

Влияние β -адреноблокаторов на рост кардиомиоцитов в культуре ткани сердца

В.А. Цырлин², Е.В. Лопатина², В.А. Пенный¹

²ФГУ НИИ кардиологии им. В.А.Алмазова, Санкт-Петербург.

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург.

Резюме

С помощью метода органотипической культуры ткани исследовали действие атенолола и метопролола на рост эксплантатов ткани сердца 10-12 – дневных куриных эмбрионов. При введении в питательную среду атенолола в концентрации 10^{-10} М наблюдается незначительное (на 20%) угнетение роста эксплантатов ткани сердца. Атенолол в концентрации 10^{-8} М угнетает рост клеток ткани сердца на 15%. В то же время атенолол в концентрациях 10^{-6} М и 10^{-4} М стимулирует рост эксплантатов ткани сердца на 23% и 40% соответственно. Метопролол угнетает рост эксплантатов во всех исследованных концентрациях (от 10^{-12} М до 10^{-4} М).

В концентрации 10^{-12} М норадреналин усиливает рост эксплантатов ткани сердца. В то же время как атенолол, так и метопролол во всех используемых концентрациях препятствуют способности норадреналина усиливать рост эксплантатов ткани сердца. Проведенный анализ позволил предположить, что влияние норадреналина на рост эксплантатов ткани сердца обусловлено активацией β_1 -адренорецепторов.

Ключевые слова: эксплантаты ткани сердца, куриные эмбрионы, β_1 -адреноблокаторы, атенолол, метопролол, норадреналин, культура ткани.

Effects of β -adrenergic blockers on the growth of explantat of cardiac tissue

V. A. Tsyrlin², E. V. Lopatina², V. A. Penney¹

²V. A. Almazov Research Institute of Cardiology.

¹Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences.

Resume

The method of organotypical cell culture was used. The long-term cell culture of cardiac embryonic tissue of 10-12-days old chicken was investigated. The effects of β_1 -adrenergic blockers (atenolol, metoprolol) and noradrenaline on the growth of explantat cardiac tissue were measured quantitatively. It was found that β_1 -adrenergic blocker atenolol in 10^{-6} M and 10^{-4} M concentration stimulated growth of cardiac tissue on 23% and 40% correspondently. Atenolol in 10^{-8} M concentration, contrary, depressed growth of explantat. Metoprolol (10^{-12} – 10^{-4} M) inhibited the growth of explantat cardiac tissue.

Noradrenaline (10^{-12} M) stimulated growth of explantat cardiac tissue. However the joint action of noradrenaline (10^{-12} M) and metoprolol or atenolol did not influence on growth explantat cardiac tissue. These results suggest that cardiac tissue stimulating effect of noradrenaline mediated through activation of β_1 -adrenergic receptors.

Key words: explantat of cardiac tissue, noradrenaline, atenolol, metoprolol, β_1 -adrenergic receptors, cell culture.

Хорошо известно, что реализация эффектов медиаторов симпатической нервной системы норадреналина и адреналина осуществляется через α и β -адренорецепторы. Локализация и количественное распределение адренорецепторов определяют реакцию тканей на адреномиметические вещества [4, 5]. В сосудах кожи, почек и кишечника, сфинктерах желудочно-кишечного тракта, трабекулах селезенки преобладают α -адренорецепторы. В сердце, мышцах бронхов, сосудах скелетных мышц в основном локализованы β -адренорецепторы, которые разделяются на β_1 и β_2 -адренорецепторы. Во многих тканях α - и β -адренорецепторы сосуществуют. В сердце человека и некоторых животных наряду с β_1 -адренорецепторами экспрессируются β_2 -адренорецепторы [5, 7].

Норадреналин (НА) и адреналин обладают способностью не только сужать сосуды, усиливать работу сердца, но и активировать аэробный гликолиз и трофические процессы в миокарде и сосудах [6] и, в частности, вызывать гипертрофию кардиомиоцитов. Однако механизм реализации трофотропного эффекта катехоламинов в отношении сердечной мышцы не установлен.

