

КАРДИОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТОЧНЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ**Аркадий Ростиславович КОЛПАКОВ***НИИ биохимии СО РАМН**630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Целью работы, продолжающей серию исследований влияния сывоточных липопротеинов на работу изолированного по Лангендорфу сердца крысы, стало изучение вклада белкового (апопротеинов) и липидного компонентов липопротеинов (ЛП) в изменение работы сердца. Установлено, что ни белковый, ни липидный компоненты сывоточных ЛП, взятые отдельно, не воспроизводили эффекты нативных ЛП, угнетая сократительную способность миокарда. Адреналин и кортикостерон не устраняли угнетающего влияния апоЛП высокой плотности на работу изолированного сердца. Обсуждаются возможные механизмы развития наблюдаемых эффектов.

Ключевые слова: липопротеины, апопротеины, изолированное сердце крысы.

В течение длительного времени, начиная с 1929 г., когда впервые в чистом виде был выделен липопротеин высокой плотности (ЛПВП), этой биологической конструкции и другим ЛП отводилась роль переносчика липидов. Даже в монографии А.Н. Климова и Н.Г. Никульчевой 1995 г. ЛП названы хотя и «уникальной», но лишь «...транспортной формой липидов в организме» [1]. Последние десятилетия резко изменили отношение исследователей к физиологической роли ЛП. И во многом этому способствовали работы сотрудников НИИ биохимии СО РАМН [2–4].

Нами было обнаружено различное влияние ЛП на функциональные показатели изолированного сердца крысы. ЛПВП оказывали выраженное стимулирующее действие на орган, при этом величина коронарного потока оставалась неизменной, и повышалась устойчивость сердца к гипоксии [5]. Было изучено и кооперативное действие ЛП с гормонами стресса на изолированное сердце крысы [5, 6]. В литературе широко обсуждается проблема существования эндогенных дигоксин-подобных соединений [7, 8], поэтому представлялось целесообразным продолжить изучение кардиотропных свойств ЛП. Целью работы стало изучение вклада белкового (апопротеинов, апоЛП) и липидного компонентов ЛП в изменение работы изолированного сердца.

Материал и методы

В работе использованы реактивы марки «ЧДА» и «ХЧ», растворы приготавливались на дистиллированной воде.

Эксперименты проведены на крысах-самцах Wistar массой 200–300 г в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755). За час до опыта животным внутривенно вводили гепарин (500 ЕД на крысу). После декапитации

сердце быстро извлекали и помещали в стаканчик с перфузионным раствором при температуре 0 °С. В аорту вводили канюлю, которую подсоединяли к перфузионной системе. В качестве перфузата использовался раствор Кребса – Хензеля [9], при насыщении газовой смесью 95 % O₂ и 5 % CO₂, температуре 37,5 °С, pH 7,4.

Перфузию проводили под постоянным давлением 60 мм рт. ст. В данных условиях эксперимента изолированное сердце может сокращаться в течение двух часов и более, при этом амплитуда и частота сокращений достаточно стабильны. Объем перфузируемой жидкости в системе в режиме рециркуляции не превышает 40 мл, что многократно уменьшает расход реактивов и липопротеинов по сравнению с незамкнутой системой.

Для регистрации амплитуды и частоты сокращений к верхушке сердца прикреплялся крючок из платиновой проволоки, который через систему блоков соединялся с устройством, преобразующим механические колебания в электрические сигналы. Запись осуществлялась быстродействующим самописцем НЗ021-1 (Россия).

Объемная скорость коронарного потока определялась объемом оттекающей от сердца жидкости (мл/мин).

Исходные (фоновые) показатели работы сердца существенно отличались между собой (частота сердечных сокращений в экспериментах варьировала от 140 до 300 уд./мин), поэтому изменения в работе миокарда под влиянием изучаемых компонентов оценивались в процентах по отношению к исходным показателям.

Для контроля pH поступающего к сердцу раствора использовался pH-метр «ELWRO N5170».

Выделенное сердце работало не менее 10 мин без рециркуляции перфузионного раствора до установления постоянных показателей амплитуды и частоты сокращений. Затем в перфузионный

раствор вносили изучаемый компонент, и сердце работало в режиме рециркуляции. Перфузия растворами с ЛП продолжалась обычно 10 мин (исключения указаны при описании результатов), после чего проводили отмывку (10 мин) обычным раствором без рециркуляции. Последующие смены растворов также осуществлялись с интервалом 10 мин. С каждым изучаемым ЛП или апоЛП проводили 4–6 опытов.

