

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ СТИМУЛЯЦИИ α_2 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ

© 2023 г. А.М. Галиева^{*,#}, Н.И. Зиятдинова^{*}, Н. Мансур^{*}, Л.И. Фасхутдинов^{*}, Т.Л. Зефирова^{*}

^{*}Казанский (Приволжский) федеральный университет, Кремлевская ул., 18, Казань, 420008, Россия

[#]E-mail: galieva_alina94@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 27.03.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Изучено влияние агониста α_2 -адренорецепторов клонидина гидрохлорида на параметры электрической активности миокарда предсердий при навязанном ритме. Клонидин гидрохлорид в рабочих кардиомиоцитах с навязанным ритмом вызывает уменьшение длительности потенциала действия на уровне 50 и 90% у взрослых крыс. У недельных и трехнедельных крыс данный агонист вызывает увеличение длительности потенциала действия на уровне 50 и 90%.

Ключевые слова: α_2 -адренорецепторы, сердце, электрофизиология.

DOI: 10.31857/S0006302923040129, EDN: KCLKWEN

Адренергические рецепторы (АР, также известны как адренорецепторы) относятся к суперсемейству гуанин-нуклеотид-связывающих G-белок-связанных рецепторов и являются мембранными рецепторами, которые активируют гетеротримерные G-белки после связывания лиганда. Данные рецепторы состоят из одного внеклеточного N-концевого домена, семи трансмембранных доменов, трех внутри- и трех внеклеточных петель и одного внутриклеточного C-концевого хвоста. Эти гептахелические трансмембранные сенсоры составляют около 4% всего генома, кодирующего белки, и считаются наиболее важными лекарственными мишенями в медицине и физиологии. G-белки обычно стимулируют (через Gs-белок) или ингибируют (через Gi-белок) фермент аденилатциклазу или активируют (через Gq-белок) фосфолипазу C.

Семейство адренорецепторов включает в себя девять членов, которые можно классифицировать по трем различным подгруппам, содержащим три подтипа α_1 -АР (α_{1A} , α_{1B} и α_{1D}), три подтипа α_2 -АР (α_{2A} , α_{2B} и α_{2C}) и три подтипа β -АР (β_1 , β_2 и β_3) [1]. Физиологические и фармакологические функции отдельных подтипов рецепторов в основном были раскрыты путем создания отдельных моделей с целевыми делеция-

ми или трансгенной сверхэкспрессией соответствующих генов *in vivo* [2].

Однако первые препараты, вызывающие фармакологический эффект при воздействии на адренорецепторы, были разработаны и введены в медицинскую терапию еще за несколько десятилетий до этих открытий. Агонист α_2 -адренорецепторов клонидин был разработан в начале 1960-х годов. Он стал первым клинически используемым селективным агонистом α_2 -АР [3]. Клонидин вызывает ряд фармакологических действий, большинство из которых до сих пор используются в современной терапии, включая седативное воздействие, гипноз, симпатическое торможение, гипотензию, анальгезию, снижение внутриглазного давления [4]. Однако большой спектр клинических эффектов клонидина ограничивает его более широкое применение в клинической медицине. В частности, побочные эффекты на сердечно-сосудистую систему, а именно гипотония и брадикардия, а также седативный эффект являются ограничениями для применения клонидина в других областях медицины [5].

В настоящее время выделено три подтипа α_2 -АР: α_{2A} -, α_{2B} - и α_{2C} АР. Существование незначительного количества α_2 АР в сердце человека было продемонстрировано методами молекулярной биологии. Поэтому неудивительно, что рецепторы данного подтипа в сердце человека изучены недостаточно [6].

Сокращения: АР – адренергические рецепторы, ПД – потенциал действия.

