

Мальцев А. В.^{1,2}, Коккоз Ю. М.¹

¹ ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН, Пущино, Россия

² ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии» РАН, Москва, Россия

ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ α_2 -АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ И ИМИДАЗОЛИНОВЫХ АГОНИСТОВ В ИЗОЛИРОВАННЫХ КАРДИОМИОЦИТАХ

Ключевые слова: гуанабенц, рилменидин, потенциал-зависимые кальциевые токи, оксид азота, кардиомиоцит.

Ссылка для цитирования: Мальцев А. В., Коккоз Ю. М. Периферические эффекты взаимодействия

α_2 -адренергических и имидазолиновых агонистов в изолированных кардиомиоцитах. Кардиология. 2019;59(4):52–63.

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Изучение функционального взаимодействия недавно обнаруженных на сарколемме одиночных кардиомиоцитов α_2 -адренергических и имидазолиновых рецепторов в отношении регуляции внутриклеточного уровня кальция и продукции сигнальной молекулы оксида азота (NO). **Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на изолированных кардиомиоцитах левого желудочка крыс линии Wistar. Потенциал-зависимые токи Ca^{2+} измеряли от целой клетки методом пэтч-кламп (patch-clamp) в конфигурации перфорированного пэтча («perforated patch»). Внутриклеточный уровень кальция и продукцию NO оценивали по изменению интенсивности флуоресценции Ca^{2+} -специфического и NO-чувствительного зондов на флуоресцентном или конфокальном микроскопе. **Результаты.** Показано, что агонисты α_2 -адренергических и имидазолиновых рецепторов ингибируют токи Ca^{2+} L-типа, однако их эффекты не развиваются на фоне друг друга. Блокада ключевых эффекторных молекул: протеинкиназы B (Akt-киназы) – для α_2 -адренорецепторов, и протеинкиназы C – для имидазолиновых рецепторов, приводит к тому, что действие агонистов становится аддитивным. Как селективный α_2 -агонист – гуанабенц, так и специфический агонист имидазолиновых рецепторов первого типа – рилменидин проявляют дополнительное ингибирование токов Ca^{2+} на фоне базального, сниженного активацией одной из двух рецепторных систем. При этом рилменидин увеличивает уровень свободного Ca^{2+} в цитозоле, а гуанабенц, напротив, снижает. Действие гуанабенца не развивается на фоне рилменидина, хотя тот эффективно увеличивает внутриклеточный уровень кальция в кардиомиоцитах, предварительно обработанных гуанабенцом. При активации α_2 -адренорецепторов происходит существенная стимуляция эндотелиальной изоформы NO-синтазы, и как следствие – увеличение уровня NO. Собственно активация имидазолиновых рецепторов не влияет на синтез NO, однако предотвращает продукцию NO, индуцируемую α_2 -агонистами. **Заключение.** Полученные данные уточняют нецентральные периферические эффекты, возникающие при активации α_2 -адренергической или имидазолиновой систем в условиях эндогенной гиперактивации второй, и позволяют сформулировать ряд практических рекомендаций для клинической практики.

Maltsev A. V.^{1,2}, Kokoz Y. M.¹

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia

² Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Moscow, Russia

NON-CENTRAL INFLUENCES OF α_2 -ADRENERGIC AND IMIDAZOLINE AGONIST INTERACTIONS IN ISOLATED CARDIOMYOCYTES CARDIAC CELLS

Keywords: guanabenz; rilmenidine; voltage-gated Ca^{2+} -currents; nitric oxide; cardiomyocyte.

For citation: Maltsev A. V., Kokoz Y. M. Non-Central Influences of α_2 -Adrenergic and Imidazoline Agonist Interactions in Isolated Cardiomyocytes Cardiac Cells. Kardiologiia. 2019;59(4):52–63.

SUMMARY

Aim: to investigate the functional interaction of α_2 -adrenergic and imidazoline receptors recently identified on the sarcolemma of isolated cardiomyocytes for regulation of the intracellular calcium and the production of the signal molecule of nitric oxide (NO). **Materials and methods:** experiments were performed on isolated left ventricular cardiomyocytes of Wistar rats. Potential-dependent Ca^{2+} -currents were measured from the whole-cell by the patch-clamp method in “perforated-patch” configuration. The intracellular calcium and the production of nitric oxide were estimated from the changes in fluorescence intensity of the Ca^{2+} -specific and NO-sensitive dyes at fluorescent or confocal microscope. **Results:** It has been shown that α_2 -adrenergic and imidazoline receptor agonists inhibit L-type Ca^{2+} -currents by themselves, but their effects do not develop against each other’s background. The blockade of key effector molecules: protein kinase B (Akt kinase) for α_2 -adrenergic receptors, and protein kinase C for imidazoline receptors causes the action of agonists to become additive. Both the selective α_2 -agonist, guanabenz, and the specific agonist of the first type imidazoline receptors, rilmenidine, show an additional inhibition of Ca^{2+} -currents against the basal background already reduced by the activation of one of the two receptor systems. Wherein rilmenidine increases the level of free Ca^{2+} in the cytosol, and guanabenz, on the contrary, decreases it.

The action of guanabenz does not develop against the background of rilmenidine, although it, in turn, effectively increases the intracellular level of calcium in guanabenz-pretreated cardiac cells. Activation of α_2 -adrenergic receptors leads to significant stimulation of the endothelial isoform of NO-synthase, and as a result to an increase in the NO level. Activation of imidazoline receptors itself does not affect NO synthesis but it prevents the production of NO induced by α_2 -agonists. *Conclusion:* obtained data make it possible to formulate a number of useful recommendations for clinical practice, and also to clarify the non-central peripheral effects arising from the activation of α_2 -adrenergic or imidazoline systems under conditions of endogenous hyperactivation on of the two systems.

Артериальная гипертензия (АГ) – комплексная патология сердечно-сосудистой системы, при которой в течение длительного времени наблюдается увеличение артериального давления (АД) как во время систолы, так и в период диастолы в покое. Согласно статистическим данным, этому заболеванию подвержены 20–30% взрослого населения в мире, причем с возрастом распространенность заболевания значительно увеличивается [1]. АГ принято считать скорее симптомом (следствием), чем причиной патофизиологических реакций, возникающих в организме. Она является одним из ключевых факторов риска развития ишемической болезни сердца, нефункциональной гипертрофии миокарда, хронической сердечной недостаточности, инфаркта миокарда и инсультов. Среди внутренних факторов, провоцирующих возникновение АГ, наиболее существенны генетически детерминированные (предрасположенность) нарушения нормальной нейрогуморальной регуляции, заключающиеся в повышении активности прессорных механизмов и/или снижении функциональности депрессорных механизмов.

В норме одной из важнейших систем регуляции тонуса сосудов и работы сердца является симпатико-адреналовая система [2]. Образующиеся в мозговом веществе надпочечников катехоламины выбрасываются в кровяное русло и через взаимодействие с α_1 - и β -адренорецепторами, локализованными в эндотелии и гладкомышечных клетках сосудов, а также на сарколемме кардиомиоцитов, вызывают увеличение внутриклеточного уровня кальция в цитозоле мышечных клеток [3]. Кальций, являясь сигнальным мессенджером и иницируя механизм мышечного сокращения, вызывает вазоконстрикцию и положительный инотропный эффект [4]. Чрезмерная стимуляция симпатико-адреналовой системы, возникающая при психоэмоциональном стрессе, приводит к усиленному синтезу катехоламинов, и, как следствие, накоплению в цитозоле эндотелиальных клеток и кардиомиоцитов (КМЦ) избыточного количества свободного кальция [2, 3]. Пролонгированное увеличение внутриклеточного уровня Ca^{2+} относительно его нормального содержания в цитозоле (около 100 нмоль), называемое перегрузкой кальцием, сопряжено с активацией индукции протоонкогенов и запуском Ca^{2+} -зависимого апоптоза, что лежит в основе патофизиологических изменений, наблюдаемых при развитии сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6].

Если роль α_1 - и β -адренорецепторов в сократимости КМЦ и миокарда в целом изучена достаточно хорошо, то с α_2 -адренорецепторной системой не все ясно. До недав-

него времени господствующей точкой зрения считалось, что α_2 -адренорецепторы отсутствуют на сарколемме КМЦ и локализованы исключительно в нейронах и нервных окончаниях, иннервирующих миокард, а также в эндотелиальных клетках сосудов. С функциональной точки зрения, их активация в пресинаптических окончаниях ингибирует выброс норадреналина и адреналина, предотвращая таким образом прессорную активность катехоламинов по механизму отрицательной обратной связи [7]. В клетках эндотелия активация α_2 -адренорецепторов вызывает стимуляцию NO-синтазы и увеличение продукции оксида азота (NO), способствующее релаксации сосудистых стенок [8]. В настоящее время известны 3 подтипа α_2 -адренорецепторов (α_{2A} -, α_{2B} -, α_{2C} -), кодируемые тремя различными генами. Делеция гена, ответственного за транскрипцию α_{2A} -адренорецепторной мРНК, приводит к повышению АД, положительному хронотропному эффекту и подверженности развитию гипертрофии миокарда и сердечной недостаточности [9]. Было установлено, что гипотензивное действие агонистов α_2 -адренорецепторов – клонидина и дексметомидина зависит от воздействия именно на подтип А этих рецепторов [10]. Активация рецепторов α_{2B} - при системном введении вызывает кратковременный гипертензивный эффект [11]. Кроме того, показано, что α_{2B} -адренорецепторы вовлекаются в развитие сольчувствительной гипертензии у крыс [12].

