

Сократительная активность миокарда и выживаемость мышей с постинфарктной сердечной недостаточностью при гиперэкспрессии P2X₄ пуринергических рецепторов в миокарде

¹ Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

³ Городская больница № 33, Санкт-Петербург

e-mail: sonin_d@mail.ru

Реферат

Исследование проводилось для оценки влияния гиперэкспрессии P2X₄ пуринергических рецепторов на параметры работы сердца и выживаемость мышей при сердечной недостаточности, вызванной перевязкой левой коронарной артерии (ЛКА). Оклюзия ЛКА осуществлялась у контрольных и трансгенных мышей (ТГМ) с гиперэкспрессией P2X₄-рецепторов человека (P2X₄R ТГМ) в миокарде. Уже на 7-й день после перевязки ЛКА у P2X₄R ТГМ наблюдалось достоверно более высокое по сравнению с диким типом значение фракции укорочения (ФУ), скорости сокращения левого желудочка и пульсового давления в левом желудочке (ЛЖ), что свидетельствует о лучшей сократительной способности миокарда трансгенных мышей в постинфарктном периоде. Более высокая по сравнению с контролем сократительная функция миокарда ЛЖ P2X₄R ТГМ сохранялась на протяжении двух месяцев наблюдения и сопровождалась повышенной выживаемостью P2X₄R ТГМ; при этом различий в размере рубцовой зоны ЛЖ между P2X₄R ТГМ и контролем выявлено не было. Таким образом, миокардиальная гиперэкспрессия P2X₄R сопровождается более высокой сократительной активностью миокарда ЛЖ и повышением выживаемости ТГМ в постинфарктном периоде.

Ключевые слова: постинфарктная сердечная недостаточность, пуринергические рецепторы, выживаемость.

Sonin D.L.^{1,2}, Sonina T.V.³, Galagudza M.M.^{1,2},
Syrensky A.V.^{1,2}

Cardiac contractility in mice with the cardiac-specific transgenic overexpression of P2X₄ purinergic receptors and postischemic cardiomyopathy

¹ V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Center, Saint-Petersburg, Russian Federation;

² I. P. Pavlov Federal Medical University, Saint-Petersburg, Russian Federation;

³ The Saint-Petersburg State Institution of Public Health, City Hospital № 33, Russian Federation

e-mail: sonin_d@mail.ru

Abstract

The aim of this study was to evaluate the influence of P2X₄ purinergic receptors overexpression on myocardial contractility and survival rate of mice after left anterior descending coronary artery ligation (LAD)-induced myocardial infarction. Transgenic mice with cardiac-specific overexpression of human P2X₄ receptor (P2X₄R TG) were used as a model. LAD ligation-mediated ischemic cardiomyopathy was induced in both wild type and P2X₄R TG mice. As early as 7 days after myocardial infarction, P2X₄R TG animals showed a greater fractional shortening, an improved +dP/dt and LV developed pressure. The enhanced contractile performance was sustained 2 months after myocardial infarction, and was associated with increased survival of the P2X₄R TG animals at 2 months. There were no differences in infarct size between wild type mice and P2X₄R TG mice. Thus, increased myocardial expression of the P2X₄R stabilized contractile function in the transgenic heart in both male and female animals.

Keywords: post-infarction heart failure, purinergic receptors, survival.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Введение

Семейство $P2X_{1-7}$ пуринергических рецепторов представляет собой группу лиганд-зависимых ионных каналов, которые активируются внеклеточным АТФ [5, 12] и являются основными посредниками инотропного эффекта АТФ [2, 6, 8].

$P2X_4$ рецепторы ($P2X_4R$) экспрессируются во многих тканях, включая миокард [4, 9]. Гиперэкспрессия $P2X_4R$ в миокарде приводит к увеличению силы сокращения изолированных кардиомиоцитов и левого желудочка (ЛЖ) изолированного сердца при действии на них 2-метилтио АТФ [6].