Несколько групп исследователей продемонстрировали, что $\alpha 2$ АР играют важную роль в пресинаптической регуляции высвобождения норадреналина в сердце человека. Так, существование пресинаптических $\alpha 2$ АР, ингибирующих высвобождение норадреналина, было прямо продемонстрировано *ex vivo* в изолированном правом предсердии человека и косвенно *in vivo* при системном и внутрикоронарном применении фентоламина [7]. В этом контексте интересно отметить, что влияние фентоламина на уровень норадреналина в плазме крови было гораздо более выраженными у пациентов с сердечной недостаточностью (у которых повышена симпатическая активность), чем у здоровых людей. Однако до сих пор остается спорным утверждение о том, что пресинаптические $\alpha 2$ -АР, присутствующие в сердце человека, являются $\alpha 2_A$ АР или $\alpha 2_C$ АР [8].

В зависимости от расположения $\alpha 2$ -адренорецептора и нейромедиатора, высвобождение которого модулируется этими рецепторами, были введены термины «ауторецепторы» и «гетерорецепторы». Под «ауторецепторами» понимают $\alpha 2$ -адренорецепторы, которые расположены в пресинаптической мембране адренергических нейронов и ингибируют экзоцитоз нейротрансмиттеров, норадреналина или адреналина, действуя как часть петли обратной отрицательной связи [9].

$\alpha 2$ -АР подавляют симпатический и надпочечниковый выброс катехоламинов по короткой обратной связи и, таким образом, в целом ингибируют симпатoadренергические воздействия [10]. Таким образом, $\alpha 2$ -АР в основном участвуют в антиноцицептивном, седативном, центральном гипотензивном, гипотермическом и поведенческом действии специфических агонистов [11].

Поскольку постоянная симпатическая стимуляция сердца была связана с дезадаптивным ремоделированием сердца, а также с развитием и прогрессированием сердечной недостаточности, нарушение функции $\alpha 2$ -АР рассматривается как риск возникновения и развития сердечно-сосудистых заболеваний. Действительно, избыточная смертность у мышей, лишенных изоформ $\alpha 2_A$ и $\alpha 2_C$, объяснялась повышением уровня циркулирующих катехоламинов, усугублением гипертрофии левого желудочка, фиброзом и развитием сердечной недостаточности [12]. Однако целенаправленное восстановление изоформ этих рецепторов в симпатических нейронах обеспечило лишь частичное восстановление реакции левого желудочка на внутривенное введение агонистов $\alpha 2$ -АР [13]. В то же время прекондиционирование с использованием агониста $\alpha 2$ -АР дексмететомидина способствует фосфорилированию Erk1/2, Akt и eNOS в миоцитах левого желудочка и улучшает восстановление сердца после ишемии/ре-

перфузии [14]. Подобные наблюдения указывают на функциональную роль $\alpha 2$ -АР в сердечной ткани, где они могут участвовать в регуляции периферического адренергического ответа. Поскольку вклад постсинаптических $\alpha 2$ -АР остается недостаточно изученным, ряд исследователей считает необходимым переоценку функциональной роли этих рецепторов в клетках миокарда.

В то время как β -АР и $\alpha 1$ -АР непосредственно участвуют в регуляции сократительной активности миокарда [15], традиционно считалось, что $\alpha 2$ -АР играют ограниченную роль в сердце. В первую очередь было обнаружено, что агонисты $\alpha 2$ -АР действуют в коронарных артериях и сердечных нервах, но не в самом миокарде [16].

Фактически экспрессия поли(А)+РНК $\alpha 2_A$, $\alpha 2_B$ и $\alpha 2_C$ в сердце крыс была незначительной по сравнению с уровнем этих рецепторов в нейронах, тканях почек, печени или аорты [17]. Однако более поздние исследования с использованием вестерн-блоттинга выявили экспрессию белков всех трех $\alpha 2$ -рецепторов в сердце крыс, но в желудочковых миоцитах были обнаружены только $\alpha 2_A$ -АР и $\alpha 2_C$ -АР [18]. У человека распределение мРНК $\alpha 2$ -АР в целом отличается от такового у крысы, а ткани желудочков характеризуются преимущественным присутствием $\alpha 2_C$ и отсутствием мРНК $\alpha 2_A$ [19]. Идентифицированная экспрессия изоформ $\alpha 2$ -АР в клетках миокарда безусловно заслуживает внимания и указывает на потенциальный вклад этих рецепторов в регуляцию миокарда.