Препаративное выделение липопротеинов из сыворотки крови крыс осуществляли методом изоплотного центрифугирования в растворе KBr [10]. Полученные ЛП диализовали при 4 °С в течение 24 ч против 0,15М раствора NaCl. Последний диализ проводили против раствора для перфузии, не содержащего глюкозы.

Делипидирование липопротеинов выполняли охлажденной смесью эфира с этанолом (1:1) и последующей многократной отмывкой эфиром.

После удаления выпавших в осадок апопротеинов смесь эфира с этанолом испаряли продувкой азота, затем липидный компонент растворяли в 6 мл раствора Кребса – Хензеляйта с добавлением бычьего сывороточного альбумина (БСА, 1 мг/мл).

При выделении ЛП учитывалось их объемное содержание в плазме. При проведении экспериментов перфузионные растворы готовились таким образом, что концентрации ЛП, апоЛП и липидов ЛП соответствовали их концентрациям в плазме.

В экспериментах использовались стандартный ампулированный 0,1%-ный раствор адреналина гидрохлорида (конечная концентрация 100 мкг/100 мл) и кристаллический кортикостерон «Sigma» (конечная концентрация 200 мкг/100 мл).

Значительная часть экспериментов выполнена совместно с д.м.н. В.Ф. Максимовым, которым затем были проведены морфологические исследования [11, 12].

Результаты и обсуждение

Влияние суммарных апопротеинов на работу изолированного сердца крысы

Исследования, проведенные с суммарными апопротеинами (апоЛП) всех фракций ЛП, показали, что апоЛП, взятые в физиологических концентрациях, вызывали угнетение работы изолированного сердца вплоть до его остановки. Существенно отличалась лишь продолжительность работы сердца при перфузии с различными апопротеинами: с апоЛП очень низкой плотности (апоЛПОНП) – 10–12 мин, с апоЛПНП – 20–25 мин, с апоЛПВП – 6–8 мин. Эффект был обратимый (устранялся при отмывке) и уменьшался при снижении концентрации апоЛП в перфузионном растворе.

Способность апо В, основного белка ЛПНП, подавлять поглощение глюкозы тканями была установлена нами в экспериментах на перфузируемых задних конечностях крыс [13]. В следующей серии исследований было изучено влияние инсулина на эффект апопротеинов. Сам инсулин

в концентрации 0,2 МЕ/л увеличивал амплитуду и частоту сокращений изолированного сердца, но, добавленный в перфузионный раствор на фоне апоЛПОНП и апоЛПВП, не изменял их влияния на сердце. Напротив, угнетающее действие апоЛПНП полностью устранялось инсулином, хотя в этих случаях усиливающего (по сравнению с контролем) действия инсулина на работу сердца не наблюдалось. Поскольку энергетическим субстратом, поступающим в сердце с раствором, является глюкоза, можно предположить, что кардиодепрессорный эффект апоЛПНП реализуется через инсулинзависимые механизмы.

Ранее нами было установлено, что апопротеин С, основной компонент апоЛПОНП, может подавлять процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях печени [14]. Интересно отметить, что снижение скорости потребления кислорода митохондриями развивалось через 18–20 мин их инкубации с ЛПОНП, что почти совпадало с временем работы сердца при перфузии его с апоЛПОНП (20–25 мин). Возможно, нарушение энергообеспечения миокарда по механизмам, сходным с описанными нами на митохондриях печени, объясняет уменьшение работоспособности изолированного сердца при перфузии его раствором, содержащим апоЛПОНП.

В качестве вероятного механизма угнетающего действия апоЛПВП можно предположить их способность связываться с липидами клеточных мембран и за счет своего рода детергентных свойств нарушать функцию клетки. Однако низкие концентрации белков, используемые нами в экспериментах, и обратимость эффектов при отмывке позволяют усомниться в таком объяснении. Таким образом, угнетающее действие сывороточных апопротеинов на сердце, очевидно, имеет различную природу и требует дальнейшего изучения.

В продолжение этих работ было изучено влияние адреналина и кортикостерона на сократительную способность миокарда при перфузии апоЛПВП.

