

---

# РОЛЬ ОПИАТОВ И $K_{ATP}^+$ -КАНАЛОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАН КЛЕТОК ПОЧЕК В РАЗВИТИИ АПОПТОЗА

**И.А. Комаревцева, Е.В. Комаревцева**

Кафедра медицинской химии ЛГМУ  
Квартал 50-летия Оборона Луганска,  
Луганск, Украина, 19104

**Ю.А. Белоус**

Кафедра психотерапии и наркологии ФПКМР  
Российский университет дружбы народов  
ул. Миклухо-Маклая, 21, корп. 3, Москва, Россия, 117198

Целью исследования является изучение роли опиатов и каналов плазматической и митохондриальной мембран клеток почек в развитии апоптоза.

В эксперименте были использованы белые крысы-самцы 16—18-недельного возраста. У животных формировали ОПН двумя моделями — ишемической (путем пережатия почечной ножки) и «глицерольной» (внутримышечным введением 50% р-ра глицерола). Даларгин вводили внутривентрикулярно за 20 минут до развития ОПН.

В результате работы нами был установлен механизм действия опиоидов на клетки почек. Он включает снижение уровня цАМФ, повышение продукции оксида азота, усиление синтеза цГМФ, подъем уровня инозитолтрифосфата.

**Ключевые слова:** опиаты, апоптоз, даларгин, ОПН.

Существуют данные о том, что в нейрональной ткани  $\mu$ - и  $\delta$ -рецепторы через G-белки связаны с  $K^+$ -каналами [4], в то время как k-рецепторы взаимодействуют с  $Ca^{2+}$ -каналами [8]. Существуют данные о том, что  $\mu$ - и  $\delta$ -рецепторы сопряжены с  $G_i$ - и  $G_o$ -белками в клетках нейробластомы [3]. Недавно было показано, что совместная экспрессия  $\delta$ -рецепторов и G-белок-зависимых  $K^+$ -каналов, выделенных из клеток предсердия, создает условия для появления  $K^+$ -тока задержанного выпрямления, который активируется  $\delta$ -агонистами и регулируется протеинкиназами C и A. Вместе с тем существуют работы о том, что k-рецепторы не сопряжены с G-белками и аденилатциклазой. Установлено, что опиоиды могут индуцировать подъем содержания цГМФ и модулировать обмен инозитолтрифосфата [6]. Общеизвестно, что цАМФ, цГМФ и инозитолтрифосфат являются внутриклеточными регуляторами транспорта кальция. Следовательно, есть основания полагать, что свои эффекты опиоиды оказывают путем изменения синтеза этих мессенджеров в клетках ткани. Однако некоторые исследования свидетельствуют о том, что опиоидные рецепторы могут регулировать ионные каналы, взаимодействуя с G-белками без участия вторичных посредников. Так, есть данные о способности  $\mu$ - и  $\delta$ -агонистов усиливать  $K^+$ -ток, а k-агонистов модулировать  $Ca^{2+}$ -каналы.

В последнее время в литературе широко обсуждается участие  $K_{\text{АТФ}}^+$ -каналов в регуляции программированной клеточной гибели. Общеизвестно, что в условиях ишемии снижается синтез АТФ, тем самым нарушается работа ионных насосов, удаляющих  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы клеток сердца, и возникает увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция и натрия. Кроме того, во время ишемии происходит усиленный гидролиз АТФ, накопление фосфорной кислоты, лактата, пирувата, что ведет к увеличению концентрации протонов в цитоплазме клеток. Во время реперфузии  $\text{Ca}^{2+}$  перегрузка еще более усиливается.

В ряде публикаций [5] указано, что некоторые ионные каналы и транспорт ионов вовлечены в процессы апоптоза. Так, полагают, что применение синтетического церамида при CD95-опосредованном апоптозе угнетает  $K^+$ -каналы в Т-лимфоцитах и нейронных клетках [7]. Исследования, проведенные на В-лимфоцитах, доказали, что при CD95-опосредованном апоптозе ингибирование  $K^+$ -каналов происходит под действием церамида, образованного при активации кислой сфингомиелиназы. Было установлено, что данный тип  $K^+$ -каналов отвечает за мембранный потенциал, а, именно, его гиперполяризация требуется для пролиферативных процессов, а деполяризация активирует апоптоз. Однако функция деполяризации мембранного потенциала в передаче апоптотических сигналов пока неизвестна. Следует отметить, что мембранный потенциал митохондрий также играет важную сигналпередающую роль при апоптозе.