Вопреки парадигме, согласно которой $\alpha 2$ -АР оказывают минимальное прямое воздействие на кардиомиоциты, недавние исследования с изолированными желудочковыми кардиомиоцитами крысы выявили не только наличие всех трех подтипов $\alpha 2_A$ -АР, $\alpha 2_B$ -АР и $\alpha 2_C$ -АР как на уровне экспрессии мРНК, так и на уровне белка, но также выявили их ранее непризнанный кардиопротекторный потенциал [20]. Кроме того, было определено, что $\alpha 2$ -АР экспрессируются как в процессе эмбрионального развития сердца, так и во взрослом возрасте у мышей, а также в кардиомиоцитах, дифференцированных *in vitro* из эмбриональных стволовых клеток [21]. Экспрессия $\alpha 2$ -адренергических рецепторов ($\alpha 2$ -АР) очень высока в сердце плода крыс, хотя их количество снижается с увеличением срока беременности. Экспрессия $\alpha 2_A$ и $\alpha 2_C$, но не $\alpha 2_B$, была подтверждена в популяции миоцитов с помощью непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии с подтип-специфическими антителами и методом вестерн-блоттинга. Селективный агонист $\alpha 2$ -АР и норадреналин увеличивали организацию актинового цитоскелета, и это увеличение блокировалось селективным антагонистом $\alpha 2$ -АР атипаме-

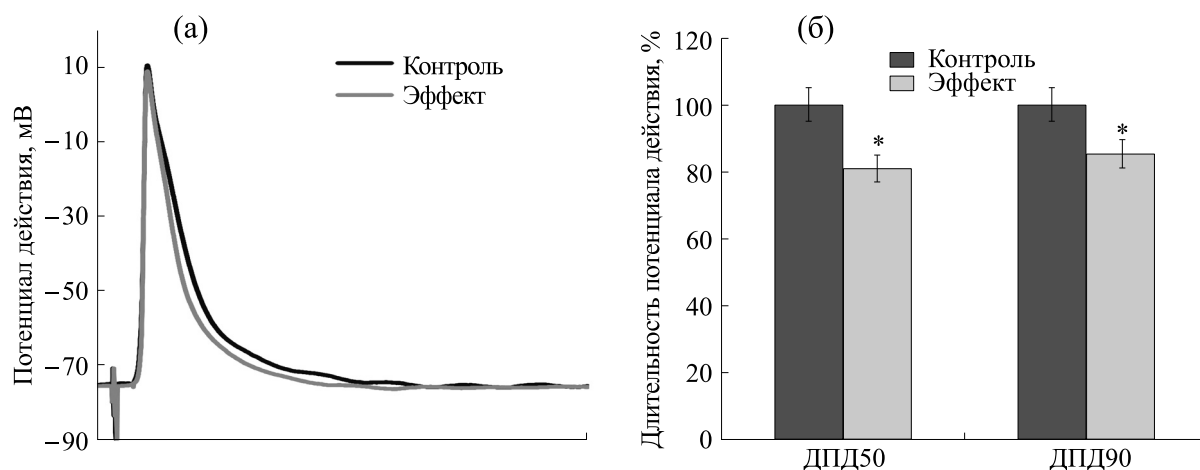


Рис. 1. (а) – Влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия миокарда предсердия с навязанным ритмом у взрослых крыс; (б) – влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия на уровне 50% ($p < 0.05$) и 90% ($p < 0.05$) миокарда предсердия с навязанным ритмом у взрослых крыс.

золом. Кроме того, дексмететомидин ингибировал стимулированное изопротеренолом накопление цАМФ в изолированном сердце плода крысы, и это блокировалось раувольцином. Следовательно, функциональные подтипы α_{2A} и α_{2B} присутствуют в сердце эмбриональной крысы, где они могут играть определенную роль в развитии сердца.

