

ДОЗОЗАВИСИМОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРБАХОЛИНА НА СИЛУ СОКРАЩЕНИЯ МИОКАРДА КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© А.М.Сергеева, Н.И.Зиятдинова, Л.И.Хисамиева, Т.Л.Зефиоров

В статье изучено *in vitro* дозозависимое действие карбахолина 10^{-5} - 10^{-9} моль на сократимость миокарда крыс у 1-, 3-, 6-, 8- и 20-недельного возраста. Отрицательный инотропный эффект карбахолина крыс выявлен в концентрации 10^{-5} моль. Исключением является миокард предсердий новорожденных животных, у которых карбахолин в концентрации 10^{-5} моль не приводил к достоверным изменениям. У 8-недельных животных карбахолин в низких концентрациях вызывал увеличение силы сокращения миокарда.

Ключевые слова: сердце, сократимость, карбахолин, крыса, постнатальный онтогенез.

В основе нервной регуляции деятельности сердца лежит взаимодействие между симпатическим и парасимпатическим отделами вегетативной нервной системы, которые реализуют свои влияния через адренорецепторы и холинорецепторы клеток сердца [1; 2; 3; 4].

Окончания этих нейронов выделяют ацетилхолин (АХ), который взаимодействует с мускариновыми холинорецепторами постганглионарных парасимпатических нейронов. Ацетилхолин может влиять на другие структуры и механизмы помимо ингибирования сердечной деятельности. Механизмы действия парасимпатических нейронов на сердце изучаются и развиваются интенсивно [3; 5; 6; 7; 8; 9]. АХ может уменьшить воздействие изопrenalина путем фосфорелирования регуляторных белков в сердце млекопитающих. В человеческом сердце АХ или карбахолин снижают базальную силу сокращения, а также силу сокращения, заранее активируемую изопrenalином, НА, прокатеролом и форскалином [10; 11]. Эти результаты получены на изолированных препаратах правого предсердия человека в условиях электрической стимуляции. В препаратах желудочков, однако АХ или карбахолин снижали силу сокращений миокарда только в случае ее предварительной стимуляции изопrenalином или форскалином [11]. На протяжении достаточно долгого времени известно, что стимуляция М-ХР повышает уровень цГМФ, что в свою очередь может ингибировать кальциевые токи L-типа через активацию цГМФ зависимых протеинкиназ [12], или через стимуляцию цГМФ зависимых цАМФ фосфодиэстераз [13], или через стимуляцию цГМФ зависимых цАМФ фосфодиэстераз [13]. Аналоги цГМФ могут имитировать эффекты АХ в сердце. Было постулировано, что уровни цАМФ и цГМФ в сердце изменяются в противоположном направлении, тем не менее преоб-

ладающая роль цГМФ в отрицательном хронотропном и инотропном эффектах при стимуляции М-ХР не получила дальнейшего развития [14]. Не менее актуален вопрос о формировании механизмов парасимпатической регуляции сердечной деятельности и в онтогенезе [14].

Целью работы явилось изучение *in vitro* дозозависимого действия карбахолина на сократимость миокарда крыс у 1-, 3-, 6-ти, 8- и 20-недельного возраста.

Методика исследования

Работа выполнена на 40 крысах 1-, 3-, 6-, 8- и 20-недельного возраста. Для наркоза использовали 25 % раствор уретана, который вводили интраперитонеально в дозе 1000 мг/кг массы животного. Изолированное сердце помещалось в ванночку с рабочим раствором, к которой подсоединялись два электрода – стимулятора и в соответствии с анатомическим строением сердца вырезались полоски миокарда из правого предсердия и правого желудочка длиной 2-3 мм и диаметром 0,8-1,0 мм. Препарат помещали вертикально в резервуар V=20 мл, оксигенированный карбогеном (97% O₂ и 3% CO₂) рабочий раствор при комнатной температуре.

