

Круглов С.В., Терехина О.Л., Смирнова Е.А., Кашаева О.В., Белкина Л.М.

Антиаритмическое действие олигонуклеотидов сопровождается активацией синтеза белка теплового шока HSP70 в сердце у крыс

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

В последние годы появились данные, что олигонуклеотиды (ОГН) обладают защитным действием при различной патологии: они ограничивают развитие гипертрофии миокарда и сердечной недостаточности, тормозят онкологические процессы. Однако механизмы защитного действия олигонуклеотидов мало изучены. Так, неизвестно, связаны ли их протекторные эффекты с активацией синтеза белков теплового шока (heat shock protein, HSP). Цель исследования состояла в изучении влияния ОГН на аритмии, вызванные ишемией и реперфузией миокарда, и уровень HSP70 в сердце. В качестве источника ОГН был использован медицинский препарат «Деринат» (ФП «Техномедсервис», РФ). Крысам-самцам популяции Вистар предварительно вводили «Деринат» в течение 7 дней (в/м, 7,5 мг/кг). Аритмии оценивали в течение 10 мин локальной окклюзии левой коронарной артерии и 5 мин реперфузии. Белок HSP70 определяли в левом желудочке сердца методом Вестерн-блот анализа. В период ишемии препарат уменьшал длительность экстрасистолии в 13 раз и в 1,5 раза частоту возникновения желудочковой тахикардии. При реперфузии препарат уменьшал частоту возникновения желудочковой фибрилляции более чем в 2 раза, по сравнению с контролем, (соответственно 23% vs 56%) и в 5 раз ее длительность ($8,4 \pm 2,3$ с vs $48,1 \pm 18,7$ с). Деринат увеличивал уровень HSP70 в сердце на 65%. Заключение. Предполагается, что вызванная ОГН активация синтеза HSP70, является одним из механизмов, увеличивающих резистентность сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям миокарда.

Ключевые слова: олигонуклеотиды, стресс-белки, HSP70, ишемия миокарда, реперфузия, аритмии.

Для цитирования: Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 16-20.

Kruglov S.V., Terekhina O. L., Smirnova E.A., Kashaeva O.V., Belkina L.M.

Antiarrhythmic effect of oligonucleotides accompanied by activation of HSP70 protein in the heart of rats

Federal State Budgetary Scientific Department «Institution of General Pathology and pathophysiology» Moscow, 125315, Russia

The mechanisms of the protective effect of oligonucleotides (OGN) during pathological processes are poorly understood. The goal of this work was to study the effect of OGN on arrhythmias induced by myocardial ischemia and reperfusion, and the HSP70 level in the heart. As a source of OGN was used the drug «Derinat» («Technomedservis», Russia). In male Wistar rats were pre-treated the drug for 7 days (i/m, 7.5 mg/kg). The intensity of the arrhythmias was assessed by ECG during 10 min occlusion of the left coronary artery and subsequent 5 min of reperfusion. Protein HSP70 determined in the left ventricle of the heart by Western-blot analysis. During ischemia, this drug reduced duration of extrasystolia by 13 times and the incidence of ventricular tachycardia by 1.5 times. During reperfusion the drug reduced the incidence of ventricular fibrillation, a more than 2-fold, as compared with the control (respectively 23% vs 56%) and by 5 times its duration (8.4 ± 2.3 vs 48.1 ± 18.7 sec). «Derinat» increased the HSP70 level in the heart by 65% compared with control. Conclusion: These data support the fact that the activation of HSP70 synthesis, induced by OGN is one of the mechanisms that increases the heart resistance to the ischemic and reperfusion damages.

Key words: oligonucleotides, stress-proteins, HSP70, arrhythmias, myocardial ischemia, reperfusion.

For citation: Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2015; 59(4): 16-20.

