

УДК 616.12

Р. Г. БОРОЯН

К МЕХАНИЗМАМ ДЕЙСТВИЯ ПРОСТАГЛАНДИНОВ  
НА МИОКАРД

В опытах на культивируемых клетках и трансплантатах миокарда куриных эмбрионов выявлено положительное инотропное и хронотропное действие простагландинов  $E_1$ ,  $E_2$  и  $A_1$ . ПГФ $_{2\alpha}$  оказался неактивным. Анализ механизмов действия ПГ на эмбриональный миокард показал, что ПГ действуют на специфические рецепторы, отличающиеся от адренорецепторов. Инотропные эффекты ПГ во многом обусловлены повышением притока Са внутрь клетки и возбуждением системы аденилатциклаза—цАМР.

Несмотря на то, что кардиотропные эффекты простагландинов (ПГ), их предшественников и некоторых метаболитов в настоящее время достаточно хорошо известны, многие вопросы, касающиеся механизмов непосредственного действия их на миокард, остаются малоизученными. Выяснение механизмов действия ПГ на функции миокарда во многом осложняется видовыми различиями в их эффектах, что, в свою очередь, предопределяет противоречивость имеющихся данных и некоторых гипотез. Кроме этого, экспериментальный анализ механизмов действия ПГ на миокард с использованием классических фармакологических антагонистов и ингибиторов оказался недостаточным для выяснения путей осуществления кардиостимулирующего действия этих природных биологически активных веществ. С этой целью, очевидно, необходимо прибегнуть к различным методическим подходам, в том числе изучению на клеточном уровне, что даст возможность при оценке выявленных эффектов исключить опосредованные изменения (рефлекторные, гемодинамические, сосудистые и др.) и уточнить механизмы непосредственного влияния ПГ на миофибриллы.

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения механизмов действия ПГЕ $_1$ , ПГЕ $_2$ , ПГА $_1$  и ПГФ $_{2\alpha}$  на сократительную функцию культивируемого миокарда куриных эмбрионов различного срока развития.

## Методика исследования

В экспериментах использовано сердце 3-дневных (симпатически не иннервированное) и желудочки сердца 7-дневных (симпатически иннервированное) [12] куриных эмбрионов. Культивирование диспергированных клеток миокарда (для одного эксперимента использовался объединенный материал, полученный из 5 сердец 3-дневных куриных эмбрионов), полученных методом трипсинизации (0,25% раствор), и

эксплантатов желудочков сердца 7-дневных эмбрионов осуществляли с использованием питательной среды Игла [8] (рН 7,2—7,4) с добавлением к ней лошадиной сыворотки (15%) и  $\alpha$ -глутамин (0,292 мг/мл). В опыт отбирались лишь камеры с хорошо фиксированными и ауторитмически сокращающимися эксплантатами и монослоем изолированных клеток миокарда. Регистрацию параметров сокращения осуществляли фотоэлектрическим методом [2], однако в отличие от обычно используемых установок [2] усиление полезного сигнала с ФЭУ-35 осуществлялось с помощью усилителя И-37 (СССР) с регистрацией не на электромагнитных, а на магнитоэлектрических гальванометрах типа Н-3020-5 (СССР), что обеспечивает повышение чувствительности и получение значительно более полной информации. Растворы веществ вводились в камеры в объеме 0,1 мл (рабочий объем камеры—2 мл), причем все вещества растворялись предварительно общепринятыми для каждого из них способами, а затем объем раствора доводился до 5 мл путем добавления питательной среды, используемой для культивирования. рН конечных растворов контролировалась в пределах 7,2—7,4; концентрации выражались как конечные молярные концентрации в камере культивирования. В случаях последовательного введения двух веществ в одном и том же опыте второе вещество вводилось с учетом эффектов предыдущего. Введение контрольных растворов (0,1 мл) не вызывало изменений в параметрах сокращения тканей миокарда. Изучаемые параметры (амплитуда и частота сокращения) рассчитывались как средние величины до введения веществ, через 1, 3, 5 (или через 0,5—5) мин после введения вещества, а изменения параметров сравнивались с исходными показателями и выражались в %. Результаты экспериментов обрабатывали статистически, используя критерий *t*. В экспериментах использованы простагландины  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $A_1$ ,  $F_{2\alpha}$  (The Upjohn Co., США), аденозин-3'5' циклический фосфат (цАМФ) (Calbiochem, Швейцария), пропранолол (ICI Ltd., Англия), полифлоретинфосфат (PPP стандарт 4, Leo 101 к натриевая соль; AB Leo, Helsingborg, Швеция), этиленгликоль-бис ( $\beta$ -аминоэтил)  $N,N'$ -тетраацетат (ЭГТА) (Sigma, США).

