

Фармакологическая регуляция роста кардиомиоцитов в культуре ткани

Е.В. Лопатина, Л.А. Геворкова, Э.В. Кулешова, В.А. Пенниайнен¹, В.А. Цырлин

Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова;

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

Резюме

В работе изучалось влияние норадреналина, бета-адреноблокаторов метопролола и атенолола, блокаторов ангиотензин-превращающего фермента зофеноприла и эналаприла и блокатора ангиотензиновых рецепторов I типа ирбесартана на рост кардиомиоцитов в органотипической культуре ткани 10–12-дневных куриных эмбрионов и новорожденных крыс. Показано, что стимулирующий эффект норадреналина предотвращается блокаторами адренорецепторов. Зофеноприл ингибирует рост кардиомиоцитов в культуре ткани, в то время как эналаприл в используемых концентрациях не оказывает влияния на этот процесс. Блокатор ангиотензиновых рецепторов только в больших концентрациях ингибирует рост кардиомиоцитов, в то время как в малых — его стимулирует.

Ключевые слова: кардиомиоциты, культура ткани, бета-адреноблокаторы, зофеноприл, эналаприл.

Pharmacological regulation of the cardiomyocyte growth in tissue culture

E.V. Lopatina, L.A. Gevorkova, E.V. Kuleshova, V.A. Penniyaynen¹, V.A. Tsyrlin

V.A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre; ¹Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Resume

Norepinephrine, blockers of beta-adrenoreceptors, angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin I receptor blocker were investigated in organotypic tissue culture of cardiomyocytes of 10–12-day-old chicken embryos and newborn rat heart in a wide range of concentrations. The data obtained show that low concentration of norepinephrine led to the cardiomyocyte growth control. The application of beta-adrenoblockers metoprolol and atenolol prevented stimulating effect of norepinephrine. Zofenopril inhibited the growth of cardiomyocytes but enalapril had no effect on this process. The effect of angiotensin I receptor blocker depended on concentration — low concentrations resulted in activation of cardiomyocyte growth; and high concentrations led to the decrease of their growth.

Key words: cardiomyocytes, tissue culture, beta-adrenoblockers, zofenopril, enalapril.

Статья поступила в редакцию: 04.08.08. и принята к печати: 03.09.08.

Ремоделирование миокарда является сложным процессом, включающим гипертрофию кардиомиоцитов и разрастание соединительной ткани, что приводит к изменению конфигурации левого желудочка сердца, расширению его полостей и развитию сердечной недостаточности. Влияют на ремоделирование миокарда как гемодинамические, так и негемодинамические факторы. Среди последних особая роль отводится норадреналину и ангиотензину II. Катехоламины вообще принято называть «гормонами миокардиальной гипертрофии» [6]. Сходным эффектом обладает и ангиотензин II [11]. Именно поэтому в комплекс лекарственных соединений, использующихся для уменьшения ремоделирования сердца [5, 7], входят блокаторы адренорецепторов и системы ренин-ангиотензин. Однако не все соединения, блокирующие бета-адренорецепторы миокарда и препятствующие образованию ангиотензина II или блокирующие ангиотензиновые рецепторы, обладают одинаковым эффектом. С одной стороны, Yamori et al., Motz et al. [7, 12] показали, что метопролол у гипертензивных крыс снижает массу миокарда, не вызывая гипотензивного действия. С другой стороны, убедительных данных в отношении способности атенолола препятствовать ремоделированию миокарда не получено. В гетерогенной группе ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) могут быть выделены отдельные суб-

станции, обладающие более выраженной способностью препятствовать ремоделированию миокарда по сравнению с другими представителями этой группы. В этом отношении одним из наиболее эффективных препаратов является SH-содержащий ингибитор АПФ зофеноприл, который уменьшает гипертрофию миокарда [3] и при раннем назначении существенно улучшает прогноз больных, перенесших инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST.

