

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

*На правах рукописи*

**Тапилина**

**Светлана Владимировна**

**УЧАСТИЕ МУСКАРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ТРЕТЬЕГО ТИПА В  
ОПОСРЕДОВАНИИ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЦА  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Специальность – 03.03.01 – Физиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Абрамочкин Д.В.

Москва – 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
1. ВВЕДЕНИЕ.....	12
1.1. Актуальность темы.....	12
1.2. Задачи исследования.....	13
1.3. Научная новизна исследования.....	13
1.4. Научно-практическая значимость.....	14
1.5. Основные положения, выносимые на защиту.....	14
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
2.1. Механизмы реализации холинергических эффектов в норме.....	15
2.1.1. Парасимпатическая иннервация сердца.....	15
2.1.1.1. Общий план вегетативной иннервации сердца.....	15
2.1.1.2. Внутрисердечное нервное сплетение.....	18
2.1.1.2.1. Структура ганглиев внутрисердечного нервного сплетения.....	18
2.1.1.2.2. Локализация узлов интеркардиального нервного сплетения.....	19
2.1.1.2.3. Нейрохимия интракардиальных ганглиев.....	23
2.1.2. Мускариновые рецепторы в миокарде.....	25
2.1.2.1. Строение и общие принципы работы мускариновых рецепторов.....	25
2.1.2.1.1. Агонисты и антагонисты мускариновых рецепторов.....	27
2.1.2.2. Мускариновые рецепторы в сердце.....	28
2.1.2.3. Физиологическая роль M1-, M4-, M5- рецепторов в сердце.....	29
2.1.2.3.1. M1-рецепторы.....	29
2.1.2.3.2. M4-рецепторы.....	30
2.1.2.3.3. M5-рецепторы.....	30
2.1.3. Реализация холинергических эффектов в сердце.....	31
2.1.3.1. M2-рецепторы в сердце.....	31
2.1.3.1.1. G $\alpha$ -субъединица и аденилатциклазный сигнальный каскад.....	31
2.1.3.1.2. $\beta\gamma$ -субъединица Gi-белка: активация GIRK-каналов.....	33
2.1.3.2. M3-рецепторы в сердце млекопитающих.....	36
2.1.3.2.1. Доказательства наличия функциональных M3-рецепторов в сердце.....	36
2.1.3.2.2. Внутриклеточные каскады, опосредуемые M3 рецепторами.....	37

2.1.3.2.3.	Фосфоинозитидный сигнальный путь: эффекты инозитолтрифосфата.....	38
2.1.3.2.4.	Фосфоинозитидный сигнальный путь: эффекты диацилглицерола.....	40
2.1.3.2.5.	Калиевый ток $I_{KM3}$ .....	42
2.2.	Особенности холинергической стимуляции при возникновении патологических ситуаций в сердце.....	44
2.2.1.	Ишемическое повреждение миокарда и МЗ-рецепторы.....	45
2.2.1.1.	Цитопротекторные эффекты стимуляции МЗ-рецепторов.....	46
2.2.1.2.	Влияние активации МЗ-рецепторов на межклеточное взаимодействие.....	47
2.2.1.3.	Ассоциация между РКС $\epsilon$ и МЗ-рецепторами.....	48
2.2.2.	Патологическая гипертрофия сердца и МЗ-рецепторы.....	48
2.2.3.	Аритмия и мускариновые рецепторы.....	49
2.2.3.1.	Участие М-рецепторов в генезе фибрилляции предсердий.....	49
2.2.3.2.	Кардиопротекторная роль МЗ-рецепторов при фибрилляции желудочков.....	50
2.2.4.	Сердечная недостаточность и МЗ-рецепторы.....	51
2.3.	Развитие холинергической регуляции в ходе онтогенеза.....	51
3.	МЕТОДИКА.....	55
3.1.	Объекты исследования.....	55
3.1.1.	Препаровка.....	56
3.1.2.	Препараты правого предсердия.....	56
3.1.3.	Препарат стенки правого желудочка.....	57
3.2.	Иммуногистохимическое окрашивание препаратов миокарда.....	57
3.2.1.	Использованные антитела.....	58
3.2.2.	Протокол окраски.....	58
3.3.	Молекулярно-биологические исследования уровня экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.....	59
3.3.1.	Принцип метода.....	59
3.3.2.	Выделение тотальной РНК из препаратов сердечной мышцы.....	63
3.3.3.	Обработка ДНКазой I.....	64
3.3.4.	Обратная транскрипция.....	65
3.3.5.	Выделение геномной ДНК.....	65
3.3.6.	Праймеры, использованные в работе.....	66
3.3.7.	Полимеразная цепная реакция.....	67
3.4.	Эксперименты с регистрацией электрической активности.....	69
3.4.1.	Устройство установки.....	69
3.4.2.	Регистрация ПД. Протокол эксперимента.....	70

3.4.3. Обработка результатов.....	71
3.5. Метод пэтч-кламп.....	72
3.5.1. Выделение изолированных кардиомиоцитов крысы.....	72
3.5.2. Регистрация кальциевого тока L-типа в изолированных кардиомиоцитах методом пэтч-кламп.....	73
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	75
4.1. Доказательства наличия и функциональной активности М3-рецепторов в сердце.....	75
4.1.1. Исследование эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов в рабочем миокарде крысы.....	75
4.1.1.1. Действие пилокарпина на параметры электрической активности в рабочем предсердном миокарде крысы. Развитие эффекта во времени.....	75
4.1.1.2. Эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов в предсердном рабочем миокарде крысы.....	76
4.1.1.3. Исследование эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов в рабочем миокарде стенки правого желудочка крысы.....	79
4.1.1.4. Сравнение влияния пилокарпина на конфигурацию ПД в предсердиях и желудочках крысы.....	83
4.1.2. Действие избирательной активации М3-рецепторов на параметры электрической активности различных отделов сердца мыши.....	84
4.1.2.1. Действие избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на параметры электрической активности синоатриального узла мыши.....	85
4.1.2.2. Исследование влияния избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на параметры ПД в препарате ушка правого предсердия мыши.....	89
4.1.2.3. Действие избирательной активации М3-рецепторов пилокарпином на электрическую активность правого желудочка мыши.....	92
4.1.2.4. Сравнение действия пилокарпина на параметры электрической активности предсердий и желудочков мыши.....	95
4.1.3. Иммуногистохимическое исследование миокарда различных отделов сердца мыши на наличие рецепторных белков М2 и М3-рецепторов.....	96
4.1.3.1. Иммуногистохимическое окрашивание препарата правого предсердия мыши.....	97
4.1.3.2. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов правого желудочка мыши.....	105

4.1.4. Измерение уровня экспрессии генов мускариновых рецепторов второго и третьего типа методом ПЦР в реальном времени.....	108
4.1.4.1. Измерение уровня экспрессии генов M2 и M3-рецепторов в сердце крысы.....	109
4.1.4.2. Измерение уровня экспрессии генов M2- и M3-рецепторов в различных отделах сердца мыши.....	112
4.2. Механизмы, опосредующие эффекты избирательной стимуляции M3-рецепторов.....	115
4.2.1. Исследование механизма воздействия стимуляции M3-рецепторов на параметры электрической активности в миокарде.....	115
4.2.1.1. Исследование роли фосфолипазы C в опосредовании эффектов избирательной активации M3-рецепторов.....	115
4.2.1.2. Исследование роли саркоплазматических рецепторов $IP_3$ в опосредовании эффектов избирательной активации M3-холинорецепторов.....	118
4.2.1.3. Исследование роли протеинкиназы C в опосредовании эффектов избирательной активации M3-холинорецепторов.....	120
4.2.2. Действие стимуляции M3-холинорецепторов на кальциевый ток в предсердных и желудочковых рабочих кардиомиоцитах крысы.....	122
4.3. Особенности развития холинергической системы в онтогенезе.....	127
4.3.1. Исследование влияния избирательной стимуляции M3-рецепторов на параметры электрической активности различных отделов сердца новорожденных крысят.....	128
4.3.1.1. Действие избирательной стимуляции M3-холинорецепторов на параметры ПД в рабочем предсердном миокарде новорожденных крысят.....	128
4.3.1.2. Действие избирательной стимуляции M3-холинорецепторов на параметры ПД в рабочем желудочковом миокарде новорожденных крысят.....	131
4.3.2. Исследование избирательной стимуляции M3-рецепторов на параметры электрической активности миокарда различных отделов сердца трехнедельных крысят.....	133
4.3.2.1. Действие избирательной стимуляции M3-холинорецепторов на параметры ПД в рабочем предсердном миокарде трехнедельных крысят.....	133
4.3.2.2. Действие избирательной стимуляции M3-холинорецепторов на параметры ПД в желудочковом миокарде трехнедельных крысят.....	135
4.3.3. Сравнение эффектов избирательной стимуляции M3-рецепторов на параметры электрической активности миокарда на разных стадиях постнатального развития крысы.....	136

4.3.4. Измерение уровня транскрипции генов M2- и M3-рецепторов в миокарде крысы на разных стадиях постнатального развития.....	139
4.3.4.1. Измерение уровня транскрипции генов M2- и M3-рецепторов в миокарде новорожденных крысят.....	139
4.3.4.2. Измерение уровня транскрипции генов M2- и M3-рецепторов в миокарде трехнедельных крыс.....	141
4.3.4.3. Сравнение уровня экспрессии генов M2- и M3-рецепторов в миокарде крысы на разных стадиях постнатального развития.....	142
4.4. Недостатки используемых экспериментальных методик.....	145
4.5. Возможное физиологическое значение M3-рецепторов.....	146
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	148
6. ВЫВОДЫ.....	149
7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	150

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

4-DAMP - 4-дифенилацетокси-N-метилпиперидина йодметилат

AADC - декарбоксилаза ароматических аминокислот

ANP - предсердный натрийуретический пептид

BDNF – нейротрофический фактор мозга

BMP – костный морфогенетический белок

BNP - мозговой натрийуретический пептид

BSA- бычий сывороточный альбумин

CGRP - пептид связанный с геном кальцитонина

ChT – высоко-аффинный транспортер холина

DAG - диацилглицерол

DRAS - дорзальный правый атриальный субплексус

DβH - дофамин бета-гидроксилаза

DTT – дитиотретиол

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

eNOS - эндотелиальная NO-синтаза

ERK - киназы, регулируемые внеклеточными сигналами

ETC - взаимодействие «возбуждение-транскрипция»

GAPDH - глицеральдегидфосфат дегидрогеназа

GIRK-каналы - G-белок связанный калиевый канал

GPCRs – рецепторы, связанный с G-белками

HCN каналы - гиперполяризационно-активируемые управляемые циклическими нуклеотидами каналы

I<sub>CaL</sub> – кальциевый ток L-типа

$I_{Cl}$  – цАМФ-зависимый хлорный ток

$I_{K1}$  - калиевый ток аномального выпрямления

$I_{K4AP}$  – калиевый ток, активируемый 4-аминопиридином

$I_{Kach}$  – калиевый ацетилхолинзависимый ток

$I_{KM3}$  – калиевый ток, активируемый M3-рецепторами

$I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  – быстрый и медленный компоненты токов задержанного выпрямления

$I_{Kur}$  – ультрабыстрый калиевый ток

IP3 – инозитолтрифосфат

IP3-R - инозитолтрифосфатные рецепторы

LCS – левый коронарный субплексус

LDS – левый дорзальный субплексус

MABA - multiple antigen blot assay

miRNA – микро рибонуклеиновая кислота

MMLV ревертаза - вирусная обратная транскриптаза

NCC - клетки нейронального гребня

NF- $\kappa$ B – транскрипционный фактор карра-B

nNOS - нейрональная NO-синтаза

NO - оксид азота

NPCH – нервное сплетения ворот сердца

NPY - нейропептид Y

p38 MAPK - митоген-активируемая протеинкиназа

PACAP - гипофизарный активирующий аденилатциклазу пептид

PBS – фосфатный буфер

PKC1 - фосфоинозитид-зависимая киназа-1

PIP2 - фосфатидилиназитол-4,5-дифосфат

PKA - протеинкиназа А

PKC – протеинкиназа С

PKG - протеинкиназа G

PLC - фосфолипазу С

PTX - коклюшный токсин

RCS – правый коронарный субплексус

SIF-клетки - клетки с низкой интенсивностью флуоресценции

SOD – супероксиддисмутаза

SP - вещество P

ТВРВ - 1-(1'-2-метилбензил)-1,4'-бипиперидин-4-ил)-1H бензо[d]имидазол-2(3H)-один

ТН – тирозингидроксилаза

VAcHT – везикулярный транспортер ацетилхолина

VIP – вазоактивный интестинальный полипептид

VLAS - вентральный левый атриальный субплексус

VMAT2 - везикулярный транспортер моноаминов 2

VRAS – вентральный правый атриальный субплексус

$\beta$ -МНС - тяжелая цепь  $\beta$ -миозина

АВУ - атрио-вентрикулярный узел

АНС – автономная нервная система

AT1 - рецептор ангиотензина II 1ого типа

АФК – активные формы кислорода

АЦХ – ацетилхолин

ВНСп - внутрисердечное нервное сплетение

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ГДФ – гуанозиндифосфат

ДПД – длительность потенциала действия

ДПД – длительность потенциала действия

ДЭПК – вода – вода, обработанная диэтилпиракарбонатом

кДНК – кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛВК – локальный выброс кальция

МДД – медленная диастолическая деполяризация

МП – мембранный потенциал

М-рецепторы – мускариновые рецепторы

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПД – потенциал действия

ПНС – парасимпатическая нервная система

РВ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени

САУ – синоатриальный узел

СНС – симпатическая нервная система

Сх43 – коннексин 43

ФДЭ2 – фосфодиэстераза 2

ФП – фибрилляция предсердий

ФС – фосфатидилсерин

ФЭУ – фотоэлектронный умножитель

ХАТ – холинацетилтрансфераза

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

ЧСС - частота сердечных сокращений

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

## **1. ВВЕДЕНИЕ**

### **1.1. Актуальность темы**

В настоящее время изучение регуляции сердечной деятельности развивается высокими темпами, что в первую очередь связано с остро стоящей перед человечеством проблемой сердечно-сосудистых заболеваний. Из всех регуляторных воздействий, которым сердце подвергается в организме, парасимпатические являются, пожалуй, наиболее важными. Нужно отметить, что многие факты говорят о кардиопротекторном значении парасимпатической регуляции сердца. Например, сердце кошки после атропинизации, т.е. блокирования всех парасимпатических влияний, становится многократно более склонным к возникновению фибрилляции желудочков в результате экспериментальной окклюзии коронарной артерии, чем до атропинизации [Rosenshtraukh et al., 1994]. Нет сомнений в том, что раскрытие механизмов кардиопротекторного действия АЦХ поможет в борьбе с заболеваниями сердца. Уже предложены способы применения защитных эффектов АЦХ в терапии хронических ишемических состояний [Castro et al, 2004; Zimerman et al, 2010]. Поэтому изучение механизмов парасимпатической регуляции сердца является исключительно важной задачей для современной физиологии.

