

УДК 612.17

Влияние активации β_2 -адренорецепторов в предсердиях мыши на силу сокращения, Са-сигналы и продукцию оксида азота

Ю. Г. Одношивкина, А. М. Петров*, А. Л. Зефирова

Казанский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, 420012, Россия, Татарстан, Казань, ул. Бутлерова, 49

*E-mail: fysio@rambler.ru

Поступила в редакцию 28.12.2010 г.

РЕФЕРАТ С помощью тензометрического и флуоресцентного методов исследовали влияние селективного агониста β_2 -адренорецепторов (фенотерола) на функционирование предсердий мыши. Показано, что чем выше концентрация фенотерола (в диапазоне 1–50 мкМ), тем значительнее положительный инотропный эффект и тем быстрее он развивается. При использовании фенотерола в относительно низких дозах (1 и 5 мкМ) эффект проявлялся спустя 20 мин после аппликации агониста, а в высоких дозах (25, 50, 300 мкМ) – в первую минуту аппликации. Фенотерол в концентрации 5 мкМ в течение 10–15 мин увеличивал амплитуду Са-сигналов в кардиомиоцитах (что отражает повышение концентрации ионов Са во время систолы) и синтез оксида азота. Однако через 20 мин после добавления агониста продукция оксида азота снижалась, а амплитуда Са-сигналов сохранялась на повышенном уровне. Фенотерол в концентрации 50 мкМ приводил к быстрому возрастанию величины Са-сигналов, тогда как продукция оксида азота в этот период снижалась и начинала увеличиваться примерно через 10 мин после аппликации агониста. Предполагается, что динамика и выраженность положительного инотропного эффекта при фармакологической стимуляции β_2 -адренорецепторов определяются скоростью увеличения амплитуды Са-сигналов и изменением продукции оксида азота.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА β_2 -адренорецепторы, фенотерол, кальций, оксид азота, сократимость, кардиомиоциты предсердий.

ВВЕДЕНИЕ

Один из основных механизмов, контролирующих сердечную деятельность, связан с воздействием катехоламинов (адреналина и норадреналина) на сопряженные с G-белками β -адренорецепторы кардиомиоцитов [1, 2]. По чувствительности к фармакологическим агентам и структурным особенностям выделяют три вида β -адренорецепторов – β_1 , β_2 и β_3 . Все виды β -адренорецепторов экспрессируются в сердце. Функция β_1 -адренорецепторов хорошо изучена в сердце. О β_2 -адренорецепторах сведений недостаточно: изучено их значение в контроле тонуса сосудов сердца и скелетных мышц, просвета бронхов и метаболизма организма [3].

Содержание β_2 -адренорецепторов особенно высоко в кардиомиоцитах предсердий. Так, если во всем сердце доля β_2 -адренорецепторов достигает 30–40% от общего количества β -адренорецепторов [2], то в кардиомиоцитах предсердий человека их доля

превышает 55% [4]. Стимуляция β_2 -адренорецепторов увеличивает силу сокращения кардиомиоцитов желудочков сердца крысы, не влияя заметно на скорость расслабления [5]. Предполагается, что активация β_2 -адренорецепторов вызывает положительную инотропную реакцию без повышения риска возникновения аритмий и внезапной смерти животного [6]. Следует упомянуть, что при стимуляции β_2 -адренорецепторов инотропный эффект может быть и отрицательным, например, в сосочковых мышцах сердца морской свинки [7].

Эффект стимуляции β_2 -адренорецепторов на сократимость кардиомиоцитов желудочков определяется взаимодействием рецептора с Gs-белком, стимулирующим аденилатциклазный каскад, который приводит к активации протеинкиназы А. Под влиянием этой киназы увеличиваются вероятность открытия и проводимость части Са-каналов L-типа и, следовательно, количество поступающих в цито-

плазму в течение потенциала действия ионов Ca [8, 9]. Однако активированные β_2 -адренорецепторы также стимулируют Gi-белки, которые угнетают аденилатциклазный каскад и таким образом ограничивают положительный инотропный эффект агонистов β_2 -адренорецепторов [10, 11]. Активация Gi-белков ведет к стимуляции каскада фосфоинозитол-3-киназа (ФИЗК)–протеинкиназа В, направленного на поддержание выживания клеток, их защиту от действия активных форм кислорода и гипоксии [12, 13]. Путь ФИЗК–протеинкиназа В может запускать также увеличение продукции оксида азота (NO), действуя на гуанилатциклазную систему, способен ослаблять эффекты агонистов β_2 -адренорецепторов [14, 15], но вместе с тем препятствовать десенситизации β_2 -адренорецепторов [16]. Высказываются предположения о кардиопротекторной роли β_2 -адренорецепторов, и агонисты β_2 -адренорецепторов позиционируются как перспективные фармакологические агенты [13]. Так, у мышей со сверхэкспрессией β_2 -адренорецепторов не развивается сердечная недостаточность и отсутствуют признаки разрушения кардиомиоцитов на фоне повышенной частоты и силы сердечных сокращений, наблюдаемых даже в отсутствие стимуляции β_2 -адренорецепторов эндогенными лигандами [17]. Дело в том, что независимо от присутствия агонистов во внеклеточной среде β_2 -адренорецепторы могут спонтанно переходить в активное состояние [18]. Интересно, что при спонтанной активации β_2 -адренорецепторов сократимость увеличивается без изменения входящего Ca-тока через Ca-каналы L-типа [19].

β_2 -Адренорецепторы – очень «гибкие» молекулы, у которых охарактеризовано несколько активных состояний (конформаций). В зависимости от конформации изменяются свойства рецептора, в том числе способность связываться с эффекторными сигнальными белками, которыми могут быть не только G-белки, но и тирозинкиназа Src, фактор, регулирующий Na/H-обмен, аррестин, N-этилмалеимидчувствительный фактор, некоторые каркасные белки [20–24]. Недавно показали, что разные агонисты переводят β_2 -адренорецепторы в специфичные активные конформации, поэтому от типа агониста зависит клеточный ответ (этот феномен называют «функциональной селективностью» агонистов) [25]. Фенотерол – один из широко применяемых в клинике и эффективных агонистов β_2 -адренорецепторов короткого действия. Под его влиянием в гладкомышечных клетках дыхательных путей человека существенно возрастает уровень cAMP и активируются MAP-киназы (mitogen-activated protein kinase) [25], а в эндотелиальных клетках усиливается синтез NO [26]. Следует отметить,

что под действием фенотерола β_2 -адренорецепторы подвергаются интенсивному фосфорилированию киназами рецепторов, сопряженных с G-белками, и в дальнейшем поглощаются в ходе клатрин-опосредованного эндоцитоза. В итоге продолжительное действие фенотерола ведет к десенситизации и снижению количества β_2 -адренорецепторов на поверхности бронхиального эпителия [25, 27]. Появляются данные об уникальных свойствах фенотерола и его стереоизомеров, которые могут использоваться для создания фармакологических препаратов, обладающих высокой степенью селективности и выраженными кардиопротекторными свойствами [28, 29].

