

## ДОЗАЗАВИСИМОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕСЕЛЕКТИВНОЙ БЛОКАДЫ МУСКАРИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ НА СИЛУ СОКРАЩЕНИЯ МИОКАРДА КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© Н.И.Зиятдинова, А.М.Сергеева, Р.Е.Дементьева, Т.Л.Зефиоров

В статье проведено исследование по изучению дозозависимого действия неселективной блокады мускариновых холинорецепторов на силу сокращения миокарда крыс разного возраста. Атропин не вызывал отрицательного эффекта на сократимость полосок миокарда предсердий и желудочков крыс. Самая высокая доза ( $10^{-3}$  М) вызывала положительную инотропную реакцию предсердий и желудочков крыс всех исследованных возрастов. Атропин в концентрации  $10^{-4}$  М также приводил к увеличению сократимости предсердий и желудочков животных 3-х и 6-ти недельного возраста. Возможно, что более высокая чувствительность к атропину у крысят данного возраста связана с созреванием в данный период симпатической регуляции сердечной деятельности.

**Ключевые слова:** сердце, сократимость, мускариновые холинорецепторы, полоски миокарда, крыса, постнатальный онтогенез.

В современной литературе показано наличие пяти различных подтипов мускариновых холинорецепторов (М-ХР) ( $M_1$ - $M_5$ ) [1]. Преобладающей формой М-ХР в сердце различных видов млекопитающих являются  $M_2$ -ХР [2; 3]. Стимуляция  $M_2$ -ХР вызывает отрицательный хронотропный и инотропный эффекты. В предсердиях стимуляция  $M_2$ -ХР вызывает постоянное урежение работы сердца, в экспериментах на изолированных тканях – постоянное уменьшение силы сокращения. В желудочках уменьшение сократимости показан только на фоне усиления силы сердечных сокращений при повышении цАМФ и введения агонистов  $\beta$ -адренорецепторов или ингибиторов фосфодиэстеразы (так называемый косвенный или "антиадренергический" эффект агонистов М-ХР) [4]. Известно, что в регуляции работы сердца участвуют  $M_2$ -ХР. Преимущественную локализацию  $M_2$ -ХР выявили радиолитандный метод исследования и функциональные исследования с использованием селективных антагонистов разных подтипов М-ХР на изолированных препаратах предсердий и желудочков человека [5; 6]. Проведя анализ зарубежной литературы, данные говорят в пользу идеи о том, что в сердце человека существуют и другие М-ХР, кроме второго подтипа мускариновых холинорецепторов.

Существует предположение, что в основе особенностей регуляции сократительной активности миокарда лежит взаимодействие АХ с разными подтипами М-ХР, активации систем вторичных посредников и модуляции деятельности различных эффекторов [7; 8; 9; 10; 11; 12; 13]. Таким образом, весьма актуальным является изучение влияния неселективной и селективной

блокады разных подтипов М-ХР на инотропию сердца крыс.

Целью работы явилось изучение *in vitro* дозозависимого влияния неселективной М-ХР на сократимость миокарда крыс у 1-но, 3-х, 6-ти, 8-ми и 20-ти недельного возраста.

### Методика исследования

Работа выполнена на 50 крысах 1-но, 3-х, 6-ти, 8-ми и 20-ти 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%  $O_2$  и 3%  $CO_2$ ) 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-ми и 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 точка 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 неселективного блокатора М-ХР атропина концентрации  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  М. 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 крыс исходная сила сокращения изолированных полосок миокарда предсердий до добавления в рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-6}$  М равнялась  $0,553339 \pm 0,084202$  g. На 1-й минуте сила сокращения увеличилась до  $0,562415 \pm 0,08682$  g, а к заключительной минуте эксперимента составила  $0,591281 \pm 0,098292$  g. Сила сокращения изолированных полосок миокарда предсердий при введении в рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-5}$  М и  $10^{-4}$  М не изменялись. После введения в рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-3}$  М сила сокращения изолированных полосок миокарда предсердий увеличилась с  $0,300026 \pm 0,138659$  g до  $0,42685 \pm 0,212457$  g ( $p < 0,01$ ) (рис.1). Атропин в концентрации  $10^{-6}$  М и  $10^{-5}$  М не менял силу сокращения полосок миокарда желудочков. Сила сокращения изолированных полосок миокарда желудочков после добавления в перфузируемый карбогеном рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-4}$  М увеличилась с  $0,449039 \pm 0,116596$  g до  $0,474923 \pm 0,135582$  g. Атропина в концентрации  $10^{-3}$  М вызывал увеличение силы сокращения полосок миокарда желудочков с  $0,230376 \pm 0,124368$  g до  $0,372058 \pm 0,19097$  g ( $p < 0,01$ ) (рис.1).



