

УДК 612.178.1

Снижение чувствительности миокарда к стимуляции мускариновых рецепторов третьего типа в постнатальном онтогенезе

С. В. Тапилина^{1,2}, Д. В. Абрамочкин^{1,2*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра физиологии человека и животных, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, кафедра физиологии, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

*E-mail: abram340@mail.ru

Поступила в редакцию 10.11.2015

Принята к печати 05.02.2016

РЕФЕРАТ Мускариновые рецепторы третьего подтипа (M3-рецепторы) наряду с M2-рецепторами опосредуют холинергические эффекты в миокарде млекопитающих. При этом у взрослых животных электрофизиологические эффекты, наблюдаемые при избирательной стимуляции M3-рецепторов в миокарде, крайне малы по сравнению с эффектами стимуляции M2-рецепторов. Нами изучено действие избирательной стимуляции M3-рецепторов путем аппликации агониста мускариновых рецепторов пилокарпина (10 мкМ) на фоне блокирования M2-рецепторов селективным антагонистом метоктрамином (100 нМ) на конфигурацию потенциалов действия (ПД) в препаратах предсердного и желудочкового миокарда новорожденных и трехнедельных крысят в сравнении с эффектами в миокарде взрослых крыс. В предсердном миокарде стимуляция M3-рецепторов вызывала уменьшение длительности ПД приблизительно одинаково выраженное у новорожденных и взрослых крыс, в то время как у трехнедельных крысят отсутствовал статистически значимый эффект. Эффект, развивающийся в желудочковом миокарде новорожденных крысят, более чем в 3 раза превосходил эффект у взрослых животных, у трехнедельных животных эффект отсутствовал. В препаратах всех типов действие стимуляции M3-рецепторов на электрическую активность полностью снималось их селективным антагонистом 4-DAMP (10 нМ). Согласно данным РВ-ПЦР, количество мРНК гена M3-рецепторов как в предсердном, так и в желудочковом миокарде снижается по мере взросления животного. Можно заключить, что вклад M3-рецепторов в реализацию холинергических воздействий на миокард снижается в постнатальном онтогенезе, что связано с уменьшением экспрессии гена M3-рецепторов по сравнению с геном M2-рецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ацетилхолин, мускариновые рецепторы, онтогенез, потенциал действия, сердце.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АХ – ацетилхолин; M2-рецепторы – мускариновые рецепторы второго типа; M3-рецепторы – мускариновые рецепторы третьего типа; НК – новорожденные крысята; ТНК – крысята трехнедельного возраста; ВК – взрослые крысы; РВ-ПЦР – метод ПЦР в реальном времени; ПД – потенциал действия; ДПД50 – длительность ПД на уровне 50% реполяризации; ДПД90 – длительность ПД на уровне 90% реполяризации.

ВВЕДЕНИЕ

Парасимпатическая регуляция сердца чрезвычайно важна для его нормальной работы. Нейромедиатор ацетилхолин (АХ), выделяющийся из окончаний интрамуральных постганглионарных парасимпатических нейронов, является основным эффектором парасимпатической нервной системы. АХ действует на пейсмекерные и рабочие кардиомиоциты посредством мускариновых рецепторов второго подтипа (M2-рецепторов), вызывая соответственно

отрицательный хронотропный и инотропный эффект [1]. Однако в последнее время появилось множество свидетельств существования в миокарде млекопитающих функционально активных холинорецепторов третьего типа (M3-рецепторов) [2–4].

В то время как M2-рецепторы сопряжены с G_i-белками, а основные эффекты их стимуляции связаны со снижением внутриклеточного уровня сАМР, M3-рецепторы сопряжены с G_q-белками, что обуславливает активацию фосфоинозитидного каскада

внутриклеточной сигнализации при их стимуляции [1, 2]. При этом α -субъединица G_q -белка активирует фосфолипазу C, что в итоге приводит к повышению внутриклеточного уровня Ca^{2+} и активации протеинкиназы C, способной посредством фосфорилирования влиять на работу различных ионных каналов. С другой стороны, каналы, переносящие калиевый ток ($I_{K_{M3}}$), активируются, по всей видимости, в результате прямого взаимодействия с субъединицами G_q -белка [3, 5]. В результате стимуляция M3-рецепторов приводит к уменьшению длительности ПД, выраженному у взрослых крыс [6], мышей [4] и морских свинок [7] главным образом в предсердном миокарде. Помимо этого, M3-рецепторы опосредуют ряд эффектов АХ, не связанных с электрической активностью, в частности его антиапоптотическое действие на кардиомиоциты [8, 9].