Механизм, лежащий в основе повышения силы сердечных сокращений, следующей за стимуляцией $P2X_4R$, в настоящее время окончательно не установлен, однако имеющиеся данные указывают на то, что активация $P2X_4R$ внеклеточным АТФ приводит к входу в клетку натрия и небольшого количества кальция, а также делает их более проницаемыми для калия [12]. Предполагается, что сарколеммальный Na^+/Ca^{2+} ионный насос меняет натрий, входящий через $P2X_4R$, на кальций, а оставшийся в цитоплазме кальций переходит в саркоплазматический ретикулум. При последующих сокращениях кардиомиоцита в саркоплазму из саркоплазматического ретикулума выделяется большее количество кальция, чем до стимуляции $P2X_4R$ [11].

К настоящему времени получены экспериментальные данные, свидетельствующие о положительном влиянии гиперэкспрессии $P2X_4R$ на сократительную функцию миокарда в условиях генетически обусловленной сердечной недостаточности. Так, при гиперэкспрессии $P2X_4R$ наблюдалось повышение сократительной функции ЛЖ и увеличение продолжительности жизни мышей с кальсеквестриновой моделью сердечной недостаточности [13]. Положительный эффект гиперэкспрессии $P2X_4R$ не связан с повышением содержания внутриклеточного цАМФ и с какими-либо изменениями количества и активности белков-транспортёров Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме [8, 11].

Цель исследования

Целью настоящего исследования было изучение влияния гиперэкспрессии $P2X_4$ пуринергических рецепторов на функцию сердца и выживаемость мышей с постинфарктной сердечной недостаточностью.

Материал и методы исследования

Исследования проводили на мышах дикого типа линии C57BL/6 ($n=166$), служивших контролем, и трансгенных мышах с гиперэкспрессией $P2X_4$ рецепторов человека в миокарде ($P2X_4R$ ТГМ, $n=138$) массой 20–25 г. Животные находились на стандартном пищевом рационе и получали воду *ad libitum*.

Моделирование коронароокклюзионного инфаркта миокарда. Животных наркотизировали внутривенным введением смеси ксилазина (100 мг/кг) и кетамина (10 мг/кг). После интубации трахеи проводили искусственную вентиляцию легких. Перевязка левой коронарной артерии (ЛКА) выполнялась с использованием описанного ранее метода [3].

Сократительная функция миокарда левого желудочка оценивалась с помощью методики эхокардиографии и перфузии изолированного работающего сердца мыши. Эхокардиография выполнялась в условиях анестезии изофлюраном по описанной ранее методике [1]. Регистрировали конечно-диастолический и конечно-систолический размеры ЛЖ (КДРЛЖ и КСРЛЖ, мм, соответственно), изменения толщины задней стенки ЛЖ (мм) и фракцию укорочения по формуле: фракция укорочения = $(КДРЛЖ - КСРЛЖ) / КДРЛЖ \times 100 \%$. Антеградная перфузия изолированного сердца мыши выполнялась в соответствии с описанным ранее методом [8]. Через 20–25 мин периода стабилизации оценивалась сократительная активность миокарда ЛЖ по следующим параметрам: пульсовое давление левого желудочка (ПДЛЖ, мм рт. ст.), частота сердечных сокращений (ЧСС, уд./мин.), скорость сокращения ЛЖ ($+dP/dt$, мм рт. ст./с) и скорость расслабления ЛЖ ($-dP/dt$, мм рт. ст./с).

Измерение размера зоны постинфарктного рубца. После завершения перфузии изолированные сердца останавливались в фазу диастолы 11 % раствором хлористого калия и перфузировались 10 % раствором формалина. Поперечные микросрезы ЛЖ (5 мкм) окрашивались по Массону [3]. Размер зоны рубца вычисляли как отношение суммы эндокардиальных и эпикардиальных окружностей рубцовой зоны всех срезов к сумме общих эндокардиальных и эпикардиальных окружностей всех срезов одного сердца, умноженное на 100.