Примечание:  $P \leq 0,01$ (\*\*).

Рис.1.

Сила сокращения изолированных полосок миокарда предсердий животных 8-ми недельного возраста до введения в рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-6}$  М равнялась  $0,527751 \pm 0,182319$  g. К заключительной минуте наблюдения она уменьшилась и составила  $0,494317 \pm 0,176441$  g. Атропин в концентрации  $10^{-5}$  М не оказывал влияния на силу сокращения полосок миокарда предсердий. Атропин в концентрации  $10^{-4}$  М вызывал незначительное увеличение силы сокращений. Исходные значения силы сокращения изолированных полосок миокарда до введения в рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-3}$  М равнялась  $0,217604 \pm 0,099303$  g. На 1-й минуте значение силы сокращения полосок миокарда достоверно увеличилось до  $0,232255 \pm 0,104808$  g ( $p < 0,01$ ), и на последней минуте наблюдения значения силы сокращения полосок увеличились и равнялись  $0,365983 \pm 0,163563$  g ( $p < 0,01$ ) (рис.2). Исходная сила сокращения изолированных полосок миокарда желудочков 8-ми недельных крыс до добавления в рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-6}$  М равнялась  $0,53294 \pm 0,186232$  g. В ходе эксперимента сила сокращения снизилась до  $0,491617 \pm 0,175386$  g. При введении в рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-5}$  М равнялась  $0,189482 \pm 0,019813$  g. Сила сокращения полосок миокарда желудочков уменьшилась до  $0,175932 \pm 0,021657$  g. После добавления в перфузируемый карбогеном рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-4}$  М сокращение полосок миокарда незначительно увеличилось с  $0,237811 \pm 0,104389$  g до  $0,257073 \pm 0,116276$  g. Атропин в концентрации  $10^{-3}$  М приводил к увеличению силы сокращения полосок с  $0,433804 \pm 0,19508$  g до  $0,679248 \pm 0,304425$  g ( $p < 0,01$ ) (рис.2).



Примечание:  $P \leq 0,01$ (\*\*).

Рис.2.

Исходные значения силы сокращения изолированных полосок миокарда предсердий 6-ти недельных крыс до введения в рабочий раствор

атропина в концентрации  $10^{-6}$  М равнялись  $0,593035 \pm 0,196822$  г. На 1-й минуте значения силы сокращения полосок миокарда увеличились до  $0,60371 \pm 0,201075$  г и далее не изменялись. Атропин в концентрации  $10^{-5}$  М не приводил к достоверным изменениям показателей сократимости полосок миокарда предсердий. При добавлении в перфузируемый карбогеном рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-4}$  М сила сокращения к 9-й минуте наблюдения достоверно увеличилась с  $0,642692 \pm 0,138308$  г до  $0,689685 \pm 0,153139$  г ( $p < 0,05$ ). Исходные значения силы сокращения изолированных полосок миокарда предсердий до введения в рабочий раствор блокатора М-ХР атропина в концентрации  $10^{-3}$  М равнялась  $0,515242 \pm 0,128222$  г. На 1-й минуте значения силы сокращения полосок миокарда увеличились до  $0,559186 \pm 0,137339$  г ( $p < 0,05$ ). К заключительной минуте наблюдения значения силы сокращения полосок увеличились и равнялись  $0,844583 \pm 0,208516$  г ( $p < 0,01$ ). Добавление в рабочий раствор блокатора М-ХР в концентрации  $10^{-6}$  М не изменяло силу сокращения полосок миокарда желудочков 6-ти недельных крысят. Атропин в концентрации  $10^{-5}$  М не оказывал влияния на силу сокращения полосок миокарда. Добавление в перфузируемый карбогеном рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-4}$  М не вызывало изменения силы сокращения полосок миокарда. Исходное значение силы сокращения изолированных полосок миокарда желудочков до введения в рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-3}$  М равнялось  $0,616121 \pm 0,141313$  г. На 1-й минуте сила сокращения полосок миокарда увеличивалась до  $0,648157 \pm 0,142056$  г ( $p < 0,05$ ), а к последней минуте – до  $0,982457 \pm 0,187295$  г ( $p < 0,01$ ).



Примечание:  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*).  
Рис.3.