Роль β_2 -адренорецепторов кардиомиоцитов предсердий не совсем понятна. Имеются сведения об увеличении силы сокращений и входящего Ca-тока при стимуляции β_2 -адренорецепторов предсердий морской свинки, кошки и человека [15, 30, 31]. Однако у мышей, сверхэкспрессирующих β_2 -адренорецепторы человека, активация β -адренорецепторов предсердий изопrenalином вызывает негативный инотропный эффект, тогда как в норме изопrenalин, действуя преимущественно через β_1 -адренорецепторы, оказывает положительный инотропный эффект [32, 33]. В представленной работе изучено влияние разных доз фенотерола-рацемата – широко применяемого в медицинской практике агониста β_2 -адренорецепторов, на силу сокращений предсердий, амплитуду Ca-сигналов и продукцию NO.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проведены на изолированных предсердиях белых мышей. Использовали стандартный раствор Кребса для теплокровных животных следующего состава, mM: NaCl – 144.0, KCl – 5.0, MgCl₂ – 0.1, CaCl₂ – 2.0, NaH₂PO₄ – 1.0, NaHCO₃ – 2.4, глюкоза – 11.0, который насыщали кислородом. pH растворов поддерживали на уровне 7.2–7.4 при температуре 20°C. Во время опыта препарат стимулировали электрическими импульсами сверхпороговой амплитуды с частотой 0.1–1 Гц через платиновые электроды. В большинстве опытов использовали аппликацию (20 мин) агониста β_2 -адренорецепторов (\pm)-фенотерола (Sigma, США) в концентрации 1–300 мкМ. В некоторых случаях применяли селективный блокатор β_2 -адренорецепторов – ICI-118.551 (Tocris, США) в концентрации 0.1 мкМ.

Тензометрия

Сокращения предсердий регистрировали с помощью установки PowerLab. Один конец изолированного предсердия подвязывали к фиксированному стержню, второй – к стержню, соединенному с тензодат-

чиком с чувствительностью 0–25 г (AD Instruments). Сигналы обрабатывали с помощью оригинальной компьютерной программы Chart, силу сокращения определяли в граммах.

Флуоресцентная микроскопия

Флуоресценцию наблюдали с помощью микроскопов OLYMPUS CX41 (со сменными монохроматическими источниками возбуждающего света) и OLYMPUS BX51 (оснащенного конфокальной системой DSU) с использованием объективов LMPlanFI 20×/0.40 и UPlanSApo 60×/1.20W. Изображения регистрировали быстродействующими CCD-видеокамерами фирмы OLYMPUS, черно-белой F-View II и цветной DP71. Для обработки изображений применяли программы Cell[^]A, Cell[^]P и ImagePro. Интенсивность свечения оценивали в относительных единицах (отн.ед.), соответствующих значению яркости в пикселях.

Измерение внутриклеточной концентрации ионов Ca. Изменения концентрации Ca²⁺ определяли с помощью красителя Fluo-4, который позволяет точно измерять концентрации Ca²⁺ в диапазоне от 1 мкМ до 1 мМ. Fluo-4 слабо флуоресцирует в отсутствие Ca²⁺, однако при связывании с ионами Ca флуоресценция Fluo-4 увеличивается более чем в 100 раз [34]. Мы применяли мембранопроникающую форму красителя, Fluo-4-AM (Molecular Probes, США), которую растворяли в DMSO (диметилсульфоксид, Sigma, США) и хранили в замороженном виде (не более недели) в темноте. Непосредственно перед экспериментом в порцию Fluo-4-AM добавляли неионный детергент Pluronic F-127 (Molecular Probes, США), который способствует растворению неполярного Fluo-4-AM в водном (физиологическом) растворе. В рабочем растворе конечная концентрация Fluo-4-AM составляла 1 мкМ, а содержание DMSO и Pluronic F-127 не превышало 0.0005%. Препарат изолированного предсердия выдерживали в растворе, содержащем 1 мкМ Fluo-4-AM, в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем в течение 40 мин препарат перфузировали физиологическим раствором (в течение этого времени в цитоплазме заканчивалась реакция деэтерификации Fluo-4-AM и образования гидрофильного Fluo-4, который не может проходить через мембрану во внеклеточную среду [34]). После этого начиналась регистрация флуоресценции в пучке кардиомиоцитов изолированного предсердия. Флуоресценцию красителя возбуждали короткими (около 1 с) вспышками света с длиной волны 480 нм, а свечение регистрировали с использованием эмиссионного светофильтра, пропускающего свет с длиной волны более 515 нм. В ходе циклов сокращения–расслабления препарата наблюдались периодические изменения свечения

Ca-сенсора в виде вспышек («Ca-сигналов»): яркость свечения повышалась в момент сокращения и снижалась при расслаблении. Ca-сигналы отражают повышение концентрации ионов Ca, которое запускает сокращение кардиомиоцитов. Для оценки амплитуды Ca-сигналов из значения максимальной флуоресценции (в период систолы) вычитали минимальную величину флуоресценции в период диастолы.

Измерение концентрации оксида азота (NO). Продуцию оксида азота детектировали при помощи маркера DAF-FM-диацетата (Molecular Probes, США), который возбуждали светом длиной волны $\lambda = 495$ нм, а при регистрации флуоресценции применяли эмиссионный фильтр, пропускающий свет с длиной волны более 515 нм. DAF-FM-диацетат легко проходит через клеточные мембраны, а внутри клетки деацетируется внутриклеточными эстеразами и превращается в DAF-FM. DAF-FM практически не флуоресцирует до вступления в реакцию с NO, но при взаимодействии с NO его флуоресценция возрастает более чем в 160 раз [29]. DAF-FM растворяли в DMSO и хранили в замороженном виде в защищенном от света месте. Препарат изолированного предсердия выдерживали в растворе с 2 мкМ DAF-FM-диацетатом в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее препарат перфузировали физиологическим раствором, не содержащим краситель, в течение 20 мин (время, за которое заканчивается реакция деацетилирования маркера [35]), после чего регистрировали флуоресценцию в пучке кардиомиоцитов изолированного предсердия.