Большинство работ, связанных с M3-рецепторами миокарда, ограничивалось лишь изучением их функций у взрослых животных, несмотря на то, что на ранних стадиях постнатального онтогенеза роль парасимпатической регуляции сердца в целом выше, чем у взрослых, в связи с недоразвитием или полным отсутствием симпатической иннервации миокарда [10]. При этом результаты экспериментов на крысах *in vivo* [11], а также предварительные данные нашей группы [12], полученные на миокарде новорожденных крысят, позволяют предполагать более высокую чувствительность миокарда к стимуляции M3-рецепторов на ранних стадиях онтогенеза.

В связи с этим в настоящей работе проведено сравнительное изучение электрофизиологических эффектов избирательной стимуляции M3-рецепторов в предсердном и желудочковом миокарде новорожденных крысят (НК) первого дня жизни, крысят трехнедельного возраста (ТНК) и взрослых крыс возрастом 4 месяца (ВК). Электрофизиологические данные сопоставляли с результатами измерения экспрессии генов M3- и M2-рецепторов методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали четырехмесячных самцов белых беспородных крыс ($n = 26$) массой 300–350 г, ТНК массой 24–28 г ($n = 24$, из пяти различных пометов) и НК массой 4.5–6 г ($n = 25$). Животных декапитировали, после чего быстро вскрывали грудную клетку, выделяли сердце и промывали раствором Тироде (состав в ммоль/л: NaCl 133.47; KCl 4.69; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.35; $NaHCO_3$ 16.31; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.18; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.5; глюкоза 7.77), насыщенным карбогеном (газовая смесь 95% O_2 , 5% CO_2). После этого из каждого сердца выделяли препарат ушка правого предсердия и препарат стенки правого желудочка.

Каждый препарат закрепляли в экспериментальной камере объемом 3 мл (температура 38°C, скорость потока раствора 10 мл/мин) эндокардиальной стороной вверх и стимулировали с помощью серебряных электродов с частотой 6 Гц (ВК и ТНК) или 4 Гц (НК).

ПД регистрировали стандартным методом внутриклеточного отведения биоэлектрической активности с помощью стеклянных микроэлектродов сопротивлением 25–50 МОм, подключенных к усилителю Neuroprobe-1600 (AM-Systems, США). Сигнал оцифровывался на аналогово-цифровом преобразователе E14-140 (L-Card, Россия) и записывался на компьютере с помощью программы Powergraph v. 3.3 (DiSoft, Россия). Обработку данных проводили в программе MiniAnalysis v. 3.0.1 (Synaptosoft, США). При анализе записей определяли длительность ПД на уровне 50 и 90% реполяризации (ДПД50 и ДПД90 соответственно), а также амплитуду ПД и величину потенциала покоя.

В электрофизиологических экспериментах использовали четыре соединения: селективные блокаторы M1-, M2- и M3-рецепторов – пирензепин, метоктрамин и 4-DAMP соответственно, а также агонист M-рецепторов пилокарпин, обладающий небольшой специфичностью по отношению к M1- и M3-рецепторам по сравнению с M2- и M4-рецепторами. Все вещества заказаны в Sigma (США). Концентрации веществ выбраны на основе данных предыдущих исследований [4, 7]. На каждом препарате не более 2 раз записывали эффект пилокарпина в норме или на фоне того или иного блокатора.