Атропин в концентрации  $10^{-6}$   $10^{-5}$  М не оказывал влияния на силу сокращения полосок мио-

карда предсердий крысят 3-х недельного возраста. Добавление в перфузируемый карбогеном рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-4}$  М привело к увеличению силы сокращения с  $0,242413 \pm 0,068894$  г до  $0,276445 \pm 0,077491$  г ( $p < 0,05$ ). Атропин в концентрации  $10^{-3}$  М вызывал увеличение с  $0,25635 \pm 0,051111$  г до  $0,423548 \pm 0,065719$  г ( $p < 0,01$ ) (рис.4). Исходная сила сокращения изолированных полосок миокарда желудочков до добавления в рабочий раствор блокатора М-ХР в концентрации  $10^{-6}$  М равнялась  $0,151935 \pm 0,029743$  г. К 9-й минуте эксперимента сила сокращения полосок уменьшилась и равнялась  $0,143103 \pm 0,027474$  г. Атропин в концентрации  $10^{-5}$  М приводил к некоторому уменьшению силы сокращения с  $0,089908 \pm 0,023477$  г до  $0,078465 \pm 0,021188$  г на заключительной минуте эксперимента. Атропин в концентрации  $10^{-4}$  М приводил к увеличению силы сокращения. Исходные значения составили  $0,308774 \pm 0,11549$  г, и на заключительной минуте равнялись  $0,323469 \pm 0,107597$  г ( $p < 0,05$ ). Атропин в концентрации  $10^{-3}$  М приводил к увеличению силы сокращения с  $0,110658 \pm 0,021066$  г до  $0,206237 \pm 0,015529$  г ( $p < 0,01$ ) (рис.5).



Примечание:  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*).  
Рис.4.

У новорожденных крысят исходные значения силы сокращения изолированных полосок миокарда предсердий до введения в рабочий раствор блокатора М-ХР атропина в концентрации  $10^{-6}$  М равнялись  $0,098784 \pm 0,022865$  г. На 1-й минуте значения силы сокращения полосок миокарда не изменились. К заключительной минуте наблюдения значения силы сокращения полосок уменьшились до  $0,097486 \pm 0,021652$  г. Сила сокращения изолированных полосок миокарда предсердий до добавления в рабочий раствор блокатора М-ХР в концентрации  $10^{-5}$  М уменьшилась с  $0,130388 \pm 0,04082$  г до  $0,126637 \pm 0,037982$  г. Значения силы сокращения изолированных полосок миокарда предсердий после добавления в перфузируемый карбогеном рабочий раствор блокато-

ра М-ХР атропина в концентрации  $10^{-4}$  М не изменились. Введение в рабочий раствор блокатора М-ХР атропина в концентрации  $10^{-3}$  М приводил к увеличению силы сокращения изолированных полосок миокарда предсердий с  $0,21532 \pm 0,058788$  г до  $0,271368 \pm 0,02818$  г ( $p < 0,01$ ) (рис. 5). Сила сокращения изолированных полосок миокарда желудочков при добавлении в рабочий раствор блокатора М-ХР в концентрации  $10^{-6}$  М не изменилась. Амплитуда сокращения полосок миокарда желудочков до введения в рабочий раствор атропина в концентрации  $10^{-5}$  М равнялась  $0,168393 \pm 0,030074$  г и увеличилась до  $0,174763 \pm 0,031638$  г. Исходные значения силы сокращения изолированных полосок миокарда до добавления неселективного блокатора М-ХР атропина в концентрации  $10^{-4}$  М равнялись  $0,518824 \pm 0,081726$  г. На следующих минутах эксперимента сила сокращения полосок миокарда желудочков равнялась  $0,504141 \pm 0,075982$  г. Сила сокращения изолированных полосок миокарда до введения в рабочий раствор блокатора М-ХР атропина в концентрации  $10^{-3}$  М равнялась  $0,072398 \pm 0,006176$  г. Сила сокращения достоверно увеличивалась до  $0,117175 \pm 0,017151$  г ( $p < 0,01$ ), а на последней минуте составила  $0,173503 \pm 0,008643$  г ( $p < 0,01$ ) (рис.5).



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

Рис.5.

Таким образом, атропин не вызывал ожидаемого по классическим представлениям отрицательного эффекта на сократимость полосок миокарда предсердий и желудочков крыс. Самая высокая доза ( $10^{-3}$  М) вызывала положительную инотропную реакцию предсердий и желудочков крыс всех исследованных возрастов. Атропин в концентрации  $10^{-4}$  М также приводил к увеличению сократимости предсердий и желудочков животных 3-х и 6-ти недельного возраста. Возможно, что более высокая чувствительность к атропину у крысят данного возраста связана с созре-

ванием в данный период симпатической регуляции сердечной деятельности.

