

УДК 612.59 + 612.43/.45 + 612.59

© Коллектив авторов

## **ВЛИЯНИЕ ЭНКЕФАЛИНОВ НА БИОСИНТЕЗ МИОКАРДИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ПРИ ОСТРОМ ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

**Ю.Б.ЛИШМАНОВ, Н.В.НАРЫЖНАЯ, Л.Н.МАСЛОВ**

Лаборатория экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН

634050, г.Томск, ул.Шевченко 24, тел. - (383-2)-213625, -262174, Факс:(383-2)-55-50-57,

Эл.: nuclear@cardiolog.tomsk.su, nam@cardio.tsu.ru

Острое холодовое воздействие на организм (4 часа при  $-20^{\circ}\text{C}$ ) ингибирует синтез белка в миокарде и повышает индекс кортизол/инсулин в крови крыс. Предварительное курсовое введение  $[\text{D-Ala}^2, \text{Leu}^5, \text{Arg}^6]$ -энкефалина (даларгин) предупреждает снижение скорости биосинтеза белка в миокарде после холодового стресса и уменьшает отношение кортизол/инсулин. Предварительное введение налоксона в дозе 0,2 мг/кг или 2 мг/кг не устраняет "анаболический" эффект даларгина. Предполагают, что "анаболический" эффект даларгина связан с активацией  $\alpha$ -опиатных рецепторов и изменением секреции инсулина и кортизола.

**Ключевые слова:** стресс, протеосинтез в миокарде, энкефалины, гормоны.

**ВВЕДЕНИЕ.** Популяционные исследования свидетельствуют о том, что при резком снижении температуры окружающего воздуха достоверно увеличивается частота возникновения инфаркта миокарда [1,2,3]. Хотя первая публикация о способности острого охлаждения организма индуцировать повреждения миокарда появилась еще в 1957 году [4], физиологические механизмы этого явления остаются малоизученными. Ранее было обнаружено снижение сократимости и коронарной перфузии изолированного сердца после острого холодового воздействия на организм крыс, а также снижение порога желудочковой фибрилляции у этих животных [3,5,6]. Эти данные позволяют говорить о развитии повреждений сердечной мышцы при холодовом стрессе.

Известно, что одним из факторов стрессорного повреждения органов и тканей является преобладание процессов гидролиза белков над скоростью их ресинтеза [7], обусловленное изменением баланса "анаболических" и "катаболических" гормонов [7]. Весьма вероятно, что патогенетические основы холодового повреждения сердца могут быть аналогичными. Анализ результатов наших ранних исследований позволил предположить, что опиоидные пептиды могли бы предупреждать повреждения сердца при острых холодовых воздействиях, поскольку синтетический аналог энкефалинов даларгин, по нашим данным, оказывает при эмоциональном стрессе кардиопротекторное действие и стимулирует включение  $^3\text{H}$ -лейцина в белки кардиомиоцитов [8].

В настоящей работе мы поставили своей целью изучить влияние энкефалинов на процессы биосинтеза белка в миокарде при остром холодовом стрессе и проанализировать гормональные механизмы этого эффекта.

**МЕТОДИКА.** Эксперименты были проведены на 72 крысах-самцах линии Вистар массой 120-140 г. Острое холодовое воздействие вызывали путем помещения

животных в рефрижераторную камеру при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  на 4 часа. Величина ректальной температуры при такой холодовой экспозиции снижалась в среднем до  $+32^{\circ}\text{C}$ . Все особи были произвольно разделены на 6 групп. Первая группа - интактные крысы. Животным второй группы (холодовой контроль) в течение 5 суток, предшествовавших охлаждению, ежедневно внутривбрюшинно вводили по 0,5 мл 0,9% NaCl. Крысы третьей группы получали внутривбрюшинно в дозе 1,38 нмоль/кг агонист  $\mu$ - и  $\delta$ -рецепторов [D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Arg<sup>6</sup>]-энкефалин (даларгин) [9]. При выборе дозы энкефалина мы руководствовались нашими данными об "анаболической" активности даларгина при стрессе [8]. Даларгин был закуплен в КНЦ РАМН. Животным четвертой группы курсовое введение даларгина проводили без последующего холодового воздействия. Крысам пятой и шестой групп в течение 5 дней перед охлаждением даларгин вводили на фоне предварительной (за 15 мин) внутривбрюшинной инъекции налоксона ("Sigma", США), соответственно, в дозах 0,2 мг/кг, достаточной для блокады только  $\mu$ -рецепторов или 2 мг/кг, вызывающей "выключение" всех типов опиатных рецепторов [10,11].