Реализация парасимпатических влияний в миокарде опосредуется метаботропными мускариновыми рецепторами, которые относятся к рецепторам, связанным с G-белками. Традиционно считалось, что единственным функционально значимым типом М-холинорецепторов в миокарде является М<sub>2</sub>. На это указывали в основном данные разнообразных физиологических и фармакологических исследований. Однако в конце прошлого столетия при помощи методов молекулярной биологии в сердце были обнаружены все 5 типов мускариновых рецепторов, описанных на данный момент в организме. При этом физиологическая роль этих типов М-рецепторов в миокарде до конца не ясна.

Среди прочих типов мускариновых рецепторов особенно выделяются М<sub>3</sub>-рецепторы, поскольку в последнее десятилетие было показано, что именно этот тип участвует в реализации кардиопротекторных влияний. Защитное влияние мускариновых рецепторов третьего типа показано в условиях ишемических повреждений сердечной ткани, при развитии патологической гипертрофии миокарда, а также при возникновении желудочковых аритмий различного генеза. Кроме того, как сами М<sub>3</sub>-рецепторы, так и основные звенья внутриклеточных каскадов, запускаемых при их активации, являются важными фармакологическими целями для лечения и коррекции заболеваний сердца. Поскольку, несмотря на широкое применение мышей и крыс в лабораторной практике, в данном отношении эти объекты остаются практически не изучены,

выяснение наличия, функциональной значимости, а также определение основных звеньев каскада внутриклеточной сигнализации М3-рецепторов в миокарде лабораторных грызунов являются важными задачами. Важно отметить, что в ряде исследований, проведенных на крысах *in vivo*, были получены свидетельства изменений физиологического ответа на стимуляцию мускариновых рецепторов в ходе постнатального развития [Зефилов и др., 2007, Зиятдинова и др., 2012], что может указывать на существенные вариации рецепторного механизма реализации холинергических влияний на миокард в процессе онтогенеза.

Поэтому целью данной работы стало определение степени участия М3-рецепторов в опосредовании холинергической регуляции электрической активности миокарда млекопитающих (мышь и крыса) на различных стадиях онтогенеза.

### **1.1. Задачи исследования**

1. Исследовать действие избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на параметры электрической активности рабочего предсердного и желудочкового миокарда мыши и крысы, а также САУ мыши.

2. Методом иммуногистохимического окрашивания проверить наличие и определить локализацию М2- и М3-холинорецепторов в различных отделах сердца мыши.

3. Методом РВ-ПЦР сравнить уровень экспрессии генов М3- и М2-холинорецепторов в рабочем предсердном и желудочковом миокарде мыши и крысы, а также САУ мыши.

4. На примере предсердного миокарда крысы установить, с какими звеньями фосфоинозитидного каскада внутриклеточной сигнализации связаны наблюдаемые электрофизиологические эффекты активации М3-рецепторов.

5. С помощью метода *patch-clamp* проверить возможность участия кальциевого тока L-типа в опосредовании этих эффектов.

6. Сравнить действие избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на параметры электрической активности рабочего предсердного и желудочкового миокарда новорожденных и трехнедельных крысят с эффектами, обнаруженными на взрослых крысах.

7. Сравнить уровень экспрессии генов М3- и М2-холинорецепторов в миокарде новорожденных, трехнедельных и взрослых крыс.

### **1.2. Научная новизна исследования**

Впервые при помощи нескольких методик показано наличие и функциональная значимость мускариновых рецепторов третьего типа в рабочем предсердном и желудочковом миокарде мыши и крысы, а также в синоатриальном узле мыши. Также в данной работе показаны возможные механизмы реализации эффектов избирательной стимуляции М3-

рецепторов через фосфоинозитидный каскад внутриклеточной сигнализации и снижение амплитуды кальциевого тока L-типа.

В данной работе впервые показано изменение рецепторного механизма реализации холинергических влияний в сердце в ходе онтогенеза.

### **1.3. Научно-практическая значимость**

Полученные данные заметно дополняют имеющиеся сведения относительно механизмов реализации холинергических эффектов в сердце основных лабораторных животных мыши и крысы. Данные о функционировании МЗ-рецепторов в миокарде представляют важную практическую ценность. Так, например, протеинкиназа С, которая активируется через фосфоинозитидный каскад, запускаемый МЗ-рецепторами, на данный момент является перспективной мишенью для разработки новых лекарственных препаратов от ишемической болезни сердца [Inagaki, Churchill, Mochly-Rosen, 2006], гипертрофии, сердечной недостаточности [Ferreira, Brum, Mochly-Rosen, 2011] и других болезней. То же можно сказать и в отношении самих рецепторов третьего типа, однако разработке этого направления на данный момент мешает отсутствие селективных агонистов МЗ-рецепторов с преимущественным действием на сердце.

### **1.4. Основные положения, выносимые на защиту**

1. МЗ-рецепторы присутствуют во всех отделах сердца мыши и крысы. При их селективной активации в рабочем миокарде наблюдается уменьшение длительности потенциала действия, а в синоатриальном узле происходит замедление синусового ритма за счет торможения медленной диастолической деполяризации.

2. Эффекты активации МЗ-рецепторов в значительной степени реализуются через активацию фосфоинозитидного каскада внутриклеточной сигнализации и протенкиназы С, и частично - через уменьшение кальциевого тока L-типа.

3. В ходе постнатального развития меняется уровень экспрессии МЗ-рецепторов. Их вклад в реализацию холинергических эффектов в миокарде новорожденных животных значительно выше, чем у взрослых.

## **2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В данном обзоре мы рассматриваем имеющиеся в литературе сведения о механизмах холинергической регуляции сердечной деятельности. В первой части будут затронуты общие вопросы организации парасимпатической иннервации сердца, структура парасимпатических интрамуральных ганглиев, их локализация в миокарде, нейрохимическая характеристика и функциональные особенности постганглионарных холинергических нейронов. Затем мы приведем краткое описание типов мускариновых рецепторов, обнаруженных в миокарде, остановившись более подробно на механизмах реализации холинергических эффектов посредством М2- и М3-холинорецепторов, в отношении которых в настоящее время накоплен существенный объем физиологических и молекулярно-биологических сведений. В заключение остановимся на особенностях холинергической регуляции сердца при различных патологических состояниях и, в частности, опишем предполагаемые механизмы кардиопротекторных эффектов ацетилхолина (АЦХ) в условиях ишемии миокарда, а также затронем имеющиеся немногочисленные данные о становлении холинергической регуляции сердца в процессе онтогенеза.

### **2.1. Механизмы реализации холинергических эффектов в норме**

Сердце млекопитающих находится под постоянным контролем со стороны автономной (вегетативной) нервной системы (АНС). АНС модулирует сердечную деятельность через симпатические и парасимпатические постганглионарные нейроны, которые воздействуют на сердце посредством выделения норадреналина и ацетилхолина из окончаний своих аксонов в миокарде. Ниже мы рассмотрим общие принципы работы автономной нервной системы в сердце, более подробно остановимся на парасимпатической иннервации различных отделов сердца, а также рецепторных механизмах реализации холинергических эффектов в кардиомиоцитах.

#### **2.1.1. Парасимпатическая иннервация сердца**

##### **2.1.1.1. Общий план вегетативной иннервации сердца**

Автономная нервная система делится на симпатический и парасимпатический отделы. В свою очередь, как симпатическая, так и парасимпатическая нервная система состоит из центральной и периферической компоненты. Центральная часть представлена несколькими ядрами в среднем и продолговатом мозге, а также в различных отделах спинного мозга. Периферическим компонентом АНС являются: нервы, которые идут от ядер головного и спинного мозга к вегетативным ганглиям; автономные интраоракальные и интракардиальные

ганглии; и волокна, которые отходят от этих ганглиев и непосредственно иннервируют соответствующие ткани и органы-мишени [Gabella, 2001]. Общая схема организации автономной нервной системы сердца и взаимосвязь центральной и периферической составляющей представлена на рисунке 1.

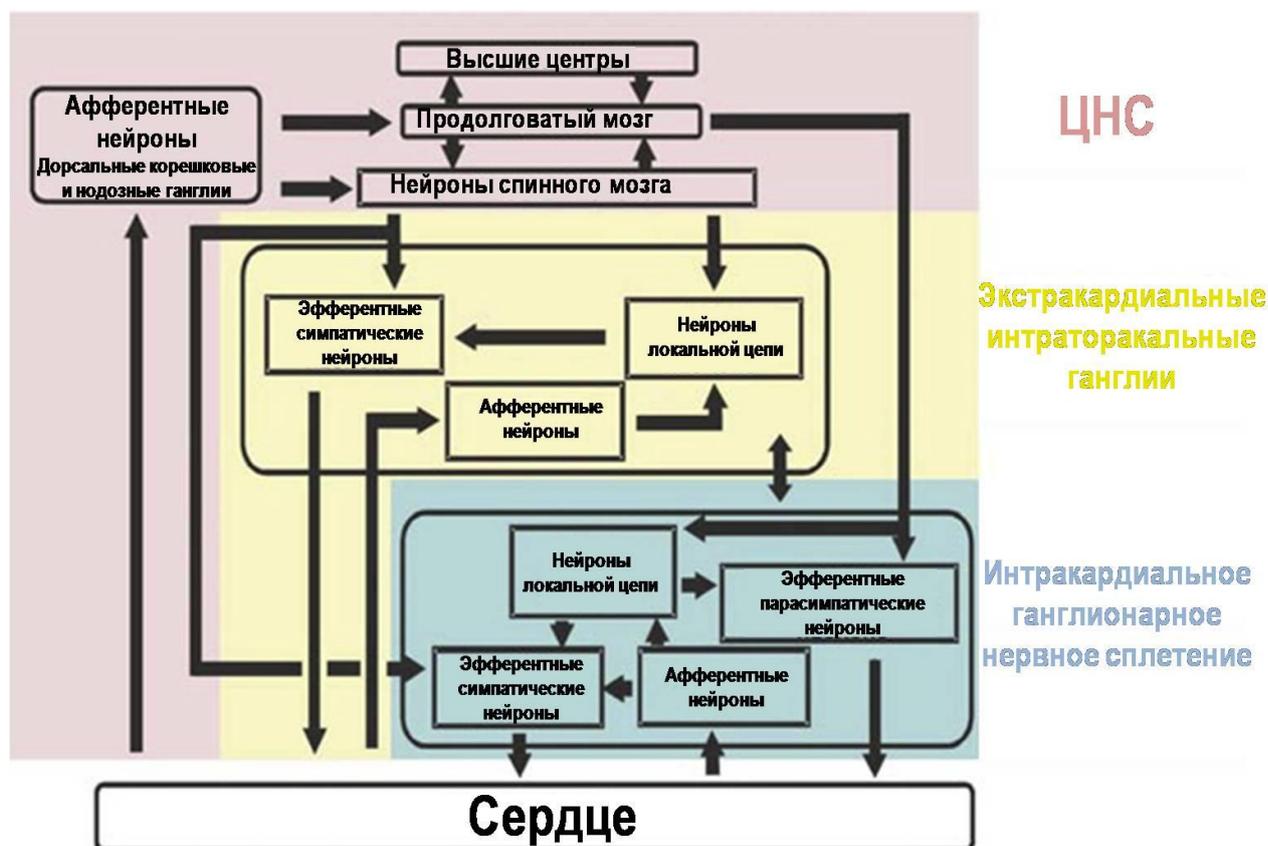


Рисунок 1. Схема организации автономной нервной системы, участвующей в регуляции работы сердца. Интраторакальные ганглии содержат не только постганглионарные симпатические нейроны, но также афферентные и нейроны локальной цепи. Во внутрисердечных ганглиях обнаружены: афферентные, эфферентные симпатические и парасимпатические нейроны, а также нейроны локальной цепи. Работа этих нейронов находится под контролем центральной нервной системы (ЦНС). По [Armour, 2010] с изменениями.

Центральная часть симпатической нервной системы (СНС), вовлеченная в управление работой сердца, представлена преганглионарными нейронами, которые лежат в интермедиолатеральной части серого вещества верхних 5-6 грудных сегментов спинного мозга. Миелинизированные преганглионарные волокна вместе с соматическими нервами покидают спинной мозг через передние корешки и заканчиваются в симпатической паравертебральной цепочке ганглиев, недалеко от спинного мозга. Здесь происходит передача сигнала с аксонов преганглионарных нейронов на тела постганглионарных посредством ацетилхолина, при участии постсинаптических никотиновых рецепторов. Долгое время считалось, что тела

постганглионарных симпатических нейронов, иннервирующих сердце, находятся только в звездчатых интраторакальных ганглиях [Mizeres, 1958]. Однако, в нескольких работах Armour и соавторов было показано, что помимо этого постганглионарные нейроны СНС локализованы билатерально в верхних, средних цервикальных и медиастинальных ганглиях [Armour, 1986; Armour, 1985; Armour, 2010]. Эти ганглии образуют интраторакальное сплетение, где помимо тел симпатических постганглионаров находятся также афферентные нейроны, собирающие информацию о работе сердца, и нейроны локальной цепи (local circuit neurons), которые способны координировать работу сердца на ганглионарном уровне (рис.1) [Ardell, Quillen, Armour, 2004]. Постганглионарные симпатические нейроны являются адренергическими и оказывают положительный хронотропный и инотропный эффект главным образом посредством  $\beta$ -адренорецепторов.

Парасимпатическая нервная система (ПНС) имеет 3 ядра в центральной нервной системе, которые связаны с работой сердечной мышцы: двойное ядро (nucleus ambiguus), дорзальное двигательное ядро (dorsal motor nucleus) и ядро одиночного пути (nucleus tractus solitarius), их работа модулируется гипоталамусом. Отсюда берут начало сердечные преганглионарные миелинизированные волокна, которые в составе X черепно-мозгового нерва (блуждающего нерва или вагуса) идут к сердцу. После выхода из черепа через яремное отверстие, каждый блуждающий нерв (левый и правый) идет вниз между яремной веной и сонной артерией и проникает в грудную клетку [Mitchell, 1953] [Levy, Martin, 1989]. Парасимпатические ганглии находятся в жировой ткани на поверхности сердца, которая тесно прилегает к эпикарду. Так же как и в СНС, нейротрансмиттером в нервных узлах ПНС выступает ацетилхолин, который действует через ионотропные никотиновые рецепторы. Постганглионарные парасимпатические нейроны в отличие от симпатических имеют короткие аксоны. Тормозное воздействие постганглионаров ПНС на сердечную мышцу осуществляется также при помощи ацетилхолина. Ацетилхолин из постганглионарных парасимпатических терминалей активирует метаботропные мускариновые рецепторы в сердце.