### Результаты

В опытах на диспергированных культивируемых клетках миокарда 3-дневных эмбрионов ПГЕ<sub>1</sub> проявил отчетливое положительное инотропное действие в концентрации  $2 \times 10^{-6}$  М; ПГЕ<sub>2</sub> и ПГФ<sub>2 $\alpha$</sub>  не вызывали статистически значимых изменений амплитуды и частоты сокращений (в первом случае статистическая недостоверность обусловлена большой вариабельностью эффектов, во втором — незначительной разностью между сравниваемыми величинами). В опытах на эксплантатах миокарда 7-дневных куриных эмбрионов ПГЕ<sub>1</sub>, ПГЕ<sub>2</sub> и ПГА<sub>1</sub> проявляют выраженное положительное инотропное действие ( $E_1 > E_2 > A_1$ ) в концентрациях, не меньших чем  $2 \times 10^{-6}$  М; хронотропные эффекты являются значительно менее отчетливыми. Инотропные эффекты ПГ типа Е возникают сразу после их введения в среду и проявляются в течение

первых 5—8 мин. Инотропные эффекты ПГА<sub>1</sub> развиваются медленно и особенно выражены через 3—5 мин после его введения. ПГФ<sub>2a</sub> во всех сериях экспериментов оказался неактивным.

РРР в конечной концентрации 100 мкг/мл полностью ( $p < 0,001$ ) блокирует инотропные эффекты ПГЕ<sub>1</sub> и ПГЕ<sub>2</sub> в опытах на эксплантатах миокарда. Во многих опытах этой серии ПГЕ<sub>1</sub> на фоне действия РРР оказывал не положительное, а отрицательное инотропное действие. Влияние РРР на хронотропные эффекты ПГ менее заметно.

Увеличение концентрации  $Ca^{2+}$  в среде культивирования в значительной степени ( $p < 0,01$ ) потенцирует инотропные и хронотропные эффекты ПГЕ<sub>1</sub> даже в опытах, в которые были отобраны эксплантаты миокарда, проявившие низкую чувствительность к ПГЕ<sub>1</sub> (рис. 1). Предва-