Уровни экспрессии генов сравнивали методом РВ-ПЦР. Для этого использовали препараты ушка правого предсердия и стенки правого желудочка, полученные от НК, ТНК и ВК, способом, описанным выше. Препараты помещали в раствор для стабилизации РНК (IntactRNA, «Евроген», Россия) на 24 ч при 4°C, которые затем хранили при –20°C до момента выделения РНК. РНК экстрагировали гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформным методом (ExtractRNA, «Евроген», Россия). РНК от геномной ДНК очищали при помощи ДНКазы I (2 000 ед. акт./мл, NEB, США) в течение 60 мин при 37°C. Концентрацию РНК измеряли при помощи спектрофотометра (Nanodrop 2000, ThermoScientific, США). Для синтеза кДНК суммарную РНК, очищенную от геномной ДНК, подвергали реакции обратной транскрипции с использованием набора MMLVRTkit («Евроген», Россия). Все манипуляции проводили в соответствии со стандартной методикой по протоколам, рекомендованным производителем. кДНК хранили при температуре –80°C до проведения РВ-ПЦР.

РВ-ПЦР проводили на приборе BioRad с системой детекции CFX96 с использованием набора реактивов

компании «Синтол» (Россия) и красителя EvaGreen (BIOTIUM, США). Использовали праймеры, синтезированные в ЗАО «Евроген» (5'-3'): М2-рецептор – ТСТАСТАТGTGATTGGTТАСТGGC (прямой), GCTТААСТGGGTAGGTCAGAGGT (обратный); М3-рецептор – САAGTGGTCTTTCATTCCTTCT (прямой), GCCAGGCTТАAGAGGAAGTAGTT (обратный); GAPDH – СAGCGATGCTTTACTTTCTGAA (прямой), GATGGСААСААТGTCCACTTT (обратный).

Программа амплификации состояла из начальной денатурации при 95°C, 5 мин; за которой следовало 50 циклов ПЦР (1 мин при 95°C, 30 с при 60°C и 30 с при 72°C), а затем последний шаг – 72°C, 10 мин. Данные анализировали пороговым методом при помощи программного обеспечения, поставляемого вместе с амплификатором. Результаты нормировали по количеству РНК, взятому в реакцию обратной транскрипции.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica v. 6.0. При оценке статистической значимости различий для связанных выборок использовали критерий Вилкоксона, для несвязанных – критерий Манна–Уитни. Использование непараметрических критериев было обусловлено малыми размерами выборок, не позволяющими гарантировать нормальность распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для избирательной стимуляции М3-рецепторов в электрофизиологических экспериментах использовали агонист мускариновых рецепторов пилокарпин (10 мкМ), который подавали в экспериментальную камеру в присутствии высокоселективного блокатора М2-рецепторов метоктрамина (100 нМ). Чтобы исключить возможный эффект активации М1-рецепторов, в специальных предварительных экспериментах пилокарпин подавали в присутствии их селективного антагониста пирензепина (100 нМ). Поскольку никаких различий между выраженностью эффектов пилокарпина на фоне метоктрамина и на фоне двух блокаторов обнаружено не было, что согласуется с ранними данными об отсутствии М1-рецепторов в кардиомиоцитах, то в дальнейшем для избирательной стимуляции М3-рецепторов пилокарпин подавали на фоне одного метоктрамина.

Помимо регистрации эффектов стимуляции собственно М3-рецепторов, ставили контрольные эксперименты, в которых пилокарпин апплицировали в отсутствие блокаторов, чтобы выявить суммарный эффект активации М2- и М3-рецепторов в препаратах миокарда.

Оказалось, что в отсутствие блокаторов пилокарпин вызывает ярко выраженное уменьшение дли-

тельности ПД как на уровне 50, так и на уровне 90% реполяризации в желудочковом (рис. 1, 2А,Б) и предсердном (рис. 2В,Г) миокарде крыс всех трех возрастов. Максимальный эффект пилокарпина развивался в течение 250–300 с от момента начала аппликации вещества, в дальнейшем мы будем обсуждать только максимальные значения эффектов пилокарпина.