Оценка выраженности гипертрофии миокарда. Выраженность гипертрофии оценивалась по формуле $МС/МТ \times 1000$, где МС — масса сердца (г); МТ — масса тела (г).

Анализ выживаемости мышей после моделирования инфаркта миокарда. Для оценки выживаемости животных использовали метод Каплана–Мейера, позволяющий анализировать выживаемость в двух и более группах животных [7]. Для сравнения групп использовали лог-ранговый критерий.

Протокол экспериментов. Исследование включало следующие группы: 1) перевязка ЛКА у мышей дикого типа (контроль); 2) перевязка ЛКА у $P2X_4R$ ТГМ. После окклюзии ЛКА сократительная функция ЛЖ оценивалась *in vivo* и *in vitro* в двух группах животных на 7-й день, через 30 суток и через 2 месяца после инфаркта миокарда.

Статистический анализ. Данные представляли в виде «среднее $\pm$ стандартное отклонение». Для оценки достоверности различий измеряемых параметров между контрольной и подопытной группами использовали статистический пакет Statistica и критерий Стьюдента (непарный t-тест). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Исходные параметры сократительной функции ЛЖ, а именно — фракция укорочения ($32,7 \pm 1,7 \%$ и $31,1 \pm 0,5 \%$ в контроле, $n=8$ и у $P2X_4R$ ТГМ, $n=9$ соответственно, $p > 0,1$), пульсовое давление ЛЖ ($130,7 \pm 2,7$ мм рт. ст. и $141,8 \pm 2,5$ мм рт. ст. в контроле, $n=13$ и у $P2X_4R$ ТГМ, $n=16$ соответственно, $p > 0,1$),

Таблица 1

Группа	Фракция укорочения, %	Пульсовое давление ЛЖ, мм рт. ст.	Скорость сокращения миокарда, мм рт. ст./с
Контроль	18,5±0,5 (33)	106,0±2,3 (26)	3504±110 (26)
P2X ₄ R ТГМ	23,6±0,7 (24) *	117,0±1,9 (25) *	4210±128 (25) *

Примечание: в круглых скобках приводится количество наблюдений; * — $p < 0,05$

скорость сокращения миокарда ЛЖ (4727 ± 191 мм рт. ст./с и 5403 ± 124 мм рт. ст./с в контроле $n=13$ и у P2X₄R ТГМ, $n=16$ соответственно, $p > 0,1$), ЧСС ($318,8 \pm 45,5$ уд./мин и $317,9 \pm 24,6$ уд./мин в контроле, $n=9$ и у P2X₄R ТГМ, $n=7$ соответственно, $p > 0,1$), а также отношение массы сердца к массе тела ($5,6 \pm 0,6$ и $4,8 \pm 0,7$ в контроле, $n=9$, и у P2X₄R ТГМ, $n=7$ соответственно, $p > 0,1$) были одинаковыми между P2X₄R ТГМ и мышами дикого типа. Эти данные указывают на нормальный фенотип сердца у P2X₄R ТГМ в физиологических условиях, что соответствует наблюдениям, сделанным ранее [3].

Сократительная функция ЛЖ у P2X₄R ТГМ в динамике развития постинфарктной сердечной недостаточности. Через 7 суток после перевязки ЛКА такие параметры, как фракция укорочения ($17,6 \pm 0,49$ % и $24,5 \pm 0,95$ % в контроле, $n=28$, и у P2X₄R ТГМ, $n=21$ соответственно, $p < 0,05$) и систолическое утолщение задней стенки ЛЖ ($0,05 \pm 0,005$ мм и $0,09 \pm 0,008$ мм в контроле и у P2X₄R ТГМ соответственно, $p < 0,05$), полученные при эхокардиографии, были достоверно выше у P2X₄R ТГМ, чем у контрольных животных. В экспериментах с использованием модели изолированного работающего сердца, выполненных на 8-е сутки, P2X₄R ТГМ имели более высокие уровни ПДЛЖ и скорости сокращения ЛЖ (рис. 1) в сравнении с контролем. При этом размер зоны рубца между группами достоверно не различался ($44,8 \pm 3,67$ % и $38,1 \pm 4,22$ % в контроле и у P2X₄R ТГМ соответственно). Таким образом, гиперэкспрессия P2X₄R в миокарде приводила к стабилизации сократительной функции миокарда в раннем постинфарктном периоде.