Интенсивность биосинтеза белка в миокарде оценивали по скорости включения [<sup>3</sup>H]-лейцина (удельная радиоактивность 1940 ТБк/моль, С-Петербург, "Изотоп"), который вводили внутривбрюшинно в дозе 500 мкКи/100г массы за 1 час до декапитации. Обработку ткани миокарда проводили по стандартной методике [12]. Содержание белка в ткани миокарда определяли методом Lowry [13]. Концентрации кортизола и инсулина в плазме крови определяли радиоиммунным методом с помощью коммерческих РИА-наборов (В/О "Изотоп", Россия). Измерение радиоактивности проб проводили на отечественном гамма-счетчике "Гамма-12" и сцинтиляционном бета-счетчике "Mark-III" (США).

Полученные данные обрабатывались статистически с применением t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Как показано на рис., при холодовом воздействии происходило снижение скорости включения [<sup>3</sup>H]-лейцина в белки миокарда на 32% по сравнению с интактными крысами. Общеизвестно, что содержание белка в клетке зависит от баланса процессов синтеза и катаболизма, а время полужизни протеинов в большинстве органов исчисляется несколькими сутками [14]. Принимая во внимание тот факт, что меченный лейцин мы вводили всего за 60 мин до декапитации, видимо, можно говорить о том, что выявленные нами изменения характеризуют скорее торможение биосинтеза белка при остром охлаждении, а не изменения интегрального показателя процессов синтеза и распада.

Важная роль в механизмах снижения скорости включения [<sup>3</sup>H]-лейцина в белки миокарда при холодовом воздействии принадлежит, по-видимому, глюкокортикоидам, которые способны ингибировать процессы протеосинтеза [15]. В пользу этого свидетельствует и обнаруженное нами при холодовом воздействии повышение на 38% уровня кортизола в плазме крови и подъем на 60% кортизол/инсулинового индекса по сравнению с интактными животными (табл.).

На рис. 1 показано, что у животных, получавших курс даларгина перед холодовым воздействием, включение [<sup>3</sup>H]-лейцина в белки миокарда происходило более интенсивно, чем в группе холодового контроля. Одновременно с этим, под влиянием данного энкефалина происходило снижение уровня кортизола в крови на 59% и индекса кортизол/инсулин на 70% по сравнению с холодовым контролем (Табл.). Следует отметить, что у интактных крыс этот энкефалин не оказывал "анаболического" эффекта (Рис.) и достоверно не влиял на уровень изучаемых гормонов в крови, хотя имелась тенденция к увеличению концентрации инсулина (Табл.).

Мы предполагаем, что этот эффект даларгина опосредуется через изменение индекса "кортизол/инсулин", которое, по мнению Л.Е.Панина [16], свидетельствует о снижении интенсивности стресс-реакции. Отсюда можно полагать, что обнаруженные нами эффекты синтетического энкефалина лишь имитируют эволюционно выработанную



физиологическую функцию эндогенных опиоидных пептидов, направленную на ограничение чрезмерной стресс-реакции и предупреждение возникновения "болезней адаптации" (по терминологии Г.Селье) [7].

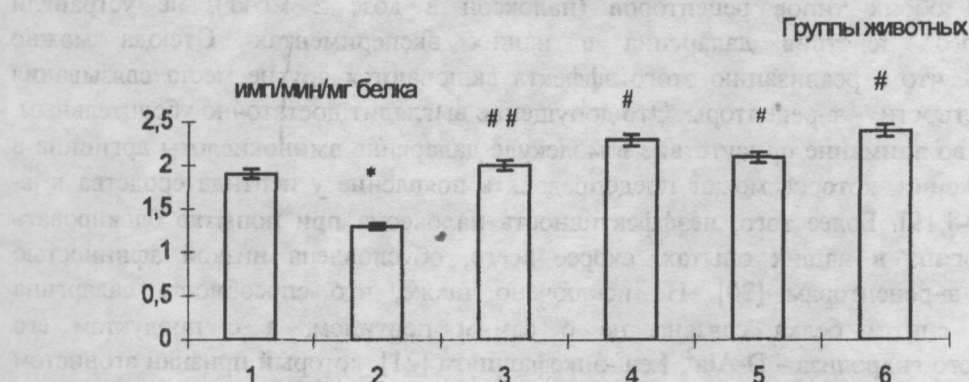


Рисунок.