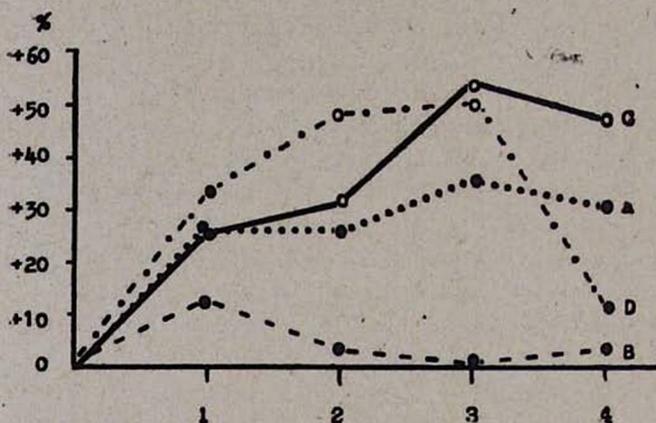


Рис. 1. Влияние изменения концентрации ионов Ca в среде культивирования эксплантатов миокарда 7-дневных куриных эмбрионов на эффекты ПГЕ<sub>1</sub> ( $2 \times 10^{-6}$  М). А—амплитуда, В—частота сокращений после введения ПГЕ<sub>1</sub> при нормальной концентрации ионов Ca в среде ( $1,8 \times 10^{-4}$  М  $CaCl_2$ ); С—амплитуда, Д—частота сокращений после введения ПГЕ<sub>1</sub> при увеличенной концентрации ионов Ca в среде ( $2,25 \times 10^{-4}$  М  $CaCl_2$ ). 1, 2, 3, 4—соответственно через 0,5, 1, 3 и 5 мин после введения ПГЕ<sub>1</sub>; о— $p < 0,05$ ; ● —  $p > 0,05$ ;  $n = 10$ .

рительное введение в среду культивирования ЭГТА полностью ( $p < 0,001$ ) блокирует инотропные эффекты ПГЕ<sub>1</sub> (рис. 2).

РРР в концентрации, в которой он полностью блокирует стимулирующие эффекты ПГ на эмбриональный миокард, не только не ингибирует, но и статистически достоверно ( $p < 0,01$ ) потенцирует положительные инотропные эффекты адреналина (рис. 3а). В условиях ингибирования  $\beta$ -адренорецепторов пропранололом инотропные и хронотропные эффекты ПГЕ<sub>1</sub> в опытах на эксплантатах миокарда 7-дневных эмбрионов не только не ингибируются, но и в существенной степени ( $p < 0,001$ ) возрастают (рис. 3б). цАМР ни в одной из изученных концентраций ( $3 \times 10^{-6}$  —  $3 \times 10^{-5}$  М и  $15 \times 10^{-5}$  М) не вызывает заметных изменений параметров сокращения эксплантатов эмбрионального

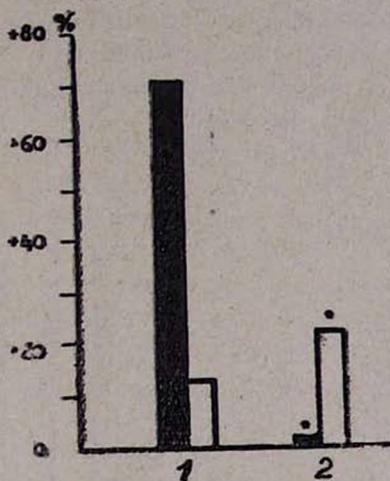


Рис. 2. Влияние ЭГТА ( $1,3 \times 10^{-4} \text{M}$ ) на эффекты ПГЕ<sub>1</sub> ( $2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) в опытах на культивируемых эксплантатах миокарда 7-дневных куриных эмбрионов. 1—через 0,5—5 мин после введения ПГЕ<sub>1</sub>; 2—то же самое, но ПГЕ<sub>1</sub> введен через 5 мин после введения ЭГТА. \* —  $p > 0,05$ ; ■ — амплитуда, □ — частота сокращений;  $n=8$ .