Известно, что мыши, полностью нокаутированные по всем 3 генам, нежизнеспособны, а двойные нокауты в любой из комбинаций ($\alpha_{2A}^{-/-}/\alpha_{2B}^{-/-}$, $\alpha_{2A}^{-/-}/\alpha_{2C}^{-/-}$, $\alpha_{2B}^{-/-}/\alpha_{2C}^{-/-}$) обладают умеренно гипертензивным фенотипом с повышением среднего систолического и диастолического АД, частоты сердечных сокращений и развивающейся гипертрофией миокарда [11, 13]. Недавно были показаны влияния специфичных α_2 -антагонистов на хронотропные явления в сердцах новорожденных крыс. Считается, что в этом возрасте отсутствует адренергическая регуляция сократительной функции сердца. Блокада α_{2A} - и α_{2B} -AR приводила к умеренной тахикардии, тогда как ингибирование α_{2C} -подтипа не оказывало никакого эффекта [14].

Еще одной рецепторной системой, контролирующей развитие АГ, является имидазолиновая. Она была открыта в середине 80-х годов прошлого столетия P. Voussquet и соавт. [15] как неадренергическая мишень для связывания имидазолинов в рострально-вентролатеральной части продолговатого мозга, отвечающей за контроль над уровнем АД. В настоящий момент агонисты имидазо-

линовых рецепторов (моксонидин и рилменидин) широко применяются в клинической практике как гипотензивные препараты второго поколения.

Не так давно на плазматической мембране одиночных КМЦ были обнаружены все 3 подтипа α_2 -адренергических рецепторов и белок нисхарин, рассматриваемый в современной литературе как основной функциональный компонент имидазолиновых рецепторов первого типа [16]. Обнаруженные рецепторы функционально активны в отношении регуляции внутриклеточного уровня кальция как основного мессенджера, отвечающего за сократимость. Так, стимуляция α_2 -адренорецепторов приводит к активации эндотелиальной изоформы NO-синтазы и NO-зависимому увеличению утилизации кальция из цитозоля с помощью Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматической сети (SERCA) [17]. Кроме того, NO активирует цГМФ (циклогуанозинмонофосфат) – специфическую протеинкиназу G, которая через фосфорилирование потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов ингибирует входящие в КМЦ токи Ca^{2+} [18]. Активация имидазолиновых рецепторов также снижает амплитуду токов Ca^{2+} , однако увеличивает внутриклеточный уровень кальция в изолированных КМЦ [16].

В связи с недавно полученными данными представляется важной задачей исследовать функциональное взаимодействие обнаруженных на сарколемме α_2 -адренергических и имидазолиновых рецепторов, чтобы лучше понимать возможные побочные явления при сочетанной терапии α_2 -адреномиметиками и агонистами имидазолиновых рецепторов. Кроме того, это позволит точнее оценивать перспективность применения того или иного препарата, направленного на активацию одной из упомянутых систем, в условиях эндогенной гиперстимуляции второй. Поэтому целью исследования явилось изучение взаимодействия рилменидина и гуанабенца при последовательной активации соответствующих рецепторов в отношении внутриклеточной кальциевой сигнализации КМЦ.

Материалы и методы

Выделение клеток

Исследование проводилось в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных (86/609/ЕЕС) и соблюдением норм биоэтики. КМЦ левого желудочка получали методом ферментативной диссоциации из сердец крыс линии Wistar [19]. Масса экспериментальных животных составляла 200–250 г. Базовый раствор содержал (в мМ, pH 7,25): NaCl – 80, KCl – 10, KH_2PO_4 – 1,2, MgSO_4 – 5, глюкоза – 20, таурин – 50, HEPES – 10, L-аргинин – 1. Сердце подвергали ретроградной перфузии по Лангендорфу средой DMEM + 10 мМ HEPES (pH 7,25) для отмыва препарата от крови. После стабилизации сокращений перфузировали базовым раствором с добавлением 2,5 мМ ЭГТА до полной

остановки сердца. Затем осуществляли перфузию раствором, содержащим 0,2 мг/мл протеазы, тип XIV (Sigma), 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина – (V фракция, «ПанЭко», Россия) и 140 мкМ CaCl_2 .

Разделение ткани (и всю процедуру выделения) проводили при температуре 37°C, в растворе с протеазой и коллагеназой IV (0,25 мг/мл, Worthington) на скорости мешалки 1–2 об/с. Раствор с клетками отделяли от недиспергированной ткани и агрегатов пропусканием через нейлоновую ткань. КМЦ осаждали центрифугированием в течение 1 мин (600–800 об/мин), дважды отмывали от ферментов и ресуспендировали в базовом растворе. Клетки сохраняли при комнатной температуре (22–24°C) в базовом растворе, содержащем 200 мкМ CaCl_2 .

Электрофизиологические измерения

Регистрацию потенциал-зависимых токов Ca^{2+} от клеток проводили через 2–3 ч после выделения, при комнатной температуре методом перфорированного пэтча («perforated patch clamp») в конфигурации от «целой клетки» («whole-cell»). Измерительные электроды (3–5 МΩ) вытягивали из мягкого молибденового стекла на пулере МЭ-4, кончики оплавливали на микрокузнице. Раствор для заполнения микроэлектродов содержал (pH 7,25): CsCl – 130 мМ, MgSO_4 – 5 мМ, HEPES – 10 мМ, с добавлением амфотерицина В для перфорации плазматической мембраны (200–250 мкг/мл). Внеклеточный раствор для камеры содержал (pH 7,25): NaCl – 80 мМ; тетраэтиламмоний хлорид, TEA-Cl – 20 мМ; CsCl – 10 мМ; KH_2PO_4 – 1,2 мМ; MgCl_2 – 5 мМ; CaCl_2 – 2 мМ; глюкоза – 20 мМ; HEPES – 10 мМ; L-аргинин – 1 мМ. Замену K^+ на Cs^+ использовали для дополнительной блокады токов K^+ входящего выпрямления. Токи регистрировали при помощи усилителя СКБ «Биоприбор». Токи Ca^{2+} L-типа индуцировали прямоугольным стимулирующим импульсом. Поддерживаемый потенциал на мембране составлял –40 мВ, стимул +40 мВ, продолжительностью 300 мс. В экспериментах по исследованию кинетики стационарной активации и инактивации Ca^{2+} -каналов использовали ступенчатый двухстимульный протокол, состоящий из прямоугольных ступенек с шагом 10 мВ. Для экспериментов использовали оригинальный пакет программ «BioQuest», обеспечивающий как сбор данных в режиме эксперимента, так и их последующий анализ [16]. Данные визуализировали и сохраняли при помощи платы цифро-аналогового/аналого-цифрового преобразователя L-153 («L-card», Россия).

Регистрация внутриклеточного уровня Ca^{2+} и оценка продукции NO

Суспензию клеток в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS), содержащем (pH 7,4): NaCl – 138 мМ; CaCl_2 – 1,3 мМ; MgSO_4 – 0,4 мМ; MgCl_2 –

0,5 мМ; КСl – 5,3 мМ; КН₂РО₄ – 0,45 мМ; NaНСО₃ – 4 мМ; Na₂НРО₄ – 0,3 мМ; глюкоза – 10 мМ; L-аргинин – 1 мМ; НЕРЕС – 10 мМ, наносили на покровные стекла и оставляли на 15 мин для прикрепления клеток. Затем раствор заменяли раствором HBSS с добавлением 5 мкМ Fluo4-AM или DAF-FM для мониторинга внутриклеточного кальция [Ca²⁺]_{in} или NO соответственно и инкубировали 40 мин при температуре 37 °С. В дальнейшем клетки отмывали в растворе HBSS и использовали в экспериментах в течение 4 ч. Измерения проводили на сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 и на флуоресцентном микроскопе Eclipse TS100F. Изменения [Ca²⁺]_{in} оценивали по интенсивности флуоресценции Ca²⁺-чувствительного сенсора Fluo4, загруженного в цитозоль КМЦ. Присоединение ионов кальция к молекуле Fluo4 увеличивает светимость сенсора. Величину продукции NO определяли по кумуляции сигнала зонда DAF-FM, квантовый выход которого многократно увеличивается при окислении в присутствии NO [20]. Экспериментальные записи представлены как функция

$$F = \frac{F' - F_0}{F_{cp}} \quad \text{от времени,}$$

где F' – интенсивность флуоресценции в текущий момент, F₀ – значение фона, F_{cp} – усредненная интенсивность флуоресценции в контроле (до подачи веществ).

В работе были использованы вещества DMEM (модифицированная среда Дульбекко–Игла), НЕРЕС [N-(2-гидроксиэтил) пиперазин-N'(2-этансульфоновая кислота)], таурин, L-аргинин, ЭГТА, нифедипин, рилменидин, гуанабенц, Akt1/2 киназы ингибитор, кальфостин С, флуоресцентные красители Fluo4-AM and DAF-FM диацетат.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакета программ SigmaPlot 11.0. Дисперсионный анализ ANOVA с последующим post-hoc t-тестом по методу Бонферрони был использован для выявления различий между значениями в группах. Все данные (кроме оригинальных записей токовых трасс или типичных записей изменения интенсивности флуоресценции зондов) представлены как среднее ± стандартное отклонение указанного числа (n) проведенных экспериментов, по меньшей мере, от трех разных животных. Различия считали статистически значимыми при p < 0,05.