Можно было высказать предположение, что наличие SH-группы в молекуле зофеноприла (в отличие от карбоксильной в других соединениях) является причиной его инфаркт-лимитирующей способности, однако каптоприл (также имеющий SH-группу в молекуле) этой способностью не обладает.

Одним из подходов к анализу причин различного влияния блокаторов адренорецепторов и ингибиторов АПФ или ангиотензиновых рецепторов на ремоделирование миокарда является изучение действия соединений непосредственно на изолированные кардиомиоциты. С этой целью в наших экспериментах был использован метод органотипического культивирования ткани, который является адекватной моделью для оценки трофических свойств биологически активных веществ и воздействий. Преимуществом органотипической культуры ткани является возможность оценить влияние фарма-

кологических соединений на развитие изолированного клеточного сообщества определенной ткани.

Материалы и методы

В качестве экспериментальных животных использовались 10–12-дневные куриные эмбрионы и 1–3-дневные новорожденные крысы линии *Wistar*. Объектами исследования являлись культивируемые эксплантаты ткани сердца. Для культивирования клеток миокарда использован метод органотипической культуры ткани сердца и последующие морфометрические методы исследования.

Препаровка и выделение ткани сердца осуществлялась под бинокулярным стереоскопическим микроскопом МБС-1 с модификацией, позволяющей в два раза увеличивать фокусное расстояние (140 мм) при сохранении всех рабочих характеристик. В качестве субстрата, на котором растут и развиваются эксплантаты ткани сердца, использован коллаген, полученный из сухожилий хвостов крыс. Части сердечной ткани помещались в стерильные чашку Петри и культивировались в питательной среде следующего состава: 40% раствора Хенкса; 15% фетальной сыворотки крови теленка; 40% — среды Игла; 5% — выделенного экстракта с добавлением глюкозы (0,6%), инсулина (0,5 ед/мл), гентамицина (100 ед/мл), глутамина (0,35%) при рН 7,2.

Через 3-е суток культивирования чашки Петри извлекали из инкубатора и исследовали. Рост эксплантатов ткани сердца оценивался прижизненно с помощью светового микроскопа, а также на препаратах. Спонтанную сократительную активность кардиомиоцитов регистрировали с помощью фотосъемки.

Каждая чашка Петри содержала по 20–25 эксплантатов, как в опытах с куриными эмбрионами, так и в опытах с новорожденными крысятами.

Для количественной оценки влияния исследуемых веществ применяли морфометрический метод. Интенсивность роста эксплантатов оценивали по величине индекса площади (ИП), который рассчитывали как отношение площади всего эксплантата, включая периферическую зону роста, к площади центральной зоны. За условную единицу площади принимали квадрат окуляра-сетки микроскопа, сторона квадрата при увеличении $3,5 \times 10$ равнялась 150 мкм.

Для удобства соотнесения результатов, полученных в разных сериях эксперимента, значения ИП выражали в условных единицах, контрольное значение ИП принимали за 100%.

В каждой экспериментальной серии за “n” принимали количество эксплантатов, развивающихся в культуральной среде. Статистическую обработку производили с использованием t-критерия Стьюдента и пакета программ «Microsoft Excell».

Исследуемые вещества добавляли в экспериментальные чашки в определенных концентрациях. За контрольные принимали эксплантаты, культивируемые только в условиях питательной среды.

Для визуализации эксплантатов использовали микротеленасадку для микроскопа (серия 10, МТН–13 «Альфа-Телеком», Россия). Количественную оценку роста эксплантатов ткани сердца 10–12-дневных куриных эмбрионов и новорожденных крысят осуществляли с помощью пакета программ PhotoM 1.2.

