

УДК 612.59 + 612.43/.45 + 612.59

© Коллектив авторов

## **ПРОЦЕССЫ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ И КАРДИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИГАНДОВ $\mu$ -ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ**

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

Лаборатория экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН  
г. Томск

Имобилизационный стресс (24 ч) приводит к усилению аккумуляции  $^{99m}\text{Tc}$ -пирофосфата в сердце крыс, что указывает на повреждение кардиомиоцитов. Одновременно с этим в сердечной мышце наблюдается замедление синтеза белков, а в плазме крови - снижение уровня иммунореактивного инсулина на фоне параллельного увеличения концентрации кортизола и альдостерона. Предварительное (перед стрессом) введение крысам агонистов  $\mu$ -опиатных рецепторов DALDA или DAGO (0,1 мг/кг, интраперитонеально) полностью предотвращает стресс-индуцированное угнетение синтеза белка и повреждение миокарда, что сопровождается повышением уровня инсулина и уменьшением концентрации кортизола в крови. Внутривнутрибрюшинное введение блокатора биосинтеза белка циклогексимида в дозе 0,3 мг/кг потенцирует процесс мембранных повреждений миокарда крыс при иммобилизации и снижает эффективность кардиопротекторного действия DALDA.

**Ключевые слова:** стресс, биосинтез белка в миокарде, энкефалины, гормоны.

**ВВЕДЕНИЕ.** Известно, что длительные экстремальные воздействия на организм вызывают диффузные повреждения сердца, получившие в литературе название "стрессорной кардиомиопатии" [1,2]. Подобные нарушения, по мнению ряда исследователей [3,4], могут способствовать развитию ишемической болезни сердца и других поражений миокарда. Вместе с тем, вопрос о патогенезе собственно стрессорных повреждений миокарда до сих пор остается открытым. Ряд исследователей полагают, что одним из факторов повреждения органов и тканей в подобных ситуациях является возникающий в условиях напряжения дисбаланс синтеза и распада белков с преобладанием катаболических процессов. В роли предрасполагающих факторов при этом выступают гиперактивация симпато-адреналовой системы и нарушение баланса "анаболических" и "катаболических" гормонов [1,5-7]. Между тем, прямых доказательств того, что повреждение миокарда при стрессе может происходить вследствие нарушения процессов синтеза белков в кардиомиоцитах до настоящего времени получено не

было. Кроме того, оставалось неясным, какие эндогенные факторы, помимо гормонов, могут регулировать биосинтез белка в миокарде в условиях стресса. Анализ результатов собственных исследований позволил нам предположить, что на роль подобной модулирующей системы могут претендовать опиоидные пептиды и их рецепторы [7,8]. Так, нами было установлено, что смешанный агонист  $\mu$ - и  $\delta$ - опиатных рецепторов (ОР) даларгин предупреждает стресс-индуцированное снижение интенсивности процессов биосинтеза белка и нуклеиновых кислот в сердечной мышце [7], ограничивая при этом стрессорное повреждение сердца. Кроме того, мы показали, что повышение толерантности сердца к стрессорным повреждениям, наблюдаемое у адаптированных животных, коррелирует с увеличением уровня эндогенных опиоидных пептидов [8] и сопровождается сохранением высокой интенсивности синтеза белка в кардиомиоцитах в условиях стресса. Однако вопросы о том, связан ли кардиопротекторный эффект опиоидов с их "анаболическим" действием, и является ли данный эффект результатом опиатергической модуляции секреции гормонов, регулирующих метаболизм белков оставались без ответа. Неясно также какие типы опиатных рецепторов принимают участие в реализации "анаболического" эффекта опиоидных пептидов?

Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы сопоставить кардиопротекторные эффекты лигандов  $\mu$ -опиатных рецепторов с их влиянием на процессы биосинтеза белка в миокарде при иммобилизационном стрессе.

**МЕТОДИКА.** Эксперименты выполнены на белых крысах-самцах линии Вистар массой 150-200 г. Стресс моделировали путем иммобилизации животных в положении на спине в течение 24 ч.