Верхний конец препарата прикреплялся к нержавеющей стержню, соединенному с измерителем напряжения, нижний конец к резиновому блоку. Препарат стимулировался электрическим сигналом через 2 серебряных электрода (с помощью стимулятора ЭСЛ-2 (Россия) с частотой 6 и 10 стимулов в минуту для 7-, 21- и 42-, 56-, 100-суточных животных, соответственно, амплитудой сигнала 10 mV, продолжительность стимула 5 мс). После погружения препарата в резервуар следовал период проработки в течение 40-60 минут, в ходе которого мышечным волокнам постепенно придавалось оптимальное напряжение. Оптимальным напряжением считалась такая точ-

ка растяжения препарата, после преодоления которой начиналось снижение силы сокращения препарата. По окончании проработки 5 минут регистрировались исходные параметры сокращения, затем 21 минуту с добавлением в рабочий раствор агониста холинорецепторов (АХ) карбахолина концентрацией 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} моль. Силу сокращения (F) выражали в граммах (g). Обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Chart 5, на установке Power Lab (AD Instruments, Австралия), с применением пакета программ Statgraphics.

Статистическая обработка и определение достоверности различий, результатов исследований по критерию Стьюдента и Вулькоксона осуществлялись в редакторе Microsoft Excel.

Результаты исследования

В экспериментальной группе взрослых 20-недельных животных исходная сила сокращения изолированного миокарда правого предсердия составляла $0,280757 \pm 0,069024$ g. После добавления в раствор агониста холинорецепторов (ХР) карбахолина в концентрации 10^{-5} М с 1-й по 14-ю минуты значения силы сокращения миокарда достоверно уменьшились до $0,226664 \pm 0,060598$ g ($p < 0,01$) и на 21-й минуте составили $0,222947 \pm 0,055694$ g ($p < 0,01$) (табл.1). Введение агониста ХР в остальные концентрации не приводило к достоверному снижению силы сокращения изолированных полосок миокарда предсердий взрослых крыс. Исходная сила сокращения изолированных полосок миокарда желудочков до введения карбахолина в концентрации 10^{-5} М имела значение $0,276514 \pm 0,058016$ g. К 7-й минуте сила сокращения достоверно уменьшилась до $0,222493 \pm 0,048771$ g ($p < 0,001$), и на 21-й минуте исследования составило $0,195407 \pm 0,048672$ g ($p < 0,001$) (табл.2). Добавление карбахолина в концентрациях 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} М не приводила к достоверным изменениям силы сокращения изолированных полосок миокарда желудочков (рис.1).

У животных 8-недельного возраста реакция сократимости полосок миокарда предсердий и желудочков зависела от концентрации. Карбахолин в концентрациях 10^{-6} и 10^{-9} М не вызывал достоверных изменений сократимости миокарда предсердий. Карбахолин в концентрации 10^{-5} М уменьшал силу сокращений миокарда предсердий с $0,233642 \pm 0,112475$ g до $0,161583 \pm 0,085385$ g ($p < 0,05$) (табл.1), в концентрации 10^{-8} М с $1,055127 \pm 0,164174$ g до $1,018986 \pm 0,163328$ g ($p < 0,01$). Карбахолин в концентрации 10^{-7} М, напротив, увеличил силу сокращения изолированных полосок миокарда правого предсердия с

$1,09567 \pm 0,174225$ g до $1,131399 \pm 0,179095$ g ($p < 0,05$).

Сила сокращения изолированных полосок миокарда правого желудочка уменьшалась при введении карбахолина в концентрации 10^{-5} М с $0,122236 \pm 0,036964$ g до $0,076398 \pm 0,026005$ g ($p < 0,01$). Карбахолин в концентрации 10^{-9} М достоверно увеличивал силу сокращения изолированных полосок миокарда с $0,220650 \pm 0,03779$ g до $0,232768 \pm 0,039811$ g ($p < 0,05$).