For correspondence: Belkina L.M., e-mail: belkinal@yandex.ru

В последние годы появились данные, что олигонуклеотиды (короткие фрагменты ДНК) обладают защитным действием при разной патологии: они ограничивают развитие гипертрофии миокарда и сердечной недостаточности, связываясь с toll-подобным рецептором 9 (TLR9) [1], тормозят онкологические процессы [2]. Созданный на основе натуральных олигонуклеотидов препарат деринат (натриевая соль ДНК), обладает широким спектром терапевтических эффектов. Препарат широко используется для иммуннокоррекции при разных патологиях у детей и взрослых [3], а также в кардиологии [4, 5]. Есть данные об антиаритмическом действии дерината при действии адреналина [4]. Однако механизмы защитного действия олигонуклеотидов мало изучены. Так, неизвестно, связаны ли их протекторные эффекты с активацией синтеза белков теплового шока (heat shock protein, HSP). Известно, что HSP70 обладает кардиопротекторным действием при ишемических и реперфузионных повреждениях миокарда [6—8]. Защитное действие некоторых HSP, а именно, HSP70, обусловлено тем, что они участвуют в восстановлении и репарации поврежденных белков, выполняя функцию молекулярных шаперонов. Активация синтеза HSP70 происходит под действием денатурированных белков [9], активных форм кислорода [10] и оксида азота [11]. Установлено, что в индукции HSP70 участвует ядерный фактор транскрипции NF- κ B (nuclear transcription factor κ B) [2]. Вместе с тем, есть данные, что активация NF- κ B может происходить и под действием экзогенных ДНК [13], содержание которых в крови увеличивается при различной патологии [14]. Эти факты дают основание предположить, что одним из механизмов защитного действия олигонуклеотидов является активация синтеза HSP70.

Цель исследования состояла в изучении влияния олигонуклеотидов на аритмии, вызванные ишемией и реперфузией миокарда, и уровень HSP70 в сердце.

Методика

В данной работе в качестве источника олигонуклеотидов был использован вышеуказанный препарат деринат (ФП «Техномедсервис», РФ). Крысам-самцам популяции Вистар массой 340—360 г препарат вводили в/м, однократно в течение 6 дней в дозе 7,5 мг/кг и на 7-й день за 40 мин до эксперимента. Контрольным крысам вводили физиологический раствор. Опыт проводили под уретановым наркозом (1,5 г/кг, в/бр) при вскрытой грудной клетке и искусственной вентиляции легких атмосферным воздухом (аппарат ВИТА-1, СССР). Локальную ишемию миокарда вызывали путем перевязки

нисходящей ветви левой коронарной артерии на 10 мин, затем лигатуру распускали и в течение 5 мин проводили реперфузию. Одновременно регистрировали ЭКГ в I отведении с помощью полиграфа RM-6000 (фирмы Nihon-Koden, Япония). Критерием ишемии служили цианоз передней стенки и верхушки левого желудочка и подъем сегмента ST в I отведении. По ЭКГ подсчитывали длительность разного типа аритмий в секундах: экстрасистолии, желудочковой тахикардии, желудочковой фибрилляции и брадиаритмий. Оценивали также частоту аритмий, то есть количество животных, у которых возникали те или иные аритмии, результаты выражали в процентах от общего числа животных в группе.

Уровень индуцибельной HSP70 оценивали в левом желудочке сердца у крыс, не подвергавшихся ишемии и реперфузии миокарда. Деринат им вводили по выше описанной схеме в дозах 0,75 мг/кг и 7,5 мг/кг. Белок HSP70 определяли методом Вестерн-блот анализа. Содержание белка определяли с помощью поликлональных антител к HSP70 (Santa Cruz Biotechnology, США), стандарта HSP70 в качестве положительного контроля и вторых антител (Santa Cruz Biotechnology, США). Визуализацию антигенной мишени осуществляли по хемилюминесценции с использованием реактивов «ECL» («Amersham») и рентгенографической пленки («Kodac»). Количественную денситометрическую обработку полученных иммуноблотов проводили путем сканирования и анализа оптической плотности блотов с помощью компьютерной программы Photoshop. Результаты представляли в виде репрезентативных диаграмм, как отношение площади сигнала в пикселях к интенсивности сигнала.

Результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента и U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. Данные усреднялись по группам и приводились как среднее \pm SEM. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Опыт проводили с соблюдением международных норм по гуманному обращению с экспериментальными животными.