Для стимуляции периферических  $\mu$ -ОР использовали пептидные лиганды этих рецепторов, неспособные проникать через гематоэнцефалический барьер: **DAGO** ([D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-enkephalin) [9] или **DALDA** ([D-Arg<sup>2</sup>, Lys<sup>4</sup>]-dermorphin-(1-4)-amide) [10] (производство "Chiron Mimotopes Peptide Systems", США), вводимые внутривентриально в дозе 0,1 мг/кг двукратно: за 30 минут до иммобилизации и через 12 ч от начала стрессорного воздействия. Для блокады биосинтеза белка применяли циклогексимид (Sigma, США) в дозе 0,3 мг/кг внутривентриально по той же схеме [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 внутривентриально 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 по методу Lowry [13]. Содержание кортизола, инсулина и альдостерона в плазме крови определяли радиоиммунным методом с помощью коммерческих РИА-наборов (В/О "Изотоп", Россия и «Amersham», Англия). Оценку стрессорного повреждения сердца проводили по уровню аккумуляции в нем <sup>99m</sup>Tc-пирофосфата (<sup>99m</sup>Tc-ПФ) [14]. Радиоактивность проб измеряли на отечественном гамма-счетчике "Гамма-12" и сцинтиляционном бета-счетчике "Mark-III" (США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.** После окончания 24-часового иммобилизационного стресса, как и в предыдущих исследованиях [15,16], мы наблюдали достоверное усиление аккумуляции <sup>99m</sup>Tc-ПФ в сердечной мышце на 26% (рис.1). Согласно данным литературы, накопление <sup>99m</sup>Tc-ПФ в миокарде коррелирует с развитием повреждений кардиомиоцитов и повышением

проницаемости сарколеммы к ионам  $\text{Ca}^{++}$  [17,18], поэтому подъем содержания  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ПФ в миокарде рассматривается в качестве индикатора стрессорной деструкции клеток сердца [14,19].

Другим интересным фактом, обнаруженным в наших опытах, явилось стресс-индуцированное снижение скорости синтеза белка в клетках сердца крыс, о чем можно было судить по снижению на 25% скорости включения  $^3\text{H}$ -лейцина в молекулы миокардиальных белков после 24-часовой иммобилизации животных (табл. 1).