В клинической практике широкое распространение находят препараты, избирательно блокирующие β_1 -адренорецепторы, в частности атенолол и метопролол. Одной из характерных особенностей этих соединений является отсутствие у них симпатомиметических свойств [2, 3]. β -адреноблокаторы без симпатомиметической активности способны влиять не только на частоту и силу сердечных сокращений, но и вызывать регрессию гипер-

трофии миокарда. Однако причины этих свойств β -адреноблокаторов не установлены.

Необходимо отметить, что одним из способов изучения механизма трофотропного эффекта лекарственных веществ является исследование их действия в культуре ткани. Поэтому целью настоящей работы был анализ действия кардиоселективных β_1 -адреноблокаторов атенолола и метопролола на рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов в органотипической культуре.

Методика

В работе применяли метод органотипической культуры ткани. В экспериментах было использовано 900 эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов, культивируемых в течение 3 суток на подложках из коллагена в чашках Петри при $36,5^\circ\text{C}$ в CO_2 инкубаторе (Sanyo) [1]. Питательная среда содержала 45% раствора Хенкса, 40% среды Игла с добавлением инсулина (0.5 ед./мл), глюкозы (0.6%), glutаминна (2мМ), гентомицина, 5% куриного эмбрионального экстракта и 10% фетальной сыворотки коровы. В части экспериментов осуществляли окрашивание препаратов гематоксилин-эозином, в этом случае культивирование эксплантатов осуществляли на покровных стеклах с подложками из коллагена, помещенных в чашки Петри.

Селективные β_1 -адреноблокаторы атенолол и метопролол вводили в питательную среду в диапазоне концентраций от 10^{-4} М до 10^{-10} М и от 10^{-4} М до 10^{-12} М, соответственно. НА добавляли в культуральную среду в концентрации 10^{-12} М. В качестве контроля, использовали эксплантаты, культивируемые только в условиях питательной среды. В работе использовали атенолол, и НА фирмы "Sigma" (США), метопролол фирмы «Leiras Hassle» (Швеция). Рост эксплантатов в культуре ткани контролировали на витальных препаратах с помощью фазово-контрастного микроскопа, а также на фиксированных препаратах. Для визуального контроля использовали микротеленасадку для микроскопа (серия 10, МТН-13 "Альфа-Телеком", Россия). Количественную оценку роста эксплантатов осуществляли с помощью пакета программ PhotoM 1.2. Интенсивность роста эксплантатов оценивали по величине индекса площади (ИП), который рассчитывали как отношение площади всего эксплантата, включая периферическую зону роста, к исходной площади фрагмента ткани (т.е. площади центральной зоны). За условную единицу площади принимали квадрат окуляр-сетки микроскопа (сторона квадрата при увеличении $3,5 \times 10$ равнялась 150 мкм). Достоверность различий индекса площади контрольных и экспериментальных эксплантатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Значения выражали в процентах, контрольное значение индекса площади принимали за 100%.

Результаты исследования

На рис.1 представлена микрофотография эксплантата ткани сердца 10-дневного куриного эмбриона. Через три суток культивирования эксплантатов ткани сердца отчетливо выделяется две зоны – центральная и периферическая. Центральная зона образована плотно расположенными немигрирующими кардиомиоцитами

Рис.1. Микрофотография эксплантата ткани сердца 10-дневного куриного эмбриона 3-и сутки культивирования (ув. $\times 100$).
Окраска гематоксилин-эозином.

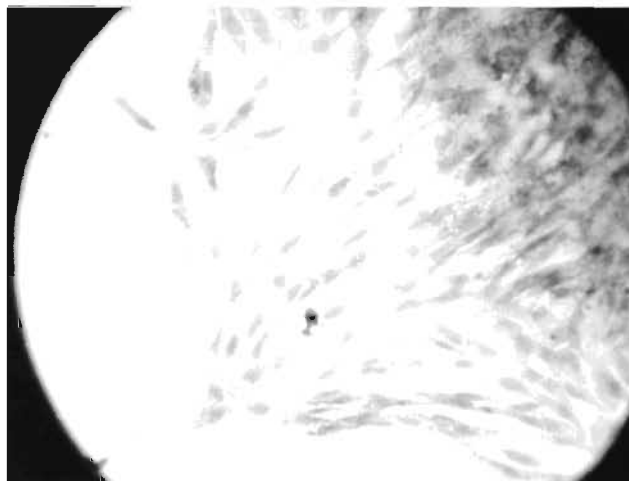


Рис. 2. Влияние атенолола на рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов (3-е суток культивирования).