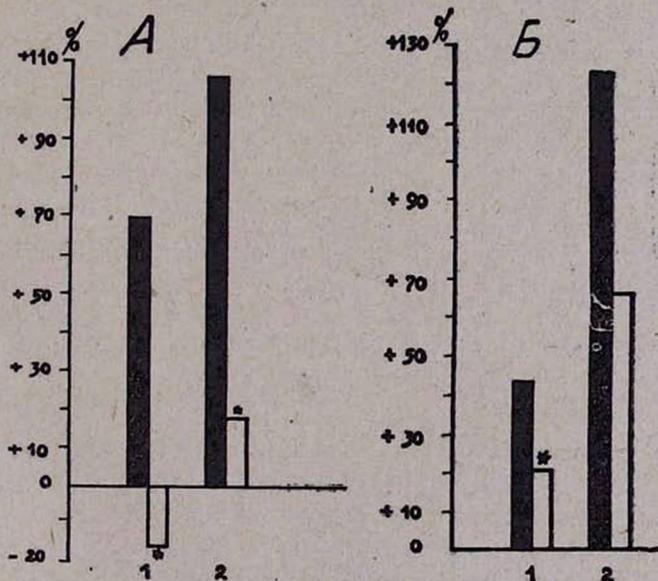


Рис. 3а. Влияние РРР (100 мкг/мл) на эффекты адреналина ( $5,45 \times 10^{-6} \text{M}$ ) в опытах на культивируемых эксплантатах миокарда 7-дневных эмбрионов. 1—через 0,5—5 мин после введения адреналина; 2—то же самое, но адреналин введен через 5 мин после введения РРР. Обозначения те же, что и на рис. 2.

б. Действие пропранолола ( $1 \times 10^{-4}$ ) на эффекты ПГЕ<sub>1</sub> ( $2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) в опытах на культивируемых эксплантатах миокарда 7-дневных куриных эмбрионов. 1—через 0,5—5 мин после введения ПГЕ<sub>1</sub>; 2—то же самое, но ПГЕ<sub>1</sub> введен через 5 мин после введения пропранолола. Обозначения те же, что и на рис. 2.

миокарда, что объясняется весьма низкой способностью цАМФ проходить через клеточные мембраны. Однако ингибирование теофиллином миокардиальной фосфодиэстеразы способствует весьма значительному потенцированию и продлению положительного инотропного (но не хронотропного) действия ПГЕ<sub>1</sub> (рис. 4).

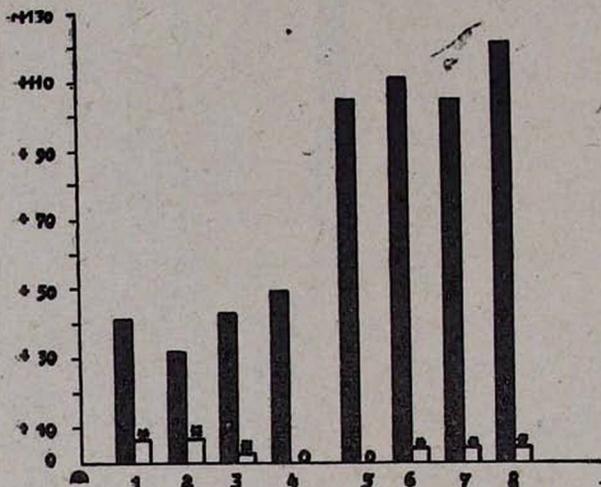


Рис. 4. Потенцирование эффектов ПГЕ<sub>1</sub> ( $2 \times 10^{-6}$  М) теофиллином ( $5 \times 10^{-5}$ ) в опытах на культивируемых эксплантатах миокарда 7-дневных эмбрионов. 1, 2, 3, 4—соответственно через 0,5, 1, 3 и 5 мин после введения ПГЕ<sub>1</sub>; 5, 6, 7, 8—то же самое, но ПГЕ<sub>1</sub> введен через 30 мин после введения теофиллина. Обозначения те же, что и на рис. 2.

### Обсуждение

В опытах на культивируемых диспергированных клетках миокарда симпатически не иннервированных сердец 3-дневных куриных эмбрионов и эксплантатах миокарда симпатически иннервированных сердец 7-дневных куриных эмбрионов ПГЕ<sub>1</sub>, ПГЕ<sub>2</sub> и ПГА<sub>1</sub> (но не ПГФ<sub>2α</sub>) проявляют зависимое от концентрации положительное инотропное и менее выраженное хронотропное влияние, осуществляемое непосредственным действием на миофибриллы. Можно допустить, что рецепторы, чувствительные к простагландинам, функционируют в сердце уже в самые ранние сроки эмбрионального развития, еще до образования симпатической иннервации в нем. Об этом свидетельствует тот факт, что положительное инотропное действие ПГЕ<sub>1</sub> проявляет на диспергированных клетках миокарда 3-дневных эмбрионов, тогда как развитие симпатической иннервации в сердце куриных эмбрионов выявляется в значительно более поздние сроки развития [12]. Тем не менее, этого факта еще недостаточно для того, чтобы исключить осуществление эффектов ПГ через адоренорецепторы, поскольку β-рецепторная активность в сердце куриных эмбрионов проявляется также на самых первых стадиях развития [18, 22], и даже в эти сроки, еще до развития симпати-