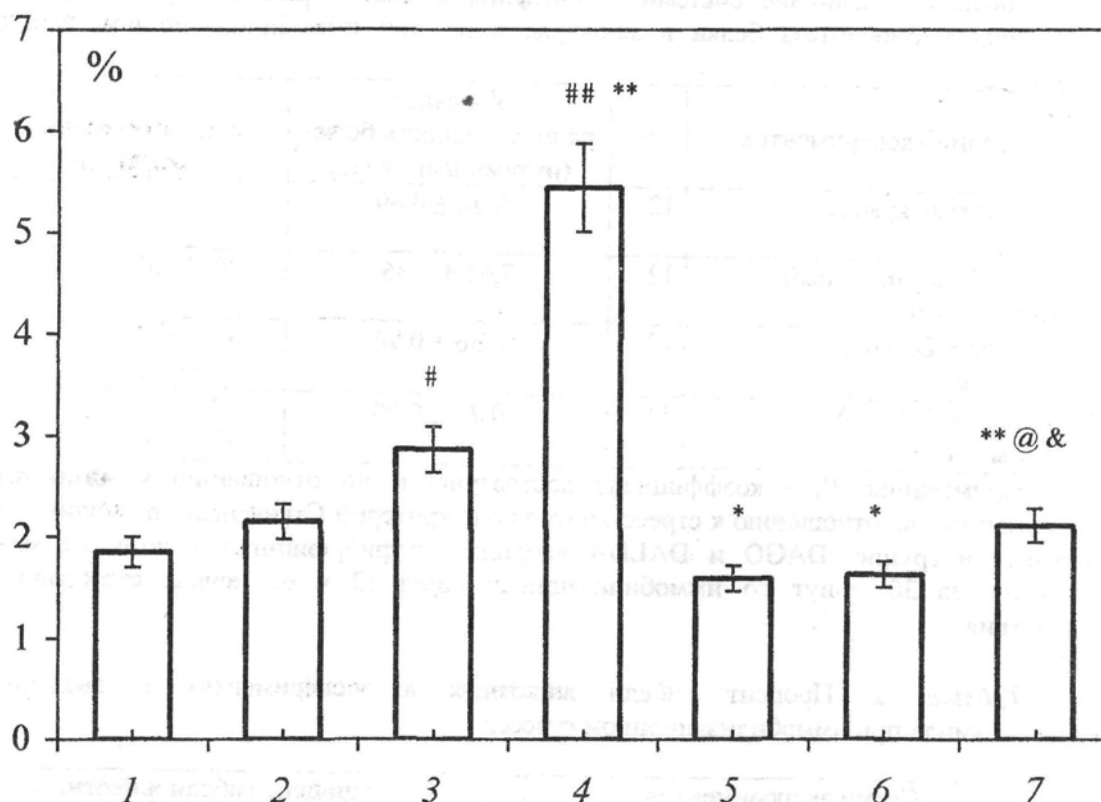


Рисунок 1.

Аккумуляция  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -пирофосфата в миокарде крыс при 24 часовом иммобилизационном стрессе ( $\bar{X} \pm m$ ). По оси ординат - поглощение  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -пирофосфата, % от общей дозы/г ткани  $\times 10^{-2}$ . По оси абсцисс - группы животных: 1 - интактные животные (n=10); 2 - циклогексимид, (n=11); 3 - стресс (n=14); 4 - стресс + циклогексимид, 0,3 мг/кг, (n=11); 5 - стресс + DALDA, 0,1 мг/кг, (n=10); 6 - стресс + DAGO, 0,1 мг/кг, (n=11); 7 - стресс + циклогексимид, 0,3мг/кг + DALDA, 0,1мг/кг, (n=9).

Примечания: #P<0,05, ## P<0,01 - достоверные различия по сравнению с интактными; \*P<0,05, \*\* P<0,01 - то же по сравнению с группой стресс-контроля; @ P<0,05 - то же по сравнению с группой животных "Стресс+DALDA" (t-тест Стьюдента); & P<0,01 - то же по сравнению с группой животных "Стресс + циклогексимид". В скобках - количество животных в группе.

Эксперименты с блокатором синтеза белка циклогексимидом показали, что степень стрессорного повреждение сердца при введении данного препарата заметно усилилась, на что указывал более высокий, по сравнению со стресс-контролем, процент аккумуляции  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ПФ в миокарде (рис.1). Следует отметить, что блокада трансляции белков циклогексимидом приводила к увеличению накопления  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ПФ в миокарде и у нестрессированных крыс, однако это повышение было весьма незначительным и статистически незначимым (рис.1).

Последний факт свидетельствует об отсутствии кардиотоксического действия циклогексимида в использованной нами дозе. В то же время, применение циклогексимида перед стрессированием приводило не только к усилению аккумуляции  $^{99m}\text{Tc}$ -ПФ в миокарде, но и к значительному увеличению гибели крыс во время эксперимента, в то время как летальности среди интактных особей данный препарат не вызывал (табл.2).

Таблица 1. Влияние системного введения лигандов опиатных рецепторов на интенсивность биосинтеза белка в миокарде крыс при иммобилизационном стрессе ( $\bar{X} \pm m$ ).