Статистический анализ проводили при помощи программы Origin Pro. Результаты измерений представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (n – число независимых опытов). Достоверность различий определяли с помощью критериев Стьюдента и ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дозозависимость инотропного эффекта фенотерола

Амплитуда сокращений. Добавление фенотерола в концентрации от 1 до 300 мкМ вызывало существенное увеличение силы сокращения (рис. 1а,б). Аппликация 1 и 5 мкМ фенотерола повышала силу сокращений до $134.0 \pm 4.4\%$ ($p < 0.01$, $n = 5$) и $144.6 \pm 5.1\%$ ($p < 0.01$, $n = 5$) относительно контрольного значения соответственно. Под действием фенотерола (25 и 50 мкМ) сила сокращений еще более возрастала – до $159.7 \pm 5.5\%$ ($p < 0.01$, $n = 6$) и $176.2 \pm 6.6\%$ ($p < 0.01$, $n = 8$). Однако в концентрации 300 мкМ фенотерол повышал амплитуду сокращений

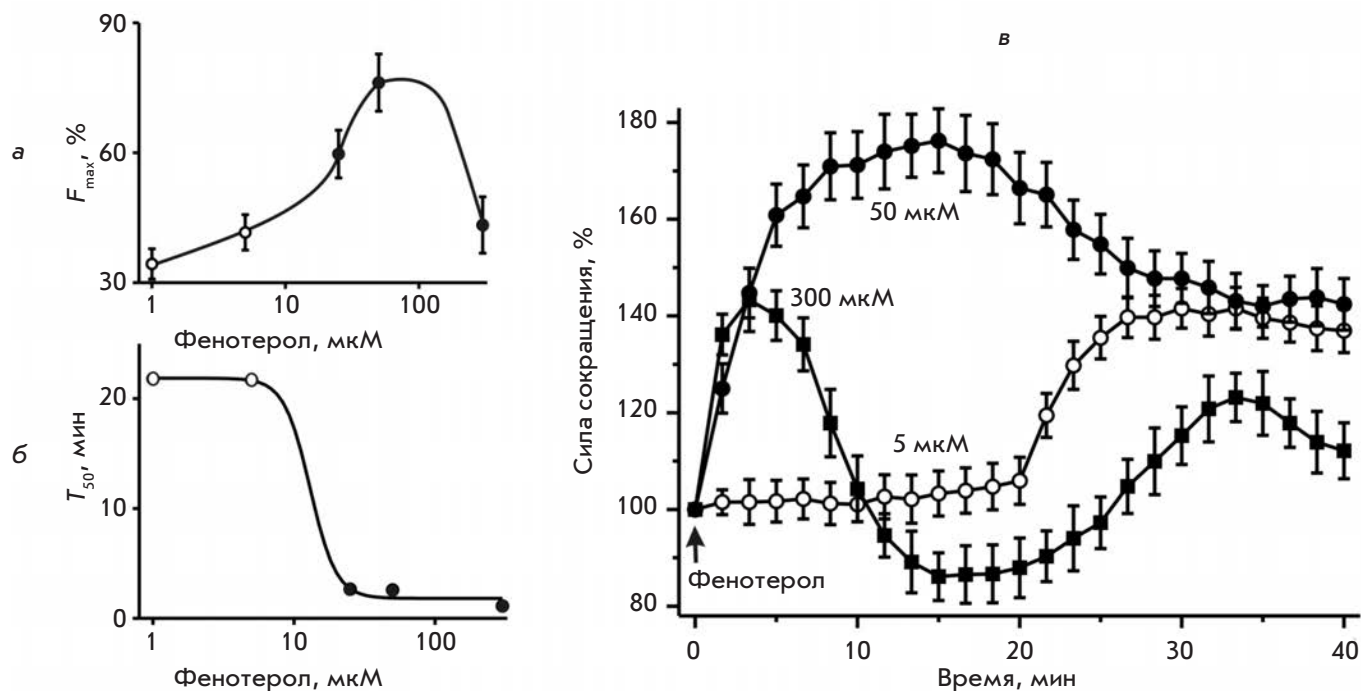


Рис. 1. Влияние фенотерола на силу сокращения изолированных предсердий.

а, б – Влияние разных доз фенотерола на сократимость (а) и время появления эффекта (б). По оси ординат: а – максимальная амплитуда сокращений (F_{max} , за «0» принято значение до аппликации фенотерола); б – время от начала аппликации фенотерола до момента, когда амплитуда сокращения достигала 50% от максимальной (T_{50}). По оси абсцисс – логарифмическая шкала концентраций (μM).

в – Изменение силы сокращения предсердий под действием 5, 50 и 300 μM фенотерола (светлые, темные кружки и темные квадраты соответственно). По оси ординат – сила сокращения в % (за 100% принята сила сокращения до аппликации фенотерола). Момент начала аппликации фенотерола обозначен стрелкой.

Данные об изменении силы сокращений предсердий под влиянием фенотерола в концентрации 1 ($n = 5$), 5 ($n = 5$), 25 ($n = 6$), 50 ($n = 8$), 300 ($n = 5$) μM получены в независимых экспериментах.

только до $143.3 \pm 6.5\%$ ($p < 0.01$, $n = 5$) (рис. 1в). Учитывая, что β_2 -адренорецепторы относительно быстро подвергаются десенситизации при действии высоких доз агонистов, можно предположить, что не столь выраженное влияние фенотерола в концентрации 300 μM на сократимость скорее всего связано с процессами десенситизации [27, 36].

Время проявления эффекта. Скорость проявления положительного инотропного эффекта фенотерола изменялась в зависимости от его концентрации: чем выше концентрация, тем раньше наблюдалось увеличение силы сокращений (рис. 1а,б). Увеличение амплитуды сокращений начиналось только через 20 мин от начала аппликации фенотерола в концентрации 1 и 5 μM , а максимальная сила сокращений отмечалась через 30–40 мин. При применении 25 и 50 μM фенотерола амплитуда сокращений увеличивалась существенно быстрее: примерно через 15 и 13

мин после добавления агониста сила сокращений достигала максимального значения. Фенотерол в концентрации 300 μM уже через 3 мин обеспечивал максимальную амплитуду сокращений.

«Отставленный» эффект фенотерола. Как уже было сказано, положительный инотропный эффект фенотерола в низких концентрациях регистрируется очень поздно (через 20–25 мин) (рис. 1в). Чтобы выяснить, с чем связано столь медленное развитие эффекта, мы провели дополнительные опыты, в которых раствор с фенотеролом (5 μM) через 20 мин (т.е. до начала усиления сокращений) заменяли нормальным раствором Кребса. Оказалось, что несмотря на отсутствие фенотерола в наружном растворе, сила сокращений возрастала. Через 10 мин после удаления фенотерола из раствора, омывающего препарат, амплитуда сокращений достигала максимума и составляла $141.6 \pm 4.1\%$ от контрольного значения

($p < 0.01$, $n = 8$), а затем постепенно уменьшалась. Это свидетельствует о том, что отставленный эффект низких концентраций агониста β_2 -адренорецептора связан с запуском внутриклеточных сигнальных систем, действие которых развивается медленно.