Вместе с тем имеются исследования, в которых показано, что в клетках гладкой мышцы легочной артерии при апоптозе, вызванном стауроспорином, наблюдается активация плазмалеммальных К-каналов и деполяризация митохондриальной мембраны. Вследствие потери цитозольного  $K^+$  происходило апоптотическое уменьшение клеточного объема, а деполяризация митохондриальной мембраны вызывала выход цитохрома с и активизацию цитозольных каспаз. Ингибирование  $K^+$ -каналов понижало степень апоптоза в данных клетках. В Т-лимфоцитах апоптоз, опосредованный Fas-лигандов, также сопровождался потерей цитозольного  $K^+$  вследствие увеличения К-потока. Совсем недавно было установлено, что активация  $K^+$ -каналов принимает участие в сигналпередающих системах апоптоза, вызванного фактором некроза опухоли, ультрафиолетовым излучением.

Эти исследования свидетельствуют, что все  $K^+$ -каналы, представленные на плазматической мембране и на митохондриях, могут участвовать в изменении клеточного объема и регуляции апоптотических процессов.

Чтобы объяснить противоположные эффекты агониста опиатных рецепторов даларгина в норме и при патологии, нами был проведен эксперимент с введением животным глибенкламида — селективного блокатора  $K_{\text{АТФ}}^+$ -каналов плазматической и митохондриальной мембран клеток почек.

**Материалы и методы.** В экспериментальной части работы были использованы белые крысы-самцы 16—18-недельного возраста, масса животных составляла  $m = 250 \pm 30$  мг. Животных содержали в стандартных условиях вивария, эксперимент над животными проводили в соответствии с Этическим кодексом Совета

международных медицинских научных обществ по проведению эксперимента с использованием животных [10].

У животных формировали острую почечную недостаточность (ОПН) двумя моделями. 1 модель преренальная — по типу ишемия/реперфузия — за счет пережатия почечной ножки в течение 30 минут. Операцию проводили под тиопенталовым наркозом в дозе 10 мг/мл, в стерильных условиях. У контрольных животных проводили двухсторонние надрезы кожи и мышц в области спины. 11 модель ренальная — «глицерольная» — путем двухстороннего внутримышечного введения 50% раствора глицерола из расчета 10 мл на 1 кг веса животного. Контрольным животным вводили соответствующий объем физиологического раствора.

Животных наблюдали в ранний период развития ОПН (олигурическая стадия): через 1 час после ишемии (контроль-2) и в течение 1, 2, 3 суток (ОПН-1, ОПН-2, ОПН-3). Забой животных проводили методом декапитации под легким эфирным наркозом.

Введение модуляторов апоптоза проводили по следующей схеме. Даларгин (синтетический лей-энкефалин D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Arg<sup>6</sup>-энкефалин, ЗАО «БИОЛИК», г. Харьков) вводили внутривентрикулярно в дозе 100 мкг/кг массы животного за 20 минут до операции (до инъекции глицерола) и в течение 1, 2, 3 суток развития ОПН, однократно. Интактным животным даларгин и остальные препараты вводили аналогично в течение 1, 2, 3 суток, однократно. Селективное ингибирование  $K_{ATФ}^+$ -каналов вызывали инъекцией глибенкламида в дозе 0,3 мг/кг.

Для определения уровня апоптоза нами был использован удобный, достаточно чувствительный и дешевый метод спектрофотометрического определения фрагментированной ДНК [2], в нашей модификации [1]. Метод основан на цветной реакции накопленных в клетках почек низкомолекулярных фрагментов ДНК, экстрагированных в раствор с низкой ионной силой, с дифениламиновым реагентом.