	Серии экспериментов	n	Удельная радиоактивность белка (имп/мин/мг белка)	Статистический показатель
1	Интактные крысы	12	$10,28 \pm 0,69$	
2	Иммобилизационный стресс, 24 ч	12	$7,61 \pm 0,86$	$P_1 < 0,05$
3	Стресс + DAGO, 0,1 мг/кг	12	$10,56 \pm 0,74$	$P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$
4	Стресс + DALDA 0,1 мг/кг	11	$10,77 \pm 0,90$	$P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$

Примечания:  $P_1$  - коэффициент достоверности по отношению к интактным животным;  $P_2$  - по отношению к стресс-контролю (t-критерий Стьюдента). n - количество животных в группе. DAGO и DALDA вводили внутривентрально в дозе 0,1 мг/кг двукратно: за 30 минут до иммобилизации и через 12 ч от начала стрессорного воздействия.

Таблица 2. Процент гибели животных в экспериментах с введением циклогексимида при иммобилизационном стрессе

	Серии экспериментов	n	Процент гибели животных
1	Иммобилизационный стресс, 24 ч,	20	5%
2	Циклогексимид, 0,3 мг/кг,	25	0
3	Стресс + циклогексимид, 0,3 мг/кг,	25	25%

Примечание: n - количество животных в группе; циклогексимид вводили внутривентрально двукратно: за 30 минут до иммобилизации и через 12 ч от начала стрессорного воздействия.

Изменения синтеза белка, наблюдаемые через 24 ч иммобилизации, сопровождались снижением уровня «анаболического» гормона инсулина в 3,7 раза, а также увеличением концентрации «катаболических» инкретов кортизола и альдостерона в плазме крови крыс по сравнению с исходным уровнем (рис.2).

Роль и место нарушений метаболизма миокардиальных белков в патогенетической цепи стрессорного повреждения сердца можно обсуждать, принимая во внимание несоответствие между усиленным распадом и ресинтезом структурных белков клетки, возникающее при экстремальных воздействиях. Ускоренный катаболизм белков при длительном тяжелом стрессе был продемонстрирован работами Меерсона и соавт. [5]. Являясь частным проявлением катаболического эффекта общего адаптационного синдрома [1], этот феномен может обусловить возникновение необратимых структурных повреждений кардиомиоцитов. Деструктивные процессы усугубляются при этом несостоятельностью репаративных механизмов, о чем свидетельствует снижение



скорости включения  $^3\text{H}$ -лейцина в белки сердечной мышцы. В результате, формируется дисбаланс между скоростью трансляции миокардиальных белков и интенсивностью их протеолиза. В механизме формирования такого дисбаланса определенную роль играет, по-видимому, усиление секреции “катаболических” гормонов (катехоламины, глюко- и минералокортикоиды, глюкагон) и снижение уровня “анаболических” инкретов (инсулин, соматотропин, пролактин и др.) [20,21,22]. Мы в своих экспериментах также обнаружили повышение концентрации кортизола и альдостерона на фоне уменьшения концентрации инсулина в сыворотке крови крыс при иммобилизационном стрессе. Немаловажное значение в патогенезе стресс-индуцированного торможения синтеза белка могут играть и возникающий при этом относительный дефицит макроэргов [23] и перегрузка цитоплазмы ионами  $\text{Ca}^{2+}$  [24].