Влияние синтетических лигандов опиатных рецепторов на биосинтез белка в миокарде крыс при остром холодовом воздействии. По оси ординат - удельная радиоактивность белка (имп/мин/мг белка). 1 - Интактные; 2 - Холодовой стресс 4 ч, -20°C; 3 - Холодовой стресс + даларгин 0,1 мг/кг; 4 - Интактные + Даларгин 0,1 мг/кг; 5 - Холодовой стресс + даларгин 0,1 мг/кг + налоксон 0,2 мг/кг; 6 - Холодовой стресс + даларгин 0,1 мг/кг + налоксон 2 мг/кг.

Примечания: \* - показатель достоверности различий по отношению к интактным животным  $p < 0,01$ ; # - то же по отношению к холодовому контролю,  $p < 0,05$ ; ## -  $p < 0,001$ .

Таблица. Влияние курсового системного введения энкефалинов на содержание гормонов в плазме крови крыс после острого холодового воздействия

Группа животных	Инсулин мкЕД/мл	Кортизол нмоль/л	Индекс К/И
ИНТАКТНЫЕ (n=10)	13,9 ± 1,92	13,84 ± 1,25	0,99
ХОЛОД -20°C, 4 часа (n=10)	14,04 ± 2,66 $P_1 > 0,05$	22,37 ± 2,2 $P_1 < 0,01$	1,59
Даларгин + холод (n=11)	17,74 ± 3,52 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	9,04 ± 2,99 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,01$	0,51
Даларгин + интактные (n=10)	17,48 ± 1,96 $P_1 > 0,05$	13,84 ± 1,2 $P_1 > 0,05$	0,78
Даларгин + налоксон 0,2 мг/кг + холод (n=11)	18,2 ± 2,4 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$ $P_3 > 0,05$	103,81 ± 13,2 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$ $P_3 < 0,01$	5,77
Даларгин + налоксон, 2 мг/кг + холод (n=10)	17,8 ± 2,3 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$ $P_3 > 0,05$	14,58 ± 2,8 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,01$ $P_3 > 0,05$	0,81

Примечания:  $P_1$ - достоверность различий по отношению к интактным;  $P_2$ - достоверность по отношению к холоду -20°C, 4 часа;  $P_3$ -достоверность по отношению к группе даларгин + холод; n - количество животных в группе.

Более сложным оказалось выяснение рецепторных механизмов влияния даларгина на синтез белков миокарда. Блокада  $\mu$ -рецепторов налоксоном (0,2 мг/кг) не устраняла "анаболический" эффект даларгина (рис.), но способствовала значительному повышению концентрации кортизола в крови (табл.). Введение налоксона в дозе 2 мг/кг, ингибирующей помимо  $\mu$ -рецепторов и другие типы опиатных рецепторов, также не сопровождалось изменением модулирующего эффекта даларгина в отношении метаболизма белка в миокарде и уровня гормонов крови. Согласно литературным

данным, пептиды, сходные по химической структуре с даларгином, взаимодействуют преимущественно с  $\delta$ -рецепторами, но могут связываться и с  $\mu$ -рецепторами [10,17]. Однако ни избирательная блокада  $\mu$ -опиатных рецепторов (налуксон в дозе 0,2 мг/кг), ни "выключение" обоих типов рецепторов (налуксон в дозе 2 мг/кг), не устраняли "анаболического" действия даларгина в наших экспериментах. Отсюда можно предположить, что в реализацию этого эффекта включаются другие места связывания опиатов, в частности, -  $\kappa$ -рецепторы. Это допущение выглядит достаточно убедительным, если принять во внимание присутствие в молекуле даларгина аминокислоты аргинина в шестом положении, которое может предопределять появление у пептида сродства к  $\kappa$ -рецепторам [18,19]. Более того, неэффективность налоксона при попытке блокировать эффект даларгина в наших опытах, скорее всего, обусловлена низкой афинностью налоксона к  $\kappa$ -рецепторам [20]. Не исключено также, что способность даларгина активировать синтез белка связана не с самим пептидом, а с продуктом его энзиматического гидролиза - D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>-энкефалином [21], который признан агонистом  $\kappa_2$ -опиатных рецепторов [18,19].

Наши результаты позволяют нам констатировать, что холодовой стресс вызывает торможение биосинтеза миокардиальных белков, опосредуя, по-видимому, свое действие через изменение баланса "анаболических" и "катаболических" гормонов, соответственно инсулина и кортизола. Введение даларгина, который является смешанным  $\mu$ - и  $\delta$ -агонистом опиатных рецепторов, препятствует снижению скорости протеосинтеза в кардиомиоцитах в указанных условиях.