Через 30 суток после окклюзии ЛКА при проведении эхокардиографии у P2X₄R ТГМ были выявлены более высокие значения фракции укорочения (таблица) и систолического утолщения задней стенки ЛЖ ($0,035 \pm 0,006$ мм и $0,090 \pm 0,016$ мм в контроле и у P2X₄R ТГМ соответственно, $p < 0,05$). Кроме того, при перфузии изолированного сердца у P2X₄R ТГМ были выявлены достоверно более высокие уровни ПДЛЖ и скорости сокращения ЛЖ в сравнении с контролем (таблица). При этом размер рубцовой зоны между указанными группами не различался, равно как и степень постинфарктной дилатации ЛЖ, критериями которой являлись конечно-систолический и конечно-диастолический размеры ЛЖ.

Различие между контрольными животными и P2X₄R ТГМ сохранялось и через 2 месяца после перевязки ЛКА. По данным эхокардиографии, фракция укорочения (контроль $17,15 \pm 0,88$ %, $n=23$, P2X₄R ТГМ $20,42 \pm 0,98$ %, $n=18$, $p < 0,05$) и утолщение задней

стенки ЛЖ (контроль $0,053 \pm 0,006$ мм, $n=23$, P2X₄R ТГМ $0,087 \pm 0,010$ мм, $n=18$, $p < 0,05$) были более высокими у P2X₄R ТГМ, чем у контрольных животных при отсутствии различий в протяженности рубца и степени постинфарктной дилатации ЛЖ.

Влияние гиперэкспрессии P2X₄-рецепторов в миокарде на выживаемость мышей после перевязки ЛКА. Из анализа выживаемости были исключены случаи гибели животных, произошедшие в первые 24 часа послеоперационного периода. Общая выживаемость к 2 месяцам после перевязки ЛКА была значительно больше у P2X₄R ТГМ, чем у контрольных животных. Различие в кривых выживаемости объясняется малым количеством летальных исходов у P2X₄R ТГМ в течение первых 7–10 дней после перевязки ЛКА. Размеры рубцовых зон были одинаковыми у контрольных животных (38 ± 2 % от всего ЛЖ, $n=69$) и у P2X₄R ТГМ ($36,0 \pm 1,7$ %, $n=58$, $p > 0,05$ в сравнении с контролем) к 2 месяцам после перевязки ЛКА.

Гиперэкспрессия P2X₄R увеличивала силу и скорость сокращений миокарда ЛЖ мышей с инфарктом миокарда по сравнению с контролем, о чем свидетельствуют результаты измерений сократительной активности ЛЖ с использованием эхокардиографии и на модели изолированного сердца. Уже через неделю после окклюзии коронарной артерии проведенные измерения функции ЛЖ показали, что сила сердечных сокращений трансгенных мышей была больше, чем у контрольных мышей. Эта особенность, связанная с гиперэкспрессии P2X₄R в миокарде, сохранялась у трансгенных мышей в течение 2 месяцев наблюдения. Вместе с тем трансгенные и контрольные мыши в среднем имели одинаковый размер инфаркта миокарда.