По оси абсцисс – концентрация, М; По оси ординат – индекс площади эксплантатов (ИП, %). Звездочка – достоверные различия относительно контрольных эксплантатов, $p < 0.05$.

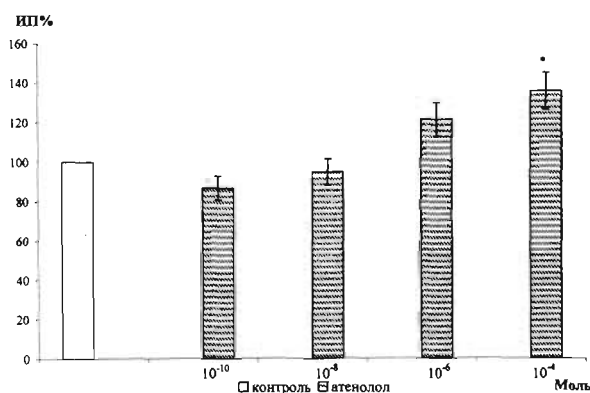


Рис.3. Микрофотография зоны роста эксплантата ткани сердца после 3-х суток культивирования в присутствии атенолола (10^{-4} М) (ув. $\times 200$).
Окраска гематоксилин-эозином.

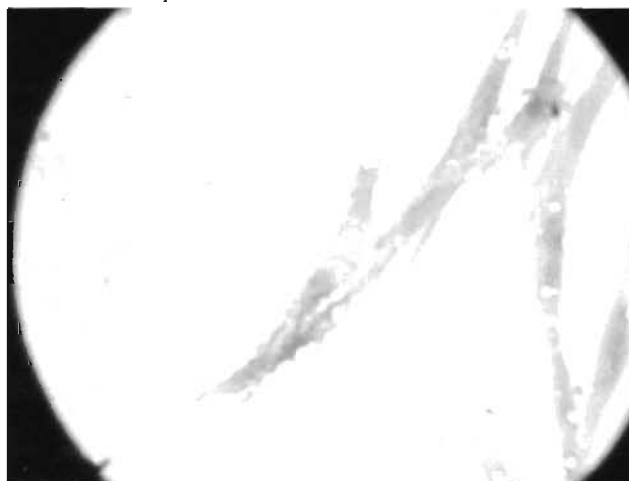


Рис. 4. Влияние норадреналина (10^{-12} М) и блокатора β_1 -адренорецепторов атенолола (10^{-4} М) на рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов. Звездочка – достоверные различия относительно контрольных эксплантатов, $p < 0.05$.

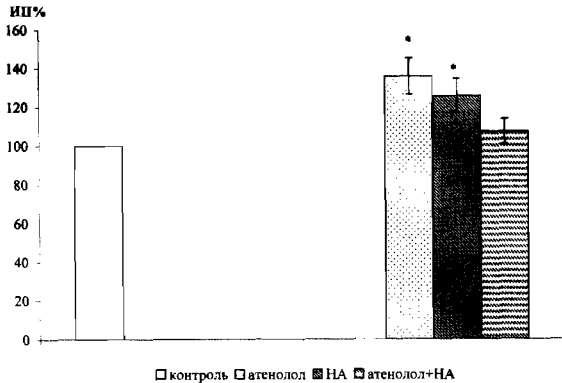


Рис. 5. Изменение индекса площади эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов при добавлении в питательную среду метопролола. По оси абсцисс – концентрация, М; По оси ординат – индекс площади эксплантатов (ИП, %). Звездочка – достоверные различия относительно контрольных эксплантатов, $p < 0.05$.