Результаты

Взаимный антагонизм α₂-адренергических и имидазолиновых рецепторов в отношении Ca²⁺-каналов L-типа

На рис.1 представлены результаты по взаимодействию селективного α₂-агониста гуанабенца и специфического агониста имидазолиновых рецепторов первого типа рилменидина на потенциал-зависимые токи Ca²⁺, измеренные от одиночных КМЦ.

Базальный уровень токов Ca²⁺ при аппликации 10 мкМ рилменидина на КМЦ снижается на 40±3,4% (n=8; см. рис. 1, А) через 10–15 мин после подачи, и изменение пиковой амплитуды тока Ca²⁺ во времени выходит на плато (см. рис. 1, Б). При этом дальнейшее введение в экспериментальную камеру 10 мкМ гуанабенца не вызывает статистически значимых изменений пиковой амплитуды тока Ca²⁺ (4,2±3,3%; p>0,05; см. рис. 1, А, Б), показывая, что активация α₂-адренорецепторной системы неэффективна на фоне запуска внутриклеточной сигнализации от имидазолиновых рецепторов первого типа. Представляется крайне актуальной задачей понять возможные механизмы блокады Ca²⁺-каналов и исследовать пути, приводящие к снижению токов Ca²⁺, индуцируемому рилменидином. Результаты протокола стационарной (steady-state) активации и инактивации Ca²⁺-канального комплекса L-типа показывают, что рилменидин смещает инактивационную кривую влево (см. рис. 1, В, сплошная линия), что свидетельствует о его влиянии на скорость инактивации проводящего состояния Ca²⁺-канала.

Стационарные кривые хорошо аппроксимировались стандартным кинетическим уравнением Больцмана:

$$Y = \frac{1}{1 + e^{(v_m - v_{0,5})/k}},$$

где v_m – мембранный потенциал, v_{0,5} – потенциал полуактивации или полуинактивации, k – slope-фактор, Y – относительная проводимость (для активации) или относительный ток (для инактивации).

Потенциал полуингибирования канального комплекса смещается практически на 3 мВ (с –23,1±0,2 мВ в контроле до –25,9±0,3 мВ при действии рилменидина, n=8; p<0,05), при этом slope-фактор остается практически неизменным (–3,64±0,05 в контроле против –3,63±0,06 в клетках, обработанных рилменидином). Рилменидин также способен достоверно влиять на открытое состояние Ca²⁺-канального комплекса (см. рис. 1, В, штриховая линия). При значениях мембранного потенциала, близких к пиковым (–10 мВ), когда ток через Ca²⁺-каналы стремится к максимально возможному, рилменидин смещает активационную кривую вправо (с –18,3±0,3 мВ в контроле до –19,6±0,2 мВ при действии рилменидина; n=8; p<0,05). Значения slope-фактора при этом достоверно различаются (6,35±0,05 – контроль против 4,82±0,04 – рилменидин). Полученные результаты свидетельствуют, что рилменидин ингибирует токи Ca²⁺ L-типа, влияя как на открытое состояние Ca²⁺-канала, так и ускоряя инактивацию Ca²⁺-канальных комплексов, опосредующую их перевод в закрытое состояние.

Гуанабенц (10 мкМ) также вызывает снижение потенциал-зависимых токов Ca²⁺ на 31,3±4,2% относительно контрольного уровня (n=8; см. рис. 1, Г). Дальнейшее

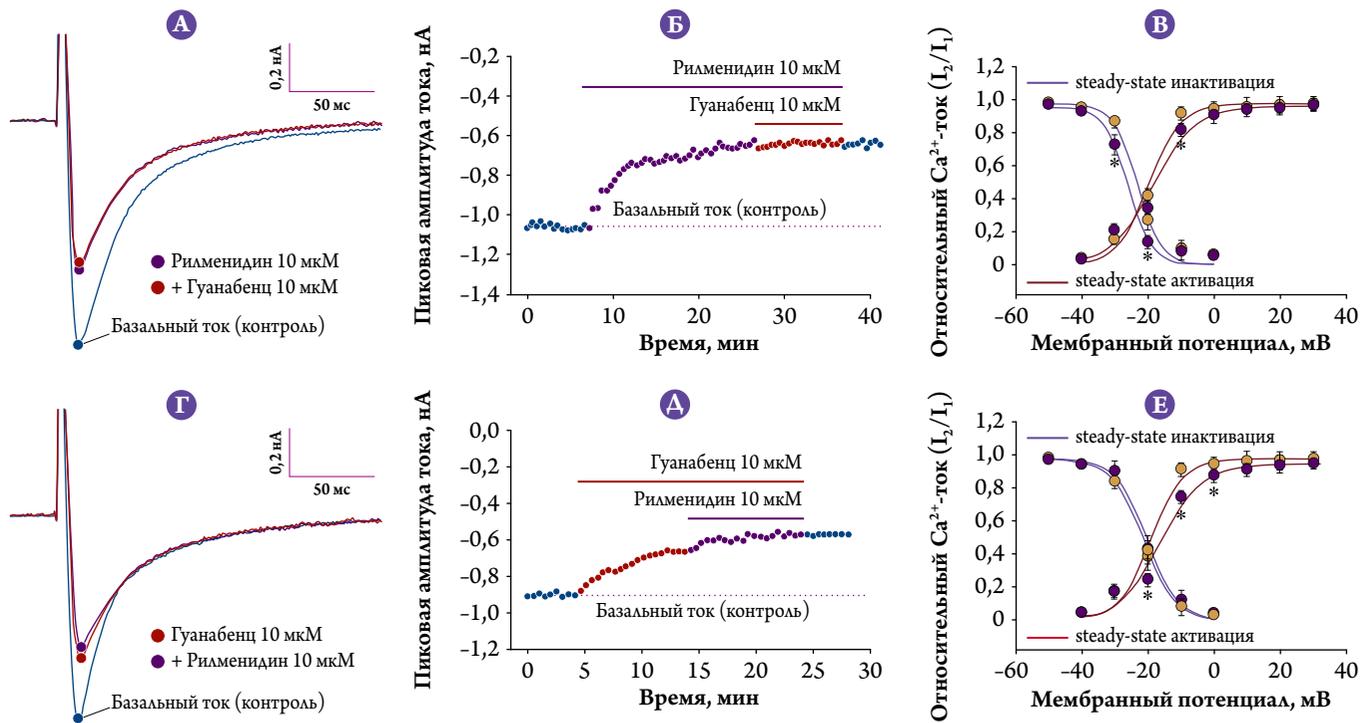


Рис. 1. Собственные и взаимные влияния агонистов α_2 -адренергических и имидазолиновых рецепторов первого типа в отношении регуляции Ca^{2+} -каналов L-типа.

А – типичная экспериментальная запись токовых трасс при регистрации токов Ca^{2+} от целой клетки: показан базальный уровень (контроль) входящего в ответ на электрическую стимуляцию тока Ca^{2+} (синий кружок), снижение токовой амплитуды при действии рилменидина (фиолетовый кружок) и отсутствие дальнейшего снижения токов Ca^{2+} при аппликации гуанабенца (красный кружок); Б – оригинальная запись изменения пиковой амплитуды входящего в КМЦ тока Ca^{2+} во времени, длительность аппликации веществ показана чертой; В – анализ кинетических характеристик Ca^{2+} -каналов в контроле (оранжевые кружки, $n=8$) и при действии 10 мкМ рилменидина (фиолетовые кружки, $n=8$). Стационарная активация каналов отмечена красными линиями, инактивация – сиреневыми линиями; Г – токовые трассы действия на базальный ток Ca^{2+} гуанабенца (красный кружок) и отсутствие эффекта 10 мкМ рилменидина на фоне гуанабенца (фиолетовый кружок); Д – типичные изменения пиковой амплитуды тока Ca^{2+} во времени при последовательной активации α_2 -адренергических и имидазолиновых рецепторов первого типа, время действия агонистов показано чертой; Е – стационарные кривые активации (красные линии) и инактивации (сиреневые линии) потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов в контроле (оранжевые кружки) и при действии 10 мкМ гуанабенца (фиолетовые кружки).

добавление в камеру 10 мкМ рилменидина не приводит к существенным изменениям пиковой амплитуды тока Ca^{2+} ($5,1 \pm 3,9\%$; $p \geq 0,05$; см. рис. 1, Г, Д), что свидетельствует о неэффективности внутриклеточной сигнализации от имидазолиновых рецепторов на фоне «запущенных» от α_2 -адренорецепторов механизмов. Анализ стационарной (steady-state) кинетики токов Ca^{2+} при аппликации гуанабенца показывает, что он значительно смещает активационную кривую вправо (с $-18,9 \pm 0,3$ мВ в контроле до $-16,2 \pm 0,3$ мВ в присутствии гуанабенца; $p \leq 0,05$; $n=8$; см. рис. 1, Е, штриховые линии), практически не влияя на кинетические параметры инактивации ($-20,6 \pm 0,5$ мВ против $21,2 \pm 0,4$ мВ; $p \geq 0,05$; см. рис. 1, Е, сплошные линии). Значения slope-коэффициентов для кривой активации также достоверно отличаются ($6,07 \pm 0,06$ против $4,77 \pm 0,07$; $p \leq 0,05$). Полученные данные свидетельствуют, что механизм ингибирования Ca^{2+} -каналов при активации α_2 -адренорецепторов гуанабенцом, вероятно, связан с его действием на открытое состояние канала и почти не затрагивает кинетику канальной инактивации и/или закрытое состояние Ca^{2+} -канального комплекса.