ческих нервов, сердце чувствительно и к адреналину, и к норадреналину, и к изопротеренолу. Кроме того, учитывая установленное нами в других сериях экспериментов резкое ингибирование простагландинами действия адреналина и норадреналина на эмбриональный миокард, можно было бы объяснить это именно связыванием ПГ с адренорецепторами. Однако вероятность осуществления кардиостимулирующих эффектов простагландинами через аднергические структуры миокарда крайне мала. Во-первых, в наших экспериментах выявлено, что блокирование  $\beta$ -адренорецепторов пропранололом не только не устраняет инотропные эффекты ПГ, но и в определенной мере даже усиливает их в дозах, при которых он полностью блокирует эффекты адреналина. Во-вторых, РРР, являющийся, по имеющимся данным [9], специфическим ингибитором действия простагландинов, в дозах, полностью ингибирующих эффекты ПГ на миокард, не только не устраняет кардиостимулирующие эффекты адреналина, но и в существенной степени потенцирует их, что в свою очередь может быть косвенным свидетельством гомеостатической роли эндогенных простагландинов. Следует отметить, что и другими исследователями на иных экспериментальных моделях выявлены антагонистические взаимоотношения между простагландинами и катехоламинами [1, 3, 5, 27]. Как и в наших экспериментах на культуре тканей миокарда куриных эмбрионов, в опытах с иными экспериментальными условиями многими исследователями не было выявлено изменений кардиостимулирующих эффектов ПГ при блокировании  $\beta$ -адренорецепторов миокарда [4, 5, 19, 20]. Имеющиеся данные позволяют заключить, что  $\beta$ -адренорецепторы не вовлекаются в процессы кардиостимулирующего действия ПГ. Результаты наших экспериментов, в которых установлено ингибирование кардиостимулирующих эффектов ПГ на миокард под влиянием РРР и, наоборот, выраженное потенцирование эффектов адреналина и норадреналина, позволяют допустить, что ПГ и катехоламины оказывают влияние на миокард через различные типы рецепторов (простагландинчувствительные, блокируемые РРР и не блокируемые  $\beta$ -адреноблокаторами типа пропранолола, и адреночувствительные, не блокируемые РРР и блокируемые  $\beta$ -адреноблокаторами). Между этими двумя типами рецепторов, возможно, существуют сложные взаимоотношения, при которых возбуждение простагландинчувствительных рецепторов сопровождается ингибированием функции адренорецепторов. Возможно, именно этим взаимоотношением частично объясняется механизм осуществления гомеостатической и лимитирующей функции ПГ, высвобождаемых в миокарде в ответ на раздражение симпатического нерва сердца или в ответ на введение экзогенного норадреналина [26]. Более полному выяснению этого вопроса будут способствовать результаты дальнейших исследований и, в частности, исследований по изучению механизмов селективного ингибирования полифлоретинфосфатом действия ПГ. В настоящее время механизмы специфического действия РРР на эффекты ПГ остаются малоизученными.

Результаты опытов по изучению зависимости действия ПГ от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и с использованием хелатирующего агента — ЭГТА, способного к специфическому связыванию  $\text{Ca}^{2+}$  с внешней стороны клеточной мембраны, дают возможность предположить, что кардиостимулирующие эффекты ПГ обусловлены во многом ускорением притока  $\text{Ca}^{2+}$  извне через клеточную мембрану. Свидетельства, находящиеся в соответствии с этим выводом, были получены также и другими исследователями на иных экспериментальных моделях [6, 13, 21, 23]. Возможно, что ускорение вхождения  $\text{Ca}^{2+}$  через клеточную мембрану является пусковым механизмом в кардиостимулирующих эффектах ПГ.