В дальнейшем использовались две концентрации фенотерола: 5 мкМ, при которой наблюдался отставленный во времени эффект, и 50 мкМ, при которой сила сокращений быстро увеличивалась (рис. 1в). Следует отметить, что на фоне селективного блокатора β_2 -адренорецепторов (0.1 мкМ ICI-118.551) положительный инотропный эффект фенотерола в концентрации 5 и 50 мкМ не проявлялся (данные не приведены).

Влияние фенотерола на Са-сигналы

Динамика изменений внутриклеточной концентрации ионов кальция, запускающих сокращения кардиомиоцитов, существенно меняется под воздействием фенотерола (рис. 2). Низкая концентрация фенотерола (5 мкМ) ведет к постепенному увеличению амплитуды Са-сигналов. К 3 мин аппликации β_2 -агониста амплитуда Са-сигналов достигала $122.6 \pm 4.7\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$), а к 10 мин – $152.1 \pm 4.9\%$ ($p < 0.01$, $n = 7$) от исходных значений. После 15 мин аппликации агониста амплитуда Са-сигналов несколько снижалась, а через 20 мин стабилизировалась на повышенном уровне – около 130–140%. Через 5 мин после замены наружного раствора раствором без фенотерола величина Са-сигналов составляла $133.6 \pm 4.7\%$ ($p < 0.01$, $n = 7$). Амплитуда Са-сигналов возвращалась к исходному уровню примерно через 60–70 мин после удаления фенотерола из внеклеточного раствора. Аппликация фенотерола в высокой концентрации (50 мкМ) вызывала повышение амплитуды Са-сигналов до $121.9 \pm 4.9\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$) уже через 30 с, а к 3 мин амплитуда достигала максимального значения – $154.5 \pm 4.8\%$ ($p < 0.01$, $n = 7$). Через 8 мин аппликации величина Са-сигналов начинала снижаться, и к 20 мин от начала действия фенотерола составляла $111.2 \pm 4.3\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$). Восстановление исходной величины Са-сигналов происходило через 50–60 мин после начала перфузии препарата раствором без фенотерола.

Воздействие фенотерола на продукцию оксида азота

Под влиянием фенотерола флуоресценция маркера DAF-FM (показатель продукции NO) в кардиомиоцитах предсердий достоверно возрастала (рис. 3). Фенотерол в низких дозах запускал постепенное увеличение продукции оксида азота, а к 20 мин аппликации фенотерола интенсивность флуоресценции увеличивалась до $104.0 \pm 0.7\%$ ($p < 0.05$, $n = 6$). После удаления фенотерола из наружного раствора флуоресценция быстро снижалась до $95.0 \pm 1.4\%$ ($p < 0.05$, $n = 6$)

от исходного уровня и в течение 10 мин возвращалась к исходному уровню. Под действием высокой дозы фенотерола в первые 5 мин аппликации наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции DAF-FM (к 5 мин интенсивность флуоресценции составляла $95.9 \pm 0.8\%$) ($p < 0.05$, $n = 6$). После 8 мин аппликации фенотерола интенсивность флуоресценции начинала возрастать и достигала $103.9 \pm 0.6\%$ ($p < 0.05$, $n = 6$) через 20 мин. После перфузии препарата раствором, не содержащим фенотерол, интенсивность флуоресценции превышала контрольный уровень в течение 10–15 мин и составляла 104.3–106.7% ($p < 0.05$, $n = 6$) от исходной величины.

ОБСУЖДЕНИЕ

Медленное развитие и стойкость эффектов фенотерола в концентрации 1 и 5 мкМ свидетельствуют о запуске при стимуляции β_2 -адренорецепторов внутриклеточных сигнальных систем, имеющих длительное действие. По нашему мнению, влияние фенотерола на инотропную функцию предсердий можно объяснить взаимодействием β_2 -адренорецепторов с несколькими внутриклеточными сигнальными каскадами, разнонаправленно регулирующими силу сокращения.

Ключевым фактором, определяющим силу сокращения сердечной мышцы, служит концентрация ионов Са в момент систолы в кардиомиоцитах. Сокращения кардиомиоцитов инициируются ионами Са, которые поступают в цитозоль из двух основных источников. Деполяризация мембраны во время потенциала действия открывает потенциал-управляемые Са-каналы, через которые ионы Са устремляются в цитоплазму, где связываются с риадиновыми рецепторами (Са-освобождающими каналами) саркоплазматического ретикулула. В итоге ионы Са лавинообразно освобождаются из ретикулула, и концентрация Ca^{2+} в цитоплазме достигает максимального значения. В наших опытах аппликация фенотерола приводила к существенному повышению величины Са-сигналов (рис. 2), что может объясняться увеличением входа Ca^{2+} через каналы плазматической мембраны. Известно, что β_2 -адренорецепторы, как и β_1 -адренорецепторы, связываются с Gs-белками, которые стимулируют аденилатциклазу, катализирующую синтез вторичного посредника — сАМР. В результате активируются сАМР-зависимые протеинкиназы, которые фосфорилируют специфичные белки-мишени [37]. Один из главных субстратов протеинкиназы А – Са-канал L-типа, который в фосфорилированном состоянии имеет большую проводимость и вероятность открытия и активируется при более негативных значениях мембранного потенциала [9, 31].