Специфичность антагонизма сигнальных путей, активируемых рилменидином и гуанабенцом

Известно, что активация имидазолиновых рецепторов первого типа приводит к стимуляции фосфатидилолиномидазы С, которая расщепляет мембранный фосфатидилолином на фосфолином и диацилглицерол. Образующийся диацилглицерол активирует новые и классические изоформы протеинкиназы С, мишенями которых является множество внутриклеточных ферментов, регуляторных факторов и белков ионных каналов [21]. В то же время стимуляция α_2 -адренорецепторов, сопряженных с ингибиторным гетеротримерным белком $G_{i/o}$, через отщепление $\beta\gamma$ -субъединицы приводит к активации фосфатидилинозитол-3-гидроксикиназы и далее – двух изоформ протеинкиназы В (Akt-киназы) [22]. Поэтому мы использовали блокаторы перечисленных протеинкиназ, чтобы проверить предположение о взаимном ингибировании сигнальных каскадов, возникающее при последовательном действии α_2 - и имидазолиновых агонистов (рис. 2).

Блокатор изоформ протеинкиназы С кальфостин С (0,5 мкМ) слабо ингибировал амплитуду токов Ca^{2+} –

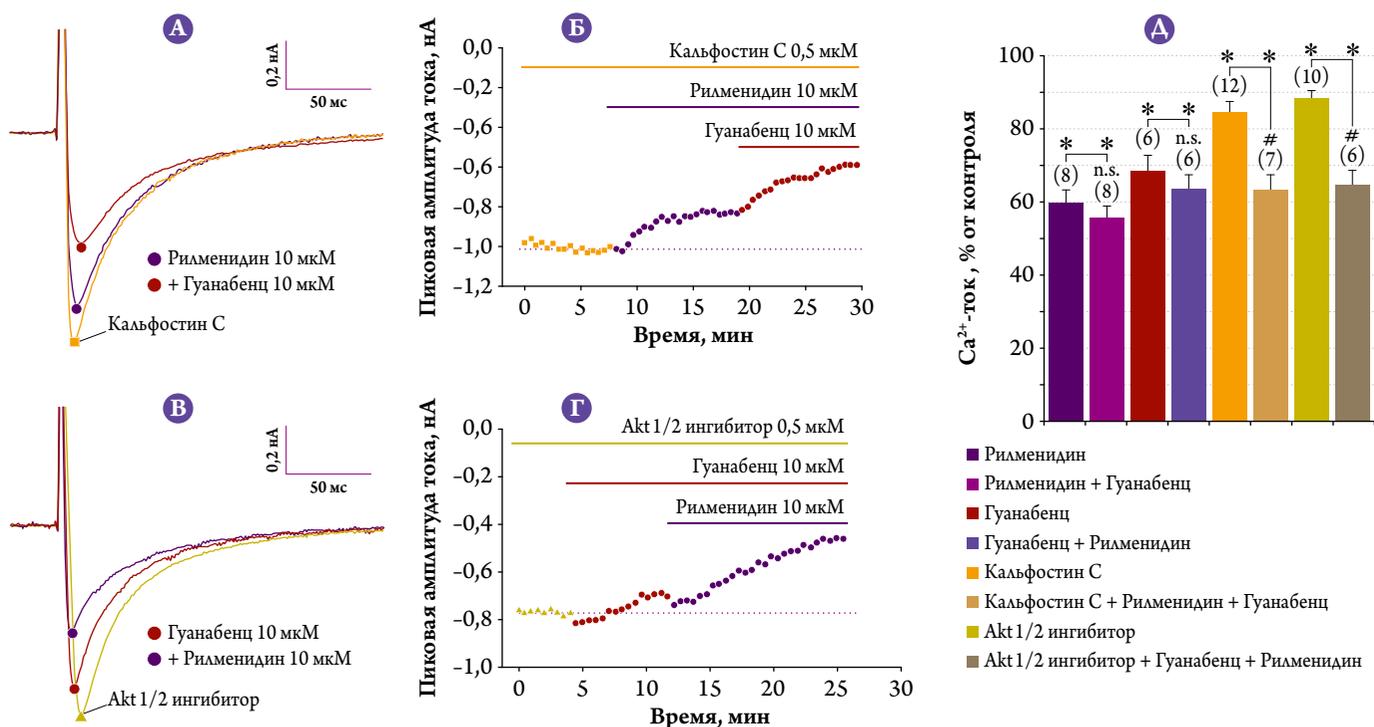


Рис. 2. Вовлеченность протеинкиназ С и Akt в взаимный антагонизм α₂-адренергических и имидазолиновых рецепторов первого типа в отношении токов Ca²⁺.

А – оригинальные записи токовых трасс при действии рилменидина на фоне блокады изоформ протеинкиназы С (фиолетовый кружок) и эффективное дополнительное снижение пиковой амплитуды после аппликации гуанабенца (красный кружок); **Б** – типичная запись изменения токов Ca²⁺ во времени, время действия веществ показано чертой; **В** – эффективное действие рилменидина (фиолетовый кружок) на фоне гуанабенца (красный кружок), апплицированного на КМЦ, предварительно обработанные ингибитором Akt1/2 киназы (жёлтый треугольник); **Г** – изменение пиковой амплитуды тока Ca²⁺ во времени, длительность действия веществ отмечена чертой; **А** – итоговые гистограммы, отражающие действие рилменидина и гуанабенца на базальный уровень токов Ca²⁺ (контроль, принят за 100%) по отдельности и на фоне друг друга, а также при ингибировании ключевых эффекторных молекул. Число в круглых скобках означает количество независимых экспериментов.

* – $p \leq 0,05$ при сравнении указанной группы с контролем; # – $p \leq 0,05$ при сравнении групп между собой; n.s. – статистически незначимо ($p \geq 0,05$).

на $15,3 \pm 2,8\%$, что, вероятно, было связано с вкладом базальной активности данной протеинкиназы в нормальную регуляцию Ca²⁺-каналов (см. рис. 2 А, Д). Поэтому клетки в экспериментальной камере выдерживались в присутствии кальфостина С на протяжении 10–15 мин, после чего введение такой же концентрации блокатора не влияло на токи Ca²⁺. Действие рилменидина на фоне кальфостина С было менее выраженным, а последующая аппликация гуанабенца вызывала существенное снижение амплитуды токов Ca²⁺ – сопоставимое с его влиянием в контроле ($36,6 \pm 4,1\%$ против $31,3 \pm 4,2$; $p \geq 0,05$; см. рис. 2 А, Б, Д).

Ингибитор Akt1/2 киназы (0,5 мкМ) аналогично кальфостину С также слабо ингибировал токи Ca²⁺ – на $11,6 \pm 2,1\%$ (см. рис. 2, В, Д). Действие гуанабенца на фоне ингибитора Akt1/2 киназы было слабо выраженным, а введение рилменидина в экспериментальную камеру приводило к достоверному ингибированию пиковой амплитуды токов Ca²⁺ величиной, сопоставимое с его действием на базальные токи Ca²⁺ ($35,2 \pm 3,8\%$ против $40,0 \pm 3,4\%$; $p \geq 0,05$; см. рис. 2 В, Г, Д). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что ключевыми эффекторными молекулами, ответственными за антаго-

низм сигнальных путей, реализующийся при последовательной активации α₂-адренергических и имидазолиновых рецепторов в отношении Ca²⁺-каналов L-типа, являются протеинкиназа С и Akt.

Внутриклеточный уровень Ca²⁺, гуанабенц и рилменидин

При измерении [Ca²⁺]_{in} в КМЦ исследователи часто сталкиваются с трудностями в выборе протокола. В состоянии покоя концентрация Ca²⁺ в цитозоле невысока, а вклад ключевых систем, транспортирующих Ca²⁺, оценить крайне сложно: потенциал-зависимые Ca²⁺-каналы закрыты, рианодиновые рецепторы, отвечающие за выброс Ca²⁺ из депо, блокированы регуляторными белками, Ca²⁺-АТФаза саркоплазматической септи (SERCA) малоактивна. Для активации транспорта Ca²⁺ используют стимуляцию «молчащих» клеток электрическими импульсами или импульсным изменением ионного состава внеклеточной среды. Стимуляция током имеет жесткие временные ограничения, поскольку даже в случае низкочастотного протокола (менее 1 Гц) через пару минут в цитоплазме стимулируемых клеток начинает накапли-