Исходная амплитуда сокращения полосок миокарда правого предсердия крыс 6-недельного возраста до добавления в перфузируемый раствор карбахолина в концентрации 10^{-5} М имела значение $0,23992 \pm 0,072524$ g. На 7-й минуте эксперимента сила сокращения уменьшилась до $0,194845 \pm 0,070196$ g ($p < 0,001$), на 14-й и 21-й минутах уменьшение достоверно составило $0,181727 \pm 0,069004$ g ($p < 0,001$) и $0,17086 \pm 0,066585$ g ($p < 0,001$) (табл.1). Карбахолин в концентрациях 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} М вызывал незначительное уменьшение силы сокращения полосок миокарда предсердий. Исходная величина силы сокращения изолированных полосок миокарда правого желудочка до добавления карбахолина в концентрации 10^{-5} М равна $0,154928 \pm 0,024818$ g. На 1-й минуте сила сокращения полосок миокарда уменьшилась до $0,150114 \pm 0,025178$ g ($p < 0,05$). В дальнейшем сила сокращения продолжала уменьшаться и на 21-й минуте составила $0,103097 \pm 0,016064$ g ($p < 0,001$) (табл.2). Карбахолин в концентрации 10^{-8} М вызывал уменьшение силы сокращения полосок миокарда желудочков. Исходное значение составило $0,375943 \pm 0,002084$ g. Сила сокращения снизилась до $0,368161 \pm 0,000464$ g ($p < 0,01$) на 14-й минуте и до $0,367106 \pm 0,000807$ g ($p < 0,01$) на 21-й минуте. Карбахолин в концентрациях 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-9} М не вызывал достоверных изменений силы сокращения изолированных полосок миокарда желудочков.

Исходная сила сокращения полосок миокарда правого предсердия 3-недельных крысят до добавления в перфузируемый раствор карбахолина в концентрации 10^{-5} М составляла $0,184734 \pm 0,05854$ g. На 7-й и 14-й минутах уменьшилась до $0,15011 \pm 0,052016$ g ($p < 0,01$) и $0,139117 \pm 0,049869$ g ($p < 0,01$). В течение 21-й минуты сила сокращения достоверно уменьшилась до $0,121994 \pm 0,041111$ g ($p < 0,01$) (табл.1). Карбахолин в концентрации 10^{-6} М достоверно уменьшал силу сокращения полосок миокарда правого предсердия. В ходе 1-й минуты сила сокращения снижалась с $0,154557 \pm 0,047939$ g уменьшилась до $0,149791 \pm 0,048718$ g ($p < 0,05$) на

21-й минуте (рис.4). Концентрации карбахолина 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} М не вызывал изменения силы сокращения изолированных полосок миокарда правого предсердия (рис.4). Сила сокращения изолированных полосок миокарда правого желудочка 3-недельных животных до введения карбахолина в концентрации 10^{-5} М равнялась $0,121646 \pm 0,024323$ г. На 7-й минуте эксперимента сила сокращения уменьшалась до $0,096634 \pm 0,02109$ г ($p < 0,01$), а на 21-й минуте уменьшение составило $0,07615 \pm 0,016482$ г ($p < 0,01$) (табл.2).

У крыс 1-недельного возраста не наблюдалось изменение сократимости миокарда предсердий при введении всех изученных концентраций карбахолина. Сила сокращения миокарда желудочков уменьшалась с $0,126922 \pm 0,038668$ г до $0,111338 \pm 0,034314$ г ($p < 0,01$) при введении агониста ХР в концентрации 10^{-5} М.

Более детальное знакомство с современными данными позволяют сделать заключение, что ацетилхолин в покое не оказывает влияние на сократимость миокарда, а ингибирует ее лишь после усиления силы сокращений при применении фармакологических агентов, активирующих систему вторичных посредников аделатциклазу-цАМФ. В качестве таковых наиболее логично предположить действие катехоловых аминов, в частности норадреналина, который высвобождает

из нервных терминалей постганглионарных симпатических нейронов. Только после их воздействия, на фоне усиления сократительной активности агонисты холинорецепторов ингибируют сократительную активность. В наших экспериментах карбахолин оказывал достоверный отрицательный эффект лишь в применении его в дозе 10^{-5} моля, что существенно превышает его физиологическую концентрацию. Можно сделать предположение, что у крыс в покое ацетилхолин из парасимпатических преганглионаров выделяется в небольших количествах и его секреция резко увеличивается лишь в особых случаях, например при электрической стимуляции вагуса. Следует отметить, что по аналогии с гипотезой профессора М.Г.Удельного, который сделал предположение о возможности разнонаправленного влияния парасимпатического отдела на сердечную деятельность. Ацетилхолин способен оказывать не только отрицательный, но и положительный инотропный эффект. Данное предположение основано на результатах ряда исследователей, которые считают, что разнонаправленный эффект ацетилхолина может быть связан с активацией разных подтипов мускариновых холинорецепторов и, как следствие, модуляцией активности различных систем вторичных посредников и различных эффекторов.