Сердечные парасимпатические и симпатические волокна заканчиваются во внутрисердечном нервном сплетении (ВНСп). Здесь обнаружены тела и аксоны парасимпатических постганглионарных нейронов, афферентные нейроны [Butler et al., 1990], нейроны локальной цепи (local circuit neurons) [Armour, Hopkins, 1990] [Gagliardi et al., 1988]. Кроме того, вопреки классическим представлениям об автономной нервной системе во внутрисердечном нервном сплетении были найдены не только холинергические, но и адренергические нейроны [Baluk, Gabella, 1990] [Hoover et al., 2009]. Эти нейроны помимо классических ферментов участвующих в синтезе, обратном захвате и переработке

ацетилхолина, также оказались иммунореактивны к ферментам осуществляющим метаболизм катехоламинов.

### **2.1.1.2. Внутрисердечное нервное сплетение**

Нормальное функционирование сердца зависит от скоординированной работы центральной нервной системы и внутрисердечного нервного сплетения. Долгое время роль ВНСп в этом процессе недооценивалась, и интракардиальные ганглии считались просто «релейной станцией» по переключению сигнала с одних нейронов на другие. Но многочисленные исследования последних 20 лет существенно изменили наше представление о внутрисердечном нервном сплетении. Было показано, что нейроны интракардиальных ганглиев способны модулировать каждый сердечный цикл посредством локальных рефлекторных дуг, по этой причине некоторые авторы даже стали называть ВНСп «мозгом сердца» [Steele et al., 1994] [Ardell, Quillen, Armour, 2004] [Armour, 2007]. Ниже мы подробнее рассмотрим структуру и распределение внутрисердечных ганглиев, а также их нейрохимический профиль.

#### *2.1.1.2.1. Структура ганглиев внутрисердечного нервного сплетения*

Исследования, проведенные на нескольких видах животных, включая человека, показывают, что нейроны внутрисердечного нервного сплетения собраны в ганглии, которые в большинстве своем имеют овальную форму. Эти ганглии можно условно разделить на два типа. Нервные узлы первого типа имеют вид глобулы, а ганглии второго типа - плоскую форму. У некоторых видов животных (крыса и морская свинка) были обнаружены переходные формы ганглиев [Pauza et al., 2002]. Большая часть нервных узлов сконцентрирована в жировой ткани, которая тесно прилегает к эпикарду в суправентрикулярных отделах сердца. Более мелкие ганглии в зависимости от вида животного могут располагаться в различных частях предсердий, желудочков, синусов и крупных сосудов [Pauza et al., 2002; Randall et al., 1987].

Размеры интракардиальных ганглиев разнообразны, и число нейронов в каждом узле тоже варьируется - от 1-4 до нескольких сотен клеток на один узел. Плоские ганглии, как правило, небольшого размера и в каждом из них сосредоточено не более пятидесяти тел нейронов. С другой стороны, самые большие глобулярные ганглии, найденные в сердце собаки, могут содержать в себе до 2000 нейронов, и хорошо различимы невооруженным глазом [Pauza et al., 2002]. Исследования других авторов указывают на меньшее количество нейронов (до 70-100 клеток) в ганглиях ВНСп собак [Randall, Ardell, 1985; Randall et al., 1987]. У человека, свиньи, крысы, морской свинки наибольшее количество клеток в одном нервном узле не превышает 200-300 штук [Batulevicius, Pauziene, Pauza, 2005; Batulevicius et al., 2008; Pardini et al., 1987; Pauza et al., 2002].

Общее количество клеток интракардиального нервного сплетения также сильно варьирует у разных видов. В сердце у свиньи насчитывается до 22 тысяч нейронов ВНСп [Batulevicius et al., 2008], у морской свинки - около 3000 [Batulevicius, Pauziene, Pauza, 2005], у овцы - примерно 17 тысяч [Saburkina et al., 2010], у собаки - 80 тысяч [Pauza, Skripka, Pauziene, 2002]. У человека число внутрисердечных нейронов может достигать от 43 до 90 тысяч в зависимости от возраста [Pauza et al., 2000]. Количество нервных клеток в сердце крысы по данным различных авторов колеблется от 1000 нейронов [Akamatsu, De-Souza, Liberti, 1999], до 4000 [Pardini et al., 1987], и даже до 7000 внутрисердечных нейронов [Batulevicius, Pauziene, Pauza, 2003]. Подобный разброс значений может быть связан с различными методиками оценки количества нейронов ВПСп. Так в своей работе Akamatsu и соавторы использовали тотальные (whole-mount) препараты сердца крысы, что не позволяет точно определить количество нервных клеток. При этом при гистохимическом окрашивании и изготовлении гистологических срезов (методика, которую использовали в других работах) часть нейронов может теряться, что также приводит к неверной оценке общего количества нервных клеток в интракардиальном сплетении [Batulevicius, Pauziene, Pauza, 2003].

#### *2.1.1.2.2. Локализация узлов интеркардиального нервного сплетения*

В одной из первых работ по топографии внутрисердечных ганглиев в сердце крысы было показано, что они образуют две группы. Правосторонняя группа ганглиев располагается в области верхней полой вены в непосредственной близости от синоатриального узла (САУ), а левосторонняя группа (более многочисленная и рассеянная) примыкает к области атрио-вентрикулярного узла (АВУ) [Meiklejohn, 1914].

Дальнейшие исследования ВНСп показали, что у большинства изученных видов млекопитающих внутрисердечные нервные узлы располагаются сходным образом. King и Coakley в своей работе на 19 видах животных, в том числе и на людях, показали, что наибольшая плотность ганглиев ВНСп наблюдается в эпикарде предсердий. У большинства видов они сконцентрированы в четырех областях: вокруг верхней полой вены, узкой полосой по обе стороны от косой вены левого предсердия, в области вокруг коронарного синуса и вдоль дорзальной части борозды межпредсердной перегородки. Кроме того, небольшое количество ганглиев было найдено вблизи легочных вен и нижней полой вены, на вентральной поверхности левого предсердия и в межпредсердной перегородке. В ушках обоих предсердий не было обнаружено узлов интракардиального нервного сплетения [King, Coakley, 1958].

В более поздних работах, выполненных с использованием иммуногистохимических методов, результаты, полученные в 1958 году, в целом подтвердились. В работе Pardini и коллег на сердце крысы также выделяется четыре основных группы скопления интракардиальных

нервных клеток: самая ростральная группа клеток находится в области верхней полой вены, следующие группы расположены в верхней и дорзальной части межпредсердной перегородки, наконец две группы найдены с дорзальной стороны левого и правого предсердия. Согласно данным по гистохимическому окрашиванию сердца на фермент холинацетилтрансферазу (ХАТ), отвечающий за синтез ацетилхолина, самая большая группа клеток ВНСп находится в межпредсердной перегородке [Pardini et al., 1987], однако не все исследования это подтверждают [Batulevicius, Pauziene, Pauza, 2003].

Batulevicius с соавторами в нескольких работах на сердце крысы установили, что нейроны внутрисердечного нервного сплетения локализуются в области ворот сердца (heart hilum), а также эпикардиально и эндокардиально [Batulevicius, Pauziene, Pauza, 2003]. При помощи окрашивания антителами к ацетилхолинэстеразе было показано, что больше всего узлов ВНСп находится в области ворот сердца (heart hilum). Некоторые авторы по аналогии с воротами легких, почек и других органов называют так место входа и выхода магистральных сосудов сердца (эта область отмечена на рис. 2 пунктирной линией). Также авторы используют в своих статьях специальные названия для обозначения сосудов сердца у млекопитающих, другие же придерживаются обозначений принятых в сердце человека. В своем обзоре мы используем названия принятые авторами соответствующих статей, но в скобках приводим название аналогичных сосудов у человека (по [Pauza et al., 1997]).

Экстракардиальные нервы входят в сердце в артериальной (область вокруг аорты и легочного ствола) и венозной (область вокруг краниальной, каудальной и легочных вен) части ворот сердца (heart hilum). Места входа экстракардиальных нервов обозначены на рис. 2 белыми стрелками. Нервы от артериальной части проходят непосредственно в эпикард желудочков, а нервы от венозной части формируют внутрисердечное нервное сплетение в области ворот сердца (nerve plexus of the cardiac hilum – NPCH). Волокна, которые достигают сердца в районе правой краниальной вены (верхней полой вены), переходят в правый нейрональный кластер. А нервы, проникающие в область левой краниальной вены (одна из левых легочных вен) и легочных синусов (вен), образуют левый нейрональный кластер. Эндокардиальные ганглии показаны на рис. 2 в виде серых областей. Оба кластера связаны между собой большим количеством комиссурных нервов. От нейрональных кластеров волокна распространяются эпикардиально по предсердию и желудочкам и эндокардиально в межпредсердную перегородку.

Внутрисердечное нервное сплетение, расположенное на основании сердца, дает проекции в различные части предсердий и желудочков по шести направлениям, которые называются эпикардиальными нейрональными субплексусами (они обозначены на рис. 2 черными стрелками). Нервы, образующие правый коронарный субплексус (right coronary

subplexuses - RCS) и левый коронарный субплексус (left coronary subplexuses - LCS), проникают в эпикард с вентро-латеральной стороны в области выхода аорты и легочного ствола. Затем проходят вдоль правой или левой коронарной бороздки, и разветвляются в вентральной и латеральной стенке соответствующего желудочка. LCS у крысы развит значительно лучше, в то время как RCS был найден не у всех исследуемых особей.

Нервы вентрального правого атриального субплексуса (ventral right atrial subplexus – VRAS) выходят из правого нейронального кластера NPCN (nerve plexus of the cardiac hilum) и проникают в эпикард в верхней части межпредсердной перегородки, далее ветви VRAS распространяются по вентральной и латеральной стороне правого предсердия. Вентральный левый атриальный субплексус (ventral left atrial subplexus – VLAS) устроен аналогичным образом, однако его проекции представлены в основном на вентральной стенке левого предсердия.

На дорзальной стороне сердца крысы также берут начало несколько субплексусов. От дорзо-латеральной части правого нейронального кластера NPCN отходят волокна дорзального правого атриального субплексуса (dorsal right atrial subplexus – DRAS). Его волокна проходят между правой краниальной веной (верхняя полая вена) и правым легочным синусом (на рис.2 обозначены RCV и RPS соответственно), доходят до каудальной вены (нижняя полая вена) и ветвятся на дорзальной и латеральной стороне правого предсердия, достигая области синоатриального узла и правого ушка. Левый дорзальный субплексус (left dorsal subplexus – LDS) является одной из самых больших и наиболее сложно устроенных структур подобного рода. Его волокна образуют обширную нейрональную сеть на дорзальной стороне левого предсердия, а на местах пересечения нервов иногда возникают небольшие ганглии. Волокна LDS берут начало в нескольких местах: от дорзальных частей правого и левого нейрональных кластеров, синуса левой краниальной вены и легочного синуса. От эпикардиальных ганглиев, расположенных на дорзальной стороне левого предсердия, нервы продолжают по направлению к дорзальной коронарной бороздке. Далее они распространяются на дорзальную и латеральную поверхность обоих желудочков, небольшая группа ветвится в области левого предсердия и ушка, кроме того, часть нервов проникает вглубь сердца со спинной стороны в области межпредсердной перегородки и уже эндокардиально доходит до области атриовентрикулярного узла (АВУ).

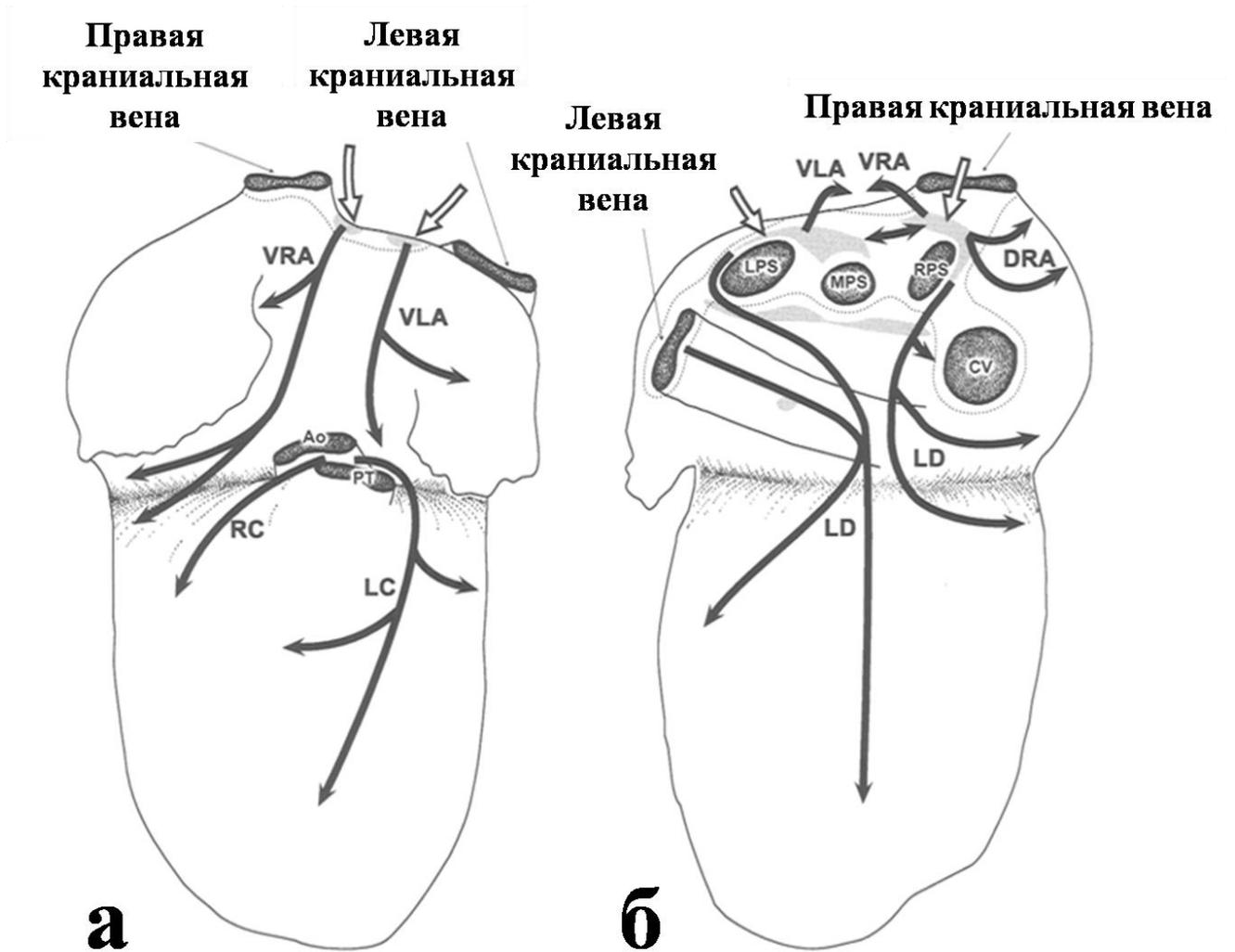


Рисунок 2. Схема нейрональных субплексусов в сердце крысы с вентральной (а) и дорзальной (б) стороны. Белыми стрелками показано место входа в сердце экстракардиальных нервов. Черными стрелками показана локализация и проекции нейрональных субплексусов. Серым цветом отмечено расположение интеркардиальных ганглиев и нейронов. Пунктирная линия ограничивает область ворот сердца (heart hilum). Ao – аорта; PT – легочный ствол; CV – каудальная вена (нижняя полая вена); LPS, MPS и RPS – левый, срединный и правый легочный синус соответственно (у человека эти вены соответствуют левыми и правыми легочными венами); RC- правый коронарный субплексус; LC – левый коронарный субплексус; VRA и VLA – вентральный правый и левый атриальный субплексус; DRA – дорзальный правый атриальный субплексус; LDS – левый дорзальный субплексус. По [Batulevicius, Pauziene, Pauza, 2003] с изменениями.