Эффект избирательной стимуляции М3-рецепторов во всех сериях опытов был качественно сходен с действием пилокарпина в отсутствие блокаторов, однако существенно слабее выражен. Тем не менее у НК и ВК наблюдалось статистически значимое уменьшение ДПД50 и ДПД90 как в желудочковом (рис. 1А,В, 2А,Б), так и в предсердном миокарде

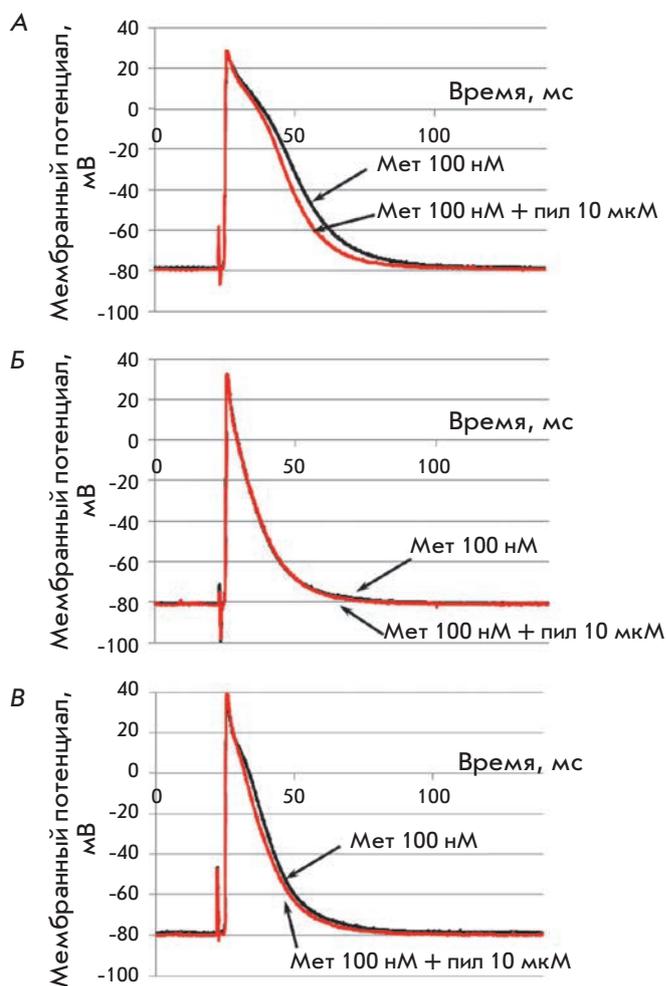


Рис. 1. Сопоставление оригинальных записей ПД в препарате изолированной стенки правого желудочка НК (А), ЛК (Б) и ВК (В) в контроле и во время максимального развития эффектов пилокарпина (пил, 10 мкМ) в присутствии селективного блокатора М2-рецепторов метоктрамина (мет, 100 нМ)