В заключение следует сказать, что обнаруженное нами торможение скорости биосинтеза миокардиальных белков при холодовом стрессе может вносить определенный вклад в патогенез повреждений сердца при воздействии низких температур на организм теплокровных животных и человека. Обнаруженный нами "анаболический" эффект синтетического энкефалина в условиях холодового воздействия позволяет предполагать существование опиатергической модуляции процессов протеосинтеза в миокарде в условиях стресса. Однако эта гипотеза несомненно нуждается в более детальном экспериментальном анализе.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований, грант N98-04-48010.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lloyd E.L. (1985) Lancet. 2, (8469/70), 1434-1435.
2. Thakur C.P., Anand M.P., Shahi M.P. (1987) Int.J.Cardiol. 16, 19-25.
3. Барбараш Н.А. (1996) Успехи физиол. наук 27, (4): 116-132.
4. Selye H. (1957) Canad. Med. Assoc. J. 77, (10), 1114-1117.
5. Афанасьев С.А., Алексеева Е.Д., Бардамова И.Б., Маслова Л.В. (1993) Бюлл. exper. биол. и мед., 11, 480-483.
6. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Маслова Л.В., Угдыжекова Д.С. (1994) Тезисы докладов региональной конференции актуальные проблемы кардиологии в Сибири и на Крайнем Севере. Тюмень, 23-24 ноября 1994 г. с.104.
7. Селье Г. (1979) Стресс без дистресса. М. Прогресс.
8. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. (1994) Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. - Томск - Издательство Томского университета.
9. Коробов Н.В. (1988) Фармакол. и токсикол., 4, 35-38.
10. Allescher H.D., Ahmad S., Daniel E.E., et al. (1988) Amer. J. Physiol. 255, (3, Part 1), G352-360.



11. Millan M.J., Colpaert F.C. (1991) *Neuroscience.*, 4, (2), 541-553.
12. Шитов Г.Д., Панопорт Э.А., Казарян В.А. (1984) Пат. физиол. Экспер. тер., 4, 36-40.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr H.L., Randall R.J. (1951) *J. Biolog. Chem.*, 193, 265-275.
14. Дин Р. (1981) Процессы распада в клетке. М: Мир.
15. Тепперман Дж., Тепперман Х. (1989) Физиология обмена веществ и эндокринной системы. М.: Мир.
16. Панин Л.Е. (1983) Биохимические механизмы стресса. - Новосибирск - Наука.
17. Zajac J-M., Gasel G., Petit F. et al. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111, (2), 390-397.
18. Benyhe S., Varga E., Borsodi A., Wollemann M. (1990) *Acta Physiol. Hung.* 76, (4), 291-294.
19. Wollemann M., Benyhe S., Simon J. (1993) *Life Sci.*, 52, (7), 599-611.
20. Romer D., Buscher H., Hill R.C. et al. (1980) *Life Sci.*, 27, (11), 971-978.
21. Каленикова Е.И., Дмитриева О.Ф., Коробов Н.В., Жуковский С.В., Тищенко В.А., Виноградов В.А. (1988) *Вопр. мед. химии*, №1, 75-83.

Поступила 21.03. 97г.

# **EFFECT OF ENKEPHALINS ON THE SYNTHESIS OF MYOCARDIAL PROTEINS DURING ACUTE COLD EXPOSURE**

YU.B. LISHMANOV, N.V. NARYZNAYA, L.N. MASLOV

Laboratory of Experimental Cardiology, Tomsk Institute Cardiology, 634050 Tomsk, Shevchenko Str.  
24, Tel: (383-2)-213625, 262174, Fax: (383-2)-55-50-57,  
E-mail: nuclear@cardiolog.tomsk.su, narn@cardio.tsu.ru

Acute cold exposure of organism (4 hours at -20°C) inhibits myocardial protein synthesis and increases cortisol/insulin index in rat blood. Preliminary repeated administration in [D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Arg<sup>6</sup>]-enkephalin (dalargin) prevents the decrease of myocardial protein synthesis rate after cold stress and decreases cortisol/insulin ratio. Pretreatment with naloxone at dose of 0.2 mg/kg or 2 mg/kg doesn't eliminate "anabolic" effect of dalargin. "Anabolic" effect of dalargin is suggested to be connected with -opioid receptor stimulation and change in insulin and cortisol secretion.

**Key words:** stress, myocardial proteosynthesis, enkephalins, hormones.