Таблица 1.

Влияние карбахолина (10^{-5} М) на силу сокращения (г) полосок миокарда предсердий крыс

Возраст (нед)	Исходная	1 мин	7 мин	14 мин	21 мин
1 (n=10)	$0,067249 \pm 0,024253$	$0,067248 \pm 0,02445$	$0,068674 \pm 0,025204$	$0,067581 \pm 0,024835$	$0,065602 \pm 0,024059$
3 (n=10)	$0,184734 \pm 0,05854$	$0,174185 \pm 0,05641$	$0,15011 \pm 0,052016$ **	$0,139117 \pm 0,049869$ **	$0,121994 \pm 0,041111$ **
6 (n=10)	$0,23992 \pm 0,072524$	$0,233968 \pm 0,076819$	$0,194845 \pm 0,070196$ ***	$0,181727 \pm 0,069004$ **	$0,17086 \pm 0,066585$ ***
8 (n=10)	$0,233642 \pm 0,112475$	$0,220874 \pm 0,108752$ *	$0,193678 \pm 0,096452$ *	$0,176226 \pm 0,089392$ *	$0,161583 \pm 0,085385$ *
20 (n=10)	$0,280757 \pm 0,069024$	$0,264817 \pm 0,070905$	$0,226664 \pm 0,060598$ **	$0,222947 \pm 0,055694$ **	$0,218338 \pm 0,053804$ *

Таблица 2.

Влияние карбахолина (10^{-5} М) на силу сокращения (г) полосок миокарда желудочков крыс

Возраст (неделя)	Исходная	1 мин	7 мин	14 мин	21 мин
1 (n=10)	$0,126922 \pm 0,038668$	$0,124476 \pm 0,037722$	$0,118778 \pm 0,035925$ **	$0,114709 \pm 0,035047$ **	$0,111338 \pm 0,034314$ **
3 (n=10)	$0,121646 \pm 0,024323$	$0,110932 \pm 0,022875$	$0,096634 \pm 0,02109$ **	$0,084288 \pm 0,018526$ **	$0,07615 \pm 0,016482$ **
6 (n=10)	$0,154928 \pm 0,024818$	$0,150114 \pm 0,025178$ *	$0,120197 \pm 0,020471$ ***	$0,10996 \pm 0,018651$ ***	$0,103097 \pm 0,016064$ ***
8 (n=10)	$0,122236 \pm 0,036964$	$0,118003 \pm 0,03512$	$0,107229 \pm 0,032826$	$0,090343 \pm 0,029463$ **	$0,076398 \pm 0,026005$ **
20 (n=10)	$0,276514 \pm 0,058016$	$0,269531 \pm 0,055655$	$0,222493 \pm 0,048771$ ***	$0,202729 \pm 0,047518$ ***	$0,195407 \pm 0,048672$ ***

Примечание: $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***).