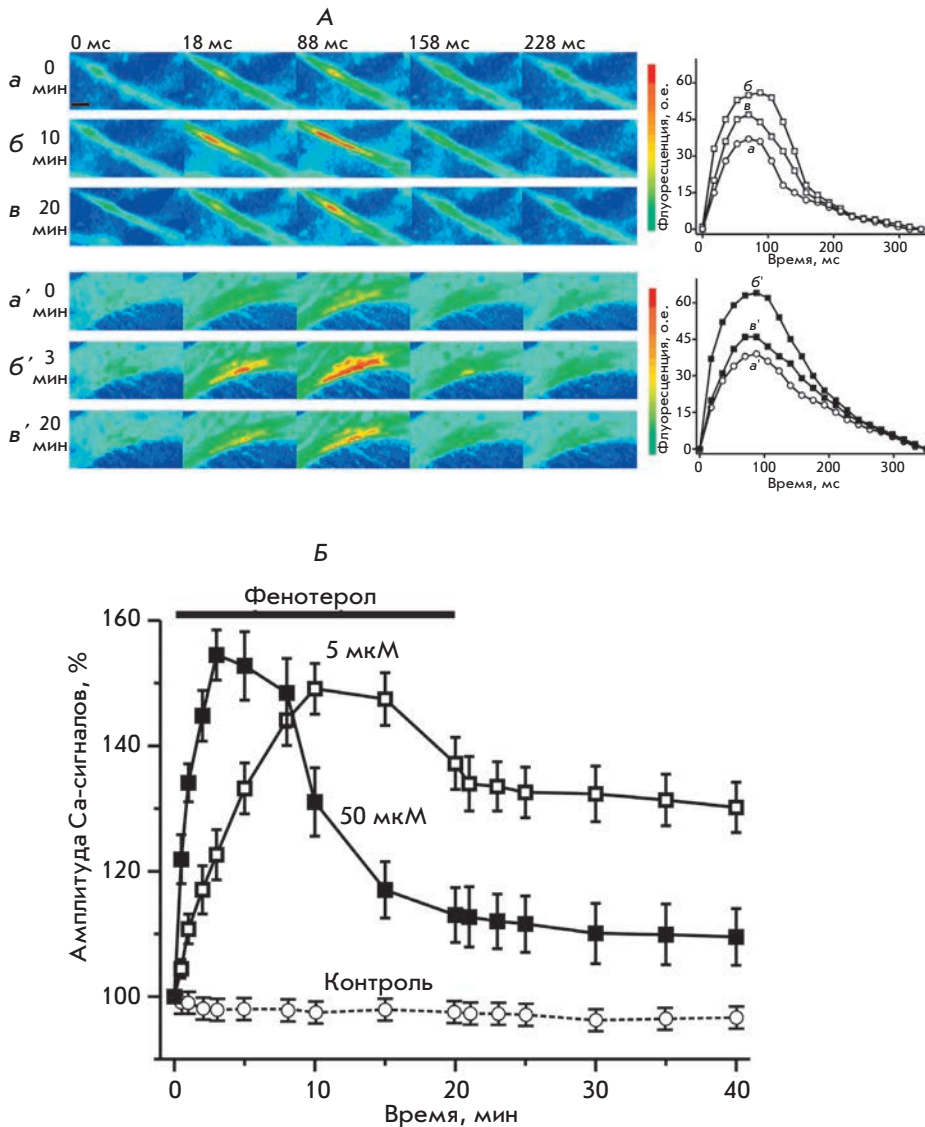


Рис. 2. Влияние фенотерола на Са-сигналы кардиомиоцитов в изолированных предсердиях. А – Изменение флуоресценции Са-индикатора Fluo-4, загруженного в кардиомиоциты изолированного предсердия. Представлены кадры (в псевдоцвете), иллюстрирующие Са-сигнал в кардиомиоцитах изолированного предсердия во время одиночного сокращения до (а, а') и после аппликации фенотерола в концентрации 5 (б, в) и 50 мкМ (б', в'). Над кадрами указано время от момента нанесения стимула (в мс): 0, 18, 88, 158, 228. Масштабная черта – 10 мкм. Справа – кривые изменения интенсивности флуоресценции Fluo-4 в ответ на стимул. По оси ординат – интенсивность флуоресценции в о.е. (за «0» принята величина флуоресценции до момента раздражения), по оси абсцисс – время (мс) от нанесения стимула. Б – Воздействие 5 (n = 7) и 50 (n = 7) мкМ фенотерола на амплитуду Са-сигналов в участках изолированных предсердий (светлые и черные квадраты соответственно). Светлыми кружками, соединенными пунктирной линией, показано изменение амплитуды Са-сигналов в отсутствие фенотерола (контроль, n = 5). По оси ординат – амплитуда Са-сигналов в % (за 100% принята амплитуда Са-сигнала до добавления фенотерола). Аппликация фенотерола обозначена чертой.

Нами обнаружен следующий интересный факт. Фенотерол в концентрации 5 мкМ вызывает медленное возрастание Са-сигналов, амплитуда которых остается повышенной после удаления фенотерола из раствора, омывающего препарат. В то же время в концентрации 50 мкМ фенотерол быстро увеличивает амплитуду Са-сигналов (рис. 2).

Можно представить три варианта объяснения данного феномена. Во-первых, можно предположить, что фенотерол в более высокой дозе начинает действовать не только на β_2 -, но и на β_1 -адренорецепторы, которые зависимы от протеинкиназы А образом активируют дополнительное количество Са-каналов. Так, константа связывания фенотерола (стереоизомеров R,R-1 и -2) с β_1 -адренорецепторами клеток НЕК оценивается примерно в 15–20 мкМ [28]. Кроме

того, наиболее эффективная концентрация фенотерола, под влиянием которой максимально увеличивается сила сокращений препаратов изолированных папиллярных мышц человека, составила 100 мкМ, при этом эффект фенотерола зависел от β_2 - и β_1 -адренорецепторов [38]. Однако такое объяснение противоречит нашим результатам, согласно которым селективный блокатор β_2 -адренорецепторов (0.1 мкМ ICI-118.551) полностью устранял положительный инотропный эффект 50 мкМ фенотерола. Вторым объяснением может быть вовлечение большего количества метаботропных β_2 -адренорецепторов, что приводит к усиленной продукции сАМР и активации большего числа молекул протеинкиназы А, которые интенсивнее фосфорилируют Са-каналы, делая их более активными [1]. Однако в кардио-