Результаты и обсуждение

ЧСС была сходной у контрольных крыс и у крыс, получавших деринат (соответственно 340 ± 16 уд./мин и 330 ± 14 уд./мин). Из таблицы видно, что деринат оказывал выраженное антиаритмическое действие при ишемии и реперфузии. В период ишемии антиаритмическое действие дерината в наибольшей степени проявлялось в отношении экстрасистолии, длительность которой в среднем была меньше, чем в контроле в 13 раз. Препарат в 1,5 раза

Влияние дерината на интенсивность аритмий при локальной ишемии и реперфузии миокарда

Серии опытов	Экстрасистолия		Желудочковая тахикардия		Желудочковая фибрилляция	
	Частота (%)	Длительность (с)	Частота (%)	Длительность (с)	Частота (%)	Длительность (с)
Ишемия						
Контроль (n = 9)	100	37,3 ± 15,6	56	7,7 ± 2,6	11	6,2 ± 5,2
Деринат (n = 13)	69	2,6 ± 0,8*	31	8,3 ± 3,1	8	6,0 ± 3,2
Реперфузия						
Контроль (n = 9)	67	2,4 ± 1,0	78	32,8 ± 9,5	56	48,1 ± 18,7
Деринат (n = 13)	61	6,1 ± 2,0	61	16,6 ± 3,7#	23	5,6 ± 2,3#

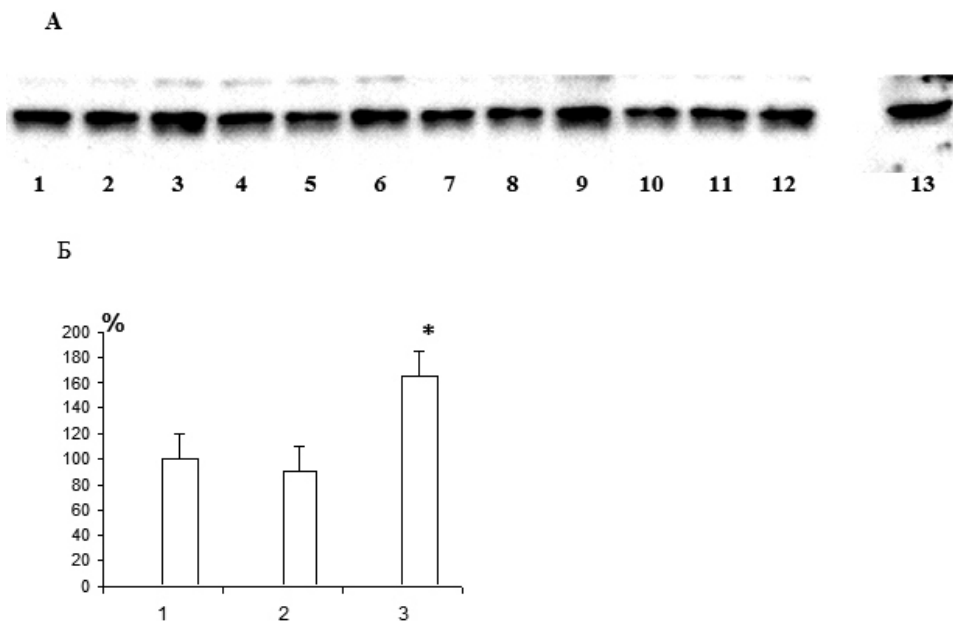
Примечание. Цифры в скобках — количество животных в каждой серии. *)<0,05 — при сравнении с контролем по t-критерию Стьюдента; #)<0,05 — при сравнении с контролем по U-критерию Вилкоксона—Манна—Уитни.

уменьшал частоту возникновения желудочковой тахикардии. При реперфузии, в отличие от ишемии, у контрольных животных наблюдались более тяжелые нарушения ритма в виде частой и длительной фибрилляции желудочков и брадиаритмий. В этот период препарат не оказывал существенного влияния на выраженность экстрасистолии, но эффективно ограничивал развитие тяжелых аритмий: препарат уменьшал частоту возникновения желудочковой фибрилляции более чем в 2 раза, по сравнению с контролем, и в 5 раз ее длительность. Кроме того, в группе, получавшей деринат, не было ни одного случая остановки сердца от желудочковой фибрилляции, в то время как в контроле остановка наблюдалась в 22% случаев. Деринат уменьшал частоту тяжелых брадиаритмий

с 44% в контроле до 30%, а их длительность с 11—28 с в контроле до 5—14 с. Во время реперфузии препарат не влиял на частоту желудочковой тахикардии, но в 2 раза уменьшал ее длительность.

Деринат вызывал значительную активацию системы HSP70 в сердце. На рис. 1А и 1Б видно, что препарат в дозе 7,5 мг/кг увеличивал уровень HSP70 на 65%, по сравнению с контролем, в то время как на порядок меньшая доза препарата не влияла на уровень белка.