Все вышесказанное указывает на то, что α_2 -АР могут быть вовлечены в механизмы регуляции сердца и могут служить потенциальными мишенями в терапии сердечно-сосудистых заболеваний [22].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на белых лабораторных крысах в возрасте 1 неделя ($n = 7$), 3 недели ($n = 9$) и 16 недель ($n = 7$) с учетом биоэтических норм. В качестве наркоза использовали 25%-й раствор уретана из расчета 1.2 г/кг массы животного, который вводили внутривенно. Наркотизированному животному вскрывали грудную клетку, сердце быстро извлекали и помещали в чашку Петри с раствором Тироде (Sigma-Aldrich, США), в состав которого входили 7.54 г/л NaCl, 0.3 г/л KCl; 0.134 г/л CaCl_2 , 0.06 г/л MgSO_4 , 0.14 г/л NaH_2PO_4 , 1.68 г/л NaHCO_3 , 0.9 г/л глюкозы (37°C , pH 7.4). Раствор обогащали карбогеном в течение всего эксперимента (95% O_2 и 5% CO_2). Сердце препарировали и изготавливали многоклеточный препарат с ушком правого предсердия, поперечным гребешком и фрагментами верхней и нижней полой вен. Электрическую активность кардиомиоцитов изучали с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения на препарате правого предсердия при на-

вязанном ритме с частотой 5 Гц. Внешнее раздражение осуществляли через платиновые электроды. Полученные записи электрической активности миокарда анализировали с помощью оригинальной программы Elph 3.0. Раствор агониста α_2 -адренорецепторов клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) подавали в течение 20 мин. Исследовали следующие параметры потенциала действия (ПД): мембранный потенциал, длительность фазы деполяризации, амплитуда потенциала действия и длительность потенциала действия на уровне 50% (ДПД50%) и 90% (ДПД90%) реполяризации. Длительность фазы реполяризации рассчитывали как время от пика ПД до спада ПД на уровне 50% и 90% [23]. Достоверность различий рассчитывали по t -критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Агонист α_2 -адренорецепторов клонидин гидрохлорид в концентрации 10^{-6} М не вызывал достоверных изменений значений мембранного потенциала, длительности фазы деполяризации и амплитуды потенциала действия во всех исследованных возрастных группах животных.

Аппликация клонидина гидрохлорида в концентрации 10^{-6} М приводила к уменьшению длительности потенциала действия на уровне 50% реполяризации у взрослых крыс с 8.88 ± 0.80 мс до 7.9 ± 0.18 мс ($p < 0.05$), что составило 19.12% (рис. 1а,б). У трехнедельных и однонедельных крысят указанная концентрация, наоборот, вызывала удлинение ДПД50% с 6.18 ± 0.74 мс до 8.12 ± 0.94 мс ($p < 0.05$) у трехнедельных и с 20.15 ± 3.27 мс до 23.98 ± 2.98 мс ($p < 0.05$) у не-