Подробные анатомические исследования, проведенные на других видах животных (морская свинка [Batulevicius, Pauziene, Pauza, 2005], свинья [Batulevicius et al., 2008], овца [Saburkina et al., 2010], собака [Pauza, Skripka, Pauziene, 2002], человек [Pauza et al., 2000] et al.),

показали аналогичное расположение основных элементов интракардиального нервного сплетения в сердце.

### *2.1.1.2.3. Нейрохимия интракардиальных ганглиев*

Сердечные ганглии имеют в своем составе два типа клеток: сердечные нейроны и SIF (small intensely fluorescent - SIF) клетки. Работа обоих типов клеток регулируется при помощи различных нейротрансмиттеров и нейромодуляторов [Parsons, 2004].

При помощи иммуногистохимического окрашивания на холинацетилтрансферазу (ХАТ) показано, что подавляющее большинство клеток ВНСп являются постганглионарными холинергическими нейронами парасимпатической нервной системы. Такие исследования были проведены на различных видах животных, включая человека [Mawe et al., 1996; Richardson, Grkovic, Anderson, 2003; Rysevaite et al., 2011; Petraitiene, Pauza, Benetis, 2014]. Окрашивание на высокоаффинный транспортер холина (high-affinity choline transporter - ChT), который является высокоспецифичным маркером, также доказывает холинергическую природу большинства интракардиальных нейронов. При двойном окрашивании было показано, что тела нейронов окрашиваются антителами к ХАТ и окружены точечными ChT-позитивными варикозами. Эти данные соответствуют классическому представлению о внутрисердечных ганглиях, содержащих холинергические нейроны и имеющих холинергический вход. Нельзя не отметить, что в некоторых работах в миокарде было найдено достаточное количество ХАТ-положительных ганглиев, которые практически не окрашивались антителами к транспортеру холина [Hoover et al., 2009]. Помимо нейронов иммунореактивны к ХАТ оказались и SIF клетки [Mawe et al., 1996].

В недавнем исследовании было показано, что почти все постганглионарные парасимпатические нейроны иммунореактивны к нейрональной NO-синтазе (nNOS), что указывает на NO-ергический фенотип данных клеток. Распределение nNOS в интракардиальных ганглиях и аксонах позволяет предположить, что оксид азота (NO) является котрансмиттером в окончаниях постганглионарных парасимпатических нервов [Hoover et al., 2009]. Оксид азота, вырабатываемый nNOS, действует аутокринно и облегчает выброс ацетилхолина из сердечных холинергических нервов [Choate et al., 2001; Conlon, Kidd, 1999]. Однако результаты других авторов указывают на меньшее количество NO-ергических клеток в сердце человека. Шуклин и Швалев в своей работе обнаружили всего около 40% нейронов иммунореактивных к nNOS [Шуклин, Швалев, 2006]. Эти различия могут быть связаны с различной локализацией интракардиальных ганглиев, попавших в исследование. У животных в сердце было обнаружено меньшее количество NO-ергических клеток – у крысы около 4% от общего количества нейронов [Klimaschewski et al., 1992], у морской свинки всего 5% [Mawe et

al., 1996], в экспериментах на мыши показано, что 16 % холинергических нейронов иммунореактивны к nNOS [Choate et al., 2001]. В работах, проведенных на сердце морской свинки, было показано, что помимо NO-ергических нейронов внутрисердечное нервное сплетение содержит множество волокон, которые также оказались иммунореактивны к nNOS. Были обнаружены и крупные пучки волокон, и мелкие, связывающие разные ганглии на препарате. Также в этом исследовании было показано, что большинство волокон окрашивающихся антителами к nNOS имеют экстракардиальную природу [Calurca, Vizzard, Parsons, 2000].

Некоторые нейроны содержат тирозингидроксилазу (ТН) и везикулярный транспортер моноаминов 2 (vesicular monoamine transporter 2 - VMAT2), которые позволяют синтезировать, хранить и высвободить катехоламины. В работах на человеке и других приматах было показано, что в сердце содержится до 50 % нейронов, которые имеют двойной холин/норадренергический фенотип [Weihe et al., 2005; Hoover et al., 2009]. Кроме того, эти нейроны иммунореактивны к ферментам, участвующим в метаболизме катехоламинов, а именно к декарбоксилазе ароматических аминокислот (aromatic amino acid decarboxylase – AADC) и дофамин бета-гидроксилазе (dopamine  $\beta$ -hydroxylase - ДВН). Это указывает на полную норадренергическую функциональность этих нейронов. Однако данный феномен наблюдается не у всех видов животных. В ходе эксперимента на мышах холинергические нейроны окрашиваются антителами к ТН, но не к VMAT2. Таким образом эти нейроны не могут полностью выполнять норадренергическую функцию [Weihe et al., 2005]. Всего в сердце мыши обнаружено около 14% бифенотипичных клеток. Также найдены SIF клетки, которые очень хорошо окрашиваются антителами в ТН, располагаются небольшими кластерами по 3-8 клеток и разбросаны по всему ганглию или обнаруживались отдельно на стенках предсердий и желудочков [Rysevaite et al., 2011]. Сердечные ганглии морской свинки также проявляют двойственный фенотип. Кроме того были найдены SIF клетки, иммунореактивные к ТН. Роль этих клеток до конца не ясна [Bałuk, Gabella, 1990; Mawe et al., 1996].

Элементы внутрисердечного нервного сплетения обнаруживают иммунореактивность к различным сигнальным молекулам пептидной природы. В сердце человека найдены нейроны окруженные варикозами нервных терминалей, окрашивающихся антителами к вазоактивному кишечинальному полипептиду (vasoactive intestinal polypeptide - VIP), субстанции P (substance P - SP), пептиду связанному с геном кальцитонина (calcitonin gene-related peptide - CGRP). Ни один из этих пептидов не ко-локализован с СНТ, что свидетельствует о том, что эти нервные окончания являются не холинергическими, а пептидергическими [Hoover et al., 2009]. Аналогичные данные о наличие пептидергических входов в сердце представлены и в экспериментах на животных [Horackova, Armour, Vuczko, 1999]. Существует предположение,

что эти пептидергические волокна являются отростками ноцицептивных сенсорных нейронов, находящихся за пределами сердца. Однако авторы не исключают возможность, что пептидергическая иннервация исходит от других ганглиев интракардиального сплетения [Hoover et al., 2009]. Многочисленные эксперименты, проведенные на животных, показали наличие иммунореактивности нейронов к различным нейропептидам, таким как VIP, SP, CGRP, соматостатин, нейропептид Y (NPY), динорфин, гипофизарный активирующий аденилатциклазу пептид (pituitary adenylate cyclase activated peptide - PACAP) и некоторым другим [Steele et al., 1994; Horackova, Armour, Byczko, 1999; Richardson, Grkovic, Anderson, 2003; Rysevaite et al., 2011]. Подобное разнообразие различных нейротрансмиттеров позволяет тонко регулировать работу интракардиального нервного сплетения и взаимодействие его симпатических и парасимпатических компонентов. Так, например, NPY, выделяемый из симпатических волокон, способен снижать выброс ацетилхолина из парасимпатических волокон [Serone, Angus, 1999], VIP вызывает положительный инотропный и хронотропный эффект [Henning, Sawmiller, 2001]. Кроме того соотношение нейропептидов изменяется при развитии различных патологических ситуаций в сердце. Это открывает пути к созданию новых терапевтических стратегий для лечения кардиомиопатий различного генеза [Dvorakova, Kruzliak, Rabkin, 2014].

Таким образом, нейроны интракардиального нервного сплетения могут иметь несколько нейрохимических фенотипов – холинергический, адренергический, NO-ергический, пептидергический. Кроме того, часто встречаются ганглии, обладающие различными вариациями двойного фенотипа. Также установлено, что в отличие от классического представления о том, что все внутрисердечные ганглии иннервируются холинергическими преганглионарами, были обнаружены пептидергические, NO-ергические и норадреналинергические входы. Все эти данные указывают на то, что внутрисердечное нервное сплетение – это сложная структура, с нейронами, выполняющими различные функции, а также подверженными многогранной внешней и внутренней регуляции.

### **2.1.2. Мускариновые рецепторы в миокарде**

Ацетилхолин модулирует работу сердца посредством мускариновых рецепторов, расположенных на мембранах кардиомиоцитов. Ниже мы опишем строение мускариновых рецепторов, общие принципы их работы, а также рассмотрим различные типы М-рецепторов, представленных в сердце.

#### **2.1.2.1. Строение и общие принципы работы мускариновых рецепторов**

Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы входят в большое семейство метаботропных рецепторов, ассоциированных с G-белками (G-protein-coupled receptors - GPCRs). Все рецепторы данного семейства представляют собой одну молекулу белка, которая семь раз пронизывает цитоплазматическую мембрану. Иными словами, молекула содержит семь гидрофобных трансмембранных доменов, соединенных тремя внеклеточными и тремя внутриклеточными гидрофильными доменами [Baldwin, 1994]. Мускариновые рецепторы имеют большую степень гомологии с другими представителями суперсемейства GPCRs и между собой [Hulme, Birdsall, Buckley, 1990]. Разные типы мускариновых рецепторов оказались высокогомологичны и у различных видов млекопитающих. Так, например, мускариновые рецепторы крысы имеют 90% гомологию по сравнению с рецепторами человека [Hall et al., 1993; Myslivecek, Nováková, Klein, 2008].

Всего описано 5 типов мускариновых рецепторов (M1-M5), состоящих из 460 – 590 аминокислотных остатков [Hulme, Birdsall, Buckley, 1990]. Карбокси-конец гликопротеина является внутриклеточным и окрашивается антителами к С-концу лишь после того, как мембраны клеток становятся проницаемы [Lu et al., 1997]. N-конец находится с внешней стороны мембраны и имеет один или несколько сайтов гликозилирования. Однако, как было показано, гликозилирование не является необходимым ни для локализации на поверхности клетки, ни для связывания лиганда, и не повышает устойчивость рецепторов к деградации [Korpen van, Nathanson, 1990].

При взаимодействии рецептора с G-белком важную роль играют 2-я (i2) и 3-я (i3) внутриклеточные петли. Так, в экспериментах с мутантными M-рецепторами было показано, что важную роль в механизмах сигнальной трансдукции играет высококонсервативная последовательность аспартат-аргинин-тирозин (Asp-Arg-Tyr) находящаяся на петле i2, а именно Arg123 [Zhu et al., 1994; Wess et al., 1997; Lu et al., 1997; Jones, Curtis, Hulme, 1995]. Кроме того, за связь с альфа-субъединицей отвечает лейцин в положении 173 [Hu et al., 2010]. Также показано, что i3 является местом, определяющим подтип рецептора и его связь с тем или иным G белком. Были созданы химерные мускариновые рецепторы (m3/m2 и m3/m2 химеры). У этих рецепторов были поменяны между собой только их третьи цитоплазматические петли, то есть получились M2-рецепторы, но с i3 от M3-рецепторов и наоборот. Оказалось, что химеры обладают свойствами того рецептора, от которого они получили свою 3 внутриклеточную петлю. При более детальном исследовании оказалось, что ключевую роль играют первые 16-21 аминокислот с NH<sub>2</sub>-конца и 19 аминокислот с COOH-конца [Wess et al., 1990; Kubo et al., 1988]. За взаимодействие с молекулой ацетилхолина, по всей видимости, отвечает остаток аспарагина

(Asp105) на N-конце третьей трансмембранной петли, который взаимодействует с положительно заряженной головкой лиганда [Curtis et al., 1989; Spalding et al., 1994].

При взаимодействии АЦХ с мускариновым рецептором происходят конформационные изменения в структуре и, как следствие, активация гетеротримерного G-белка, состоящего из  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ - субъединиц. В неактивной форме гетеротримера ГДФ (гуанозиндифосфат) связан с  $G\alpha$ -субъединицей. При активации происходит замена ГДФ на ГТФ и диссоциация от рецептора комплексов  $G\alpha$ -ГТФ и  $G\beta\gamma$ , каждый из которых в свободном состоянии способен активировать соответствующие внутриклеточные каскады. Продолжительность сигнала определяется скоростью гидролиза ГТФ  $G\alpha$ -субъединицей и последующей реассоциацией  $G\alpha$ -ГДФ и  $G\beta\gamma$  субъединиц [Cabrera-Vera et al., 2003].

Мускариновые рецепторы принято делить на 2 функциональных класса. «Нечетные» М1, М3- и М5-рецепторы сопряжены с  $G_{q/11}$ -белком не чувствительным к коклюшному токсину (РТХ).  $G_{q/11}$ -белок стимулирует фосфолипазу С (PLC) и, по-видимому, модулирует работу некоторых ионных каналов. «Четные» М2- и М4-рецепторы сопряжены с  $G_i/G_o$ -белком, чувствительным к РТХ, при активации которого происходит ингибирование аденилатациклазы [Harvey, 2012].