Полученные результаты показали, что антиаритмическое действие олигонуклеотидов, содержащихся в деринате, сопровождается увеличением уровня HSP70 в сердце. Представленные результаты согласуются с данными других исследований. Так, показана



Влияние дерината на уровень HSP70 в сердце у крыс. А — репрезентативные иммуноблоты HSP70: 1,4,7,10 — контроль, 2, 5, 8, 11 — деринат в дозе 0,75 мг/кг, 3, 6, 9, 12 — в дозе 7,5 мг/кг, 13 — маркер HSP70. Б — по оси ординат уровень HSP70 в процентах к контролю, принятому за 100%. По оси абсцисс: 1 — контрольные крысы, 2 и 3 — крысы, получавшие деринат соответственно в дозах 0,75 мг/кг и 7,5 мг/кг *) <0,05 — достоверно по сравнению с контролем по U-критерию Вилкоксона—Манна—Уитни.

но, что при ишемии/реперфузии миокарда уровень HSP70 уменьшается, в то время как активация синтеза белка путем блокады его ингибитора оказывает защитное действие [8]. Известно, что клеточной основой возникновения аритмий при ишемии и реперфузии миокарда, является нарушение ионной проницаемости мембран, обусловленной повреждением мембраносвязанных ферментов, регулирующих ионные каналы. Белки HSP70, функционируя как шапероны, тормозят дисфункцию мембранных ферментов и соответственно нарушения ионной проводимости, тем самым ограничивая развитие аритмий. Спектр защитного действия HSP70 может быть довольно широким. В данной работе антиаритмический эффект дерината был особенно выражен при реперфузии миокарда. Как известно, реперфузионные, а в сущности, реоксигенационные, повреждения миокарда обусловлены резкой активацией перекисного окисления липидов. Показано, что HSP70 обладают антиоксидантной активностью, стимулируя активацию супероксиддисмутазы [15]. Не исключено, что ранее показанные антиоксидантные свойства дерината [16] связаны также с активацией синтеза HSP70. Защитный эффект HSP70 может быть связан и с защитой ферментов дыхательной цепи митохондрий, что препятствует истощению АТФ [15]. Показана также способность HSP70 ограничивать внутриклеточную аккумуляцию кальция [18]. Возможно, фрагменты ДНК способны индуцировать и другие HSP с защитными свойствами, например HSP20, кардиопротекторный эффект которого при ишемии и реперфузии миокарда связан с увеличением эффективности Ca^{2+} транспорта СПР [19]. В целом, описанные механизмы препятствуют дегенерации кардиомиоцитов благодаря цитопротекторным и репаративным свойствам дерината.

При анализе механизмов индукции HSP70 под действием олигонуклеотидов есть основание предположить, что иммуномодулирующая функция дерината сопровождается активацией синтеза HSP70. Показано, что одноцепочная ДНК через TLR-рецепторы, являющиеся главными компонентами системы врожденного иммунитета, вызывают активацию NF- κ B [13], который играет важную роль в каскаде иммунных реакций. Установлено, что TLR-рецепторы 3, 7, 8 и 9, располагающиеся внутриклеточно на поверхности эндосом, способны связываться с нуклеиновыми кислотами. После связывания TLR-рецепторов с лигандом одним из путей передачи внутриклеточного сигнала обеспечивается включением адаптерного белка MyD88 (белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88), который активирует NF- κ B. Последний инициирует в ядре транскрипцию генов не только провоспалительных цитокинов, но и многих

других генов, в том числе, как уже указывалось, и HSP70 [12]. Вполне вероятно, что фрагменты ДНК, содержащиеся в препарате деринат, индуцируют активацию синтеза HSP70 по такому же механизму, то есть, реализуется та же цепочка событий, в результате которых происходит активация NF- κ B с последующей индукцией HSP70. Полученные результаты говорят в пользу того, что вызванная олигонуклеотидами активация синтеза HSP70, является одним из механизмов, увеличивающих резистентность сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям миокарда.