**Результаты и обсуждение.** Нами установлено, что глибенкламид приводит к статистически значимому повышению фрагментации ДНК в клетках почек по сравнению с группами ОПН (табл. 1). Так, на 1-е сутки развития ОПН увеличение составило 23,8%, на 2-е сутки — 30,6%, на 3-и сутки — 25,9% для экспериментальных групп 1 модели. При «глицерольной модели» ОПН этот показатель соответствовал 32,1% (1-е сутки), 15,8% (2-е сутки), 17,8% (3-и сутки). Такая динамика деградации ДНК свидетельствует о проапоптотическом эффекте блокатора  $K_{ATФ}^+$ -каналов на клетки почек при экспериментальной ОПН. Имеются данные, что при ишемии/гипоксии существует физиологический защитный механизм, сопряженный с открытием  $K_{ATФ}^+$ -каналов гладкомышечных клеток сосудов и кардиомиоцитов, которое приводит к уменьшению работы сердца, риску развития аритмий и расширению коронарных сосудов [5]. По-видимому, при ишемии/гипоксии почек также угнетается эндогенный защитный механизм, который усугубляет повреждающее действие данной патологии.

Таблица 1

**Содержание фрагментированной ДНК в клетках почек при введении ингибитора  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-каналов и даларгина на фоне развития ОПН**

Сутки	ОПН	I модель ОПН		
		+ глибенкламид	+ глибенкламид + даларгин	+ даларгин
1-е	20,1 ± 2,5	28,8 ± 3,2*	27,9 ± 3,4**	16,4 ± 2,3*
2-е	30,9 ± 4,8	40,5 ± 4,1*	40,3 ± 4,3**	24,5 ± 3,8*
3-е	25,4 ± 2,5	33,3 ± 3,9*	33,1 ± 4,1**	18,5 ± 2,2*
II модель				
1-е	20,7 ± 2,8	27,5 ± 3,5*	33,1 ± 3,4**	16,4 ± 2,1*
2-е	35,9 ± 3,8	42,6 ± 4,2	43,2 ± 4,1**	21,4 ± 3,3*
3-е	26,2 ± 2,3	31,8 ± 2,3*	33,8 ± 4,2**	16,7 ± 3,8*

*Примечание:* \* —  $p < 0,05$ , различия достоверны по сравнению с группой ОПН; \*\* —  $p < 0,05$ , различия достоверны по сравнению с группой ОПН + даларгин.

При параллельном введении глибенкламида и даларгина наблюдалось полное устранение цитопротекторного эффекта последнего. Количество фрагментированной ДНК достоверно отличалось от групп ОПН+глибенкламид. Механизм цитопротекторного действия активаторов митохондриальных каналов полностью не изучен, однако установлено, что они предупреждают распад АТФ. Наши данные позволяют предположить, что активация  $\delta$ -ОР приводит к открытию  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-каналов внутренних мембран митохондрий. Это способствует улучшению энергетики клетки, что было подтверждено в собственных исследованиях по снижению синтетическим лей-энкефалином уровня ЛДГ в клетках почек, при этом увеличивается синтез АТФ, который необходим для восстановления энергетики клетки. Эффект даларгина как активатора  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-каналов в условиях метаболического стресса также можно связать с понижением уровня катехоламинов (адреналина) за счет угнетения аденилатциклазы.

Ранее мы получили результаты по влиянию даларгина на фрагментацию ДНК в клетках почек у интактных крыс, которые указывают на стимуляцию апоптотических процессов. Разнонаправленное действие препарата мы попытались объяснить с точки зрения его влияния на регуляцию  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-каналов через разные типы рецепторов. Для этого была проведена серия эксперимента на интактных крысах, которым вводили глибенкламид и даларгин по отдельности и сочетанно.

Инъекция блокатора  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-каналов не сопровождалась изменением содержания фрагментированной ДНК в клетках почек по сравнению с интактными почками (табл. 2).

Таблица 2

**Содержание фрагментированной ДНК в клетках интактных почек при введении животным блокатора  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-каналов, активатора ОР**

Серии экспериментов	+ глибенкламид	+ даларгин	+ глибенкламид + даларгин
И-1	6,1 ± 2,3	19,0 ± 2,1*	20,5 ± 2,1*
И-2	7,5 ± 2,5	23,0 ± 2,2*	23,9 ± 2,7*
И-3	8,9 ± 2,5	24,4 ± 2,3*	24,2 ± 2,8*

*Примечание:* \* —  $p < 0,05$ , различия показателей достоверны по сравнению группой контроля.