#### 2.1.2.1.1. *Агонисты и антагонисты мускариновых рецепторов*

Развитие фармакологии дало возможность различать подтипы мускариновых рецепторов. На данный момент существует достаточное количество ортостерических антагонистов, обладающих достаточной селективностью к М1-М5. Для М1 это пирензепин и мускариновые белковые токсины МТ1 и МТ7, выделенные из яда зеленой мамбы. Метоктрамин, АF-DX 116, АF-DX 384 и трипитрамин селективны в отношении М2-рецепторов. Селективными антагонистами для М3-рецепторов являются 4-дифенилацетокси-N-метилпиперидина йодметилат (4-DAMP) и гексагидро-силадифенидол гидрохлорид. Тропикамид, химбацин, PD102807(28) и мускариновые токсины МТ3 и МТ1 блокируют мускариновые рецепторы 4-го подтипа. [Caulfield, Birdsall, 1998; Wang, Shi, Wang, 2004; Myslivecek, Nováková, Klein, 2008]. Недавно был найден специфичный антагонист и для М5-рецепторов - VU0488130 [Gentry et al., 2014]. Однако, для большинства антагонистов селективность достигается только в узком диапазоне концентраций. Исключение в данном случае составляют мускариновые антагонисты, выделенные из ядов черной и зеленой мамбы, которые обладают достаточной степенью селективности [Jerusalinsky et al., 2000].

Обнаружены достаточно селективные агонисты для некоторых типов мускариновых рецепторов – для M1 рецепторов это ТВРВ (1-(1'-2-метилбензил)-1,4'-бипиперидин-4-ил)-1H бензо[d]имидазол-2(3H)-один) [Jones et al., 2008], а также VU0357017 и VU0364572 [Digby et al., 2012], M1 и M4 рецепторы селективно активируют производные N-замещенного 7-азаиндолина [Suwa et al., 2014; Takai et al., 2014], кроме того, слабую селективность к M3-рецепторам показывают пилокарпин [Wang et al., 1999], холин и тетраметиламмоний [Shi, Wang, Wang, 1999a]. Сейчас активно развивается поиск аллостерических и битопических агонистов и антагонистов для мускариновых рецепторов, что открывает широкие возможности для коррекции различных патологических состояний [Schmitz et al., 2014; Kruse et al., 2014].

### **2.1.2.2. Мускариновые рецепторы в сердце**

Долгое время считалось, что в сердце присутствует только один подтип мускариновых рецепторов – M2. Это подтверждалось экспериментами, проведенными с использованием различных методик на основании анализа кДНК (кодирующей ДНК), выделенной из кардиомиоцитов [Peralta et al., 1987a; Kubo et al., 1986], а также при помощи Northern-blotting [Peralta et al., 1987b], иммунологической детекции [Dörje, Levey, Brann, 1991] и в опытах с конкурентным радиолигандным связыванием [Doods et al., 1987].

Однако многие наблюдаемые физиологические эффекты ацетилхолина в сердце не могли быть объяснены наличием только одного типа мускариновых рецепторов [Tietje, Nathanson, 1991; Jaiswal et al., 1989]. Исследования с использованием методики конкурентного ингибирования меченных тритием лигандов и антагонистов мускариновых рецепторов показали присутствие в кардиомиоцитах левого желудочка собаки еще одного типа холинорецепторов, помимо M2. [Yang et al., 1992]. А уже через год при помощи ПЦР с обратной транскрипцией было показано наличие M1-рецепторов в желудочковых кардиомиоцитах морской свинки. Кроме того, была доказана их функциональная значимость методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell [Gallo et al., 1993]. В дальнейшем наличие различных типов мускариновых рецепторов во всех отделах сердца многократно подтверждалось с использованием большого количества методик и разных видов животных. M1-рецепторы были найдены и охарактеризованы в желудочковых кардиомиоцитах крысы [Sharma et al., 1996], показано наличие функциональных M3- и M4-рецепторов в предсердии собаки [Shi, Wang, Wang, 1999a], M3-рецепторов в сердце морской свинки [Shi et al., 1999], человека [Hellgren et al., 2000] и кролика [Kan, Ruan, Malik K, 1996]. В кардиомиоцитах человека с применением 4 различных методик было показано присутствие нескольких типов мускариновых рецепторов - M1, M2, M3 и впервые найден в сердце млекопитающего M5 тип, а

для М4 типа не был обнаружен рецепторный белок. Однако методом РВ-ПЦР показано наличие мРНК всех 5 типов рецепторов (М1-М5) во всех отделах сердца [Wang et al., 2001]. Аналогичные данные получены в работе, проведенной на желудочке и предсердии крысы [Krejčí, Tušek, 2002]. В этом же исследовании было показано, что более 90% от общего количества рецепторов обнаруженных в сердце составляют именно М2 тип. Дальнейшие работы с использованием все более широкого спектра методик подтверждали ранее полученные доказательства присутствия М1-М5 рецепторов в сердце. Так в работе Перса и соавторов, опубликованной в 2006 году, помимо радиолигандного метода и ПЦР в реальном времени, авторы использовали три иммунологические методики – Western blotting, multiple antigen blot assay (МАВА) и ELISA. Было подтверждено наличие молекул всех типов мускариновых рецепторов, а не только их мРНК [Pérez et al., 2006].

Однако наличие мРНК или рецепторных белков не указывает на функциональную активность этих типов мускариновых рецепторов в сердце. Поэтому потребовались физиологические доказательства участия разных типов М-рецепторов в холинергической регуляции работы сердца.

### **2.1.2.3 Физиологическая роль М1-, М4-, М5- рецепторов в сердце**

#### *2.1.2.3.1 М1-рецепторы*

Именно этот тип не-М2-рецепторов был впервые обнаружен у морской свинки в 1993 году Галло и коллегами [Gallo et al., 1993]. В этой работе отмечалось увеличение  $Ca^{2+}$ -тока, при блокаде М2-рецепторов коклюшным токсином и одновременной стимуляции рецепторов агонистом карбамилхолином. Этот эффект уменьшался в присутствии селективного блокатора М1-рецепторов пирензипина. Авторы предположили, что именно М1 рецепторы участвуют в опосредовании положительного инотропного эффекта при высоких концентрациях мускаринового агониста. Тем не менее, до сих пор существует некоторая неопределенность относительно вклада М1-рецепторов в парасимпатическую регуляцию сердца. Отмечается положительный инотропный эффект связанный с активацией М1-рецепторов [Du et al., 1995; Woo et al., 2005]. С другой стороны, активация М1-рецепторов вероятно вызывает отрицательный хронотропный и дромотропный эффекты, поскольку в экспериментах *in situ* на анестезированных собаках пирензепин (агонист М1) частично снимал эти эффекты, развивавшиеся после активации парасимпатической системы [Narita et al., 1991]. Кроме того, хронотропные эффекты, вызванные стимуляцией вагуса, уменьшались не только при использовании пирензепина, но и высокоселективного агониста МТ7 [Hogan, Markos, 2007].

Однако эти эффекты могут быть связаны с блокадой преганглионарных/постганглионарных М1-рецепторов, находящихся на поверхности нервных клеток, а не кардиомиоцитов. Так в экспериментах на мышах дикого типа и животных, нокаутных по гену М1-рецепторов, было продемонстрировано, что применение блокатора М1-рецепторов McN-A-343 у мышей дикого типа вызывало увеличение ЧСС и давления в левом желудочке, чего не наблюдалось у нокаутов. С другой стороны, все эти стимулирующие эффекты снимались пропранололом, что указывает на вовлечение в их реализацию симпатических постганглионарных нейронов [Hardouin et al., 2002]. Таким образом, участие М1-рецепторов в опосредовании холинергических эффектов в сердце ставится под серьезное сомнение.

#### 2.1.2.3.2 *М4-рецепторы*

Эксперименты проведенные на кардиомиоцитах собаки с использованием методики пэтч-кламп в конфигурации whole-cell, показали наличие  $K^+$ -тока задержанного выпрямления К4АР. Этот ток был чувствителен к коклюшному токсину, активировался под действием агониста М4-рецепторов 4-аминопиридином, блокировался тропикамидом, и усиливался в присутствии изопротеренола [Shi et al., 2003].

#### 2.1.2.3.3 *М5-рецепторы*

В сердечной ткани была обнаружена мРНК и показано наличие рецепторных белков, соответствующих М5-рецепторам [Wang et al., 2001; Pérez et al., 2006]. Однако никаких данных, указывающих на функциональную значимость этого типа рецепторов в сердце, до сих пор нет. До недавнего времени работа с М5-рецепторами осложнялась отсутствием селективных агонистов и антагонистов. Недавно был найден антагонист и к этому типу холинорецепторов [Gentry et al., 2014], что открывает новые возможности для определения роли М5-рецепторов в сердце.

Функциональная значимость мускариновых рецепторов М1-, М4-, М5- типов до сих пор остается под вопросом и является предметом научных споров. На данный момент доказано, что в реализации холинергических эффектов в сердечной мышце участвуют два типа физиологически значимых мускариновых рецепторов - 2-й и 3-й. Ниже мы подробно рассмотрим вопрос о реализации холинергических эффектов через классические М2-рецепторы, а также интенсивно изучаемые в настоящее время М3-рецепторы миокарда.

## 2.1.3 Реализация холинергических эффектов в сердце

### 2.1.3.1 M2-рецепторы в сердце

Доминирующим типом мускариновых рецепторов в сердце является второй тип. Около 90% всей мРНК M-рецепторов, которую удалось обнаружить в сердце, составляют M2-рецепторы [Krejčí, Tušek, 2002]. Классические отрицательные хроно-, ино-, батмо- и дромотропные эффекты ацетилхолина обусловлены активацией именно этого типа мускариновых рецепторов.

Активация M2-рецепторов в сердце приводит к гиперполяризации клеток синоатриального узла и замедлению медленной диастолической деполяризации (МДД), что в результате приводит к замедлению синусного ритма. В рабочем миокарде предсердий происходит уменьшение длительности потенциала действия и снижение силы сокращений, в атриовентрикулярном узле происходит снижение проводимости и, наконец, ткань желудочков отвечает незначительным снижением силы сокращений, более выраженным после предварительной стимуляции цАМФ пути, например через  $\beta$ -адренорецепторы [Dhein, Коррен ван, Brodde, 2001].

На клеточном уровне при стимуляции M2-рецепторов происходит замена ГДФ на ГТФ в нуклеотид-связывающем центре Gi-белка и диссоциация Gi-белка на  $\alpha_i$  и  $\beta\gamma$ -субъединицы. После диссоциации эти субъединицы выполняют специфичные для себя функции до тех пор, пока не произойдет гидролиз связанной ГТФ до ГДФ и реассоциация субъединиц Gi-белка [Cabrera-Vera et al., 2003]. Ниже мы рассмотрим эффекты, которые опосредуются работой этих субъединиц.

#### 2.1.3.1.1 *Gi $\alpha$ -субъединица и аденилатциклазный сигнальный каскад*

Активная  $\alpha$ -субъединица Gi-белка подавляет работу аденилатациклаз изоформ 5 и 6, экспрессируемых в миокарде, снижая уровень цАМФ в кардиомиоцитах [Sunahara, Dessauer, Gilman, 1996]. Циклический АМФ действует в качестве вторичного мессенджера в клетке и модулирует работу ионных каналов. Это происходит как правило за счет последующей активации протеинкиназы А (РКА) и дальнейшего фосфорилирования этим ферментом соответствующих каналов, в то же время каналы активируемого гиперполяризацией тока  $I_f$  стимулируются напрямую связыванием цАМФ с нуклеотидсвязывающим доменом на С-конце молекулы.

Снижение уровня цАМФ приводит к уменьшению активности протеинкиназы А. РКА фосфорилирует кальциевые каналы L-типа, за счет чего усиливается ток  $I_{CaL}$  [Kameyama, Hofmann, Trautwein, 1985; Trautwein et al., 1987; Bean, Nowycky, Tsien, 1984]. Следовательно, стимуляция M2-рецепторов приводит к ослаблению этого эффекта. Ингибирование  $I_{CaL}$  происходит в предсердиях и в желудочках при активации мускариновых рецепторов. В желудочке, в отличие от предсердия, эффект блокады кальциевого тока L-типа наблюдается только при предварительном повышении уровня цАМФ в клетке [Fischmeister, Hartzell, 1986; Dhein, Korpen van, Brodde, 2001]. Эффект ингибирования  $I_{CaL}$  при стимуляции M-рецепторов был подробно изучен в клетках синоатриального узла кролика [Petit-Jacques et al., 1993; Zaza, Robinson, DiFrancesco, 1996]. Компьютерное моделирование клеток САУ кролика показывает, что за счет подавления  $I_{CaL}$  АЦХ может резко снижать амплитуду ПД в клетках истинного водителя ритма САУ, где передний фронт создается только этим током [Aliev, Fedorov, Rozenshtraukh, 2004]. В рабочих кардиомиоцитах подавление  $I_{CaL}$  под действием АЦХ приводит к укорочению фазы плато и ускорению реполяризации. А в атриовентрикулярном узле снижение тока  $I_{CaL}$  вызывает отрицательный дромотропный эффект.

В нескольких работах Harvey и соавторов, выполненных на кардиомиоцитах кролика и морской свинки, описывается так называемый цАМФ-зависимый хлорный ток [Harvey, Clark, Hume, 1990; Harvey, Hume, 1989a; Harvey, Hume, 1989c]. Было показано, что этот ток активируется при воздействии изопротеренола, а последующая стимуляция мускариновых рецепторов снижает его до исходных значений. Регуляция  $I_{Cl}$  очевидно опосредуется цАМФ и протеинкиназой А. По всей видимости, ионные каналы этого тока активны только в фосфорилированном состоянии, и, поскольку воздействие на мускариновые рецепторы снижает уровень цАМФ, активность РКА снижается и ток подавляется. Таким образом, хлорный ток активируется при возбуждении симпатической нервной системы и приводит к укорочению ПД, что может служить защитным механизмом при удлинении ПД при слишком сильной активации  $I_{CaL}$ .

Еще одной мишенью для РКА являются каналы быстрого калиевого тока задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  [Yazawa, Kameyama, 1990; Harvey, Hume, 1989b], потенциалзависимая активация которых облегчается в фосфорилированном состоянии. Ингибируя активность аденилатциклазы, M2-рецепторы также в небольшой степени снижают и этот ток.