Влияние апобелков липопротеинов высокой плотности при совместной перфузии с адреналином и кортикостероном на работу изолированного сердца

АпоЛПВП, вводимые на фоне адреналина, вызывали быстрое (в течение 2–3 мин) снижение амплитуды сокращений (на 70–80 %) при относительно небольшом уменьшении частоты сокращений (80–85 % от исходного), на 1/3 снижалась величина коронарного потока. Угнетающее действие апоЛПВП приводило к полной остановке сердца через 8–10 мин, но могло быть устранено отмывкой обычным раствором Кребса – Хензеляйта, при этом наблюдалось полное восстановление высоких исходных показателей амплитуды и частоты сердечных сокращений. Повторные перфузии апоЛПВП совместно с адреналином вновь приводили к быстрому снижению показателей работы сердца.

Действие аполПВП на фоне кортикостерона также выражалось в довольно быстром угнетении работы изолированного сердца. После кратковременной реакции (20–30 с) на подключение апопротеинов и кортикостерона, выражающейся в повышении частоты и амплитуды сокращений, наблюдалось значительное снижение всех показателей работы сердца (снижение амплитуды на 50 %, частоты — на 60 %, скорость коронарного потока снижалась втрое). Появлялись аритмии. Эффект был обратимый, т. к. перфузия сердца обычным раствором Кребса — Хензеляита восстанавливала показатели работы до уровня исходных. Повторное введение аполПВП совместно с кортикостероном также быстро приводило к падению сердечной деятельности.

Таким образом, адреналин и кортикостерон не предотвращали угнетающего действия аполПВП на работу сердца. Разные эффекты, вызываемые липопротеинами и их апопротеинами на изолированном сердце, делали необходимым изучение влияния липидного компонента ЛП на работу сердца.

Влияние липидного компонента ЛП различных классов на работу изолированного сердца

Липидный компонент ЛП получали, как описано в разделе «Материал и методы»; с учетом разведения перед перфузией концентрация БСА в перфузионной жидкости составляла 0,08–0,1 мг/мл. Сам БСА в такой концентрации не оказывал заметного влияния на работу изолированного сердца (предварительные исследования). Подача к сердцу липидных компонентов всех классов ЛП вызывала быстрое (в течение 5–8 мин) угнетение работы сердца (в основном за счет уменьшения амплитуды сокращений). Этот эффект липидной части ЛП был частично обратимый, т. к. замена перфузионного раствора на обычный раствор Кребса — Хензеляита восстанавливал амплитуду сокращений до 60–70 % от исходной. Повторная подача к сердцу раствора липидов вызывала более быстрое угнетающее действие.

Возможно, конкурируя с глюкозой за пути метаболизма в миокарде, липиды липопротеинов, лишенные регуляторного компонента (апопротеинов), не могли быть использованы должным образом.

Таким образом, ни белковый, ни липидный компоненты сывороточных ЛП, взятые отдельно, не воспроизводили эффекты нативных ЛП при перфузии изолированного работающего сердца крыс. Адреналин и кортикостерон не устраняли угнетающего влияния аполПВП на работу изолированного сердца. Результаты исследований показывают, что в кардиотропном действии сывороточных ЛП задействованы различные механизмы, которые требуют дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. СПб., 1995. 304 с.
Klimov A.N., Nikulcheva N.G. Lipids, Lipoproteins and Atherosclerosis. SPb, 1995. 304 p.
2. Панин Л.Е., Усынин И.Ф., Поляков Л.М. Поглощение иодированных липопротеинов плазмы крови субпопуляциями гепатоцитов и синусоидальными клетками печени крыс // *Вопр. мед. хим.* 1986. 32. (4). 106–110.
*Panin L.E., Usynin I.F., Poliakov L.M. Absorption of iodinated plasma lipoproteins by subpopulations of hepatocytes and sinusoid cells of the rat liver // *Vopr. med. khim.* 1986. 32. (4). 106–110.*
3. Панин Л.Е., Суменкова Д.В., Князев Р.А., Поляков Л.М. Взаимодействие аполипопротеинов А-I и Е в регуляции биосинтеза ДНК, РНК и белка в культуре гепатоцитов крыс // *Бюл. exper. биол. и мед.* 2007. 144. (12). 629–631.
*Panin L.E., Sumenkova D.V., Knyazev R.A., Polyakov L.M. Interaction of apolipoproteins A-I and E in the regulation of DNA, RNA, and protein biosynthesis in cultured rat hepatocytes // *Bul. exper. biol. and med.* 2007. 144. (6). 780–782.*
4. Панин Л.Е., Кунитсин В.Г., Тузиков Ф.В. Changes in the secondary structure of highly polymeric DNA and CC(GCC)n-type oligonucleotides under the action of steroid hormones and their complexes with apolipoprotein A-I // *J. Phys. Chem. B.* 2006. 110. (27). 13560–13571.
5. Панин Л.Е., Колпаков А.Р., Максимов В.Ф. Влияние плазменных липопротеинов и адреналина на работоспособность изолированного сердца крыс // *Бюл. СО РАМН.* 2006. (1). 56–60.
*Panin L.E., Kolpakov A.R., Maksimov V.F. Influence of plasma lipoproteins and adrenaline on working capacity of isolated rat heart // *Bul. SO RAMN.* 2006. (1). 56–60.*
6. Панин Л.Е., Колпаков А.Р., Максимов В.Ф. Влияние кортикостерона и плазменных липопротеинов на работоспособность и ультраструктуру изолированного сердца крыс. // *Кардиология.* 2007. 47. (1). 31–36.
*Panin L.E., Kolpakov A.R., Maksimov V.F. Effect of corticosterone and plasma lipoproteins on working capacity and ultrastructure of isolated rat heart // *Kardiologiya.* 2007. 47. (1). 31–36.*
7. Manunta P., Ferrandi M., Bianchi G. et al. Endogenous ouabain in cardiovascular function and disease // *J. Hypertens.* 2009. 27. (1). 9–18.
8. Nicholls M.G., Lewis L.K., Yandle T.G. et al. Ouabain, a circulating hormone secreted by the adrenals, is pivotal in cardiovascular disease. Fact or fantasy? // *J. Hypertens.* 2009. 27. (1). 3–8.
9. Harrison G.J., Jordan L.R., Selley M.L. et al. Low-density lipoproteins inhibit histamine and NaNO₂ relaxations of the coronary vasculature and reduce