References

1. Yang L., Cai X., Liu J., Jia Z., Jiao J., Zhang J. et al. CpG-ODN attenuates pathological cardiac hypertrophy and heart failure by activation of PI3K α -Akt signaling. *PLoS One*. 2013; 8(4): e62373.
2. Alyamkina E.A., Lixacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Dolgova E.V., Rogachev V.A. i dr. The action of the exogenous DNA associated with protamine on the experimental tumors growth of mice. *Voprosy onkologii*. 2009; 55(6): 765-8. (in Russian)
3. Kaplina E.N., Vajnberg Yu.P. Derinat. The natural immunomodulator for children and adults. Moskva: Nauchnaya kniga; 2005. (in Russian)
4. Svyatkina O.I., Balashov V.P., Balykova L.A., Shhukin S.A. Antiarrhythmic activity of Derinat under the experimental conditions. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya*. 2004; 1: 22-4. (in Russian)
5. Zubeeva G.N., Kopejkina I.A., Goroxova Z.A., Motylev I.M. Echocardiographic parameters of myocardial contractility in patients with atrial fibrillation in the treatment by immunomodulators. *Vestnik aritmologii*. 2005; №39. Suppl A. 37-81. (in Russian)
6. Mestrlil R., Chi S.H., Sayen M.R., O'Reilly K., Dillmann W.H. Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. *J Clin Invest*. 1994; 93(2): 759-67.
7. Chiu J.H., Cheng Y.F., Wang J.Y., Hsu CF. Remote pharmacological preconditioning on median nerve territory increases Hsp32 expression and attenuates ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Life Sci*. 2012; 90(17-18): 629-36.
8. Zhao B., Sun G., Feng G., Duan W., Zhu X., Chen S. et al. Carboxy terminus of heat shock protein (HSP) 70-interacting protein (CHIP) inhibits HSP70 in the heart. *J Physiol Biochem*. 2012; 68(4): 485-91.
9. Matts R.L., Hurst R. The relationship between protein synthesis and heat shock proteins levels in rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem*. 1992; 267(25): 18168-74.
10. Kukreja R.C., Kontos M.C., Loesser K.E., Batra S.K., Qian Y.Z., Gbur C.J. Jr. et al. Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *Am J Physiol*. 1994; 267(6 Pt 2): H2213-H2239.
11. Malyshev I.Yu., Manukhina E.B., Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Vanin A.F. *FEBS Lett*. 1995; 370(3): 159-62.
12. Wilhide M.E., Tranter M., Ren X., Chen J., Sartor M.A., Medvedovic M., Jones W.K. Identification of a NF- κ B cardioprotective gene program: NF- κ B regulation of Hsp70.1 contributes to cardioprotection after permanent coronary occlusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 51(1): 82-9.

13. Wagner H., Bauer S. All is not Toll: new pathways in DNA recognition *J Exp Med.* 2006; 203(2): 265-8.

14. Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Yu., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P. et al. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004; 23(6-7): 879-83.

15. Suzuki K., Murtuza B., Sammut I.A., Latif N., Jayakumar J., Smolenski R.T. et al. Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation.* 2002; 106(12 Suppl 1): I270-6.

16. Konoplya A.A., Petrov S.V., Gavrilyuk V.P. Correction of the immune, cytokine and antioxidant status in patients with chronic salpingo-oophoritis. *Medicinskaya immunologiya.* 2006; 8(1): 97-100. (in Russian)

17. Vogt S., Portig I., Iqrsusi M., Ruppert V., Weber P., Ramzan R. Heat shock protein expression and change of cytochrome c oxidase activity: presence of two phylogenic old systems to protect tissues in ischemia and reperfusion. *J Bioenerg Biomembr.* 2011; 43(4): 425-35.

18. Szenczi O., Kemecei P., Miklys Z., Ligeti L., Snocckx L.H., van Riel N.A. et al. In vivo heat shock preconditioning mitigates calcium overload during ischaemia/reperfusion in the isolated, perfused rat heart. *Pflugers Arch.* 2005; 449(6): 518-25.

19. Qian J., Vafiadaki E., Florea S.M., Singh V.P., Song W., Lam C.K. et al. Small heat shock protein 20 interacts with protein phosphatase-1 and enhances sarcoplasmic reticulum calcium cycling. *Circ Res.* 2011; 108(12): 1429-38.

Поступила 02.11.15

Сведения об авторах:

Круглов Сергей Васильевич (*Kruglov S.V.*), канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии, e-mail: sergey9273@yandex.ru

Терехина Ольга Леонидовна (*Terekhina O.V.*), науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии, e-mail: terminator-ola@yandex.ru

Смирнова Елена Александровна (*Smirnova E.A.*), канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии, e-mail: smelal@yandex.ru

Кашаева Ольга Викторовна (*Kashaeva O.V.*), канд. мед. наук, доцент кафедры «Патологической физиологии» Московский Медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, e-mail: kashaeva@derinat.ru