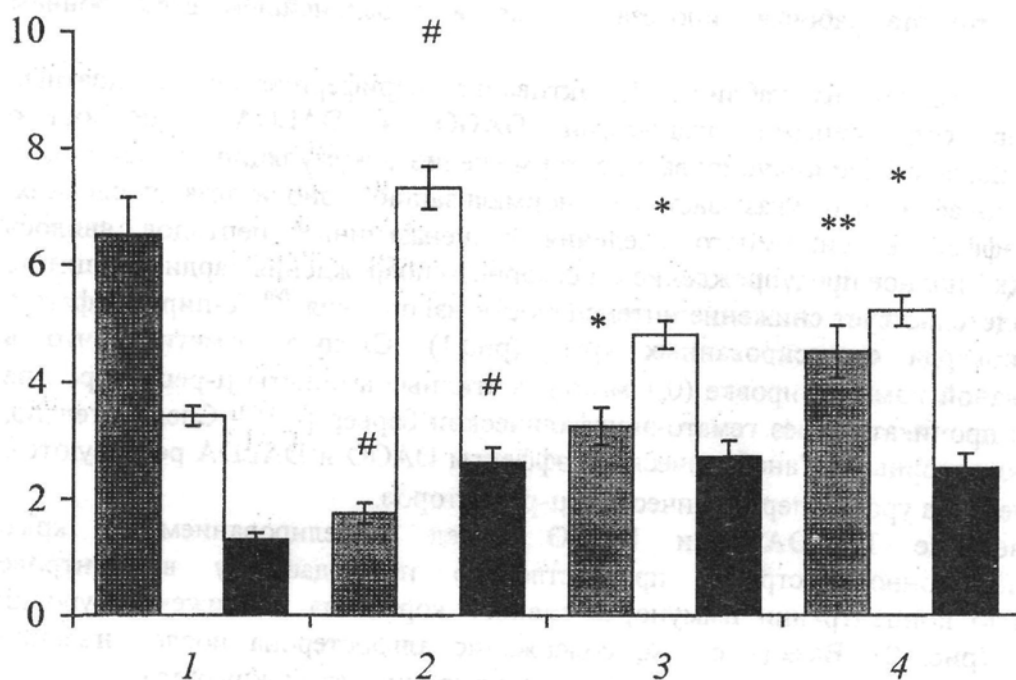


Рис.2.

Влияние агонистов  $\mu$ -опиатных рецепторов на содержание инсулина, кортизола и альдостерона в сыворотке крови крыс при иммобилизационном стрессе.

По оси ординат: ■ - содержание инсулина, мкЕд/мл; □ - содержание кортизола, нмоль/л × 10<sup>-1</sup>; ▨ - содержание альдостерона, нмоль/л.

По оси абсцисс - группы животных: 1 - интактные животные (n=10); 2 - стресс (n=12); 3 - стресс + DALDA, 0,1 мг/кг (n=10); 4 - стресс + DAGO, 0,1 мг/кг, (n=11). Примечания: # - P < 0,01 - достоверные различия по сравнению с интактными; \*P < 0,05, \*\* P < 0,01 - то же по отношению к группе стресс-контроля. В скобках - количество животных в группе.

Все препараты вводили внутривенно двукратно: за 30 минут до иммобилизации и через 12 ч от начала стрессорного воздействия.

Таким образом, совокупность приведенных данных позволяет утверждать, что одним из важных патогенетических факторов повреждения миокарда при стрессе является дисбаланс процессов биосинтеза и распада белков, по-видимому, обусловленный диспропорцией между повышенным уровнем катаболических гормонов (кортизола, альдостерона) и уменьшенным содержанием инсулина.

О каких белках может идти речь? Анализ литературных данных позволяет нам предполагать, что важную роль в формировании устойчивости клеток миокарда к стрессорным повреждениям играют белки теплового шока HSP-70 и HSP-27, которые называют также стресс-белками [25-27]. В условиях функционального покоя эти белки практически не синтезируются в миокарде, однако при экстремальных воздействиях на организм их экспрессия в кардиомиоцитах многократно усиливается [25]. Предполагают, что активация биосинтеза этих белков в миокарде обеспечивает повышение устойчивости цитоскелета кардиомиоцитов к ишемическим, реоксигенационным [26,27] и стрессорным воздействиям [25]. Мы предполагаем, что ингибирование синтеза белков теплового шока цитогексимидом обеспечивает повышение чувствительности миокарда к стрессорным повреждениям. Вместе с тем, следует отметить, что эта рабочая гипотеза нуждается в дальнейшем всестороннем изучении.