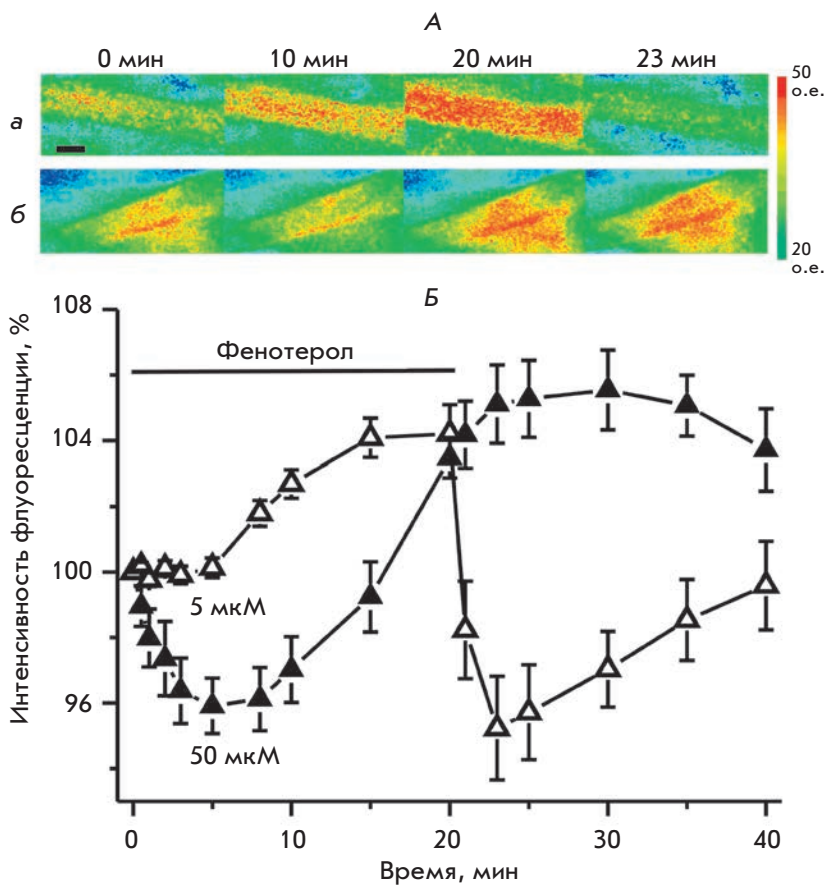


Рис. 3. Влияние фенотерола на продукцию оксида азота в кардиомиоцитах изолированных предсердий. А – Изменение интенсивности флуоресценции маркера DAF-FM, предварительно загруженного в кардиомиоциты изолированного предсердия, в ответ на аппликацию 5 (а) и 50 (б) мкМ фенотерола. Приведены изображения пучков кардиомиоцитов в изолированных предсердиях (интенсивность флуоресценции показана с помощью псевдоцвета). Масштабная черта – 10 мкм. Б – Динамика интенсивности флуоресценции маркера DAF-FM (показатель продукции оксида азота). По оси ординат – интенсивность флуоресценции в % (за 100% принята величина флуоресценции до добавления фенотерола). Фенотерол в концентрации 5 ($n = 6$) и 50 ($n = 6$) мкМ – светлые и черные треугольники соответственно. В контрольных условиях (без добавления фенотерола) флуоресценция маркера не изменялась (данные не представлены). Аппликация фенотерола обозначена чертой.

миоцитах желудочков крысы R,R -стереоизомер фенотерола при концентрации около 0.5 мкМ активирует практически все β_2 -адренорецепторы [39]. По приблизительным оценкам, используемый нами фенотерол-рацемат уже в концентрации 2 мкМ оккупирует около 90% β_2 -адренорецепторов эпителиальных клеток бронхов [27]. Поэтому вероятно, что под влиянием фенотерола в концентрации 5 и 50 мкМ активируется приблизительно одинаковое число β_2 -адренорецепторов. В-третьих, появляются данные о том, что в зависимости от дозы агониста β_2 -адренорецепторы могут «нанимать» для передачи сигнала внутрь клетки различные сигнальные каскады и/или с разной эффективностью связываться с эффекторными молекулами [22]. Так, при применении высоких доз агониста (100 мкМ изопротеренола) изолированные β_2 -адренорецепторы могут находиться в двух различных конформациях [40], в которых активированный рецептор может с разной эффективностью взаимодействовать с G-белками и другими белками. Интересно, что в ответ на аппликацию избирательно высоких доз агониста β_2 -адренорецептор начинает активировать не только Gs-белки, но и тирозинкиназу Src, которая управляет сигнальными белками (например, MAP-киназой) и фосфорилирует

β_2 -адренорецептор. Фосфорилированные остатки тирозина β_2 -адренорецепторов могут служить крепежными сайтами для других сигнальных молекул [22]. Кроме того, Src-киназа способна регулировать (в том числе активировать) работу Ca-канала L-типа, прямо связываясь с N-концевой областью $\alpha 1$ -субъединицы канала и фосфорилируя ее [41]. Возможно, быстрое увеличение амплитуды Ca-сигналов под влиянием 50 мкМ фенотерола происходит за счет активации дополнительного пути (например, связанного с Src-киназой), усиливающего работу Ca-каналов L-типа. На наш взгляд, это предположение наиболее вероятно и в первую очередь подлежит экспериментальной проверке.

В проведенном исследовании впервые обнаружено увеличение образования оксида азота в кардиомиоцитах предсердий под действием фенотерола (рис. 3). Продукция оксида азота является важным фактором, регулирующим силу сокращения кардиомиоцитов. Усиление синтеза оксида азота может вызывать отрицательный инотропный эффект и/или препятствовать увеличению силы сокращений кардиомиоцитов [42]. Подобное действие оксида азота может быть сопряжено с активацией cGMP-зависимых протеинкиназ G, которые, фосфорилируя тропонин I, сни-

жают чувствительность тропонина С к Са, а влияя на Са-каналы, уменьшают Са-проводимость [43, 44]. Поскольку эффект оксида азота связан с активацией гуанилатциклазы, которая во «включенном» состоянии продуцирует тысячи молекул сGMP, то даже небольшое увеличение синтеза NO способно значительно повлиять на функционирование клетки [45].

Можно предложить несколько гипотетических механизмов сопряжения β_2 -адренорецепторов с NO-синтазой, отвечающей за образование оксида азота. β_2 -Адренорецепторы способны взаимодействовать с Gi-белками, однако активированный рецептор связывается с Gi-белком менее «охотно», чем с Gs-белком [46]. Предполагается, что активированный β_2 -адренорецептор дольше пребывает в состоянии, для которого характерно высокое сродство к Gs-белку, и меньше времени проводит в состоянии, в котором избирательно связывается с Gi-белком [47]. В соответствии с другой гипотезой, β_2 -адренорецептор может взаимодействовать с Gi-белком только после фосфорилирования протеинкиназой А или киназой рецепторов, сопряженных с G-белками [48]. α -Субъединицы Gi-белков угнетают продукцию сAMP аденилатциклазами, а димеры $\beta\gamma$ -субъединиц влияют на некоторые ионные каналы и сигнальные молекулы, в частности активируют сигнальный путь ФИЗК–протеинкиназа В [1, 49]. Одним из эффекторов данного пути служит NO-синтаза (нейрональная и эндотелиальные изоформы), активность которой усиливается после фосфорилирования протеинкиназой В [50]. В клетках эндотелия крыс под влиянием фенотерола усиливается зависимость от пути ФИЗК–протеинкиназа В активность эндотелиальной NO-синтазы [26]. Однако в кардиомиоцитах желудочков крысы и предсердий кошки фенотерол (в концентрации 0.1 мкМ) не стимулировал путь, связанный с Gi-белком и продукцией NO, а его действие на сократимость было полностью связано с Gs-белком [15, 51].

Недавно показали, что активация Gi-белка в клетках HEK293 под действием фенотерола не зависит от ERK1/2-киназы (extracellular signal-regulating kinases) [29]. В кардиомиоцитах крысы ERK1/2 фосфорилируется и активируется в NO-зависимом пути [52]. Возможно, β_2 -адренорецепторы способны активировать NO-синтазу независимо от G-белка. Фактором, сопрягающим активацию рецептора и усиление синтеза NO, может служить белок β -аррестин 2, который взаимодействует одновременно с β_2 -адренорецепторами и NO-синтазой [53]. Стимулируемая β_2 -адренорецепторами Src-киназа также фосфорилирует эндотелиальную NO-синтазу по остатку Tyr83, усиливая синтез NO [54]. Кроме того, активации NO-синтазы способствует комплекс ионов Са

с кальмодулином [42], поэтому усиление продукции NO, вероятно, частично связано с увеличением концентрации ионов Са за счет большей активности Са-каналов L-типа.