Повышенная сократительная активность миокарда ЛЖ P2X₄R ТГМ сопровождалась большей продолжительностью жизни. Основное число случаев гибели животных происходило в течение первой недели после окклюзии ЛКА. Данные настоящего исследования согласуются с наблюдениями, показавшими позитивную роль стимуляции P2X-пуриnergических рецепторов [10] и гиперэкспрессии P2X₄R в условиях кальсеквестриновой модели сердечной недостаточности [13].

Таким образом, полученные результаты позволяют считать перспективной дальнейшую разработку способов фармакологической стимуляции данного типа рецепторов в постинфарктном периоде с целью улучшения ближайшего и отдаленного прогноза у пациентов с ишемической болезнью сердца.

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам Центра здоровья Коннектикутского Университета (Фармингтон, США) Б. Т. Лианг, С.-Ю. Зоу, Ч. Кронин и К. МакГуинес за консультативную помощь и организационное обеспечение экспериментального исследования.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (государственный контракт П607 от 18.05.2010).

Литература

1. Bridgman, P. Gender-specific patterns of left ventricular and myocyte remodeling following myocardial infarction in mice deficient in the angiotensin II type 1a receptor / P. Bridgman [et al] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2005. — № 289. — P. H586–H592.
2. Christie, A. Mechanism of extracellular ATP-induced increase of cytosolic Ca^{2+} concentration in isolated rat ventricular myocytes / A. Christie, V. K. Sharma, S. S. Sheu // *J. Physiol.* — 1992. — № 445. — P. 369–388.
3. Curcio, A. Competitive displacement of phosphoinositide 3-kinase from beta-adrenergic receptor kinase-1 improves postinfarction adverse myocardial remodeling / A. Curcio [et al] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2006 — Vol. 291 (4). — P. H1754–H1760.
4. Garcia-Guzman, M. Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue / M. Garcia-Guzman // *Mol. Pharmacol.* — 1997. — № 51. — P. 109–118.
5. Hu, B. A novel contractile phenotype with cardiac transgenic expression of the human P2X4 receptor / B. Hu, Q. B. Mei, X. J. Yao // *FASEB J.* — 2001. — Vol. 15 (14). — P. 2739–2741.
6. Hu, B. P2X4 Receptor Is a Glycosylated Cardiac Receptor Mediating a Positive Inotropic Response to ATP / B. Hu, C. Senkler, A. Yang // *The journal of biological chemistry.* — 2002. — Vol. 277 (18). — P. 15752–15757.
7. Lloyd-Jones, D. M. Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age / D. M. Lloyd-Jones [et al] // *Circulation.* — 2006. — Vol. 113 (6). — P. 791–798.
8. Mei, Q. P2 purinergic receptor activation enhances cardiac contractility in isolated rat and mouse hearts / Q. Mei, B. T. Liang // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* — 2001. — Vol. 281 (1). — P. H334–H341.
9. Nori, S. Coexpression of mRNAs for P2X1, P2X2 and P2X4 receptors in rat vascular smooth muscle : An in situ hybridization and RT-PCR study / S. Nori [et al] // *J. Vasc. Res.* — 1998. — № 35. — P. 179–185.
10. Shen, J. B. P2X purinergic receptor-mediated ionic current in cardiac myocytes of calsequestrin model of cardiomyopathy : implications for the treatment of heart failure / J. B. Shen [et al] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* — 2007. — Vol. 292 (2). — P. H1077–H1084.
11. Shen, J. B. Characterization and mechanism of P2X receptor-mediated increase in cardiac myocyte contractility / J. B. Shen [et al] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* — 2007 — Vol. 293 (5). — P. H3056–H3062.
12. Vassort, G. Adenosine 5'-triphosphate : a P2-purinergic agonist in the myocardium / G. Vassort // *Physiol. Rev.* — 2001. — Vol. 81 (2). — P. 767–806.
13. Yang, A. A beneficial role of cardiac P2X4 receptors in heart failure : rescuing the calsequestrin-overexpression model of cardiomyopathy / A. Yang [et al] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2004. — № 287 — P. H1096–H1103.