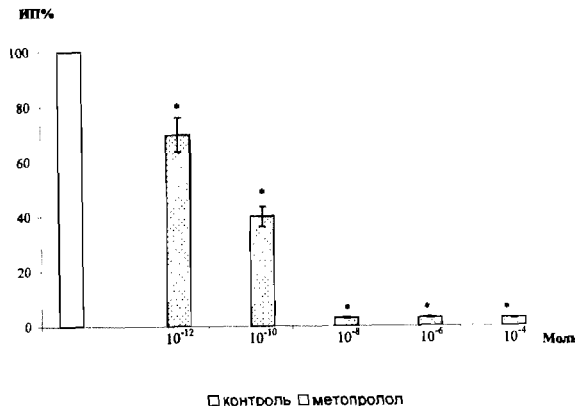
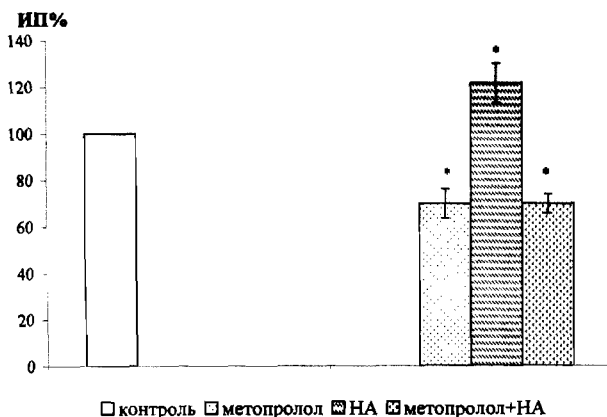


Рис. 6. Влияние норадреналина (10^{-12} М) на фоне метопролола (10^{-12} М) на рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов.



и фибробластами, периферическая зона (зона роста) представлена мигрирующими и пролиферирующими кардиомиоцитами, а также некоторым количеством фибробластов. В целом, зона роста на 96% представлена кардиомиоцитами, представляющими собой многоядерные полиплоидные клетки веретенообразной формы с поперечной исчерченностью. Между собой клетки образуют плотные контакты. В части экспериментов регистрировалась их спонтанная сократительная активность.

При введении в питательную среду атенолола в концентрации 10^{-10} М наблюдали незначительное угнетение роста эксплантатов ткани сердца (рис.2), ИП составил 80% от контрольного значения. Атенолол в концентрации 10^{-8} М угнетал рост клеток ткани сердца на 15%. Обнаружено, что в концентрациях 10^{-6} М и 10^{-4} М атенолол достоверно стимулировал рост эксплантатов ткани сердца 10-12 дневных куриных эмбрионов на 23% и 40% соответственно. Зона роста была представлена кардиомиоцитами и небольшим количеством фибробластов (рис.3).

Влияние НА на рост эксплантатов ткани сердца 10-12 дневных куриных эмбрионов исследовано нами ранее [1]. НА в концентрации 10^{-12} М достоверно стимулировал рост эксплантатов ткани сердца на 25%.

При культивировании эксплантатов ткани сердца 10-12 дневных куриных эмбрионов в питательной среде, содержащей атенолол (10^{-4} М) и НА (10^{-12} М), стимулирующие эффекты обоих веществ отсутствовали. Данные экспериментов не отличались от контрольных (рис. 4).

При введении в питательную среду метопролола в концентрациях 10^{-4} , 10^{-6} и 10^{-8} М обнаружено полное угнетение процесса пролиферации клеток эксплантатов ткани сердца. При введении в культуральную среду метопролола в концентрации 10^{-10} М наблюдали достоверное ингибирование роста эксплантатов ткани сердца. ИП в этом случае составил всего 40% от контрольного значения. Метопролол в концентрации 10^{-12} М также достоверно угнетал рост эксплантатов ткани сердца, ИП был ниже контрольного значения на 30% (рис.5).