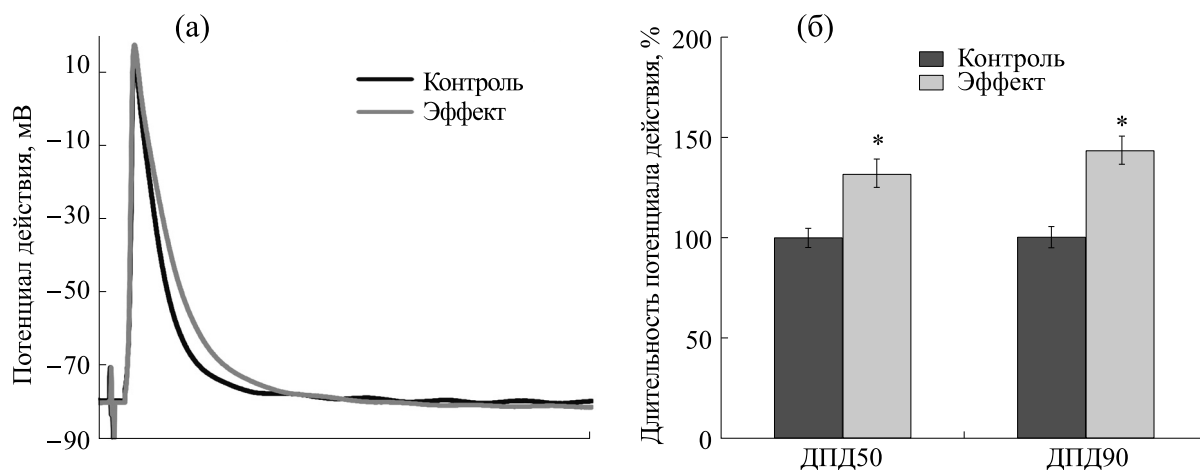


Рис. 2. (а) – Влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия миокарда предсердия с навязанным ритмом у трехнедельных крысят; (б) – влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия на уровне 50% ($p < 0.05$) и 90% ($p < 0.05$) миокарда предсердия с навязанным ритмом у трехнедельных крысят.

дельных крысят, т.е. на 32.47% (рис. 2а,б) и 22.24% (рис. 3а,б) соответственно.

Также было выявлено, что длительность потенциала действия на уровне 90% у взрослых крыс уменьшилась с 26.47 ± 6.43 мс на 22.24 ± 2.69 мс ($p < 0.05$), что составило 14.79% (рис. 1а,б). Но у трехнедельных и однонедельных было выявлено удлинение данного параметра при введении клонидина гидрохлорида в концентрации 10^{-6} М. У трехнедельных животных ДПД90% увеличивался с 16.63 ± 1.41 мс до 23.41 ± 1.57 мс ($p < 0.05$) мс, а у однонедельных крысят значение данного показателя возрастало с 50.48 ± 8.28 мс до 66.41 ± 9.40 мс ($p < 0.05$). Таким образом, длительность потенциала действия на уровне 90% ре-

поляризации в данных возрастных группах увеличивалась соответственно на 44.32% (рис. 2а,б) и 35.03% (рис. 3а,б).

ВЫВОДЫ

В ранее проведенных исследованиях нами было рассмотрено влияние клонидина гидрохлорида на параметры изолированного сердца и выявлено, что агонист $\alpha 2$ -АР изменял частоту сердечных сокращений и коронарный поток изолированного сердца трехнедельных крыс. Возможно, что стимуляция $\alpha 2$ -АР приводит к активации ингибирующих G-белков и, как следствие, к возникновению брадикардии. Кроме того, разнонаправленная динамика показателей ча-

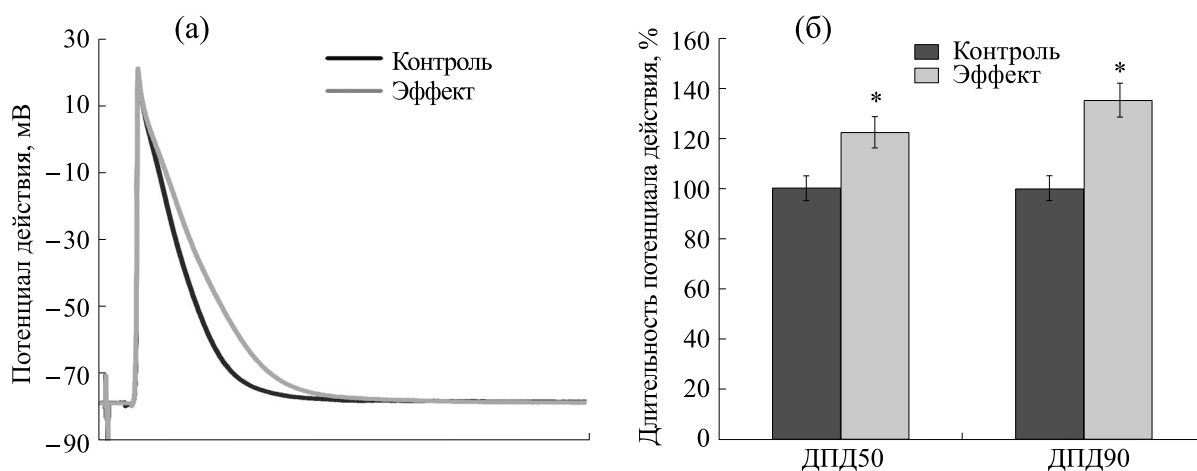


Рис. 3. (а) – Влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия миокарда предсердия с навязанным ритмом у недельных крысят; (б) – влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия на уровне 50% ($p < 0.05$) и 90% ($p < 0.05$) миокарда предсердия с навязанным ритмом у недельных крысят.