Как отмечалось, в работах группы под руководством DiFrancesco показано, что цАМФ независимо от активации РКА, способен усиливать пейсмекерный ток  $I_f$ . Молекулы цАМФ связываются с цитоплазматическими участками в молекуле канала HCN (hyperpolarization-

activated cyclic nucleotide-gated canal – каналы тока  $I_f$ ) и вызывают сдвиг кривой активации тока  $I_f$  в сторону более положительных потенциалов [DiFrancesco, Tortora, 1991; DiFrancesco, Tromba, 1988], что ускоряет первую половину МДД в клетках синоатриального узла [Bucchi et al., 2007]. Следовательно, АЦХ, снижая уровень цАМФ, вызывает обратный эффект, то есть подавляет  $I_f$  и замедляет МДД и снижает синусный ритм. Эти эффекты наблюдаются уже при очень низких концентрациях АЦХ (0,01  $\mu\text{M}$ ), в то время как для активации калиевых ацетилхолинзависимых каналов входящего выпрямления, через стимуляцию которых также проявляется отрицательное хронотропное действие АЦХ, нужны концентрации в несколько раз выше [DiFrancesco, Tromba, 1988].

Помимо цАМФ, вторичным мессенджером в клетках сердечной ткани может выступать цГМФ. Впервые феномен увеличения концентрации цГМФ при активации мускариновых рецепторов был описан еще в 70-е годы прошлого столетия [George, Wilkerson, Kadowitz, 1973; George et al., 1970]. Было высказано предположение, что активация  $M_2$ -рецепторов приводит к стимуляции эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), вследствие чего происходит увеличение концентрации NO, который в свою очередь активирует растворимую гуанилатациклазу и повышает таким образом уровень цГМФ в клетке. Циклический ГМФ предположительно воздействует на 2 мишени в клетках сердца – стимулирует протеинкиназу G (PCG) и фосфодиэстеразу 2 (ФДЭ2). Активация ФДЭ2 приводит к гидролизу цАМФ и, соответственно, снижению его концентрации. В экспериментах с эмбриональными кардиомиоцитами на ранней стадии развития было показано, что при стимуляции  $M_2$ -рецепторов происходит ингибирование пейсмекерного  $I_f$ -тока с участием цГМФ/ФДЭ2 сигнального пути и NO [Lang et al., 2007]. Кроме того, в нескольких работах описано ингибирование кальцевого тока L-типа через цГМФ/ФДЭ2 путь [Méry et al., 1993; Sakai, Shen, Pappano, 1999]. Однако существует довольно большой пул данных, опровергающих участие NO и цГМФ в опосредовании холинергических эффектов, поэтому их роль до конца не ясна и является предметом научных споров [Harvey, Belevych, 2003].

#### 2.1.3.1.2 $\beta\gamma$ -субъединица Gi-белка: активация GIRK-каналов

Гиперполяризация, возникающая при активации мускариновых рецепторов, обусловлена активацией GIRK-каналов (G-белок связанный калиевый канал). Ток  $I_{K_{ach}}$ , генерируемый этими каналами описан в клетках синоатриального узла, атриовентикулярного узла, рабочих кардиомиоцитах предсердий и желудочков некоторых видов животных [Harvey, 2012]. Ток  $I_{K_{ach}}$  относится к семейству калиевых токов входящего выпрямления, при этом свойства входящего выпрямления у него выражены существенно слабее, чем у фонового тока  $I_{K1}$ .  $I_{K_{ach}}$  возникает в

кардиомиоцитах исключительно на фоне стимуляции М-рецепторов, в нормальных условиях он не обнаруживается. Латентный период активации  $I_{K_{Ach}}$  при аппликации АЦХ составляет 30-100 с, что значительно дольше, чем активация токов через инотропные рецепторы, но меньше, чем модуляция тех или иных токов через системы вторичных мессенджеров. Это является косвенным доказательством в пользу активации  $I_{K_{Ach}}$  посредством  $G_{\beta\gamma}$ -субъединицы [Yatani, Brown, 1989].

В настоящее время является общепризнанным, что активация калиевых ацетилхолинзависимых каналов происходит при помощи  $\beta\gamma$ -субъединицы Gi-белка [Kurachi et al., 1992]. Канал представляет из себя гетеротетрамер состоящий из две субъединиц GIRK1 и две GIRK 4 [Krapivinsky et al., 1995]. Субъединица GIRK1 имеет сайты фосфорилирования, которое является необходимым условием для связи с  $\beta\gamma$ -субъединицей Gi-белка и последующей активацией каналов [Medina et al., 2000]. GIRK-канал может связывать до четырех  $G_{\beta\gamma}$ -субъединиц, то есть на одну субъединицу канала приходится один сайт связывания [Corey, Clapham, 2001]. Кроме того, было показано, что активность работы канала зависит от количества присоединенных  $\beta\gamma$ -субъединиц – максимальная активность канала достигается при ассоциации трех субъединиц G-белка [Sadja, Alagem, Reuveny, 2002].

Гиперполяризация мембраны, вызванная активацией калиевых ацетилхолинзависимых каналов, слабо выражена в клетках рабочего миокарда, поскольку их мембранный потенциал (МП) велик и приближается к калиевому равновесному потенциалу. Однако активация  $I_{K_{Ach}}$  приводит к ускорению реполяризации, то есть к уменьшению длительности потенциала действия (ДПД). Уменьшение ДПД при стимуляции мускариновых рецепторов также частично обусловлено подавлением  $Ca^{2+}$ -тока L-типа, о чем говорилось выше. Также в результате уменьшения длительности ПД укорачивается и период рефрактерности, что может приводить к возникновению преждевременных ПД и фибрилляций в предсердном миокарде [Kovoor et al., 2001].

В синоатриальном узле максимальный диастолический потенциал существенно позитивнее калиевого равновесного, поэтому гиперполяризация мембраны при активации  $I_{K_{Ach}}$  может достигать величины 25-30 мВ. За счет гиперполяризации максимальный диастолический потенциал увеличивается и возрастает время, которое требуется для достижения порогового потенциала активации каналов тока  $I_{CaL}$ . Вследствие этого общая длительность диастолической деполяризации возрастает и происходит замедление синусного ритма. Атриовентрикулярный узел выступает в роли посредника проведения импульса от предсердий к желудочкам, и активация мускариновых рецепторов приводит здесь к отрицательному дромотропному

эффекту. Этот эффект возникает при активации  $I_{KACH}$ , за счет снижения проводимости клеток АВУ [Nishimura et al., 1988]. В желудочковых кардиомиоцитах также обнаружены GIRK каналы, однако их количество значительно ниже, чем в предсердиях.

Таким образом, эффекты АЦХ, опосредуемые активацией M2-рецепторов, можно разделить на две группы: зависимые от активации каналов  $I_{Kach}$   $\beta\gamma$ -субъединицей и опосредованные аденилатциклазным сигнальным путем (Рис.3). Важно отметить, что последние имеют место уже при воздействии наномолярных концентраций АЦХ, в то время как выраженная активация  $I_{Kach}$  наблюдается при аппликации микромолярных концентраций.

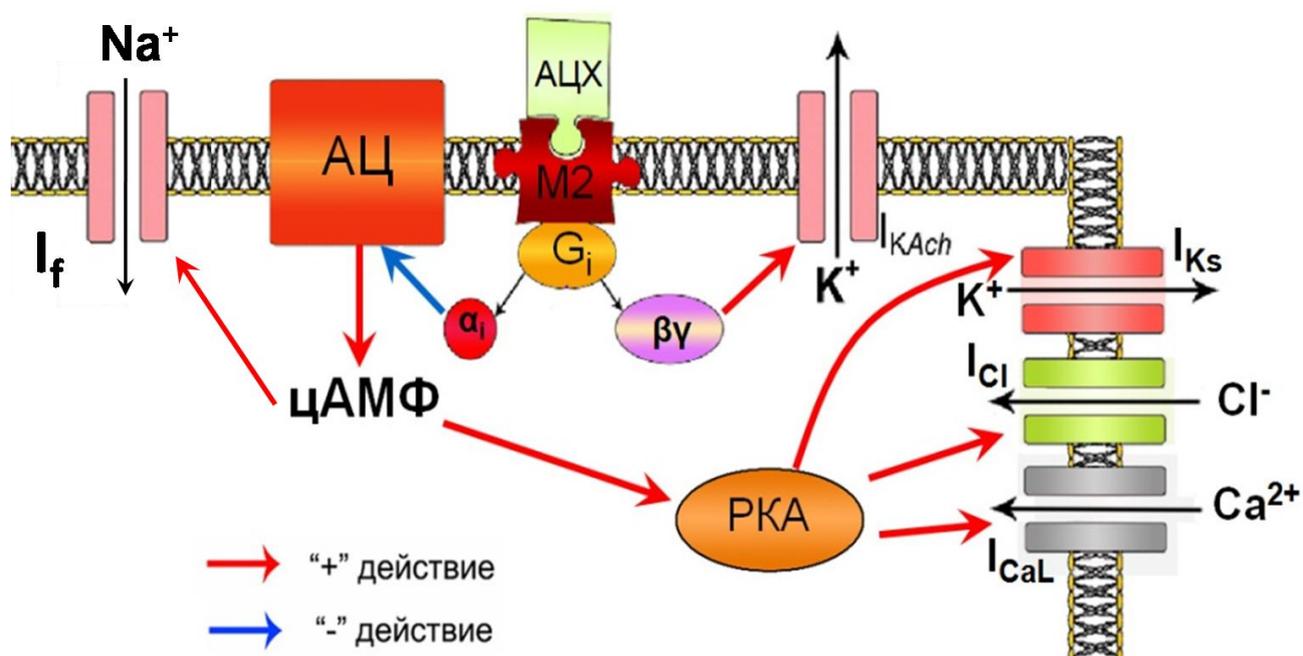


Рисунок 3. Сигнальный путь M2-рецепторов. После активации M2-рецепторов происходит диссоциация G<sub>i</sub> белка на α- и βγ-субъединицы. Основной мишенью для α-субъединицы является аденилатациклаза, при блокаде которой происходит снижение цАМФ и как следствие ингибирование тока I<sub>f</sub>, калиевого, хлорного и кальциевого тока L-типа. βγ-субъединица активирует ацетилхолинзависимые калиевые каналы. Все это приводит к возникновению в сердце отрицательных хроно-, дромо-, ино- и батмотропных эффектов. Более подробные описания приведены в тексте главы 2.1.4.1.

### 2.1.3.2 МЗ-рецепторы в сердце млекопитающих

#### 2.1.3.2.1 Доказательства наличия функциональных МЗ-рецепторов в сердце

Впервые свидетельства в пользу наличия функциональных МЗ-рецепторов в сердце млекопитающих были получены в 1989 году [Jaiswal et al., 1989]. В этой работе было показано, что АЦХ вызывает увеличение синтеза простагландинов в сердце кролика, и этот эффект снимается блокатором МЗ-рецепторов 4-DAMP. Затем в работах на кардиомиоцитах морской свинки было показано, что стимуляция М-рецепторов карбамилхолином приводит к увеличению внутриклеточной концентрации инозитолтрифосфата ( $IP_3$ ), что происходит при активации «нечетных» рецепторов, сопряженных с  $G_q$ -белками [Ford, Eglen, Whiting, 1992]. Другая группа авторов в экспериментах на кардиомиоцитах новорожденных крысят установила, что карбамилхолин-индуцированное увеличение  $IP_3$  снимается при аппликации ННСiD (селективного агониста МЗ-рецепторов), чего не происходит при блокаде М1- и М2-рецепторов [Sun et al., 1996]. Pönicke и соавторы, основываясь на экспериментах, проведенных на желудочковых кардиомиоцитах крысы, сделали вывод, что стимуляция МЗ-рецепторов приводит к активации фосфоинозитидного сигнального пути в сердце [Pönicke, Heinroth-Hoffmann, Brodde, 2003].

На изолированном предсердии мыши был описан феномен двухфазного инотропного ответа на АЦХ – сначала происходит снижение силы сокращений, а затем постепенное его увеличение. Оба ответа являются дозависимыми и блокируются атропином. Кроме того при использовании селективных антагонистов М2-рецепторов снимается отрицательный ответ, а при блокаде МЗ – положительный. При воздействии РТХ на препарат сердца, блокируется только отрицательный ответ, а следовательно возникновение положительного инотропного эффекта не связано с РТХ-нечувствительным  $G_q$ -белком [Nishimaru et al., 2000].

Большой вклад в развитие наших представлений о работе МЗ-рецепторов внесла группа китайских ученых во главе с Z. Wang. В серии работ этой группы был открыт и описан новый калиевый ток, вызываемый стимуляцией МЗ-рецепторов –  $I_{KM3}$  [Shi, Wang, Wang, 1999a; Shi et al., 1999; Shi, Wang, Wang, 1999b; Wang et al., 1999; Shi et al., 2004a; Shi et al., 2004b]. Подробнее о свойствах этого тока мы поговорим в соответствующей главе.

Значительное количество данных об МЗ-рецепторах в миокарде было получено при помощи различных молекулярно-биологических и биохимических методик. Методом РВ-ПЦР при помощи праймеров подобранных к 3 трансмембранной петле (считается, что этот участок отвечает за взаимодействие с G-белком) было показано наличие МЗ-транскриптов в предсердии собаки [Shi, Wang, Wang, 1999a]. Анализ наличия мРНК в сердце человека показал, что уровень

экспрессии гена мускариновых рецепторов в предсердии несколько раз выше, чем в желудочках. Также впервые показано наличие мРНК М3-рецепторов в сердце человека [Hellgren et al., 2000]. Дальнейшие исследования подтвердили этот факт [Oberhauser et al., 2001]. А в работе Wang и коллег было показано наличие не только мРНК, но и мембранных белков М3-рецепторов. Интересно, что уровень белка М2-рецепторов был сопоставим в желудочках и предсердиях, в то время как количество белка М3-рецепторов было примерно в 10 раз выше в желудочках, нежели в предсердиях. Отметим также, что судя по снимкам кардиомиоцитов, прошедших иммуногистохимическое окрашивание на М2- и М3-рецепторы, полученным на конфокальном микроскопе, М2-рецепторы распределены более менее равномерно по всей поверхности клетки, а М3 концентрируются в основном в области вставочных дисков [Wang et al., 2001].

Итак, за последние годы собраны убедительные доказательства в пользу не только наличия, но и функциональной значимости М3-рецепторов в сердце млекопитающих. Далее мы рассмотрим внутриклеточные каскады, ионные токи и внутриклеточные мишени, а также обсудим физиологические эффекты, которые возникают в сердце при возбуждении М3-рецепторов.