Исследование совместного действия НА (10^{-12} М) и метопролола (10^{-12} М) (рис. 6) позволило обнаружить, что даже в этой дозе метопролол полностью устранял стимулирующее действие НА по отношению к клеткам ткани сердца. Величина ИП экспериментальных эксплантатов не отличалась от его значения, рассчитанного в экспериментах с исследованием действия одного метопролола в концентрации 10^{-12} М.

Обсуждение

Известно, что атенолол и метопролол, являясь селективными β_1 -адреноблокаторами, имеют определенные отличия. Селективность атенолола уменьшается с повышением дозы и препарат относится к гидрофильным соединениям. В то же время метопролол относится к липофильным соединениям. Фактор липофильности определяет их проникновение через тканевые барьеры.

В экспериментах с использованием метода органо-типической культуры ткани обнаружено, что атенолол в достаточно высокой концентрации (10^{-4} М), подобно НА, стимулирует рост эксплантатов ткани сердца 10-12 дневных куриных эмбрионов. Необходимо отметить,

что эта концентрация атенолола в 3 раза выше, чем концентрация НА, необходимая для усиления трофических процессов в аналогичных экспериментальных условиях [1]. Трофические и нейротрофические свойства НА реализуются благодаря активации адренорецепторов [6]. По литературным данным β_1 -адренорецепторы посредством регуляторных Gs-белков связаны с аденилатциклазой, локализованной в мембране эффекторных клеток. Этот фермент обеспечивает синтез циклического 3',5'-аденозинмонофосфата (цАМФ). цАМФ, в свою очередь, активирует протеинкиназы. При вовлеченности в реакцию Gi-белков (при активации α_2 -адренорецепторов) наблюдается ингибирование синтеза цАМФ, при участии Gs-белков, напротив, происходит стимуляция синтетических процессов.

Обнаруженное нами стимулирующее влияние атенолола в высоких концентрациях на рост ткани сердца 10-12 дневных куриных эмбрионов, по-видимому, обусловлено его непосредственным действием на β_1 -адренорецепторы, связанные с Gs-белками и увеличением уровня цАМФ клеток сердечной мышцы.

Проведенные исследования позволили выявить, что метопролол обладает выраженной способностью к угнетению процесса пролиферации клеток сердечной ткани 10-12 дневных куриных эмбрионов во всех исследуемых концентрациях от 10^{-12} М до 10^{-4} М. Эти результаты также подтвердили наше предположение о том, что трофическое действие НА по отношению к клеткам сердечной ткани реализуется через активацию адренорецепторов [1].

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 04-04-49859 и «Фонда содействия отечественной науке».

Литература

1. Лопатина Е.В., Пеннийнен В.А., Зайка А.А. Исследования участия Na^+ , K^+ -АТФазы в регуляции роста эксплантов ткани сердца в органотипической культуре. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2005; 140 (8): 150-153.
2. Darmansjah I., Wong E., Setiawati A. et al., Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of controlled release (CR/ZOK) metoprolol in healthy Oriental subjects: a comparison with conventional formulations of metoprolol and atenolol. J. Clin. Pharmacol., 1990; 30: 39-45.
3. Haria M., Plosker G.L., Markham A. Felodipine/metoprolol: a review of the fixed dose controlled release formulation in the management of essential hypertension. Drugs, 2000; 59 (1): 141-157.
4. Schaeffers R.F., Nuernberger J., Herrmann B. et al. Adrenoceptors mediating the cardiovascular and metabolic effects of alpha-methylnoradrenaline in man. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1999; (289): 918-925.
5. Schaeffers R.F., Nuernberger J., Wenzel R.R., Philipp T. Characterization of adrenoceptors mediating cardiovascular and in vivo effects of alpha-methyl-noradrenaline (AMN) in humans. Naunin-Schmiedel-berg's Arch Pharmacol., 1997; (356): 52.
6. Wallin B.G., Sundlof G., Stromgren E., Aberg H. Sympathetic outflow to muscles during treatment of hypertension with metoprolol. Hypertension, 1984; (6): 557-562.
7. Weber F., Brodde O.E., Anlauf M., Bock K.D. Sub-classification of human beta-adrenergic receptors mediating renin-release. Clin. Exp.Hypertens., 1983; (5): 225-238.

8