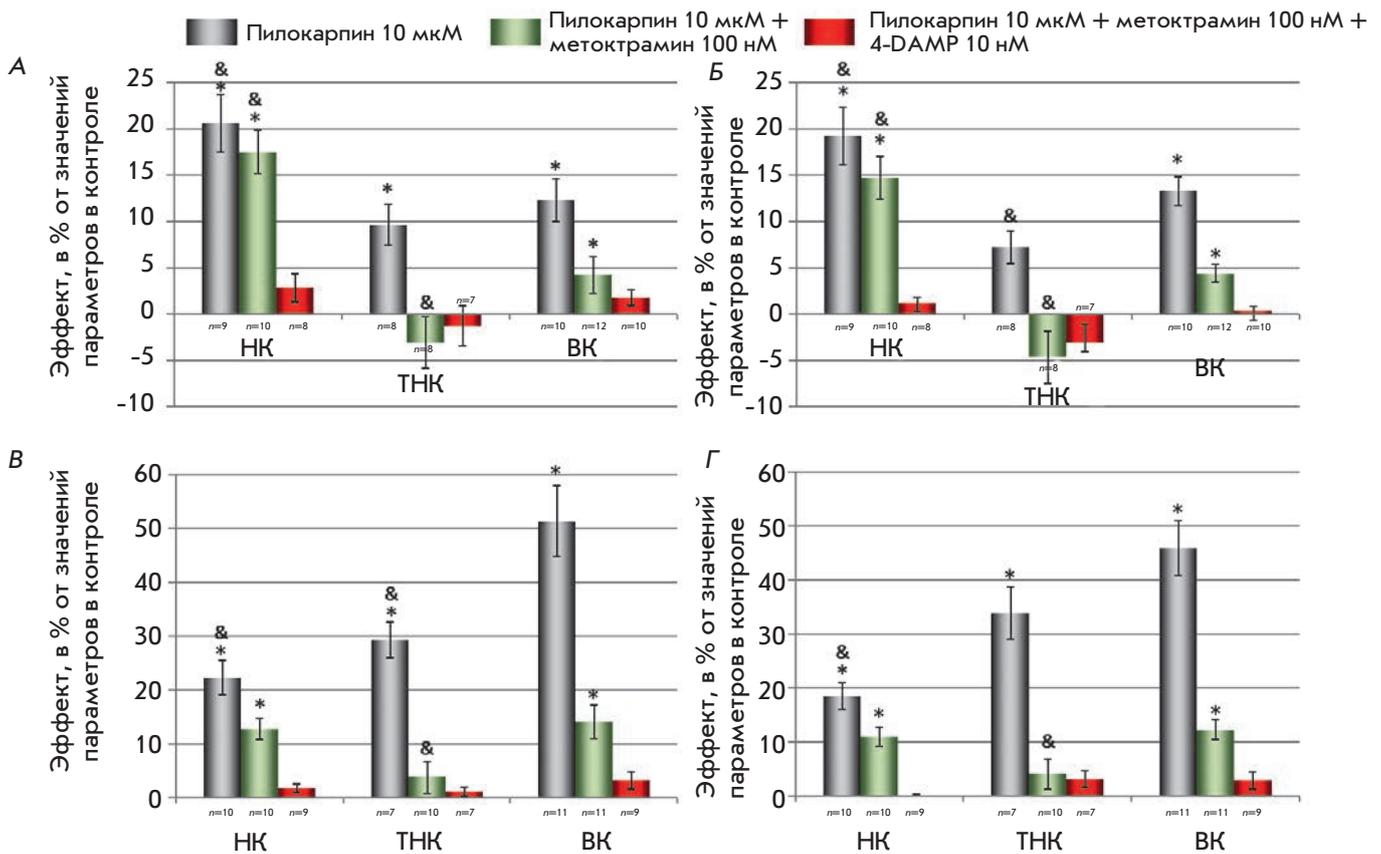


Рис. 2. Относительное уменьшение длительности ПД в препаратах желудочкового (А, Б) и предсердного (В, Г) миокарда на уровне 50% (А, В) и 90% (Б, Г) реполяризации под действием пилокарпина (10 мкМ) в нормальных условиях, а также в присутствии метоктрамина (100 нМ) и 4-DAMP (10 нМ). По оси ординат – максимальная выраженность изменений, вызванных пилокарпином, в % от значений соответствующих величин в контроле. * – статистическая эффекта, критерий Вилкоксона, $p < 0.05$. & – значимость отличия величин эффекта от соответствующего значения у взрослых крыс, критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$

(рис. 2В,Г). Напротив, в группе ТНК значимый эффект избирательной стимуляции М3-рецепторов отсутствовал (рис. 1Б, 2). Эффекты избирательной стимуляции М3-холинорецепторов практически не проявлялись на фоне селективного блокатора М3-рецепторов 4-DAMP (10 нМ), т.е. действительно были опосредованы активацией М3-рецепторов (рис. 2).

Важно отметить, что в желудочковом миокарде НК эффект стимуляции М3-рецепторов более чем в 3 раза превосходил эффект у ВК (рис. 2А,Б), в то время как в предсердном миокарде существенных различий в выраженности эффекта не наблюдалось. Таким образом, в желудочковом миокарде эффект М3-стимуляции был наиболее выражен у НК, а наименее – у ТНК. В предсердном миокарде основное различие между тремя возрастными группами наблюдалось по реакции на пилокарпин, подаваемый без блокаторов, – выраженность эффекта растет по мере увеличения возраста животного и у ВК более чем в 2 раза превосходит эффект у НК.