contractile function in isolated rat hearts // Heart Vessels. 1995. 10. (5). 249–257.

10. Havel R.J., Eder H.H., Bragdan J.N. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum // J. Clin. Invest. 1955. 7. 1345–1353

11. Панин Л.Е., Максимов В.Ф., Коростышевская И.М., Колпаков А.Р. Проникновение липопротеинов и аполипипропротеинов очень низкой плотности в миокард и изменения его структуры при перфузии сердца крыс *in vitro* // Вестн. РАМН. 2004. (7). 24–29.

Panin L.E., Maksimov V.F., Korostyshevskaya I.M., Kolpakov A.R. Penetration of lipoproteins and apolipoproteins of very low density into the myocardium and changes of its structure in rat heart perfusion // Vestn. RAMN. 2004. (7). 24–29.

12. Максимов В.Ф., Колпаков А.Р., Панин Л.Е. и др. Распределение меченых липопротеинов в

миокарде при перфузии изолированного сердца крыс на фоне введения адреналина // Морфология. 2003. 123. (2). 56–60.

Maksimov V.F., Kolpakov A.R., Panin L.E. et al. Distribution of the labeled lipoproteins in the myocardium during perfusion of the isolated rat heart and adrenaline administration // Morfologiya. 2003. 123. (2). 56–60.

13. Панин Л.Е., Останина Л.С., Колпаков А.Р. К механизму контринсулярного эффекта апопротеина В // Вопр. мед. химии. 1995. 41. (6). 12–16.

Panin L.E., Ostanina L.S., Kolpakov A.R. The mechanism of anti-insulin effect of apoprotein B // Vopr. med. khim. 1995. 41. (6). 12–16.

14. Панин Л.Е., Колпаков А.Р., Кузменко Д.И. et al. Influence of apoproteins of serum lipoproteins on bioenergetic functions of liver mitochondria // Phys. Chem. Biol. Med. 1995. 1. 27–35.

CARDIOTROPIC PROPERTIES OF SERUM LIPOPROTEINS

Arkady Rostislavovich KOLPAKOV

Scientific Research Institute of Biochemistry of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov st., 2

The aim of the work is to continue the investigation of influence of serum lipoproteins on the isolated working rat heart. Both apoproteins and lipid component taking apart in experiments hardly depressed heart working capacity and didn't reproduce effects of lipoproteins. Adrenalin and corticosterone didn't avoid the impair action of apoHDL on the heart. The possible mechanisms of noted effects were discussed.

Key words: lipoproteins, apoproteins, isolated rat heart.

Kolpakov A.R. — doctor of medical sciences, professor, leading researcher of laboratory of molecular biology of cell, e-mail: akolpakov2000@mail.ru