Предварительное введение блокатора  $K_{ATP}^+$ -каналов достоверно не изменяет деградацию ДНК, вызванную даларгином, т.е. глибенкламид не устраняет действие последнего. Полученные данные позволяют предположить, что в норме активация ОР не связана с регуляцией  $K_{ATP}^+$ -каналов [9] и действие даларгина реализуется не через  $\delta$ -ОР.

Таким образом, механизм действия опиоидов на клетку представляет довольно пеструю картину, которая включает снижение уровня цАМФ, повышение продукции оксида азота, усиление синтеза цГМФ, подъем уровня инозитолтрифосфата, активацию  $K^+$ -каналов и угнетение  $Ca^{2+}$ -тока.

### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Кухарчук О.Л., Кузнецова О.В. Вплив спленектомії на обмежений та необмежений протеоліз у плазмі крові і тканинах внутрішніх органів білих шурів // Вісник наук. досл. — 2001. — № 1. — С. 96—8.
- [2] Орлова Е.А., Комаревцев В.Н. Определение фрагментации ДНК в клетках почечной ткани // Акт. проблемы акушерства и гинекологии, клинической иммунологии и мед. генетики. — 2001. — Вып. 6. — С. 206—209.
- [3] Угдыжекова Д.С., Маслов Л.Н., Крылатов А.В. и др. К вопросу о специфичности антиаритмического эффекта К-агонистов опиатных рецепторов // Экспер. и клин фармакол. — 2001. — № 4. — С. 17—20.
- [4] Abbruscato T.J., Thomas S.A., Hruby V.J., Davis T.P. Blood-brain barrier permeability and bioavailability of a highly potent and mu-selective opioid receptor antagonist, CTAP: comparison with morphine // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1997. — № 1. — P. 402—409.
- [5] Finucane D.M., Waterhouse N.J., Amarante-Mendes G.P. et al. Collapse of the inner mitochondrial transmembrane potential is not required for apoptosis of HL 60 cells // Exp. Cell. Res. — 1999. — P. 166—174.
- [6] Gulbins E., Jekle A., Ferlinz K. et al. Physiology of apoptosis // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2000. — № 4. — P. 605—615.
- [7] Kroemer G., Reed C. Mitochondrial control of cell death // Nat. Med. — 2000. — P. 513—519.
- [8] Pugsley M.K., Penz W.P., Walker M.J., Wong T.M. Antiarrhythmic effects of U-50, 488H in rats subject to coronary artery occlusion // Eur. J. Pharmacol. — 1992. — № 1. — P. 15—19.
- [9] Sasaki N., Sato T., Ohler A. et al. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide // Circulation. — 2000. — P. 439—445.
- [10] Wild K.D., Vanderah T., Mosberg H.I. et al. Opioid  $\delta$ -receptor subtypes are associated with different potassium channels // Eur. J. Pharmacol. — 1991. — P. 135—136.

**THE ROLE OF OPIATES AND  $K_{ATP}^{+}$  -CHANNELS  
OF PLASMA AND CELL MEMBRANES  
MITOCHONDRIAL KIDNEYS  
IN THE DEVELOPMENT OF APOPTOSIS**

**I.A. Komarevtseva, K.V. Komarevtseva**

Department of medical chemistry LGMU  
*50 let Oboroni Luganska boulevard, Lugansk, Ukraina, 91045*

**Y.A. Belous**

Department of psychotherapy and narcology FIPMS  
Peoples' Friendship University of Russia  
*Mikluho-Maklaya str., 21, k. 3, Moscow, Russia, 117198*

The study of researching is to examine the role of opiates and channels of plasma and mitochondrial membrane of kidney cells in the development of apoptosis.

In this experiment rats were used white-male mice of sixteen-eighteen weeks of age. Animals were formed renal tubular injury with help of two models — ischemic and «glitserolnoy» (intramuscular introduction of 50% solution of glitserol). Dalargin was injected 20 minutes before the renal tubular injury.

As a result of our established mechanism of action of opioids in the kidney cells.

**Key words:** opiates, apoptosis, dalargin, renal tubular injury.