у этих же клеток с незаблокированными ОР (табл. 1).

Таким образом, кардиопротекторный эффект ХННГ в отношении реоксигенационного повреждения кардиомиоцитов не проявляется на фоне блокады ОР налоксоном. Сигнальные механизмы реализации протекторного эффекта при хронической гипоксии практически не изучены. Известно лишь, что они могут включать в себя ОР [6], протеинкиназу С [9], NO-синтазу [4], митохондриальные $ВК_{Ca^{2+}}$ -каналы (big conductance Ca^{2+} -зависимый K^{+} -канал) [2], K_{ATP} -каналы [4], МРТ-пору (mitochondrial permeability transition pore) [14]. Анализ

Таблица 1. Гибель кардиомиоцитов при гипоксии—реоксигенации (%; $M \pm SEM$)

Группа	Интактные ($n=11$)	ХННГ ($n=13$)
Контроль	23.27 \pm 2.60	2.51 \pm 2.25*
Налоксон	17.23 \pm 4.16*	12.96 \pm 2.05**

Примечание. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем; * $p < 0.00001$ по сравнению с интактными крысами.

Таблица 2. Выброс ЛДГ при гипоксии и реоксигенации изолированных кардиомиоцитов (% от общего ЛДГ относительно нормоксического контроля; $M \pm SEM$)

Группа	Гипоксия		Реоксигенация	
	интактные ($n=11$)	ХННГ ($n=13$)	интактные ($n=11$)	ХННГ ($n=13$)
Контроль	11.36 \pm 1.90	6.91 \pm 1.42*	18.62 \pm 3.14	8.68 \pm 1.76*
Налоксон	7.68 \pm 0.79	7.94 \pm 1.24	14.03 \pm 2.52	13.95 \pm 3.23*

Примечание. $p < 0.05$ по сравнению *с интактными крысами, *с контролем.

данных литературы позволяет предположить, что в механизме протекторного действия ХННГ могут принимать участие киназы, тесно интегрированные с ОР, например, PI3-протеинкиназа, Akt, MEK1/2, ERK1/2, Src-протеинкиназа и JAK2 [12]. Однако участие этих киназ в кардиопротекторном эффекте ХННГ требует изучения.

Остается неясным вопрос, почему ОР опосредуют защиту кардиомиоцитов при реперфузионном повреждении, а протекторный эффект ХННГ на фоне аноксии не связан с их активацией. Наши результаты согласуются с данными работы [3], в которой также не обнаружено влияния агонистов ОР на процент гибели кардиомиоцитов при аноксии, но выявлен выраженный, дозозависимый положительный цитопротекторный эффект этих опиоидов во время реоксигенации. Можно предположить, что защитный эффект ХННГ при аноксии обусловлен другими, не связанными с ОР механизмами.

Сопоставляя данные литературы и полученные результаты, мы можем считать верной гипотезу о важной роли ОР кардиомиоцитов в обеспечении защитного эффекта ХННГ при ишемических и реперфузионных повреждениях сердца.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 14-15-00008).

ЛИТЕРАТУРА

1. Маслов Л.Н., Платонов А.А., Ласукова Т.В. и др. // Пат. физиол. и Экспер. тер. 2006. № 4. С. 13-17.
2. Borchert G.H., Yang C., Kolar F. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2011. Vol. 300, N 2. P. H507-H513.
3. Cao Z., Liu L., Van Winkle D.M. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2003. Vol. 285, N 3. P. H1032-H1039.
4. Fitzpatrick C.M., Shi Y., Hutchins W.C. et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005. Vol. 288, N 1. P. H62-H68.
5. Lee A.Y., Wong T.M. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1985. Vol. 179, N 2. P. 219-221.
6. Maslov L.N., Naryzhnaia N.V., Tsibulnikov S.Y. et al. // Life Sci. 2013. Vol. 93, N 9-11. P. 373-379.
7. Miki T., Cohen M.V., Downey J.M. // Mol. Cell. Biochem. 1998. Vol. 186, N 1-2. P. 3-12.
8. Neckár J., Szárszoi O., Herget J. et al. // Physiol. Res. 2003. Vol. 52, N 2. P. 171-175.
9. Rouet-Benzineb P., Eddahibi S., Raffestin B. et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. 1999. Vol. 31, N 9. P. 1697-1708.
10. Roques B.P., Gacel G., Dauge V. et al. // Neurophysiol. Clin. 1990. Vol. 20, N 5. P. 369-387.
11. Vander Heide R.S., Rim D., Hohl C.M., Ganote C.E. // J. Mol. Cell. Cardiol. 1990. Vol. 22, N 2. P. 165-181.
12. Williams-Pritchard G., Headrick J.P., Peart J.N. // Pharmaceuticals. 2011. Vol. 4, N4. P. 470-484.
13. Xu X., Colecraft H.M. // J. Vis. Exp. 2009. N 28. P. 1308.
14. Zhu W.Z., Xie Y., Chen L. et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2006. Vol. 40, N 1. P. 96-106.

Получено 22.02.14