#### 2.1.3.2.2 *Внутриклеточные каскады, опосредуемые М3-рецепторами*

Мускариновые рецепторы третьего типа сопряжены с  $G_{q/11}$ -белками. Активация GPCR классически приводит к диссоциации  $G_q$  на  $\alpha_{q/11}$  и  $\beta\gamma$ -субъединицы. Первая активирует мембрано-связанную фосфолипазу C (PLC), которая катализирует гидролиз мембранного фосфолипида фосфатидилиназитол-4,5-дифосфата ( $PIP_2$ ) до инозитолтрифосфата ( $IP_3$ ) и диацилглицерола (DAG).  $\beta\gamma$ -субъединица задействована в активации особого калиевого тока  $I_{KM3}$ . Эти пути представлены на рисунке номер 4.

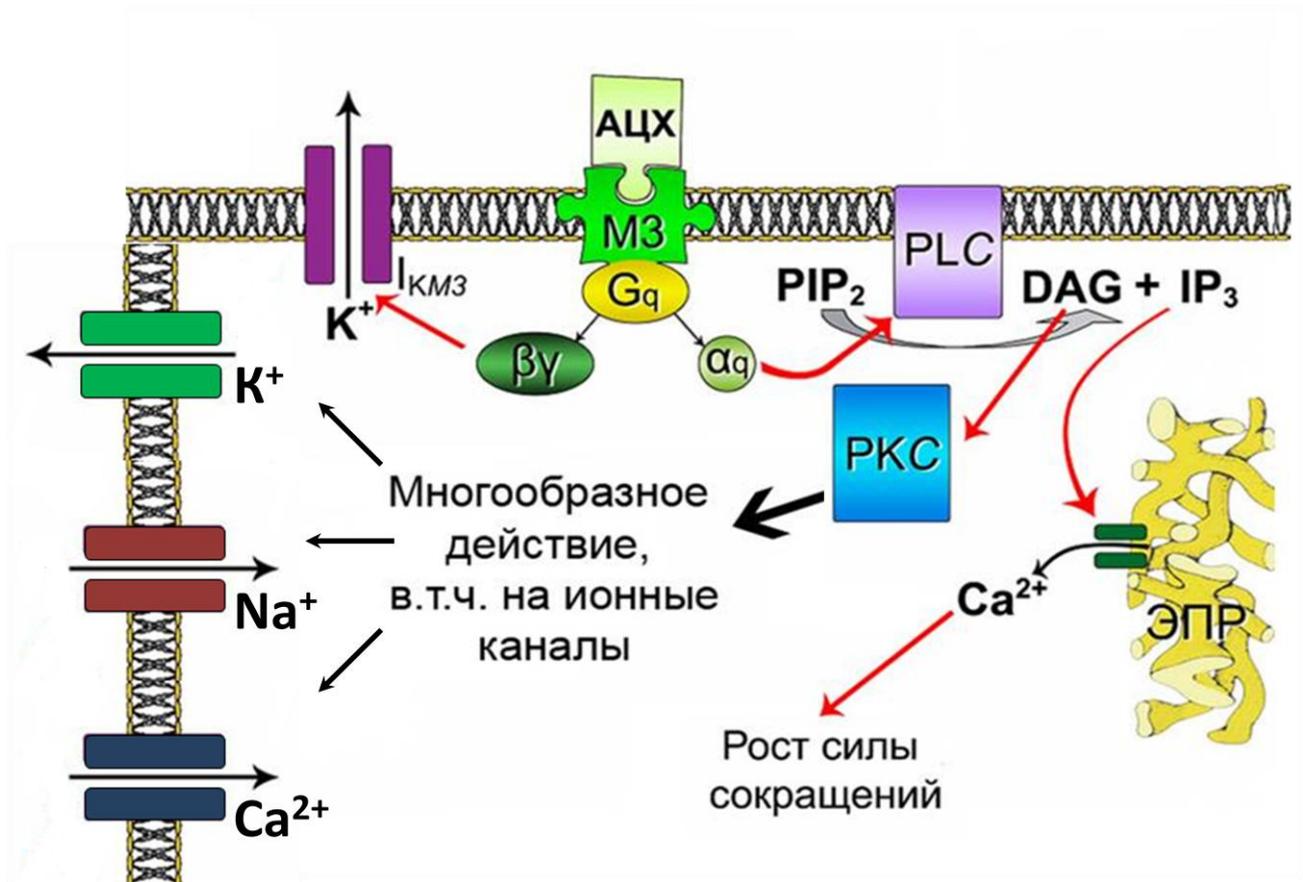


Рис.4 Сигнальный путь М3-рецепторов. После активации М3-рецепторов происходит диссоциация G<sub>q/11</sub> белка на α- и βγ-субъединицы. Основной мишенью для α<sub>q/11</sub>-субъединицы является фосфолипаза С. Ее активация приводит к образованию IP<sub>3</sub> и DAG, которые воздействуют на выброс Ca<sup>2+</sup> из ЭПР (эндоплазматического ретикулума), а также активируют РКС. Как α<sub>q/11</sub>, так и βγ-субъединица могут активировать калиевые каналы тока I<sub>KM3</sub>.

#### 2.1.3.2.3 Фосфоинозитидный сигнальный путь: эффекты инозитолтрифосфата

В сердце экспрессируется несколько изоформ PLC, относящихся к семействам β, γ, δ и ε. Наибольший интерес для нас представляет PLCβ, поскольку именно она активируется рецепторами, связанными с G-белками [Kockskämper et al., 2008].

Активация фосфолипазы С приводит к образованию двух продуктов - IP<sub>3</sub> и DAG, которые являются важными вторичными мессенджерами в клетке. IP<sub>3</sub> является гидрофильным соединением, поэтому транслоцируется от сарколеммы в цитоплазму. Тут происходит активация инозитолтрифосфатных рецепторов (IP<sub>3</sub>-R), которые располагаются преимущественно на поверхности саркоплазматического ретикулума и ядерной оболочке. Они представляют собой семейство катионных каналов, отвечающих за высвобождение ионов кальция из депо саркоплазматического ретикулума [Malviya, 1994; Humbert et al., 1996; Leite et al., 2003]. Всего известно 3 типа IP<sub>3</sub>-рецепторов, которые различаются аффинностью к IP<sub>3</sub> и

отношением к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ . Согласно исследованиям, проводимым на разных видах животных, в сердце могут экспрессироваться все три типа. Однако существуют видоспецифичные различия в преобладании той или иной изоформы. Так у человека в сердце преобладает 1-ый тип [Yamada et al., 2001], в то время как у большинства других видов животных в предсердиях и желудочках превалирует 2-ая изоформа  $\text{IP}_3\text{-R}$  [Bare et al., 2005; Li et al., 2005]. Имеются доказательства, что плотность  $\text{IP}_3\text{-R}$  в предсердиях в 3,5-10 раз выше, чем в желудочках [Lipp et al., 2000; Domeier et al., 2008].

Наличие  $\text{IP}_3\text{-R}$  в сердечной ткани было показано при помощи методов *in situ* гибридизации и иммуногистохимии. Несмотря на то, что количество  $\text{IP}_3\text{-R}$  значительно ниже (в 50-100 раз), чем рианодиновых [Moschella, Marks, 1993], их значение в жизни кардиомиоцитов не стоит недооценивать. На клеточном уровне активированный  $\text{IP}_3$  рецептор участвует в модуляции электромеханического сопряжения посредством сенситизации рианодиновых рецепторов. В работах на предсердных и желудочковых кардиомиоцитах было показано, что активация  $\text{IP}_3\text{-R}$  вызывает положительный инотропный эффект. Это происходит благодаря опосредованному  $\text{IP}_3$  локальному выбросу  $\text{Ca}^{2+}$  в непосредственной близости от рианодиновых рецепторов, что облегчает кальций-зависимый выброс кальция. Также активация  $\text{IP}_3$ -рецепторов может быть важным звеном в развитии  $\text{Ca}^{2+}$ -опосредованной аритмии [Lipp et al., 2000; Zima, Blatter, 2004; Mackenzie et al., 2004; Domeier et al., 2008]. Кроме того, существуют данные, что повышение количества  $\text{IP}_3\text{-R}$  при гипертрофии сердца вызывает чрезмерное увеличение цитозольного уровня кальция, что также облегчает индукцию желудочковых аритмий. Повышенное количество  $\text{IP}_3\text{-R}$  наблюдалось не только у лабораторных животных (крыс и мышей), но и у людей, страдающих от подобных болезней сердца [Harzheim et al., 2009].

Наконец, именно этим рецепторам отводят ключевую роль в реализации взаимодействия «возбуждение-транскрипция» (excitation-transcription coupling - ETC) [Bootman et al., 2009]. Активация  $\text{IP}_3\text{-R}$ , расположенных непосредственно на ядерной оболочке, может приводить к локальному ядерному увеличению концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [Ibarra et al., 2013], и изменению активности различных факторов транскрипции и регуляции метаболических путей [Wu et al., 2006; Gómez et al., 2013].

#### 2.1.3.2.4 Фосфоинозитидный сигнальный путь: эффекты диацилглицерола

Основной функцией диацилглицерола, который образуется при гидролизе  $PIP_2$ , является активация протеинкиназы С. В кардиомиоцитах новорожденных крысят обнаружено шесть изоформ РКС -  $\alpha$ ,  $\beta_{1/2}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , и  $\zeta$  [Disatnik, Buraggi, Mochly-Rosen, 1994]. У взрослых животных в миокарде сохраняются только  $\delta$ ,  $\epsilon$  и  $\zeta$  изоформы, в то время как остальные изоформы РКС исчезают с возрастом [Pucéat et al., 1994; Rybin, Steinberg, 1994; Bogoyevitch, Parker, Sugden, 1993]. У человека в сердце были найдены  $\alpha$ ,  $\beta_{1/2}$ ,  $\delta$ , и  $\epsilon$  [Bowling et al., 1999]. Таким образом, на разных стадиях онтогенеза в сердце могут экспрессироваться изоформы РКС относящиеся к трем разным группам:

1. классическим РКС ( $\alpha$ ,  $\beta_{1/2}$ ) – активируемым DAG и фосфатидилсерином (ФС) и зависящим от  $Ca^{2+}$ ,
2. неклассическим ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ) – активируемым DAG и ФС, но не зависящим от  $Ca^{2+}$
3. атипичным РКС ( $\zeta$ ) - чувствительным только к ФС.

В регуляции работы РКС есть 2 ключевых момента: фосфорилирование фосфоинозитид-зависимой киназой-1 (PDK1) и активация посредством DAG. Нефосфорилированная РКС связана с мембраной и является незрелой, после фосфорилирования PDK1 (при запуске соответствующего каскада), происходит выход РКС в цитоплазму и аутофосфорилирование, что приводит к закрытию активного центра фермента псевдосубстратом. При связывании с DAG и ФС увеличивается сродство РКС к мембране и происходит изгнание псевдосубстрата, что в конечном итоге приводит к активации РКС и дальнейшей передаче сигнала [Dempsey et al., 2000].

Различные изоформы РКС имеют множество мишеней в миокарде. В первую очередь описано влияние РКС на целый спектр ионных токов в кардиомиоцитах. В ходе биохимических исследований *in vitro* было показано, что обе субъединицы канала  $Ca_L$ -тока  $\alpha_1C$  и  $\beta_2a$  могут служить субстратом для РКС [Puri et al., 1997]. Так, в экспериментах на желудочковых кардиомиоцитах крысы с использованием PMA (неселективного активатора РКС) была описана блокада  $Ca^{2+}$ -тока L-типа [Zhang et al., 1997; Hu, Mochly-Rosen, Boutjdir, 2000]. Однако другие исследования показывают, что активация РКС может как подавлять, так и активировать  $Ca_L$ -ток [Singer-Lahat et al., 1992; Bourinet et al., 1992]. Возможно, это связано с активацией различных изоформ РКС, присутствующих в сердце, и использование селективных агонистов поможет решить этот вопрос. Так, было показано, что селективная активация РКС $\epsilon$ , приводит к подавлению  $Ca_L$ -тока [Hu, Mochly-Rosen, Boutjdir, 2000]. Так же в исследованиях, проводимых

на трансгенных мышах с повышенной активностью РКС $\epsilon$ , было продемонстрировано уменьшение базальной амплитуды  $I_{CaL}$  в кардиомиоцитах [Yue, Herzig, Marban, 1990].

Каналы транзиторного  $Ca^{2+}$  тока, который наряду с другими функциями участвует в генерации автоматической активности пейсмекерных клеток, также подвержены влиянию РКС. В желудочковых кардиомиоцитах собаки активация РКС угнетает  $Ca_T$ -ток [Tseng, Boyden, 1991]. Непрямая активация РКС арахидоновой кислотой также оказывает ингибирующее действие [Zhang, Cribbs, Satin, 2000]. Механизм этого эффекта исследован пока слабо, до сих пор не известно, какие изоформы РКС участвуют в опосредовании данного феномена.

В регуляции работы  $Na^+$ -каналов в сердце, по всей видимости, задействованы РКС $\epsilon$  и РКС $\beta_{II}$ , что было показано в экспериментах с использованием селективных активаторов этих ферментов [Vijayaragavan, Boutjdir, Chahine, 2004]. Ингибирование  $Na^+$ -тока происходит и при использовании РМА [Murray et al., 1997].

Ключевым регулятором работы каналов тока  $I_{Ks}$  также считается РКС. В миоцитах мышей и крыс в ответ на активацию протеинкиназы С происходит снижение  $I_{Ks}$  [Honore et al., 1991], а у морских свинок этот ток наоборот увеличивается [Varnum et al., 1993]. Другие калиевые токи, присутствующие в кардиомиоцитах, также подвержены влиянию РКС [Nakamura et al., 1997; Barros et al., 1998]. Однако стоит отметить, что воздействие на  $K^+$ -токи является видоспецифичным и отличается между разными отделами сердца.

РКС имеет множество мишеней в клетке, помимо ионных каналов. РКС-фосфорилирование коннексинов  $Sx43$  может приводить как к увеличению [Kwak, Jongsma, 1996], так и к снижению проводимости щелевых контактов [Münster, Weingart, 1993; Doble, Ping, Kardami, 2000]. Работа  $Na/Ca$ -обменника становится интенсивней при фосфорилировании протеинкиназой [Iwamoto et al., 1996]. РКС $\alpha$  и РКС $\zeta$  могут непосредственно активировать аденилатциклазу 5го типа (основная изоформа в сердце) и увеличивать ее каталитическую активность в 20 раз [Kawabe et al., 1994]. Кроме того, протеинкиназа С может воздействовать на киназу  $\beta$ -адренорецепторов [Winstel et al., 1996], мускариновые рецепторы [Haga, Haga, Ichiyama, 1990], транскрипционные факторы и гены [Malhotra et al., 2001] и многие другие мишени.