Согласно данным РВ-ПЦР, в миокарде животных всех возрастов синтезируется мРНК как М2-, так и М3-рецепторов, однако ген последних экспрессируется гораздо слабее (рис. 3). При этом уровень экспрессии гена М3-рецептора снижается по мере взросления животного как в предсердном, так и в желудочковом миокарде (рис. 3Б), т.е. в миокарде ТНК он выше, чем у ВК. Однако уровень экспрессии гена М2-рецептора был максимальным именно в группе ТНК. Поэтому отношение экспрессии М3 к М2 в желудочковом миокарде у ВК выше, чем у ТНК – 0.59 против 0.19%. В предсердном миокарде отношение приблизительно одинаковое – 0.16 и 0.18% соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, нами впервые получены сведения об изменении относительного вклада М3-рецепторов в регуляцию электрической активности желудочкового и предсердного миокарда крыс в постнатальном онтогенезе.

В электрофизиологических экспериментах избирательную стимуляцию М3-рецепторов вызывали ранее неоднократно применявшимся способом [4, 7], а именно, аппликацией 10 мкМ пилокарпина на фоне полной блокады М2-рецепторов 100 нМ метоктрамина. Отметим, что в нашей ранней работе повышение концентрации метоктрамина не приводило к изменению эффектов пилокарпина, а, следовательно, наблюдаемый в присутствии 100 нМ пилокарпина эффект не связан с активацией остаточных М2-рецепторов. Это подтверждается также практически полным исчезновением эффекта пилокарпина на фоне блокаторов М-рецепторов обоих типов, метоктрамина и 4-DAMP.

Электрофизиологические данные показывают, что степень воздействия стимуляции М3-рецепторов на электрическую активность желудочкового миокарда максимальна у НК. В предсердном миокарде чувствительность к пилокарпину в отсутствие блокаторов М-рецепторов увеличивается с возрастом, в то время как чувствительность к пилокарпину на фоне блокады М2-рецепторов одинакова у НК и ВК. Можно предположить, что как в предсердном, так и в желудочковом миокарде вклад М2-рецепторов в регуляцию электрической активности увеличивается с возрастом, при этом в желудочковом миокарде у НК М3-рецепторы занимают главенствующее положение.

Данные РВ-ПЦР в целом подтверждают эти предположения, поскольку показывают, что экспрессия гена М3-рецептора снижается с возрастом. Остается неясным, почему эффект стимуляции М3-рецепторов не наблюдается у ТНК. С одной стороны, это можно объяснить наименьшим отношением количества мРНК М3- к мРНК М2-рецепторов в этой возрастной группе. С другой стороны, относительный уровень трансляции белков М2- и М3-рецепторов может отличаться от уровня экспрессии мРНК соответствующих генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, результаты нашей работы позволяют предположить важную функциональную роль М3-рецепторов в желудочках новорожденных крысят, которая нивелируется у ВК. При этом функции М3-рецепторов не ограничиваются изученным нами воздействием на электрическую активность. Например, возможно участие М3-рецепторов в реализации кардиопротекторных воздействий АХ [8, 9] в условиях окислительного стресса, испытываемого организмом новорожденного. Связь изменения роли М3-рецепторов с началом симпатической регуляции