стоты сердцебиения и коронарного потока изолированного сердца при введении клонидина имеет концентрационную зависимость [24].

В исследованиях влияния стимуляции $\alpha 2$ -АР на сократимость полосок миокарда предсердий новорожденных, трехнедельных и взрослых крыс было показано, что агонист $\alpha 2$ -АР в концентрации 10^{-6} М оказывал отрицательный инотропный эффект [25].

Проведенные электрофизиологические исследования с постоянным навязанным ритмом позволяют сделать вывод о существенной роли $\alpha 2$ -АР в регуляции электрической активности рабочих кардиомиоцитов. Стимуляция $\alpha 2$ -адренорецепторов неселективным агонистом в кардиомиоцитах однедельных, трехнедельных и взрослых крыс с навязанным ритмом в концентрации 10^{-6} М приводила к разнонаправленному эффекту длительности фазы реполяризации потенциала действия, что, возможно, связано с возрастными особенностями каскадов внутриклеточных посредников данного типа адренорецепторов сердца. Согласно литературным данным, семисуточные крысята характеризуются отсутствием симпатической влияния в сердце, у 21-суточных животных наблюдается пик частоты сердечных сокращений и начало формирования адренергической иннервации сердца, а у 100-суточных животных симпатическая иннервация сердца является полностью сформированной и симпатические регуляторные воздействия приобретают черты, характерные для взрослых животных. Таким образом, нами рассматриваются животные с различными уровнями развития симпатической иннервации сердца [26].

Известно, что длительность фазы реполяризации ПД в кардиомиоцитах зависит от выходящих калиевых токов – I_{Kur} (сверхбыстрый выходящий ток задержанного выпрямления), I_{to} (транзиторный выходящий ток), I_{Kr} и I_{Ks} (быстрый и медленный компоненты токов задержанного выпрямления) [27], I_{K1} (ток аномального выпрямления) и некоторые другие. Токи задержанного выпрямления протекают через потенциалзависимые калиевые каналы. У человека и крысы длительность фазы реполяризации ПД в основном определяется током I_{Kr} . Калиевые каналы играют важную роль в формировании потенциала покоя и потенциала действия в кардиомиоцитах. Калиевые каналы, по сравнению с натриевыми и кальциевыми, наиболее разнообразны как в кардиомиоцитах, так и в мембранах других клеток. Стимуляция $\alpha 2$ -АР может активировать протеинкиназу С, что приводит к высвобождению ионов Ca^{2+} . Повышение внутриклеточного Ca^{2+} активирует Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую киназу и протеинкиназу С; это приводит к усиле-

нию K^{+} -тока, что может служить объяснением укорочения длительности реполяризации у взрослых животных [28]. Особенности механизмов удлинения реполяризации у крысят одно- и трехнедельного возраста могут служить предметом дискуссии. Так или иначе, полученные результаты показывают, что эффекты стимуляции $\alpha 2$ -АР зависят от активации различных уровней регуляции сердечной деятельности, что, безусловно, следует учитывать при применении этих препаратов в терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00121, <https://rscf.ru/project/21-15-00121>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. Bylund, D. C. Eikenberg, J. P. Hieble, et al., *Pharmacol. Rev.*, **46**, 121 (1994).
2. M. Philipp and L. Hein, *Pharmacol. Ther.*, **101**, 65 (2004).
3. W. Hoefke and W. Kobinger, *Arzneimittelforschung*, **16**, 1038 (1966).
4. R. D. Sanders and M. Maze Adrenergic and cholinergic compounds. In *Handbook of experimental pharmacology, Vol. 177. Analgesia*, Ed. by C. Stein (Springer, Heidelberg, 2007), pp. 251–264.
5. R. Gilsbach, J. Albarran-Juarez, and L. Hein, *Curr. Topics in Membranes*, **67**, 139 (2011).
6. O.-E. Brodde and M. C. Michel, *Pharmacol. Rev.*, **51**, 651 (1999).
7. S. Minatoguchi, H. Ito, K. Ishimura, et al., *Am. Heart J.*, **130**, 516 (1995).
8. O.-E. Brodde, H. Bruck, and K. Leineweber, *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 323 (2006).
9. K. Starke, *J. Neurochem.*, **78**, 685 (2001).
10. A. U. Trendelenburg, W. Klebroff, L. Hein, and K. Starke, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **364** (2), 117 (2001).
11. J. Lähdesmäki, J. Sallinen, E. MacDonald, et al., *Neuroscience*, **113** (2), 289 (2002). DOI: 10.1016/S0306-4522(02)00185-9