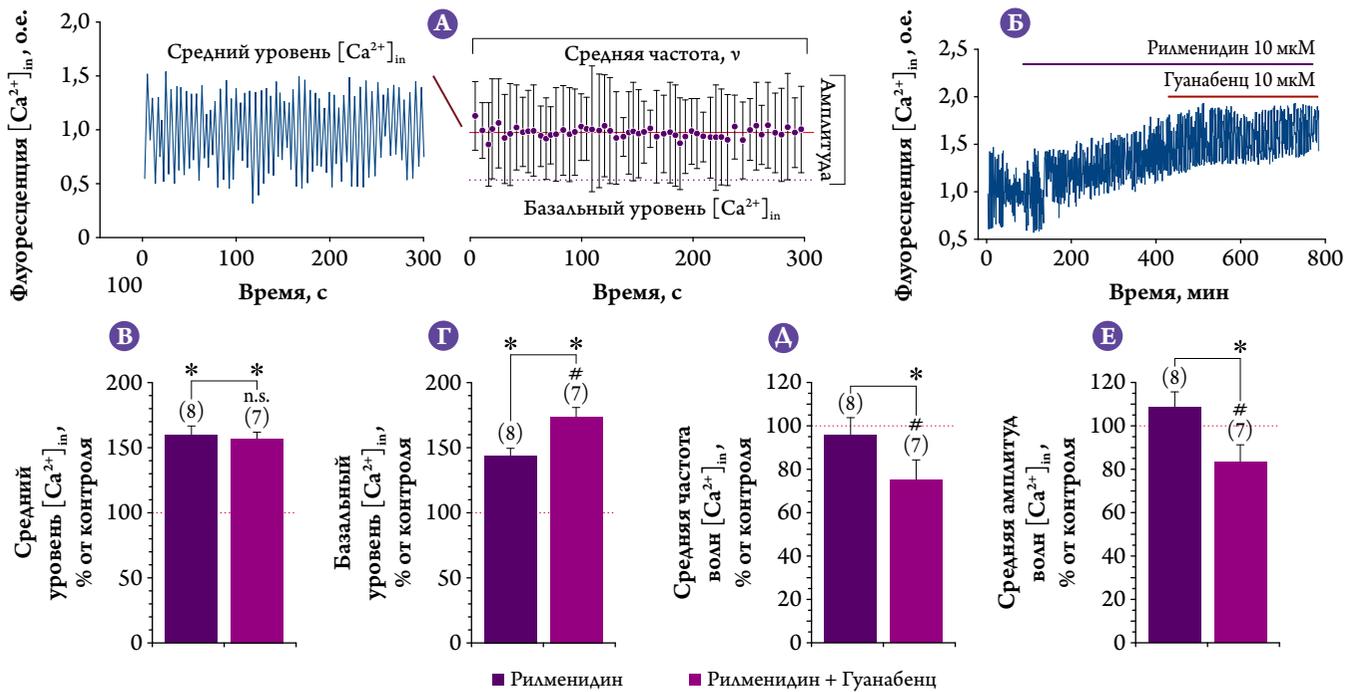


Рис. 3. Влияние α_2 -агониста на фоне активации имидазолиновых рецепторов первого типа на регуляцию внутриклеточного уровня Ca^{2+} .

А – устойчивые спонтанные Ca^{2+} -волны в изолированных КМЦ: слева – типичная запись интенсивности флуоресценции Fluo4 в контроле, справа – средние значения (сиреневые кружки) уровня Ca^{2+} по каждой отдельной волне во времени, соответствующие записи слева. Штриховой пурпурной линией показан базальный уровень внутриклеточного кальция, сплошной красной линией – аппроксимация средневолнового уровня Ca^{2+} ; средняя частота спонтанных волн в записи рассчитывается как отношение суммарного числа отдельных волн к продолжительности времени (в секундах), в течение которого эти волны наблюдаются, средневолновая амплитуда рассчитывается как отношение суммы амплитуд каждой отдельной волны к количеству волн, пробегающих за время наблюдения; Б – типичная запись влияния рилменидина в модели спонтанных волн Ca^{2+} , с последующей аппликацией гуанабенца: время действия веществ показано чертой; В–Е – изменения среднего и базального уровня Ca^{2+} , а также частоты и амплитуды спонтанных волн Ca^{2+} относительно контроля при действии рилменидина и гуанабенца на фоне рилменидина: число в скобках указывает количество независимых экспериментов.

* – $p \leq 0,05$ при сравнении с контролем; # – $p \leq 0,05$ при сравнении групп между собой; n.s. – статистически незначимо ($p \geq 0,05$).

ваться избыточный кальций, который не успевает утилизироваться. Такой вариант грозит запуском патофизиологических реакций в клетке, поэтому исследователи, работающие с электрической стимуляцией, ограничиваются несколькими минутами наблюдения за кинетикой $[Ca^{2+}]_{in}$, что не позволяет регистрировать медленную и/или пролонгированную динамику кальциевых ответов. Вызов деполяризации КМЦ путем частичной замены Na^+ на K^+ в наружном растворе может инициировать обратный режим работы Na^+/Ca^{2+} -обменника, что в норме не происходит [23]. Как результат, вклад Na^+/Ca^{2+} -обменного механизма может быть переоценен, тогда как в норме его роль должна быть менее существенна [24].

Эксперименты по влиянию физиологически активных веществ на $[Ca^{2+}]_{in}$ в настоящей работе были выполнены на клетках, генерирующих устойчивые спонтанные волны Ca^{2+} (рис. 3, А).

Спонтанные волны Ca^{2+} в изолированных КМЦ наблюдались в каждой диссоциированной суспензии КМЦ левого желудочка крыс всех возрастов. Число клеток в популяции, генерирующее спонтанные волны Ca^{2+} , составляло около $20 \pm 5\%$. Морфологически спонтанно-активные

КМЦ ничем не отличались от нормальных клеток, в которых спонтанные волны не наблюдались: отчетливая исчерченная структура, ровные, но не сглаженные края, прямоугольная, без скруглений, форма клетки. Числовые пределы распространенности и морфология спонтанно-активных КМЦ свидетельствуют, что, вероятнее всего, такие КМЦ относятся к типу «рабочих» клеток миокарда. Устойчивая волновая кинетика предполагает, что в таких КМЦ реализуется некое стационарное состояние, при котором выброс Ca^{2+} из депо в цитозоль и его закачивание обратно скомпенсированы во времени, что выражается в относительном постоянстве средневолнового уровня Ca^{2+} . Средний уровень Ca^{2+} по каждой отдельной волне слабо меняется на протяжении наблюдений и хорошо аппроксимируется прямой с коэффициентом наклона, близким к нулю (см. рис. 3, А). Очевидно, что такое постоянство среднего уровня $[Ca^{2+}]_{in}$ может быть успешно использовано для адекватной оценки действия фармакологических соединений как вполне пригодный контроль. Кроме среднего уровня Ca^{2+} , для спонтанных волн Ca^{2+} могут быть посчитаны базальный уровень Ca^{2+} (отражает минимальный уровень кальция в цитозоле после прохож-

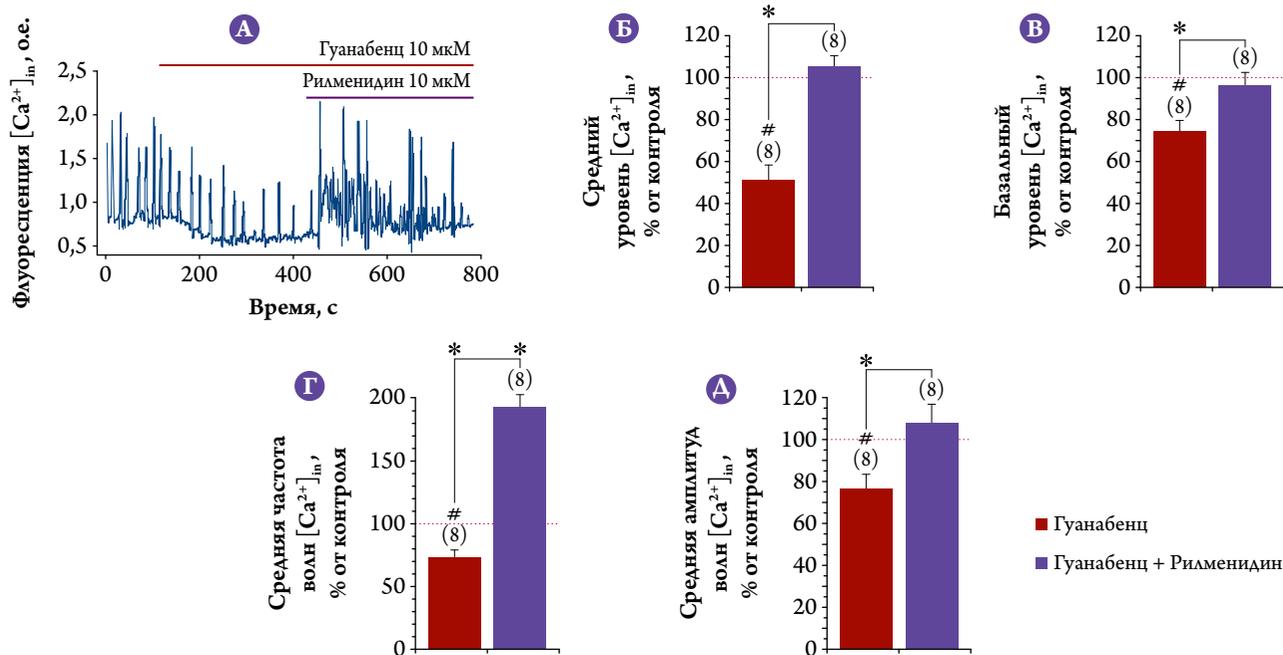


Рис. 4. Влияние имидазолинового агониста на фоне активации α_2 -адренорецепторов.

А – типичная экспериментальная запись действия гуанабенца и рилменидина на фоне гуанабенца на спонтанные волны Ca^{2+} , время аппликации веществ показано чертой; Б–Д – изменения среднего и базального уровня Ca^{2+} , а также частоты и амплитуды спонтанных волн Ca^{2+} относительно контроля при действии гуанабенца и рилменидина в присутствии гуанабенца, число в скобках указывает количество независимых экспериментов.

* – $p < 0,05$ при сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ при сравнении групп между собой.