Интересно отметить, что в нашей работе продукция оксида азота начинала возрастать практически сразу после аппликации фенотерола в низкой концентрации, тогда как в высокой концентрации фенотерол сначала несколько снижал, а затем увеличивал синтез NO. Возможно, в последнем случае резкое увеличение продукции сAMP первоначально отрицательно сказывалось на работе NO-синтазы (наши неопубликованные данные), а затем проявлялось активирующее действие сигналов от β_2 -адренорецепторов и повышенного уровня Са.

При рассмотрении эффектов стимуляции β_2 -адренорецепторов не стоит забывать о том, что β_2 -адренорецепторы могут прямо взаимодействовать с фактором, регулирующим Na/H-обмен, N-этилмалеимидчувствительным фактором (контролирующим интернализацию рецепторов и взаимодействие с Gi-белками) и с каркасными белками, соединяющими адренорецепторы с протеинкиназами А, С, фосфатазой 2А, Са-каналами L-типа [20, 22–24]. В итоге димеры β_2 -адренорецепторов могут собирать вокруг себя макромолекулярный сигнальный комплекс, который обеспечивает «координированный» ответ клетки на их активацию [55, 56]. Кроме того, β_2 -адренорецепторы, Са-каналы, эндотелиальная NO-синтаза, NADPH-оксидаза и другие регуляторные молекулы колокализуются на территории кавеол – обогащенных холестерином и кавеолином углублений в мембране [55]. Поэтому *in vivo* эффекты стимуляции β_2 -адренорецепторов могут быть связаны с изменением активности большого количества регуляторных молекул в ограниченных регионах клетки.

Известно, что β_2 -адренорецепторы быстро теряют чувствительность к агонистам, а затем количество рецепторов стремительно уменьшается [27, 36]. С учетом этого можно предположить, что под влиянием фенотерола запускаются процессы, препятствующие десенситизации β_2 -адренорецепторов, что объясняет стойкость воздействия фенотерола на амплитуду сокращений и Са-сигналов. Оксид азота способен непосредственно действовать на β_2 -адренорецепторы и белки, участвующие в десенситизации β_2 -адренорецепторов (киназу рецепторов, сопряженных с G-белками), посредством S-нитрозилирования. В результате предотвращается вызванное агонистом снижение чувствительности рецепторов и их количества [16, 53]. В ответ на стимуляцию β_2 -адренорецепторов S-нитрозилированию подвергается динамин – участвующая в эндоцитозе

малая GTP-аза, что облегчает его способность полимеризоваться и образовывать сжимающийся «воротник» [57]. Таким образом, пролонгированный эффект фенотерола, по-видимому, можно объяснить действием оксида азота на рецепторы, киназу рецепторов, сопряженных с G-белками, и динамин. Под влиянием фенотерола увеличение продукции NO может способствовать, с одной стороны, «закрытию» кавеол (сужению поры, соединяющей внеклеточную среду с полостью кавеол), в которые при этом «ловятся» молекулы агониста, а с другой – обеспечивать длительную активность β_2 -адренорецепторов. В этом случае даже удаление фенотерола из внеклеточной среды не приведет к быстрому уменьшению его эффектов.

ВЫВОДЫ

Исходя из полученных данных, можно предположить следующее. Активация β_2 -адренорецепторов относительно низкими дозами агониста запускает одновременно сигнальные каскады, разнонаправленно воздействующие на сократимость предсердий. Поэтому сначала положительный инотропный эффект агониста не проявляется. Однако позже продукция оксида азота снижается при сохранении повышенной амплитуды Ca-сигналов, что ведет к увеличению силы сокращений. В случае стимуляции β_2 -адренорецепторов высокими дозами агониста в работу быстрее включается путь, сопряженный с мощным увеличением ам-

плитуды Ca-сигналов, тогда как усиление продукции оксида азота «запаздывает», поэтому проявляется существенное положительное инотропное действие агониста. Представленный гипотетический двухкомпонентный, разнонаправленный механизм, лежащий в основе изменения силы сокращений предсердий при активации β -адренорецепторов фенотеролом (рацемат), требует дальнейшего детального экспериментального исследования. Фармакологический подход, связанный с применением блокаторов синтеза оксида азота, аденилатциклазной системы, кальциевых каналов L-типа, риадиноновых рецепторов, а возможно, и ингибиторов эндоцитоза, позволит выяснить пути реализации эффектов β_2 -адренорецепторов кардиомиоцитов предсердий и ответить на поставленные в данной работе вопросы. ●

Благодарим за обсуждение полученных результатов и ценные замечания при оформлении статьи И.Р. Ефимова и А.В. Глухова (университет Вашингтона, Сент-Луис, США).