12. M. Brede, G. Nagy, M. Philipp, et al., *Mol. Endocrinol.*, **17** (8), 1640 (2003).
13. R. Gilsbach, J. Schneider, A. Lothar, et al., *Cardiovasc. Res.*, **86** (3), 432 (2010).
14. Y. Yoshikawa, N. Hirata, R. Kawaguchi, et al., *Anesthesia & Analgesia*, **126** (2), 443 (2018).
15. B.-E. Myagmar, J. M. Flynn, P. M. Cowley, et al., *Circ. Res.*, **120** (7), 1103 (2017).
16. M. Hongo, S. Fujisawa, T. Adachi, et al., *J. Pharmacol. Sci.*, **131** (2), 118 (2016).
17. W. Lorenz, J. W. Lomasney, S. Collins, et al., *Mol. Pharmacol.*, **38** (5), 599 (1990).
18. M. Ibacache, G. Sanchez, Z. Pedrozo, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Molecular Basis of Disease*, **1822** (4), 537 (2012).
19. D. E. Berkowitz, D. T. Price, E. A. Bello, et al., *J. Am. Soc. Anesthesiol.*, **81** (5), 1235 (1994).
20. Y. M. Kokoz, E. V. Evdokimovskii, A. V. Maltsev, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **100**, 9 (2016).
21. A. Martinez-Fernandez, T. J. Nelson, S. Reyes, et al., *Circulation. Cardiovasc. Genetics*, **7** (5), 667 (2014).
22. A. E. Alekseev, S. Park, O. Y. Pimenov, et al., *Pharmacol. Therapeut.*, **197**, 179 (2019).
23. A. A. Zverev, T. A. Anikina, N. G. Iskakov, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **165** (5), 610 (2018).
24. А. М. Купцова, И. И. Хабибрахманов, А. М. Галиева и др., в *Сб. тезисов III Международного конгресса «Фундаментальная и клиническая электрофизиология. Актуальные вопросы аритмологии»* (2019), сс. 65–66.
25. Л. И. Фасхутдинов, Н. И. Зиятдинова, Р. С. Кобзарев и Т. Л. Зефилов, *Рос. кардиол. журн.*, № 27 (S5), 113 2022.
26. Ф. Г. Ситдииков и Т. Л. Зефилов, *Лекции по возрастной физиологии сердца* (ТГГПУ, Казань, 2006).
27. С. А. Кодиров, В. Л. Журавлев, Т. А. Сафонова и др., *Обзоры по клинич. и лекарств. фармакологии* **3** (4), 27 (2004).
28. С. М. J. Tan, P. Green, N. Tapoulal, et al., *Front. Physiol.*, **9**, 1 (2018).

Age Peculiarities in the Effect of Stimulation of α_2 -Adrenergic Receptor on Electrical Activity of Rat Cardiomyocytes

A.M. Galieva*, N.I. Ziyatdinova*, N. Mansour*, L.I. Fashutdinov*, and T.L. Zefirov*

*Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia

Clonidine hydrochloride, an agonist of the α_2 -adrenergic receptor, was tested for its effect on the parameters of the electrical activity of the atrial myocardium induced by pacing. In the experimental rat cardiomyocyte pacing model, clonidine hydrochloride caused a decrease (approximately 50% and 90%) in action potential duration in adult rats. Treatment of one- and three-week-old rats with this agonist led to an increase (around 50% and 90%) in action potential duration

Keywords: α_2 -adrenergic receptors, heart, electrophysiology