дения волны), средневолновая амплитуда и средняя частота на всей протяженности записи (см. рис. 3, А).

В модели устойчивых волн Ca^{2+} рилменидин существенно увеличивал средний уровень Ca^{2+} (на $59,7 \pm 6,9\%$; $n=8$; см. рис. 3, Б, В), базальный уровень Ca^{2+} в цитозоле (на $44,3 \pm 5,8\%$; см. рис. 3, Б, Г), достоверно не влияя ни на среднюю частоту волн ($-4,4 \pm 8,2\%$; $p \geq 0,05$; см. рис. 3, Б, Д), ни на амплитуду ($8,3 \pm 7,4\%$; $p \geq 0,05$; см. рис. 3, Б, Е). Последующая аппликация гуанабенца, как и в случае потенциал-зависимых токов Ca^{2+} , не приводила к достоверным изменениям среднего уровня Ca^{2+} ($2,1 \pm 4,3\%$; $p \geq 0,05$), однако вызывала перераспределение вклада систем, транспортирующих Ca^{2+} , в генерации спонтанных волн. Так, базальный уровень Ca^{2+} в цитозоле при действии гуанабенца на фоне рилменидина увеличился на $29,4 \pm 7,4\%$ (см. рис. 3, В), однако снижались средняя частота волн (на $25,1 \pm 9,3\%$; см. рис. 3, Д) и средневолновая амплитуда (на $16,9 \pm 8,2\%$; см. рис. 3, Е).

Гуанабенц, в отличие от рилменидина, напротив, эффективно снижал средневолновой уровень Ca^{2+} на $48,9 \pm 7,2\%$ (рис. 4, А, Б). При этом снижались как базальный уровень Ca^{2+} в цитозоле (на $25,8 \pm 5,5\%$; рис. 4, В), так и частота (на $26,9 \pm 5,9\%$; рис. 4, Г), и средневолновая амплитуда ($23,5 \pm 6,7\%$; рис. 4, Д). Подача в камеру рилменидина на фоне гуанабенца приводит к достоверному увеличению среднего уровня Ca^{2+} (на $54,3 \pm 5,1\%$) и базального уровня Ca^{2+} в цитозоле ($22,6 \pm 6,1\%$) до значений, близких к контрольным. При этом существенно увеличивается частота

спонтанных волн (на $219,3 \pm 9,8\%$) и в меньшей степени – средневолновая амплитуда ($31,4 \pm 9,1\%$). Полученные результаты показывают, что эффекты α_2 -агониста в отношении регуляции $[Ca^{2+}]_{in}$ не развиваются при активации имидазолиновой сигнализации, тогда как рилменидин способен эффективно «работать» на фоне включенного α_2 -адреносигналинга.

Продукция оксида азота, α_2 -адренергические и имидазолиновые рецепторы

Известно, что Акт-киназа и протеинкиназа С двусторонне модулируют активность эндотелиальной изоформы NO-синтазы. Фосфорилирование NO-синтазы по серину-1179 Акт-киназой увеличивает активность фермента (соответственно и синтез NO), а фосфорилирование по треонину-495, реализующееся протеинкиназой С, существенно ингибирует процесс синтеза [25]. Учитывая важность сигнальной молекулы NO для нормального функционирования КМЦ, мы прямо измерили продукцию NO в изолированных КМЦ. Гуанабенц существенно стимулировал процесс синтеза, приводя к увеличению интенсивности флуоресценции NO-чувствительного зонда на $57,3 \pm 9,4\%$ ($n=9$; рис. 5). Рилменидин достоверно не влиял на уровень NO ($1,8 \pm 3,7\%$; $p \geq 0,05$; рис. 5, А, Б), однако полностью предотвращал синтез NO, опосредуемый активацией α_2 -адренорецепторов, до $3,1 \pm 4,4\%$ ($p \geq 0,05$; см. рис. 5, А, Б). Полученные результаты свидетельствуют, что активация имидазолиновых рецепторов

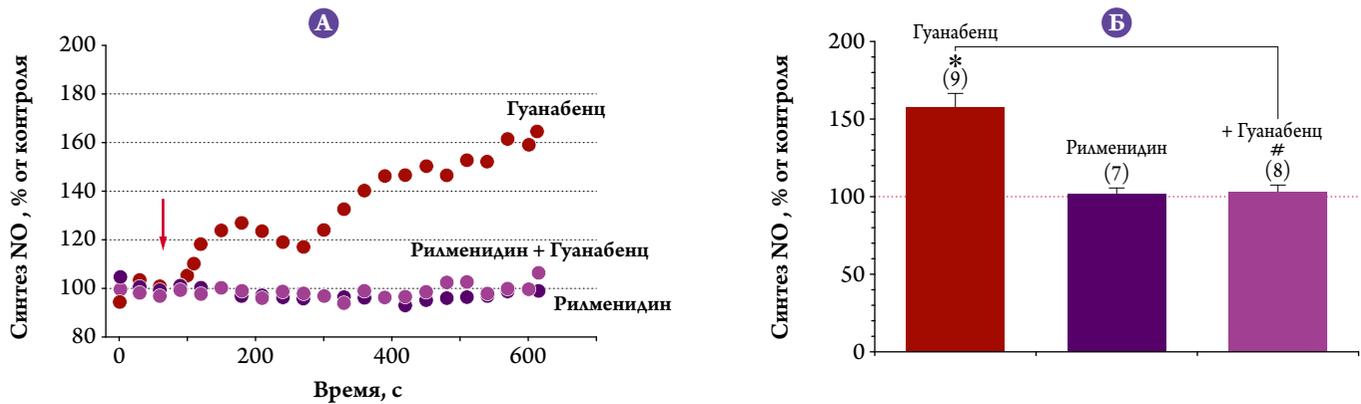


Рис. 5. Влияние α_2 -адренергических и имидазолиновых рецепторов на NO-синтазу.

А – типичные экспериментальные записи флуоресценции зонда DAF-FM, момент подачи в камеру агонистов показан стрелкой; Б – итоговые гистограммы для действия α_2 - и имидазолинового агониста, число в скобках указывает количество независимых экспериментов.

* – $p < 0,05$ при сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ при сравнении групп между собой.

первого типа «выключает» синтез NO, стимулируемый через сарколеммальные α_2 -адренорецепторы.

Обсуждение

В течение многих лет β -адренорецепторы считались единственным типом сарколеммных рецепторов, за счет связывания катехоламинов приводящим к усилению сокращения миокарда через индукцию синтеза циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Специфическая цАМФ-зависимая протеинкиназа А за счет фосфорилирования Ca^{2+} -транспортирующих белков, главным образом, Ca^{2+} -канальных комплексов L-типа и SERCA, приводит к увеличению внутриклеточного уровня Ca^{2+} [26]. Позднее демонстрация цАМФ-независимого увеличения силы сокращений привела к открытию дополнительной популяции α_1 -адренорецепторов в КМЦ [27]. Эти две ключевые рецептивные системы ответственны за положительный инотропный эффект, определяемый обычно увеличением плотности потенциалзависимого тока Ca^{2+} , входящего в КМЦ, усилением выброса Ca^{2+} из депо и повышением базального уровня кальция в цитозоле. Для нормального функционирования КМЦ и мышцы в целом необходимо наличие отрицательной обратной связи, эффект которой направлен в сторону, противоположную текущему действующему стимулу. Очевидно, что пролонгированное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ грозит запуском ряда патофизиологических реакций, вплоть до апоптотической гибели клетки. Про системы снижения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ в цитозоле известно существенно меньше. Так, в КМЦ показано наличие мускариновых рецепторов, ингибирующих амплитуду входящих токов Ca^{2+} , но судя по эффективности действующих доз (требуются миллимоли ацетилхолина для их активации), их физиологическая роль остается неясной [28]. Обнаружение на мембране КМЦ популяций α_2 -адренергических рецепторов и имидазолиновых рецепторов первого типа, а также вовлечение этих рецепторов во внутриклеточную кальциевую сигна-

лизацию открывает новые стратегии управления сократимостью сердечных клеток, выявляя ранее не учитываемые периферические эффекты α_2 - и имидазолиновых агонистов. В связи с этим представляется важным всестороннее исследование сигнальных путей от обнаруженных типов рецепторов, а также их функциональное взаимодействие в отношении друг друга. В наших экспериментах по исследованию амплитуды потенциал-зависимых токов Ca^{2+} рилменидин и гуанабенц, сами существенно снижающие входящий ток Ca^{2+} , не были способны к его ингибированию на фоне друг друга. По-видимому, активации одной из рецепторных систем (α_2 -адренергической или имидазолиновой) на уровне КМЦ вполне достаточно, чтобы эффективно реализовать отрицательный инотропный эффект как защитную функцию при возникающих в миокарде кратковременных или пролонгированных кальциевых перегрузках. Физиологически это представляется вполне логичным, поскольку выверенная регуляция потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, являющихся триггером мышечного сокращения, для внутриклеточной сигнализации наиболее критична, поэтому нельзя допускать ее чрезмерного подавления или гиперактивации. Анализ стационарных кинетик активации и инактивации Ca^{2+} -канальных комплексов показывает, что эффекты α_2 - и имидазолиновых агонистов по влиянию на канал несколько различаются по механизмам. Гуанабенц практически не влияет на закрытое состояние Ca^{2+} -каналов, реализуя свое действие на открытом состоянии канальных комплексов. Вероятно, это происходит как за счет снижения общеканальной ионной проводимости в единицу времени, так и снижения общего времени нахождения Ca^{2+} -каналов в открытом состоянии. Рилменидин в меньшей степени, чем гуанабенц, реализует свои эффекты через воздействие на открытое состояние каналов (для потенциалов, близких к пиковым), и гораздо сильнее влияет на кинетику инактивации. Вероятно, рилменидин ускоряет переход Ca^{2+} -каналов в закрытое состояние и пролонгирует время