\*\*\*\*\*

1. *Peralta E.G., Ashkenazi A., Winslow J.W., Smith D.H.* Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors // *Ramachandran J and Capon DJ.* – 1987. – 3929 p.
2. *Caulfield M.P.* Muscarinic receptors: Characterization, coupling and function. – 1993. – 379 p.
3. *Hulme E.C., Birdsall N.J.M., Buckley N.J.* Muscarinic receptor subtypes // *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30. – 1990. – P.663-673.
4. *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.
5. *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.
6. *Giraldo E., Martos F., Gomez A.* Characterization of muscarinic receptor subtypes in human tissue // *Giraldo.* – 1988. – P.1507-1515.
7. *Anger T., Klintworth N., Stumpf C., Daniel W.G.* RGS protein specificity towards Gq- and Gi/o-mediated ERK 1/2 and Akt activation, in vitro // *J Biochem Mol Biol.* – 2007. – Vol.30; 40(6). – P.899-910.
8. *Ganzinelli S., Joensen L., Borda E., Bernabeo G., Sterin-Borda L.* Mechanisms involved in the regulation of mRNA for M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptors and endothelial and neuronal NO synthases in rat atria // *Br J Pharmacol.* – 2007. – P.175-185.
9. *Hang P.Z., Zhao J., Wang Y.P.* Reciprocal regulation between M<sub>3</sub> muscarinic acetylcholine receptor and protein kinase C-epsilon in ventricular myocytes during myocardial ischemia in rats // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 2009. – P.443-450.
10. *Hussain R.I., Qvigstad E., Birkeland J.A., Eikemo H.* Activation of muscarinic receptors elicits inotropic responses in ventricular muscle from rats with heart failure through myosin light chain phosphorylation // *Br J Pharmacol.* – 2009. – P.575-586.
11. *Myslivecek J., Klein M., Novakova M., Ricny J.* The detection of the non-M<sub>2</sub> muscarinic receptor subtype in the rat heart atria and ventricles // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 2008. – P.103-116.
12. *van Borren M.M., Verkerk A.O., Wilders R., Hajji N., Zegers J.G., Bourrier J., Tan H.L.* Effects of muscarinic receptor stimulation on Ca<sup>2+</sup> transient, cAMP production and pacemaker frequency of rabbit sinoatrial node cells // *Basic Res Cardiol.* – 2010. – P.73-87.
13. *Vieira C., Duarte-Araujo M.* Muscarinic M (3) facilitation of acetylcholine release from rat myenteric neurons depends on adenosine outflow leading to activation of excitatory A(2A) receptors // *Neurogastroenterol Motil.* – 2009. – P.1118-1195.

**DOSE-DEPENDENTE EFFECT OF NON SELECTIVE  
M-ACETYLCHOLINE RECEPTORS BLOCKADE ON RATS  
MYOCARDIUM CONTRACTILITY IN POSTNATAL ONTOGENESIS**

**N.I.Ziyatdinova, A.M.Sergeeva, R.E.Dementieva, T.L.Zefirov**

Dose-dependent actions of non selective blockade M-acetylcholine receptors on contractility of rat's myocardium in postnatal ontogenesis were studied. Atropine didn't cause a negative effect on contractility activity of a myocardium of auricles and ventricles of rats. The maximal dose ( $10^{-3}$ ) caused positive inotropic reaction of auricles and ventricles of rats of all investigated age. Atropine in concentration of  $10^{-4}$  M also led to increase contractility auricles and ventricles of animals 3 and 6 week age. Probably that higher sensitivity to atropine at rats of this age is connected with maturing of heart sympathetic regulation.

**Key words:** heart, contractility, M-acetylcholine receptors, myocardium, rat, postnatal ontogenesis.

\* \* \* \* \*

**Зиятдинова Нафиса Ильгизовна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры анатомии, физиологии и охраны здоровья человека Института физической культуры и восстановительной медицины Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: zefirovtl@mail.ru

**Сергеева Анна Михайловна** – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры анатомии, физиологии и охраны здоровья человека Института физической культуры и восстановительной медицины Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: zefirovtl@mail.ru

**Дементьева Рената Евгеньевна** – аспирант кафедры анатомии, физиологии и охраны здоровья человека Института физической культуры и восстановительной медицины Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: zefirovtl@mail.ru

**Зефирова Тимур Львович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии, физиологии и охраны здоровья человека Института физической культуры и восстановительной медицины Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: zefirovtl@mail.ru

Поступила в редакцию 25.04.2011