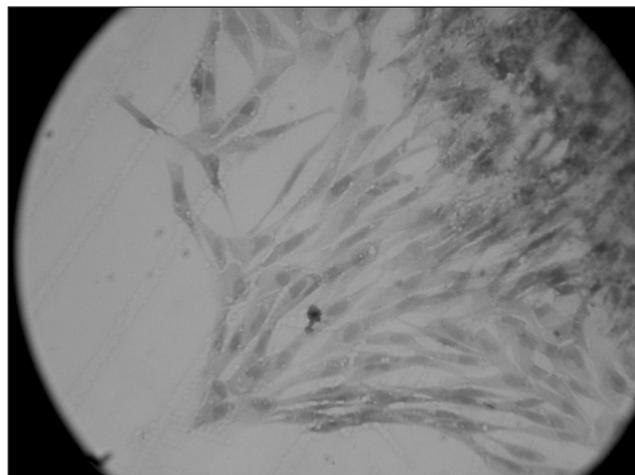
Для проведения цитологических исследований эксплантаты ткани сердца выращивали на стеклах, помещенных в чашки Петри. При приготовлении чашек Петри на дно чашек помещали разрезанное предметное стекло, затем всю поверхность дна вместе со стеклом заливали раствором коллагена. Наличие ровного слоя коллагена обеспечивает нормальное прикрепление эксплантатов во время культивирования. После 3-х суток культивирования в CO_2 инкубаторе стекла с прикрепленными эксплантатами извлекали из чашек Петри и фиксировали в течение десяти минут в метаноле. Затем стекла с зафиксированным материалом высушивали в ламинаре, далее промывали дистиллированной водой с рН 6,8–7,2 и высушивали на воздухе. В качестве красителей использовали метиленовый синий и гематоксилин-эозин.

В работе исследовали следующие вещества: норадrenalин, атенолол (“Sigma”), метопролол (“Leiras Hassle”, Швеция), ирбесартан (“Bristol-Myers Squibb”), зофеноприл (“Berlin-Chemie AG”), эналаприл (“Nemopharm”) в широком диапазоне концентраций.

Результаты

В 1-е сутки культивирования происходило расплывание эксплантатов ткани сердца на коллагеновой подложке. От края эксплантата происходило выселение пролиферирующих и мигрирующих клеток. На 3-и сутки (рис.1) на препаратах можно выделить две зоны — центральную и периферическую. Центральная зона образована плотно расположенными клетками, периферическая зона представлена мигрирующими и пролиферирующими кардиомиоцитами, а также некоторым количеством фибробластов. В целом, зона роста на 90–96% представлена кардиомиоцитами, представляющей собой многоядерные полиплоидные клетки веретенообразной формы с поперечной исчерченностью. В части экспериментов регистрировалась их спонтанная сократительная активность. Между собой клетки образуют плотные контакты. Ядра клеток окрашены в разные оттенки синего цвета, цитоплазма розовая. В цитоплазме содержится небольшое количество компартментализованных пузырьков.

Рисунок 1. Микрофотография эксплантата ткани сердца 10-дневного куриного эмбриона (ув. $\times 100$)



Влияние норадреналина и β_1 -адреноблокаторов на рост кардиомиоцитов в культуре ткани сердца 10–12-дневных куриных эмбрионов и новорожденных крысят

В первой серии экспериментов исследовали влияние норадреналина (НА) (в диапазоне концентраций от 10^{-12} М до 10^{-9} М) на рост эксплантатов ткани сердца куриного эмбриона и крысы. Влияние препарата на рост эксплантатов, т.е. изменение ИП эксплантатов по сравнению с контрольными значениями ИП, оценивали через трое суток после введения НА в питательную среду.

После введения в питательную среду НА в концентрации 10^{-12} М ИП эксплантатов куриного эмбриона был выше контрольного значения на $18 \pm 2,5\%$ ($n = 25$). Однако НА в концентрации 10^{-9} М вызывал уменьшение роста эксплантатов, при этом ИП снижался на $31 \pm 2\%$ ($n = 27$, $p < 0,05$) по отношению к контролю.

В эксплантатах миокарда крысы НА в концентрациях 10^{-6} – 10^{-10} М также ингибировал их рост, но в концентрации 10^{-11} М стимулировал рост ткани сердца на $34 \pm 4\%$ ($n = 27$, $p < 0,05$).