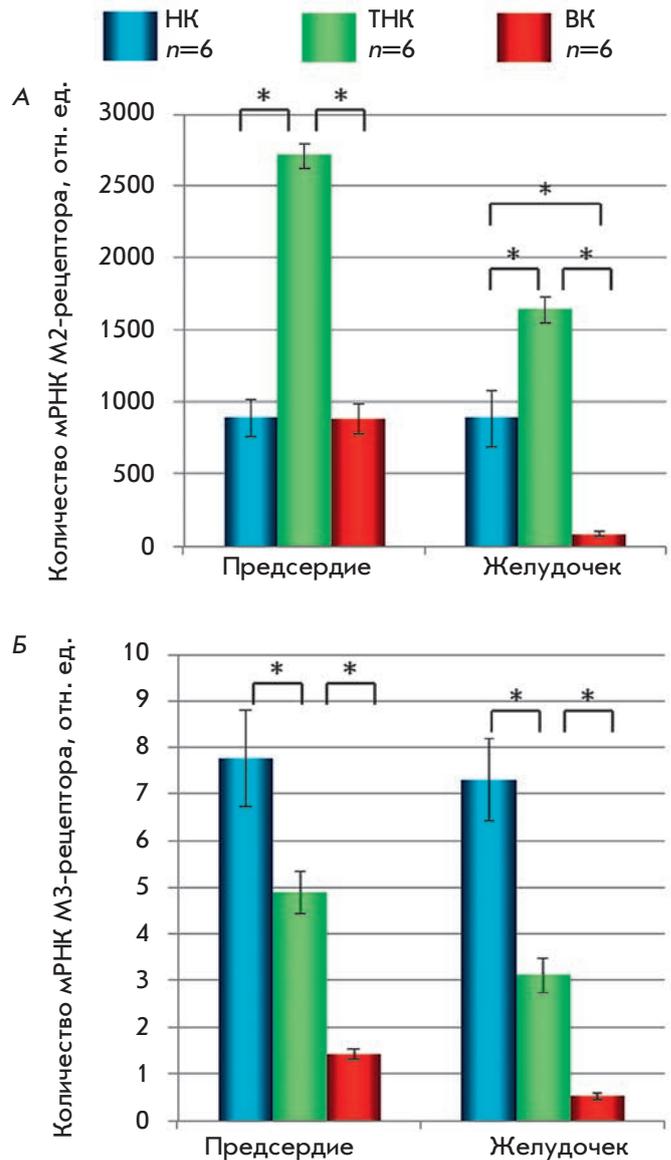


Рис. 3. Уровень экспрессии генов М2- (А) и М3-рецептора (Б) в предсердном и желудочковом миокарде НК, ТНК и ВК, выраженный в относительных единицах количества мРНК М2- и М3-рецепторов. * – статистическая значимость различий между возрастными группами, критерий Манна–Уитни, p < 0.05

миокарда представляется маловероятной, поскольку в трехнедельном возрасте перед включением симпатической регуляции эффект стимуляции М3-рецепторов уже отсутствует. ●

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-01564).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dhein S., van Koppen C.J., Brodde O. // *Pharmacol. Res.* 2001. V. 44. P. 161–182.
2. Wang H., Lu Y., Wang Z. // *Auton. Autac. Pharmacol.* 2007. V. 27. P. 1–11.
3. Shi H., Wang H., Yang B., Xu D., Wang Z. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 21. P. 21774–21778.
4. Abramochkin D.V., Tapilina S.V., Sukhova G.S., Nikolsky E.E., Nurullin L.F. // *Pflug. Arch.* 2012. V. 463. № 4. P. 523–529.
5. Shi H., Wang H., Lu Y., Yang B., Wang Z. // *J. Membrane Biol.* 1999. V. 169. P. 55–64.
6. Abramochkin D.V., Suris M.A., Borodinova A.A., Kuzmin V.S., Sukhova G.S. // *Neurochem. J.* 2008. V. 2. P. 90–94.
7. Wang H., Shi H., Lu Y., Yang B., Wang Z. // *Br. J. Pharmacol.* 1999. V. 126. P. 1725–1734.
8. Yang B., Lin H., Xu C., Liu Y., Wang H., Han H., Wang Z. // *Cell. Physiol. Biochem.* 2005. V. 16. № 4–6. P. 163–174.
9. Zhao J., Su Y., Zhang Y., Pan Z., Yang L., Chen X., Liu Y., Lu Y., Du Z., Yang B. // *Br. J. Pharmacol.* 2010. V. 159. № 6. P. 1217–1225.
10. Robinson R.B. // *Cardiovasc. Res.* 1996. V. 31. P. E68–E76.
11. Зиятдинова Н.И., Сергеева А.М., Дементьева Р.Е., Зефирова Т.Л. // *Бюл. эксп. биол. мед.* 2012. Т. 154. № 7. С. 4–6.
12. Тапилина С.В., Абрамочкин Д.В. // *Бюл. эксп. биол. мед.* 2015. Т. 159. № 1. С. 11–14.