нахождения каналов в закрытом состоянии. С точки зрения физиологии КМЦ, зачастую важнее не абсолютное количество ионов Ca^{2+} , вошедших в клетку в единицу времени, а эффективность его утилизации из цитозоля. При равных прочих условиях, меньшее количество Ca^{2+} , поступающее в клетку за счет снижения величины проводимости открытого состояния каналов (равномерное), представляется более выгодной стратегией, чем замедленное поступление большего количества ионов (импульсное), наблюдаемое при увеличении времени нахождения каналов в закрытом состоянии. Поэтому влияние гуанабенца на КМЦ выглядит более предпочтительным, чем использование имидазолиновых агонистов. Особенно очевидно это становится при анализе действия исследуемых агонистов на внутриклеточный уровень Ca^{2+} . Гуанабенц, эффективно снижающий средний и базальный уровни Ca^{2+} в цитозоле, а также среднюю частоту и амплитуду спонтанных волн Ca^{2+} , реализует существенный кардиопротекторный механизм. Снижение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , реализуемое за счет потенцирования закачивания Ca^{2+} обратно в саркоплазматическую сеть с участием SERCA, способствует оптимизации нагрузок на КМЦ и мышцу в целом. Рилменидин же, напротив, приводит к увеличению как средневолнового, так и базального уровня Ca^{2+} в цитоплазме КМЦ. Возможно, такое существенное повышение $[Ca^{2+}]_{in}$ частично ответственно за столь интенсивное ингибирование потенциал-зависимых токов Ca^{2+} , поскольку одним из эффективных механизмов их блокады является Ca^{2+} -индуцируемая Ca^{2+} -инактивация, происходящая при связывании ионов кальция с особым доменом (EF-hand) в структуре канала [29]. Повышение $[Ca^{2+}]_{in}$ истощает запасы Ca^{2+} во внутриклеточных депо, поэтому вполне может приводить к снижению силы сердечных сокращений и отрицательной инотропии. Однако последствия такого снижения для КМЦ чреваты запуском патофизиологических реакций, которые могут привести к зависимому от Ca^{2+} апоптозу. Вполне вероятно, что провал III фазы клинических испытаний имидазолинового агониста моксонидина в 2002 г. был связан с отсутствием учета активации периферических имидазолиновых рецепторов в КМЦ [30]. Испытания были вынуждены прекратить за счет почти двукратного увеличения смертности у пациентов, принимающих моксонидин в высоких дозах, несмотря на то что он был эффективен при лечении больных АГ. Неудача, постигшая данное исследование, указывает на отсутствие достаточного понимания как метаболических путей, связанных с имидазолиновыми рецепторами, так и механизмов действия их агонистов и центров связывания. Данные, полученные в настоящей работе, могут помочь по-новому взглянуть на эту проблему.

В наших экспериментах аппликация рилменидина на фоне сниженного $[Ca^{2+}]_{in}$ гуанабенцом приводила как к повышению среднего и базального уровня Ca^{2+} в цитозо-

ле, так и к увеличению частоты спонтанных волн более чем в 2 раза. Эти результаты показывают, что активация имидазолиновых рецепторов первого типа в КМЦ истощает уровень Ca^{2+} в депо даже в условиях, когда скорость закачивания Ca^{2+} обратно сильно потенцирована. Гуанабенц же был неэффективен для утилизации избыточного Ca^{2+} , индуцированного рилменидином. Следует отметить, что изменения внутриклеточного уровня Ca^{2+} хорошо коррелировали с синтезом еще одной сигнальной молекулы – NO – известного вазодилатора и миорелаксанта за счет двух механизмов: прямого нитрозилирования белков-мишеней и его способности активировать гуанилатциклазу и стимулировать синтез циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). цГМФ активирует специфическую цГМФ-зависимую протеинкиназу G, которая фосфорилирует ионные каналы, регулируя, таким образом, тонус сосудов. В наших экспериментах активация α_2 -адренорецепторов гуанабенцом приводила к существенному увеличению продукции NO, тогда как рилменидин достоверно не влиял на продукцию этой сигнальной молекулы. Однако гуанабенц, апплицированный на КМЦ, предварительно обработанных рилменидином, терял способность индуцировать синтез NO. Молекулярные основания, которые могут лежать в основе такого антагонизма, связаны с киназной регуляцией активности эндотелиальной изоформой NO-синтазы, локализованной в КМЦ. Протеинкиназы, запускаемые при активации соответствующих рецепторов, являются одним из универсальных механизмов как в межклеточных взаимодействиях, так и во внутриклеточной сигнализации. Акт-киназа (протеинкиназа B), стимулируемая запуском α_2 -адренорецепторов, фосфорилирует NO-синтазу по серину-1179, приводя к увеличению ее ферментативной активности, а соответственно, продукции NO. Протеинкиназа C, активирующаяся при запуске имидазолиновой сигнализации, фосфорилирует NO-синтазу по треонину-495, ингибируя синтез NO [25]. Вероятно, что зависимое от протеинкиназы C фосфорилирование NO-синтазы обладает более приоритетным статусом, поскольку активация Акт-киназы при подаче в экспериментальную камеру гуанабенца на фоне рилменидина существенно не меняет функциональную активность NO-синтазы. Кроме того, некоторые изоформы протеинкиназы C могут приводить к повышению утечки Ca^{2+} из депо в цитозоль или прямо стимулировать выброс Ca^{2+} из саркоплазматической сети через инозитол-3-фосфатные/рианодиневые каналные комплексы [31]. Возможно, что значительное увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$ рилменидином реализуется через все перечисленные механизмы, связанные с активацией протеинкиназы C. В силу ограниченности фармакологического подхода и отсутствия в настоящее время высокоселективных агонистов к подтипам α_2 -ARs, невозможно однозначно установить, каким(и) именно подтипом(ами) α_2 -ARs обусловлено действие гуа-

набенца на кальциевую сигнализацию в КМЦ. Нам представляется, что при прочих равных условиях больший вклад в наблюдаемые эффекты будут вносить рецепторы того подтипа, которые наиболее экспрессированы на плазматической мембране КМЦ. Вестерн-блот анализ показывает, что белка α_{2B} -ARs несколько больше, чем α_{2A} -ARs и α_{2C} -ARs [16], поэтому логично предположить, что ассоциированные с α_{2B} -ARs механизмы также будут вносить более весомый вклад в эффекты, наблюдаемые при аппликации α_2 -агониста. Однако данное предположение нуждается в проверке.

Так как α_2 -адреномиметики и имидазолиновые агонисты широко применяются в клинической практике как антигипертензивные препараты центрального действия, обнаруженные взаимные влияния активации α_2 -адренергических и имидазолиновых рецепторов составляют основу для того, чтобы сделать ряд рекомендаций для терапевтической практики. Во-первых, агонисты указанных рецепторов, будучи апплицированными в организм, вероятно, будут оказывать нецентральные эффекты на КМЦ за счет существенного вовлечения в регуляцию гомеостаза Ca^{2+} в КМЦ. Периферические влияния α_2 - и имидазолиновых агонистов на сократимость одиночных клеток и миокарда в целом в таком случае необходимо учитывать дополнительно к их эффектам, реализующимся через рецепторы, локализованные в центрах контроля АД в мозге, и/или через влияние на выброс нейротрансмиттеров в симпатических окончаниях, иннервирующих миокард. Значение нецентральных эффектов только предстоит установить, но, учитывая наличие гематоэнцефалического барьера при реализации центрального механизма регуляции АД, дозы агонистов, применяемые в клинической практике, представляются вполне достаточными, чтобы достоверно влиять на функциональность одиночных КМЦ. Во-вторых, эксперименты на изолированных КМЦ показывают, что одновременное назначение (и прием) препаратов на основе стимуляции рецепторов обоих типов, по меньшей мере, является неэффективным в силу некумулятивности эффектов активации α_2 -адренергических и имидазолиновых рецепторов. Кроме того, как показывают эксперименты с измерением продукции NO и внутриклеточного уровня Ca^{2+} , можно предположить, что действие α_2 -адреномиметиков на фоне терапии имидазолиновыми агонистами может существенно ослабляться вплоть до полного исчезновения их эффективности. В-третьих, представляется целесообразным комбинированное применение имидазолиновых агонистов либо с прямыми донорами NO, либо с соединения-

ми, увеличивающими активность NO-синтаз (например, нитроглицерин, нитропруссид, L-аргинин). Это позволит предотвратить повышение внутриклеточного уровня Ca^{2+} в КМЦ, индуцируемое активацией имидазолиновых рецепторов первого типа, и развитие сопряженных с перегрузкой Ca^{2+} патофизиологических реакций.