Для того чтобы проверить, связано ли обнаруженное стимулирующее действие НА с активацией β_1 -адренорецепторов, в следующей серии изучали влияние НА на рост исследуемых объектов в условиях блокады β_1 -адренорецепторов. Блокаду β_1 -адренорецепторов в экспериментах на куриных эмбрионах осуществляли при помощи атенолола и метопролола, в опытах с эксплантатами новорожденных крысят применяли атенолол.

Метопролол в концентрации 10^{-12} М достоверно угнетал рост клеток сердечной ткани 10–12-дневных куриных эмбрионов. ИП был достоверно ниже контрольного значения на 30%. При этом метопролол полностью устранял стимулирующее действие НА по отношению к клеткам ткани сердца. Величина ИП эксплантатов ткани сердца 10–12-дневных куриных эмбрионов после совместного введения соединений в питательную среду не отличалась от значения ИП, рассчитанного в экспериментах с исследованием действия одного β_1 -адреноблокатора.

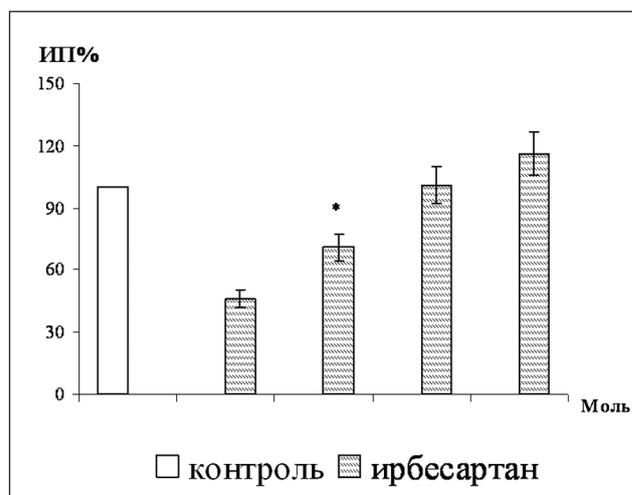
При введении в питательную среду атенолола в концентрации 10^{-10} М наблюдалось незначительное угнетение роста эксплантатов ткани сердца как куриного эмбриона, так и сердца крысы. Атенолол в концентрации 10^{-8} М угнетал рост клеток ткани сердца на 15–18%. В концентрациях 10^{-6} М и 10^{-4} М атенолол, напротив, достоверно стимулировал рост эксплантатов ткани сердца 10–12-дневных куриных эмбрионов [1] и новорожденных крысят (рис.2). Однако при совместном введении в питательную среду атенолола в концентрациях, вызывающих рост клеток эксплантатов ткани сердца, и норадреналина как в опытах с эксплантатами куриного эмбриона [1], так и сердца крысы полностью снимался стимулирующий эффект НА, и ИП соответствовал контрольным значениям.

Влияние блокаторов ренин-ангиотензиновой системы и ирбесартана на рост кардиомиоцитов в культуре ткани сердца 10–12-дневных куриных эмбрионов

Ирбесартан в концентрации 10^{-10} незначительно стимулировал рост ткани миокарда куриного эмбриона, в концентрации 10^{-8} не оказывал влияния на ИП, а в концентрациях 10^{-4} и 10^{-6} угнетал рост эксплантатов (рис.

3). При анализе влияния блокаторов АПФ отмечалось различие в действии двух препаратов. Как следует из табл. 1, эналаприл только в больших концентрациях (близких к токсическим, так как в концентрации 10^{-5} М вызывал разрушение и «лизис» клеток) угнетал рост кардиомиоцитов. В меньших концентрациях препарат не влиял на этот процесс. В то же время зофеноприл (в экспериментах с тканью сердца куриного эмбриона) уже в минимальных концентрациях угнетал рост кардиомиоцитов (табл.1).

Рисунок 3. Изменение индекса площади эксплантатов ткани сердца 10–12-дневных куриных эмбрионов при добавлении в питательную среду ирбесартана



По оси абсцисс — концентрация, М; по оси ординат — индекс площади эксплантатов (ИП, %).

* — $p < 0,05$.