В наших экспериментах экзогенная цАМФ, введенная в среду культивирования ауторитмически сокращающихся эксплантатов миокарда куриных эмбрионов, не проявила даже при сравнительно высоких концентрациях каких-либо эффектов в связи с недостаточной способностью проникать через клеточные мембраны. Однако эффекты ПГЕ<sub>1</sub> значительно потенцируются в условиях ингибирования теофиллином миокардиальной фосфодиэстеразы и вследствие этого повышения уровня эндогенной цАМФ в клетке. Известно, что инотропные эффекты теофиллина и других метилксантинов обусловлены именно ингибированием фосфодиэстеразной активности [25] и накоплением цАМФ в миокарде [15], хотя имеются данные, согласно которым в интактном сердце инотропные эффекты теофиллина опосредуются не только цАМФ [11], но и дополнительным влиянием на сократительный аппарат. Полученные нами данные свидетельствуют, что инотропные эффекты ПГ сопровождаются накоплением цАМФ в миокардиальных клетках. Эти данные соответствуют результатам исследований, в которых изучено влияние ПГ на активность миокардиальной системы аденилатциклаза—цАМФ [17], причем накопление цАМФ в миокарде под влиянием ПГ не является результатом ингибирования ими активности фосфодиэстеразы [14, 16]. То, что пропранолол не влияет на процесс накопления цАМФ в условиях действия ПГ [14], является дополнительным подтверждением вывода, согласно которому ПГ и катехоламины действуют на различные типы рецепторов в миокарде. Кроме того, они, возможно, действуют на различные системы аденилатциклаза, так как известно, что блокирование  $\beta$ -адренорецепторов в миокарде куриных эмбрионов пропранололом ведет к угнетению стимулируемого изопротеренолом биосинтеза и накопления в клетках цАМФ [22]. Следовательно, между  $\beta$ -адренорецепторами и аденилатциклазой в сердце существует определенная связь. Комбинированное введение ПГЕ<sub>1</sub> ( $1 \cdot 10^{-4}$  М) и норадреналина ( $5 \cdot 10^{-4}$  М) не приводит к аддитивному эффекту в отношении накопления цАМФ в миокарде морских свинок, в связи с чем предполагается существование различных рецепторов скорее на одной аденилатциклазе, чем отдельных рецепторов на различных аденилатциклазах, причем один рецептор отвечает на ПГ, а другой на норадреналин [14]. Однако при оценке отсутствия аддитивного эффекта на биосинтез цАМФ в миокарде при комбинированном действии ПГЕ<sub>1</sub> и норадреналина нельзя не учитывать

антагонистического влияния ПГ и катехоламинов, о чем говорилось выше.

Кардиостимулирующие эффекты ПГ могут быть обусловлены и иными механизмами, помимо активирования аденилатциклазы. Так, ПГЕ<sub>1</sub> на изолированном сердце лягушки антагонизирует с депрессией, вызванной Mg<sup>2+</sup>, являющимся активатором фосфодиэстеразы [25], а также с эффектами другого активатора фосфодиэстеразы—никотиновой кислоты [6]. Конечно, это предположение требует дальнейших доказательств, поскольку Mg<sup>2+</sup> является не только активатором фосфодиэстеразы, но и принимает участие в других ферментных системах; кроме того, имеются прямые свидетельства об отсутствии у ПГ способности ингибировать фосфодиэстеразу [14, 16, 24].

Стимуляция простагландинами аденилатциклазы, тесно связанной с саркоплазматическим ретикуломом, способствует повышению внутриклеточного количества цАМФ, которая в свою очередь не только активирует протеинкиназу и процессы фосфорилирования в саркоплазматическом ретикулуме, но и обуславливает увеличение саркотубулярных запасов Ca<sup>2+</sup> [10] и повышает транспорт Ca<sup>2+</sup> через саркотубулярные везикулы [11], способствуя усилению сокращений. Не исключено, что система аденилатциклаза—цАМФ и система транспорта Ca<sup>2+</sup> саркоплазматического ретикулума регулируются независимо друг от друга [7]. При всех случаях, однако, в кардиотропных эффектах ПГ важное место занимает, по-видимому, контроль мышечной активации и путем увеличения притока Ca<sup>2+</sup> внутрь клетки и высвобождения его из саркоплазматического ретикулума, и путем повышения активности аденилатциклазы и увеличения внутриклеточного количества цАМФ.