1. *Зефирова Т.Л., Зиятдинова Н.И., Сайфутдинова Л.Р., Зефирова А.Л.* Влияние селективной блокады разных подтипов М-холинорецепторов на сердечную деятельность и артериальное давление крыс // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2006. – №6. – С.565.
2. *Зефирова Т.Л., Гибина А.Е., Салман М.А.Х., Зиятдинова Н.И., Сайфутдинова Л.Р., Зефирова А.Л.* М3-холинорецепторы участвуют в постнатальном развитии холинергической регуляции работы сердца крыс // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2007. – №8. – С.135.
3. *Choate J.K.* Neuronal control of heart rate in isolated mouse atria // *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285. – 2003. – H.1340-1346.
4. *Robinson R.B., Baruscotti M., DiFrancesco D.* Autonomic modulation of heart rate: pitfalls of nonselective channel blockade // *Am. J Physiol Heart Circ Physiol* 285. – 2003. – P.2865.
5. *Зиятдинова Н.И., Зефирова А.Л., Ситдииков Ф.Г., Зефирова Т.Л.* Вегетативный контроль сердечной деятельности включает модуляцию каналов, активируемых при гиперполяризации *in vivo* // *Российский физиологический ж. им.Сеченова.* – 2003. – №2(89). – С.154-160.
6. *Habuchi Y.* Muscarinic inhibition of basal l-type calcium current in pacemaker cells from the rabbit atrioventricular node // *Can. J. Cardiol.* – 1997. – Vol.13. – P.118-1190.
7. *Ito H., Hosoya Y., Inanobe A., Tomoike H., Endoh M.* Acetylcholine and adenosine activate the G protein-gated muscarinic K⁺ channel in ferret ventricular myocytes // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 350. – 1995. – P.610-617.
8. *Mangoni M., Nargeot J.* You might find this additional information useful // *Physiol Rev* 88. – 2008. – P.919-982.
9. *Renaudon B., Bois P., Bescond J., Lenfant J.* Acetylcholine modulates I(f) and IK(ACh) via different pathways in rabbit sino-atrial node cells // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1997. – Vol.29(3). – P.969-975.
10. *Du X.Y., Schoemaker R.G., Bos E., Saxena P.R.* Characterization of the positive and negative inotropic effects of acetylcholine in the human myocardium. – 1995. – P.119-127.
11. *Giessler C., Wangemann T., Zerkowski H.R., Brodd O.E.* Age-dependent decrease in the negative inotropic effects of carbachol on isolated human right atrium // *Eur J Pharmacol.* – 1998. – P.199-202.
12. *Lohmfin S.M., Vaanbrager A.B., Smolenski A., Walter U., Jonge H.R.* De Distinct and specific functional of cGMP-dependent protein kinases // *Trends Biochem Sci* 22. – 1997. – P.307-312.
13. *Mery P.F., Abi-Gerges N., Vandecasteele G., Jurevicius J., Eschenhagen T., Fischmeister R.* Muscarinic regulation of L-type calcium current in isolated cardiac myocytes // *Life Sci* 60. – 1997. – P.1113-1120.
14. *Zefirov T.L., Ziyatdinova N., Zefirov A.L.* Effects of blockade of hyperpolarization-activated ion currents (I_h) on autonomic control of the heart in rats: age-related peculiarities // *Neurophysiology.* – 2003, 35 (b). – P.415-421.

DOSE DEPENDENT EFFECTS OF CARBOCHOLINE ON MYOCARDIAL CONTRACTILITY OF RATS IN POSTNATAL PERIOD

A.M.Sergeeva, N.I.Ziyatdinova, L.I.Hisamieva, T.L.Zefirov

The dose dependent effects of carbocholine 10⁻⁵ to 10⁻⁹ mole on myocardial contractility of rats of one, three, six, eight and twenty-week-old were investigated. The negative inotropic effect of carbocholine was evoked in concentration 10⁻⁵ mole, except the myocardium of the atria of newborn animals where carbocholine in a concentration of 10⁻⁵ did not lead to significant changes. In eight-week-old animals carbocholine in low concentrations increased contractility of myocardium.

Key words: heart, myocardial contractility, carbocholine, rat, postnatal period.

Сергеева Анна Михайловна – кандидат биологических наук, специалист по учебно-методической работе Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета.

E-mail: zefirovlt@mail.ru

Зиятдинова Нафиса Ильгизовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры анатомии, физиологии и охраны здоровья человека Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета.

E-mail: zefirovlt@mail.ru

Хисамиева Луиза Ирековна – соискатель кафедры анатомии, физиологии и охраны здоровья человека Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета.

E-mail: zefirovtl@mail.ru

Зефирова Тимур Львович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии, физиологии и охраны здоровья человека Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета.

E-mail: zefirovtl@mail.ru

Поступила в редакцию 15.12.2010