Как следует из таблицы 1, активация периферических  $\mu$ -опиатных рецепторов селективными агонистами DAGO и DALDA полностью предотвращала стресс-индуцированное торможение аккумуляции  $^3\text{H}$ -лейцина в белках миокарда, что указывает на "нормализацию" биосинтеза последних. Другим эффектом системного введения вышеназванных пептидов явилось практически полное предупреждение стрессорного повреждения кардиомиоцитов, о чем свидетельствует снижение интенсивности накопления  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -пирофосфата в ткани миокарда стрессированных крыс (рис.1). Следует отметить, что в использованной нами дозировке (0,1 мг/кг) пептидные агонисты  $\mu$ -рецепторов не способны проникать через гемато-энцефалический барьер [9,10]. Следовательно, кардиопротекторный и "анаболический" эффекты DAGO и DALDA реализуются, скорее всего, на уровне периферических  $\mu$ -рецепторов.

Введение DALDA или DAGO перед моделированием у крыс иммобилизационного стресса препятствовало наблюдаемому в контроле увеличению концентрации иммунореактивного кортизола и снижению уровня инсулина (рис. 2). Вместе с тем, содержание альдостерона после инъекции опиоидов оставалось таким же высоким, как и в группе стресс-контроля.

Учитывая, с одной стороны, важную роль инсулина в поддержании высокой интенсивности биосинтеза белка в кардиомиоцитах, а с другой - способность глюкокортикоидов активировать катаболизм белков в миокарде [22], можно думать, что обнаруженная нами способность опиоидов нормализовать стрессорный дисбаланс гормонов может являться основой их "анаболического" эффекта.

Таким образом, нам удалось установить, что экзогенная стимуляция периферических  $\mu$ -рецепторов в условиях иммобилизационного стресса в значительной степени корректирует дисбаланс кортизола и инсулина, что способствует предотвращению стресс-индуцированного торможения синтеза белка в миокарде крыс и развития повреждений кардиомиоцитов. Дальнейшие наши эксперименты выполнялись с целью аргументации данной гипотезы.

Как показано на рис. 1, введение ингибитора белкового синтеза циклогексимида существенно ослабляло кардиопротекторное действие DALDA, о чем можно было судить по более высокому (на 32%) уровню накопления  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -пирофосфата в сердце крыс данной серии по сравнению с животными, получавшими DALDA без блокады протеосинтеза. На наш взгляд, это можно рассматривать как прямое доказательство того, что сохранение высокой скорости

трансляционных процессов в кардиомиоцитах является важным механизмом кардиопротекторного эффекта активации  $\mu$ -ОР.

Однако нельзя не заметить, что циклогексими́д далеко не полностью устранял позитивные эффекты DALDA. Так, уровень аккумуляции  $^{99m}\text{Tc}$ -пирофосфата в миокарде животных, получавших перед стрессом циклогексими́д и DALDA, оставался на более низком, чем в стресс-контроле, и в 2,4 раза ниже аналогичного показателя у животных из группы "циклогексими́д + стресс" (рис. 1). Следовательно, в механизм кардиопротекторного эффекта, связанного с активацией  $\mu$ -ОР, наряду с протеосинтезом, могут быть вовлечены и другие процессы, обеспечивающие повышение толерантности сердца к стрессорным повреждениям. Например, ранее было показано, что в реализации кардиопротекторного действия агонистов  $\mu$ -рецепторов значимую роль играет опиатергическое торможение секреции эндогенных катехоламинов [15,25] и влияние лигандов ОР на баланс простаноидов [16].

Результаты работы позволили сделать следующие выводы:

1. Сохранение высокой интенсивности биосинтеза белков в миокарде является обязательным условием формирования высокой резистентности сердца к стрессорным повреждениям.
2. Активация синтеза белка в кардиомиоцитах является одним из механизмов кардиопротекторного эффекта активации периферических  $\mu$ -опиатных рецепторов при стрессе.
3. Одним из механизмов кардиопротекторного и "анаболического" действия лигандов  $\mu$ -опиатных рецепторов является способность последних модулировать секрецию инсулина и кортизола.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований, грант N98-04-48010. Авторы выражают признательность д-ру Kevin Gormley (NIDA, США) за предоставленные лиганды опиатных рецепторов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Selye H. (1969) The Pluricausal Cardiopathies Springfield, Ill, Charles C. Thomas, Publisher.
2. Непомнящих Л.М. (1991) Морфогенез важнейших общепатологических процессов в сердце - Новосибирск, Наука, Сибирское Отделение.
3. Чазов Е.И. (1975) Вестн. АМН СССР, № 8, 3-8.
4. Lown B., DeSilva R., Reich P. (1980) Amer. J. Psychiatr. **137**, 1325-1335.
5. Меерсон Ф.З., Васильев В.К. (1981) Бюлл. экспер. биол. и мед. N9, 297-299.
6. Дин Р. (1981) Процессы распада в клетке М., Мир.
7. Маслова Л.В., Лишманов Ю.Б., Смагин Г.Н. (1991) Вопр. мед. химии, **37** (1), 63-65.
8. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. (1994) Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. Томск, Изд-во Томского Государственного университета.
9. Baamonde A, Dauge V, Gacel G. (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther., **257**, 767-773.
10. Schiller P.W., Nguyen T.M.-D., Chung N.N. et al. (1990) The International Narcotic Research Conference (INRC)'89, Alan R. Liss, 53-56.
11. Farber J.L., Farmar R. (1973) Biochim. Biophys. Res. Commun., **51**, (3), 626-630.

12. Шитов Г.Д., Рапопорт Э.А., Казарян В.А. (1984) Пат.физиол. exper. тер., N4, 36-40.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr H.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275
14. Miller D.G., Mallov S. (1977) Pharm. Biochem. Behav., **7**, 139-145.
15. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Ревинская Ю.Г., Лишманов Ю.Б. (1998) Российский Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова, **84**(8), 791-797.
16. Л.Н. Маслов, Н.В. Нарыжная, Н.Л. Барбараш, Ю.Б. Лишманов (1997) Российский Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова, **83**(3), 43-50.
17. Chien K.R., Reeves J.P., Buja L.M. et al. (1981) Circ. Res., **48**, 711-719.
18. Rude R.E., Rubin H.S., Stone M.J. et al. (1980) Am. J. Med., **68**, 405-413.
19. Мальшев В.В., Трещук Л.И., Харитончик Е.Г. (1986) Архив патологии, **6**, 20-23.
20. Панин Л.Е. (1983) Биохимические механизмы стресса. Новосибирск, Наука.
21. Тенперман Дж., Тенперман Х. (1989) Физиология обмена веществ и эндокринной системы. М., Наука.
22. Sudgen P.N. (1985) Adv. Myocardiol. **5**, 105-121.
23. Якушев В.С., Куприна В.И., Белоконь Л.Е. и др. (1990) Вопр. мед. химии, **36** (1), 19-23.
24. Меерсон Ф.З. (1984) Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М., Медицина.
25. Лишманов Ю.Б., Кондратьев Б.Ю. (1995) Российский Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. **81**, (5), 77-85.

Поступила 03.10.99.

# **PROTEIN SYNTHESIS IN HEART MUSCLE AND THE CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF $\mu$ -OPIOID RECEPTOR LIGANDS AT IMMOBILIZATION STRESS**

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

Laboratory of Experimental Cardiology, Tomsk Institute of 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

Immobilization stress leads to the increase of  $^{99m}\text{Tc}$ -pyrophosphate accumulation in the heart that points to the cardiomyocyte damage. The stress-reaction was accompanied by a decrease of protein synthesis rate in the heart muscle and immunoreactive insulin level in blood plasma and increase of blood plasma cortisol and aldosterone. Pretreatment with agonists  $\mu$ -opioid receptors DALDA and DAGO (0,1 mg/kg intraperitoneally (i.p.) twice during stress) completely prevented the stress-induction decrease of myocardial protein synthesis rate, heart damage and hormonal imbalance. Cycloheximide administration (0,3 mg/kg i.p.) increased rats myocardial membrane injury during immobilization and reduced cardioprotective effect of DALDA.

**Key words:** stress, myocardial protein synthesis, enkephalins, hormones.