Кафедра фармакологии

Ереванского медицинского института

Поступила 9/VI 1977 г.

Ի. Ղ. ԲՈՐՈՅԱՆ

ՊՐՈՍՏԱԳԼԱՆԴԻՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ:  
ՍՐՏԱՄՎԱՆԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ն փ ու լ

Աճեցվող էմբրիոնալ սրտամկանի հյուսվածքների վրա կատարված փորձերում հայտնաբերված է, որ պրոստագլանդիները իրականացնում են իրենց ազդեցութունը սպեցիֆիկ պրոստագլանդինազգացող ռեցեպտորների միջոցով:

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бороян Р. Г. Журн. экспер. и клинич. мед. АН Арм.ССР, 1976, 6, стр. 10.
2. Карапетян А. Е., Геворкян Р. А., Манукян Г. А., Львов М. В. Булл. экспер. биол. и мед., 1968, 9, стр. 124.

3. Baum T. and Shropshire A. T. Am. J. Physiol., 1971, 221, 1470.
4. Berti F., Lentati R. and Usardi M. M. Med. Pharmac. exp., 1965, 13, 233.
5. Bhagat B., Dhalla N. S., Ginn D., La Montagne A. E. and Montier A. D. Br. J. Pharmac., 1972, 44, 689.
6. De Boer J., Houtsmuller U. M. T. and Vergroesen A. J. Prostaglandins, 1973, 3, 805.
7. Dhalla N. S., Sulakhe P. V., Khandelwal R. C. and Hamilton I. R. Life Sci. 1970, 9, 625.
8. Eagle H. Science, 1955, 122, 501.
9. Bakins K. E., Miller J. D. and Karim S. M. M. J. Pharmacol. exp. Ther., 1971, 176, 441.
10. Entman M. L., Levey G. S. and Epstein S. E. Circ. Res., 1969, 25, 429.
11. Epstein S. E., Levey G. S. and Skelton C. L. Circulation, 1971, 43, 437.
12. Hamilton H. L. Lillie's Development of the chick. 3 rd. ed., Holt, Rinehart a. Winston, Inc., N. Y., 1952.
13. Klaus W. and Piccinini F. Experientia, 1967, 23, 556.
14. Klein I. and Levey G. S. Metabolism, 1971, 20, 890.
15. Krishna G., Weiss B. and Brodie B. B. J. Pharmacol. exper. Ther., 1968, 163, 379.
16. Levey G. S. and Klein I. Life Sci., 1973, 13, 41.
17. Limas C. J., Ragan D. and Frels E. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1974, 147, 103.
18. McCarty L. P., Lee W. C. and Shideman F. F. J. Pharmacol. exp. Ther., 1960, 129, 315.
19. Nakano J. and McCurdy J. R. J. Pharmac. exp. Ther., 1967, 156, 538.
20. Nutter D. O. and Ratts T. Prostaglandins, 1973, 3, 323.
21. Piccinini F., Pomarelli P. and Chiarra A. Pharmac. Res. Commun., 1969, 1, 381.
22. Polson J. B., Goldberg N. D. and Shideman F. E. J. Pharmacol. exp. Ther., 1977, 200, 630.
23. Sabatini-Smith S. Pharmacologist., 1970, 12, 239.
24. Sobel B. E. and Robison A. K. Circulation, 1969, 40 (suppl. 3); III—189.
25. Sutherland E. W., Robison G. A. and Butcher R. W. Circulation, 1968, 37, 279.
26. Wennmalm A. Acta physiol. scand., 1971, 82, suppl. 365.