Заключение

Установленные в настоящем исследовании антагонистические влияния гуанабенца и рилменидина в отношении друг друга в вопросах Ca^{2+} -сигнализации обнаруживают периферические эффекты взаимодействия α_2 -адренергических и имидазолиновых рецепторов в кардиомиоцитах. По влиянию на потенциал-зависимые токи Ca^{2+} обе системы равно приоритетны, поскольку при активации одной из них дальнейший запуск второй не приводит к значимым эффектам. Однако в отношении регуляции внутриклеточного уровня кальция большим приоритетом обладает имидазолиновая сигнализация, которая приводит к ингибированию синтеза NO и медленному повышению в цитозоле уровня свободного кальция. Активация α_2 -адренорецепторов, вызывающая в контроле NO-зависимое усиление закачивания Ca^{2+} в саркоплазматическую сеть, на фоне сигнальных путей, «запущенных» от имидазолиновых рецепторов, не может эффективно регулировать внутриклеточный уровень кальция. Наши результаты показывают, что α_2 -адренергические рецепторы могут оказаться важными в защите кардиомиоцитов от перегрузки кальцием и сопряженных с ней патофизиологических состояниях миокарда. В то же время пролонгированная активация имидазолиновых рецепторов первого типа, несмотря на существенное ингибирование входящих потенциал-зависимых токов Ca^{2+} , будет скорее провоцировать состояние перегрузки кальция в кардиомиоцитах, приводя к ремоделированию миокарда и хронической сердечной недостаточности.

Работа поддержана грантом РФФИ: №18-015-00165А (Ю. М. К.).

Благодарности.

Авторы выражают благодарность О.Ю. Пименову (ИТЭБ РАН, Пушкино), А.В. Кучину (ИБК РАН, Пушкино) за техническую помощь, а также А.Е. Алексееву (клиника Мэйо, США) за интерес к данной работе и ценные комментарии.

Information about the author:

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia

Maltsev Alexandr V. – ScD.

E-mail: alex.v.maltsev88@gmail.com

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- World Health Organization. World health statistics 2016: Monitoring health for the SDGs. 136 c. ISBN 978-92-4-069569-6
- Selye H. Stress without distress. -Philadelphia: Lippincott; 171 c. ISBN 978-0-397-01026-4
- William Tank A, Lee Wong D. Peripheral and Central Effects of Circulating Catecholamines. In: Comprehensive Physiology. -Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. - pp.1-15. ISBN: 978-0-470-65071-4.
- Bers DM. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. Annual Review of Physiology. 2008;70(1):23-49. DOI: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455
- Gustafsson AB, Gottlieb RA. Heart mitochondria: gates of life and death. Cardiovascular Research. 2007;77(2):334-43. DOI: 10.1093/cvr/cvm005
- Brini M, Ottolini D, Cali T, Carafoli E. Calcium in Health and Disease. In: Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. -Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. - pp.81-137. ISBN: 978-94-007-7499-5, 978-94-007-7500-8.
- Foucart S, Nadeau R, de Champlain J. The release of catecholamines from the adrenal medulla and its modulation by alpha 2-adrenoceptors in the anaesthetized dog. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 1987;65(4):550-7. PMID: 3038285
- Gadkari TV, Cortes N, Madras K, Tsoukias NM, Joshi MS. Agmatine induced NO dependent rat mesenteric artery relaxation and its impairment in salt-sensitive hypertension. Nitric Oxide. 2013;35:65-71. DOI: 10.1016/j.niox.2013.08.005
- Brede M, Wiesmann F, Jahns R, Hadamek K, Arnolt C, Neubauer S et al. Feedback inhibition of catecholamine release by two different alpha2-adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure. Circulation. 2002;106(19):2491-6. PMID: 12417548
- MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT, Limbird LE. Central hypotensive effects of the alpha2A-adrenergic receptor subtype. Science (New York, N.Y.). 1996;273(5276):801-3. PMID: 8670421
- Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Bernstein D et al. Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c. Science (New York, N.Y.). 1996;273(5276):803-5. PMID: 8670422
- Makaritsis KP, Handy DE, Johns C, Kobilka B, Gavras I, Gavras H. Role of the alpha2B-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. Hypertension (Dallas, Tex.: 1979). 1999;33(1):14-7. PMID: 9931075
- Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. Nature. 1999;402(6758):181-4. DOI: 10.1038/46040
- Zefirov TL, Khisamieva LI, Ziyatdinova NI, Zefirov AL. Peculiar Effects of Selective Blockade of alpha2-Adrenoceptor Subtypes on Cardiac Chronotropy in Newborn Rats. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015;160(1):6-8. DOI: 10.1007/s10517-015-3084-5
- Bousquet P, Feldman J, Atlas D. An endogenous, non-catecholamine clonidine antagonist increases mean arterial blood pressure. European Journal of Pharmacology. 1986;124(1-2):167-70. PMID: 3720837
- Maltsev AV, Kokoz YM, Evdokimovskii EV, Pimenov OY, Reyes S, Alekseev AE. Alpha-2 adrenoceptors and imidazoline receptors in cardiomyocytes mediate counterbalancing effect of agmatine on NO synthesis and intracellular calcium handling. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2014;68:66-74. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.12.030
- Maltsev A.V., Nenov M.N., Pimenov O. Yu., Kokoz Yu. M. Modulation of L-type Ca²⁺ currents and intracellular calcium by agmatine in rat cardiomyocytes. Biological membranes: journal of membrane and cell biology. 2013;30(2):92-104. [Russian: Мальцев А.В., Ненов М.Н., Пименов О.Ю., Коккоз Ю.М. Модуляция агматинном Са²⁺-токов L-типа и внутриклеточной концентрации ионов Са²⁺ в кардиомиоцитах крыс. Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. 2013;30(2):92-104]. DOI: 10.7868/S0233475513020059
- Kokoz YM, Evdokimovskii EV, Maltsev AV, Nenov MN, Nakipova OV, Averin AS et al. Sarcolemmal alpha2-adrenoceptors control protective cardiomyocyte-delimited sympathoadrenal response. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2016;100:9-20. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.09.006
- Alekseev AE, Korystova AF, Mavlyutova DA, Kokoz YM. Potential-dependent Ca²⁺ currents in isolated heart cells of hibernators. Biochemistry and Molecular Biology International. 1994;33(2):365-75. PMID: 7951054
- Nagano T, Yoshimura T. Bioimaging of nitric oxide. Chemical Reviews. 2002;102(4):1235-70. PMID: 11942795
- Edwards L, Fishman D, Horowitz P, Bourbon N, Kester M, Ernsterberger P. The 11-imidazole receptor in PC12 pheochromocytoma cells activates protein kinases C, extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-jun N-terminal kinase (JNK). Journal of Neurochemistry. 2001;79(5):931-40. PMID: 11739604
- Nenov M.N., Berezhnov A.V., Fedotova E.I., Grushin K.S., Pimenov O.Yu., Murashev A.N. et al. "Arginine paradox" in cardiomyocytes of Sprague-Dawley and Spontaneously Hypertensive Rats: alpha2-adrenoceptor-mediated regulation of L-type Ca²⁺ currents by L-arginine. Biological Membranes: Journal Of Membrane And Cell Biology. 2010;27(5):440-8. [Russian: Ненов М.Н., Березин А.В., Федотова Е.И., Гришин К.С., Пименов О.Ю., Мурашов А.Н. и др. "Arginine paradox" in cardiomyocytes of Sprague-Dawley and Spontaneously Hypertensive Rats: alpha2-adrenoceptor-mediated regulation of L-type Ca²⁺ currents by L-arginine. Биологические Мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. 2010;27(5):440-8.]
- Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications. Physiological Reviews. 1999;79(3):763-854. DOI: 10.1152/physrev.1999.79.3.763
- Sipido KR, Maes M, Van de Werf F. Low efficiency of Ca²⁺ entry through the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger as trigger for Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca²⁺ current and reverse-mode Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchange. Circulation Research. 1997;81(6):1034-44. PMID: 9400385
- Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA et al. Coordinated Control of Endothelial Nitric-oxide Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the cAMP-dependent Protein Kinase. Journal of Biological Chemistry. 2001;276(21):17625-8. DOI: 10.1074/jbc.C100122200
- Schumann HJ, Endoh S, Brodde OE. The time course of the effects of beta- and alpha-adrenoceptor stimulation by isoprenaline and methoxamine on the contractile force and cAMP level of the isolated rabbit papillary muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 1975;289(3):291-302. PMID: 169486
- Terzic A, Pucéat M, Clément O, Scamps F, Vassort G. Alpha1-adrenergic effects on intracellular pH and calcium and on myofilaments in single rat cardiac cells. The Journal of Physiology. 1992;447:275-92. PMID: 1317431
- Ranek MJ, Kost CK, Hu C, Martin DS, Wang X. Muscarinic2 receptors modulate cardiac proteasome function in a protein kinase G-dependent manner. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2014;69:43-51. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.017
- Lee N, Jeong S, Kim K-C, Kim J-A, Park J-Y, Kang H-W et al. Ca²⁺ Regulation of Cav3.3 T-type Ca²⁺ Channel Is Mediated by Calmodulin. Molecular Pharmacology. 2017;92(3):347-57. DOI: 10.1124/mol.117.108530
- Cohn JN, Pfeffer MA, Rouleau J, Sharpe N, Swedberg K, Straub M et al. Adverse mortality effect of central sympathetic inhibition with sustained-release moxonidine in patients with heart failure (MOXCON). European Journal of Heart Failure. 2003;5(5):659-67. PMID: 14607206
- Kang M, Chung KY. PKC-epsilon mediates multiple endothelin-1 actions on systolic Ca²⁺ and contractility in ventricular myocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012;423(3):600-5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.024

Поступила 26.06.18 (Received 26.06.18)