Работа поддержана грантами Министерства образования и науки Российской Федерации (НШ-5250.2010.4 и МК-3840.2010.4), Российского фонда фундаментальных исследований (№ 11-04-00568-а, 11-04-00422-а) и ФЦП 02.740.11.0302.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамочкин Д.В., Сухова Г.С., Розенштраух Л.В. // Кардиология. 2006. Т. 45. № 6. С. 50–53.
2. Buxton B.F., Jones C.R., Molenaar P., Summers R.J. // Br. J. Pharmacol. 1987. V. 92. P. 299–310.
3. Vatner S.F., Young M.A. // Circ. Res. 1986. V. 59. P. 579–596.
4. Hedberg A., Kempf F.Jr., Josephson M.E., Molinoff P.B. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1985. V. 234. P. 561–568.
5. Xiao R.P., Lakatta E.G. // Circ. Res. 1993. V. 73. P. 286–300.
6. Sosunov E.A., Gainullin R.Z., Moise N.S., Steinberg S.F., Danilo P., Rosen M.R. // Cardiovasc. Res. 2000. V. 48. P. 211–219.
7. Faucher F.A., Gannier F.E., Lignon J.M., Cosnay P., Malécot C.O. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2008. V. 294. P. 106–117.
8. Davare M.A., Avdonin V., Hall D.D., Peden E.M., Burette A., Weinberg R.J., Horne M.C., Hoshi T., Hell J.W. // Science. 2001. V. 293. P. 98–101.
9. Haase H. // Cardiovasc. Res. 2007. V. 73. P. 19–25.
10. Jo S.H., Leblais V., Wang P.H., Crow M.T., Xiao R.P. // Circ. Res. 2002. V. 91. P. 46–53.
11. Xiao R.P., Ji X., Lakatta E.G. // Mol. Pharmacol. 1995. V. 47. P. 322–329.
12. Chesley A., Lundberg M.S., Asai T., Xiao R.P., Ohtani S., Lakatta E.G., Crow M.T. // Circ. Res. 2000. V. 87. P. 1172–1179.
13. Zhu W.Z., Zheng M., Koch W.J., Lefkowitz R.J., Kobilka B.K., Xiao R.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 1607–1612.
14. Dansona J.F., Zhangb Y.H., Sears C.E., Edwardsc A.R., Casadeib B., Patersona D.J. // Cardiovasc. Res. 2005. V. 67. P. 613–623.
15. Dedkova E.N., Wang Y.G., Blatter L.A., Lipsius S.L. // J. Physiol. 2002. V. 542. P. 711–723.
16. Whalen E.J., Foster M.W., Matsumoto A., Ozawa K., Violin J.D., Que L.G., Nelson C.D., Benhar M., Keys J.R., Rockman H.A., et al. // Cell. 2007. V. 129. P. 511–522.
17. Milano C.A., Allen L.F., Rockman H.A., Dolber P.C., McMinn T.R., Chien K.R., Johnson T.D., Bond R.A., Lefkowitz R.J. // Science. 1994. V. 264. P. 582–586.
18. Liggett S.B., Tepe N.M., Lorenz J.N. // Circulation. 2000. V. 101. P. 1707–1714.
19. Zhou Y.Y., Cheng H., Song L.S., Wang D., Lakatta E.G., Xiao R.P. // Mol. Pharmacol. 1999. V. 56. P. 485–493.
20. Hall R.A., Premont R.T., Chow C.W., Blitzer J.T., Pitcher J.A., Claing A., Stoffel R.H., Barak L.S., Shenolikar S., Weinman E.J., et al. // Nature. 1998. V. 392. P. 626–630.
21. Peleg G., Ghanouni P., Kobilka B.K., Zare R.N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 8469–8474.
22. Sun Y., Huang J., Xiang Y., Bastepe M., Jüppner H., Kobilka B.K., Zhang J.J., Huang X.Y. // EMBO J. 2007. V. 26. P. 53–64.
23. Wang Y., Lauffer B., von Zastrow M., Kobilka B.K., Xiang Y. // Mol. Pharmacol. 2007. V. 72. P. 429–439.
24. Xiang Y., Kobilka B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 10776–10781.
25. Swift S.M., Schwarb M.R., Mihlbachler K.A., Liggett S.B. // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2007. V. 136. P. 236–243.
26. Figueroa X.F., Poblete I., Fernández R., Pedemonte C., Cortés V., Huidobro-Toro J.P. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2009. V. 297. P. 134–143.
27. Bruce R.W., Roger B., Richard B.C. // Mol. Pharmacol. 2000. V. 58. P. 421–430.

28. Jozwiak K., Woo A.Y., Tanga M.J., Toll L., Jimenez L., Kozocas J.A., Plazinska A., Xiao R.P., Wainer I.W. // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. V. 18. P. 728–736.
29. Woo A.Y., Wang T.B., Zeng X., Zhu W., Abernethy D.R., Wainer I.W., Xiao R.P. // *Mol. Pharmacol.* 2009. V. 75. P. 158–165.
30. Iijima T., Taira N. // *Eur. J. Pharmacol.* 1989. V. 163. P. 357–360.
31. Skeberdis V.A., Jurevicius J., Fischmeister R. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997. V. 283. P. 452–461.
32. Hasseldine A.R., Harper E.A., Black J.W. // *Br. J. Pharmacol.* 2003. V. 138. P. 1358–1366.
33. Prendergast C.E., Shankley N.P., Black J.W. // *Br. J. Pharmacol.* 2000. V. 129. P. 1285–1288.
34. Harkins A.B., Kurebayashi N., Baylor S.M. // *Biophysic. J.* 1993. V. 65. P. 865–881.
35. Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1999. V. 38. P. 3209–3212.
36. Liggett S.B. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000. V. 161. P. 197–201.
37. DiPilato L.M., Zhang J. // *Circ. Res.* 2006. V. 99. P. 1021–1023.
38. Mügge A., Posselt D., Reimer U., Schmitz W., Scholz H. // *J. Mol. Med.* 1985. V. 63. P. 26–31.
39. Jozwiak K., Khalid C., Tanga M.J., Berzetei-Gurske I., Jimenez L., Kozocas J.A., Woo A., Zhu W., Xiao R.P., Abernethy D.R., et al. // *J. Med. Chem.* 2007. V. 50. P. 2903–2915.
40. Swaminath G., Xiang Y., Lee T.W., Steenhuis J., Parnot C., Kobilka B.K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 686–691.
41. Dubuis E., Rockcliffe N., Hussain M., Boyett M., Wray D., Gawler D. // *Cardiovasc. Res.* 2006. V. 69. P. 391–401.
42. Balligand J.L., Feron O., Dessy C. // *Physiol. Rev.* 2009. V. 89. P. 481–534.
43. Fiedler B., Wollert K.C. // *Cardiovasc. Res.* 2004. V. 63. P. 450–457.
44. Seddon M., Shah A.M., Casadei B. // *Cardiovasc. Res.* 2007. V. 75. P. 315–326.
45. Уразаев А.Х., Зефиоров А.И. // *Успехи физиологических наук.* 1999. Т. 30. № 1. С. 54–72.
46. Wenzel-Seifert K., Seifert R. // *Mol. Pharmacol.* 2000. V. 58. P. 954–966.
47. Seifert R., Dove S. // *Mol. Pharmacol.* 2009. V. 75. P. 13–18.
48. Liu R., Ramani B., Soto D., De Arcangelis V., Xiang Y. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 32279–32287.
49. Baillie G.S., Sood A., McPhee I., Gall I., Perry S.J., Lefkowitz R.J., Houslay M.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 940–945.
50. Lynch G.S., Ryall J.G. // *Physiol. Rev.* 2008. V. 88. P. 729–767.
51. Xiao R.P., Zhang S.J., Chakir K., Avdonin P., Zhu W., Bond R.A., Balke C.W., Lakatta E.G., Cheng H. // *Circulation.* 2003. V. 108. P. 1633–1639.
52. Xu Z., Ji X., Boysen P.G. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2004. V. 286. P. 1433–1440.
53. Ozawa K., Whalen E.J., Nelson C.D., Mu Y., Hess D.T., Lefkowitz R.J., Stamler J.S. // *Mol. Cell.* 2008. V. 31. № 3. P. 395–405.
54. Fulton D., Church J.E., Ruan L., Li C., Sood S.G., Kemp B.E., Jennings I.G., Venema R.C. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 35943–35952.
55. Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A., Rasmussen S.G., Thian F.S., Kobilka T.S., Choi H.J., Kuhn P., Weis W.I., Kobilka B.K., et al. // *Science.* 2007. V. 318. P. 1258–1265.
56. Liu G., Shi J., Yang L., Cao L., Park S.M., Cui J., Marx S.O. // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 2196–2205.
57. Wang G., Moniri N.H., Ozawa K., Stamler J.S., Daaka Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 1295–1300.