Таблица 1

ВЛИЯНИЕ ЭНАЛАПРИЛА И ЗОФЕНОПРИЛА НА РОСТ ЭКСПЛАНТАТОВ МИОКАРДА КУРИНОГО ЭМБРИОНА (ИНДЕКС ПЛОЩАДИ В % ОТ ИСХОДНОГО, ПРИНЯТОГО ЗА 100%)

Концентрация вещества (М)	Эналаприл	Зофеноприл
10^{-9}	92,8	75,89 *
10^{-7}	106,34	85,44 *
10^{-5}	68,9 *	82,27*

* — $p < 0,05$

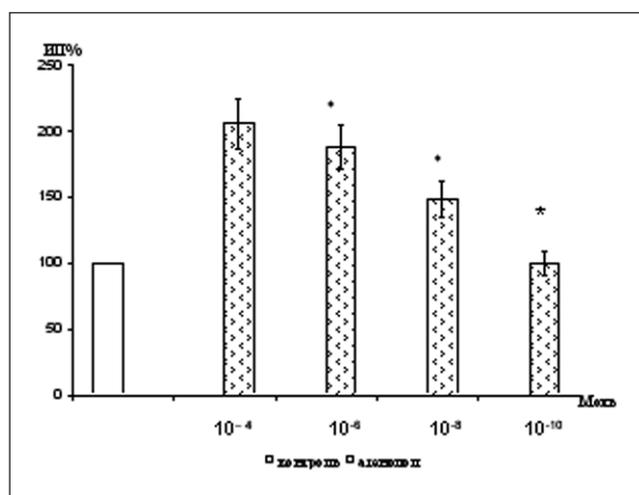
Обсуждение

Понятие структурного ремоделирования включает в себя различные варианты геометрии левого желудочка сердца в зависимости от эхокардиографических параметров, а также комплекс изменений на клеточном уровне, который включает развитие фиброза, изменение размеров и ориентации кардиомиоцитов, их гибель посредством некроза и апоптоза, структурные изменения в коронарных сосудах [10]. Все эти изменения определяют функциональное состояние сердца и находят свое отражение в тех патологических последствиях, которые связываются с гипертрофией левого желудочка, — диастолической дисфункции, снижении коронарного резерва, аритмогенности, дальнейшем сердечно-сосудистом ремоделировании.

На кардиомиоцитах присутствует только альфа-1 подтип альфа-адренорецепторов и оба подтипа бета-адренорецепторов. Стимуляция катехоламинами, аналогично гемодинамической нагрузке, запускает развитие в сердце и сосудах анаболических биологических процессов, основным из которых является индукция экспрессии генов, ответственных за развитие гипертрофии [10]. Наши исследования в экспериментах с кардиомиоцитами сердца крыс (так же как и в опытах с сердцами куриных эмбрионов

[1]) подтвердили, что стимулирующее действие НА в концентрации 10^{-12} М на рост кардиомиоцитов связано с активацией β_1 -адренорецепторов. Как метопролол, так и атенолол (даже в концентрациях, вызывающих усиление роста кардиомиоцитов) устранил стимулирующий эффект норадrenalина (рис.2).

Рисунок 2. Влияние атенолола на рост эксплантатов ткани сердца крыс



По оси абсцисс — концентрация, М; по оси ординат — индекс площади эксплантатов ИП, %.

* — $p < 0,05$. Контроль — 100%.

Известно, что зофеноприл, обладающий антиоксидантными свойствами, достоверно улучшает продукцию NO эндотелиальными клетками, замедляет развитие атеросклеротического поражения и подавляет экспрессию адгезивных молекул за счет снижения продуктов перекисного окисления [3–4]. В эксперименте [8] показано, что зофеноприл обладает более выраженным антиатеросклеротическим и антиоксидантным действием и более значимо, чем эналаприл, предупреждает развитие атеросклеротического поражения аорты. При этом вазопротективный эффект достигался при использовании более низких доз зофеноприла, чем эналаприла. Наконец, зофеноприл при раннем назначении существенно улучшает прогноз больных, перенесших инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST. В постинфарктном периоде важной проблемой является предупреждение развития сердечной недостаточности, обусловленной ремоделированием левого желудочка. Однако, очевидно, что антиоксидантные, антиатеросклеротические и кардиопротективные [2] свойства зофеноприла не могут быть причиной его способности предупреждать ремоделирование сердечной мышцы.

Как видно из табл. 1, одной из причин, обуславливающих способность зофеноприла предупреждать ремоделирование миокарда (во всяком случае, задерживать гипертрофию кардиомиоцитов), является способность препарата непосредственно тормозить рост кардиомиоцитов. Причина этой способности препарата не установлена. Можно только высказать предположение, что активация зофеноприлом сарколеммальных и митохондриальных АТФ-чувствительных калиевых (K_{ATP}) каналов [9] лежит в основе не только кардиопротективного эффекта зофеноприла, но и его способности непосредственно задерживать рост кардиомиоцитов.

Литература

1. Цырлин В.А., Лопатина Е.В., Пенниайнен В.А. Влияние β -адреноблокаторов на рост кардиомиоцитов в культуре ткани сердца. Артериальная гипертензия 2006;12(3):248–251.
2. Шляхто Е.В., Цырлин В.А., Сыренский А.В. и др. Протишошемическое действие ингибитора ангиотензин-превращающего фермента зофеноприла при острой ишемии миокарда в эксперименте. Артериальная гипертензия 2006;12(5):31–34.
3. Evangelista S, Manzini S. Antioxidant and cardioprotective properties of the sulphhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor zofenopril. J Int Med Res 2005;33(1):42–54.
4. Frascarelli S., Ghelardoni S., Ronca-Testoni S. et al. Cardioprotective effect of zofenopril in perfused rat heart subjected to ischemia and reperfusion. J Cardiovasc Pharmacol 2004;43:294–299.
5. Gagnon C., Legault F., Gerales P., Tanguay J.F., Lambert C. Diverse effects of Ace inhibitors and angiotensin II receptor antagonists on prevention of cardiac hypertrophy and collagen distribution in spontaneously hypertensive rats. Int J Cardiol 2004;97(3):373–81.
6. Manolis A., Athanasopoulos G., Karatasakis G. et al. Pressor hormone profile during stress in hypertension: does vasopressin interfere with left ventricular hypertrophy? Clin Exp Hypertens 1993;15(3):539–55.
7. Motz W., Ringsgwandl G., Straner B.E. Regression of structural cardiovascular changes by antihypertensive therapy: effects on the heart in SHR. In: Hypertension ed. B. Folkow et al., Molndal, 1985:312–325.
8. de Nigris F., D'Armiento F.P., Somma P. et al. Chronic treatment with sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce susceptibility of plasma LDL to in vitro oxidation, formation of oxidation-specific epitopes in the arterial wall, and atherogenesis in apolipoprotein E knockout mice. Int J Cardiol 2001;81(2–3):107–15.
9. Sargent C.A., Sleph P.G., Dzwonczyk S. et al. Cardioprotection in ischemic rat heart with the SH-containing angiotensin-converting enzyme inhibitor zofenopril: possible involvement of the ATP-sensitive potassium channel. J Pharmacol Exp Ther 1992;265:609–618.
10. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. Physiol Rev 1999;79(1):215–62.
11. Yamashita C., Hayashi T., Mori T., Tazawa N., Kwak C.J., Nakano D, Sohmiya K., Okada Y., Kitaura Y, Matsumura Y. Angiotensin II receptor blocker reduces oxidative stress and attenuates hypoxia-induced left ventricular remodeling in apolipoprotein E-knockout mice. Hypertens Res 2007;30(12):1219–30.
12. Yamori Y., Tarazi R.C., Ooshima A. Effect of β -receptor-blocking agents on cardiovascular structural changes in spontaneously and noradrenaline-induced hypertension in rats. Clin Sci 1980;59:457–460.