Изменение соотношения различных изоформ РКС в сердце связывают с развитием патологических ситуаций в сердце. Имеются сведения, что  $Ca^{2+}$ -зависимые изоформы РКС ( $\beta_1$  и  $\beta_2$ ) могут участвовать в механизмах, задействованных в развитии сердечной недостаточности [Bowling et al., 1999]. Увеличение активности РКС $\epsilon$  и РКС $\delta$  связано с развитием ишемии

[Strasser et al., 1999; Dorn et al., 1999], а РКСа - с развитием гипертрофии сердца [Braz et al., 2002]. Рост концентрации РКС $\beta$ 2 и DAG также может приводить к развитию сердечно-сосудистых патологий при диабете [Inoguchi et al., 1992]. Поэтому многие изоформы РКС на данный момент являются перспективными мишенями для разработки новых лекарственных препаратов от ишемической болезни сердца [Inagaki, Churchill, Mochly-Rosen, 2006], гипертрофии, сердечной недостаточности [Ferreira, Brum, Mochly-Rosen, 2011] и других болезней.

Однако стоит отметить, что все исследования, описанные выше, проводились с использованием либо прямых активаторов РКС разной селективности, либо через стимуляцию рецепторов связанных с G-белками. Поэтому до сих пор остается открытым вопрос о том, на какую из изоформ влияет активация именно М3-рецепторов, и какие конкретно эффекты в кардиомиоцитах это вызывает.

#### 2.1.3.2.5 Калиевый ток $I_{KM3}$

Как уже говорилось ранее, группой китайских физиологов впервые был открыт и описан особый калиевый ток, который активируется при действии мускариновых агонистов на М3-рецепторы. При действии пилокарпина (0,1-10 мкМ) и холина (0,1-10 мМ) на миокард собаки и морской свинки происходило замедление синусового ритма, уменьшение длительности ПД и гиперполяризация кардиомиоцитов [Shi et al., 1999; Wang et al., 1999]. Все эти эффекты снимались при применении селективных блокаторов М3-рецепторов - 4-DAMP (2–10 нМ), р-F-NHSiD (20–200 нМ) и дарифенацином (20 нМ). В пэтч-кламп экспериментах на предсердных кардиомиоцитах морской свинки и собаки как пилокарпин, так и холин в приведенных выше концентрациях индуцировали выходящий ток калиевой природы, вольт-амперная характеристика которого принципиально отлична от характерной для токов входящего выпрямления, но сходна с вольт-амперной зависимостью токов задержанного выпрямления:  $I_{Kt}$  (хвостовой),  $I_{Ks}$  и  $I_{Kur}$  (рис. 5).

На предсердных кардиомиоцитах собаки было проведено более подробное исследование по изучению внутриклеточного каскада, который приводит к активации  $I_{KM3}$ . Оказалось, что изменения функционирования фосфоинозитидного пути сигнализации (ингибирование PLC, РКС, изменение внутриклеточного уровня DAG и  $IP_3$ ) в кардиомиоцитах никак не влияют на  $I_{KM3}$ . С другой стороны, перфузия кардиомиоцитов пипеточным раствором, содержащим антитела к  $\alpha$ -субъединице  $G_q$ -белка (как к N-, так и к C-концевому участку), либо антитела к  $\beta$ -субъединице  $G_q$ -белка, приводила к выраженному подавлению  $I_{KM3}$ . Такой же эффект наблюдался при перфузии раствором, содержащим вместо ГТФ неактивный комплекс  $\beta\gamma$ -ГДФ.

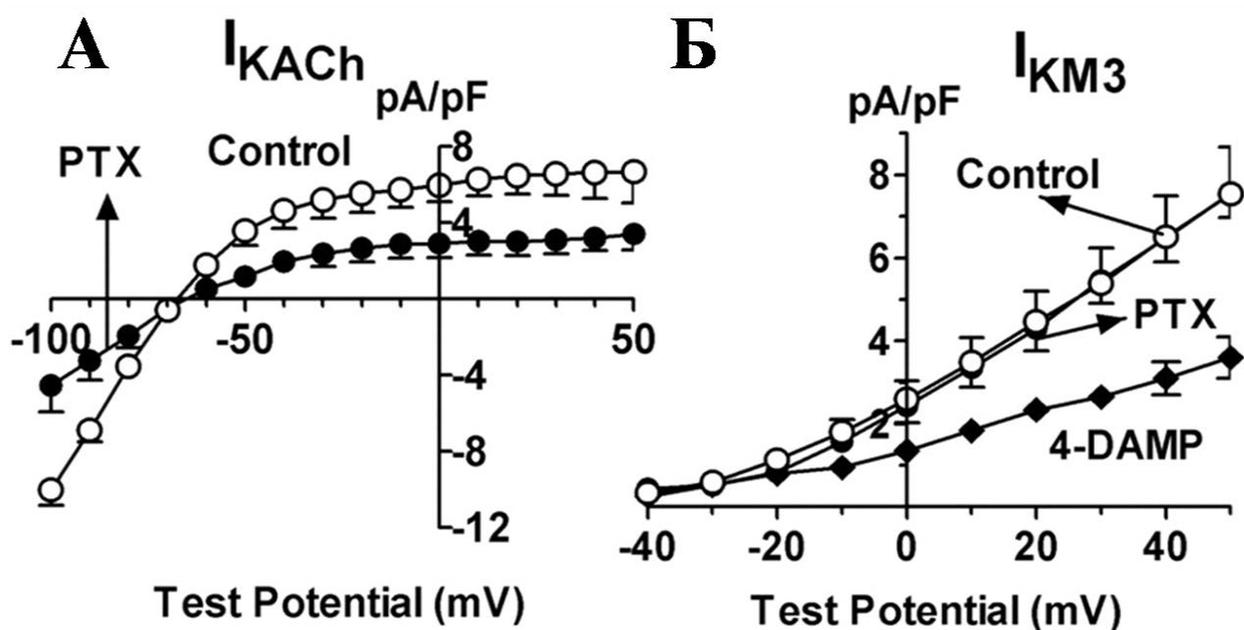


Рисунок 5. Сравнение вольт-амперных кривых калиевого ацетилхолинзависимого тока входящего выпрямления и калиевого МЗ-зависимого тока  $I_{KM3}$  в контроле и после инкубации с коклюшным токсином (PTX – подавляет  $I_{KACh}$ , но не  $I_{KM3}$ ), а также на фоне блокатора МЗ-рецепторов 4-DAMP (10 нМ). По Shi et al., 2004b.

Таким образом, для индукции  $I_{KM3}$  критически необходима активация  $G_q$ -белков, однако фосфоинозитидный каскад внутриклеточной сигнализации не участвует в активации каналов этого тока. По-видимому, каналы напрямую взаимодействуют как с  $\alpha$ , так и с  $\beta\gamma$ -субъединицей  $G_q$ -белка, в результате чего они переходят в состояние готовности к потенциалзависимой активации.

Физиологическое значение  $I_{KM3}$  вытекает из его вольт-амперной характеристики. Очевидно, что поскольку существенных значений ток достигает лишь при деполяризации позитивнее -30 мВ, основной эффект, развивающийся при его индукции, будет представлять уменьшение длительности ПД на уровне 50% реполяризации и выше, в то время как активация  $I_{KACh}$  приводит как к общему укорочению ПД, так и к поддержанию потенциала покоя в рабочих кардиомиоцитах и гиперполяризации пейсмекерных клеток. С другой стороны, уменьшение ДПД, вызванное  $I_{KM3}$ , может опосредованно приводить к снижению поступления ионов  $Ca^{2+}$  в клетку, и тем самым снижать сократительную активность [Wang, Shi, Wang, 2004].

Итак, активация МЗ-рецепторов в клетке имеет несколько последствий: во-первых, индуцируется особый ток  $I_{KM3}$ , а во-вторых, активируется фосфоинозитидный каскад

внутриклеточной сигнализации через PLC. Инозитолтрифосфат, образующийся при этом, вызывает выброс кальция из саркоплазматического ретикулюма, и таким образом обуславливает положительный инотропный эффект. Однако, этому эффекту противодействует подавление сократительной активности, обусловленное активацией  $I_{KMs}$  и уменьшением длительности ПД. По всей видимости результирующий эффект зависит от соотношения описанных сигнальных путей в миокарде. Диацилглицерол активирует PKC, которая имеет множество мишеней в клетке и, в том числе, может влиять на ионные токи в кардиомиоцитах.

## **2.2. Особенности холинергической стимуляции при возникновении патологических ситуаций в сердце**

В последнее время появилось множество данных, говорящих в пользу того, что парасимпатическая система играет важную кардиопротекторную роль в сердце. Так, например, сердце кошки, после воздействия атропина, снимающего все холинергические воздействия, становится более подвержено возникновению фибрилляций в экспериментах с окклюзией коронарных артерий [Rosenshtraukh et al., 1994]. Поскольку сердечно-сосудистые заболевания на данный момент являются причиной большинства смертей в мире [Adabag et al., 2010; Deo, Albert, 2012], эти данные вызвали интерес к перспективам использования холинергических регуляторных механизмов в клинической практике. В частности, были предложены способы применения защитных эффектов АЦХ в терапии хронических ишемических состояний [Castro et al, 2004; Zimerman et al, 2010]. А вместе с тем, механизмы защитных эффектов АЦХ изучены в настоящее время явно не полностью.

Особую роль в реализации кардиопротекторных эффектов отводят М3-рецепторам. Как было показано, они могут не только участвовать в регуляции ЧСС и модулировать инотропию, но и оказывать цитопротекторное действие во время ишемических повреждений, регулировать межклеточные взаимодействия, а с другой стороны участвуют в патогенезе фибрилляции предсердий [Wang, Lu, Wang, 2007]. Схема реализации кардиопротекторных механизмов, опосредованных М3-рецепторами, представлена на рисунке 6.

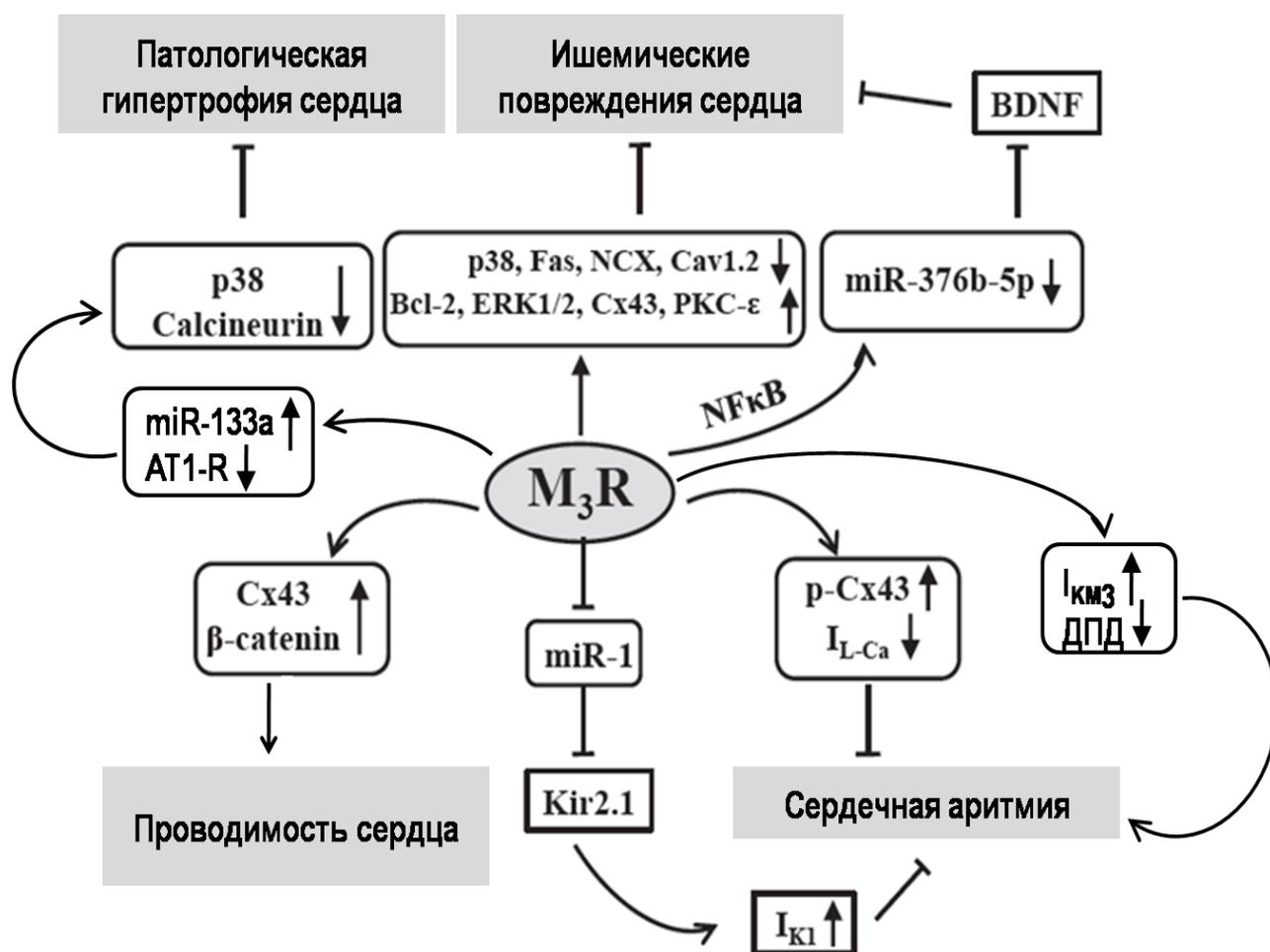


Рисунок 6. Участие M<sub>3</sub>-рецепторов в коррекции патологических ситуаций в сердце. На данный момент показана роль M<sub>3</sub>-рецепторов в таких заболеваниях сердца как ишемия, патологическая гипертрофия, аритмии. Cx43 – коннексин 43, NCX – натрий-кальциевый обменник, PKCε – протеинкиназа C-ε, BDNF – нейротрофический фактор мозга, NFκB – транскрипционный фактор NFκB, I<sub>KM3</sub> – калиевый ток, активируемый M<sub>3</sub>-рецепторами, ДПД – длительность потенциала действия. По [Hang et al., 2013] с изменениями и дополнениями.

### 2.2.1. Ишемическое повреждение миокарда и M<sub>3</sub>-рецепторы

Ишемия миокарда возникает при ограничении кровотока к тканям сердца, что может привести к серьезным последствиям. Возникает дисбаланс между метаболическими потребностями сердечной мышцы и коронарным кровотоком, что в первую очередь приводит к развитию воспаления и апоптоза кардиомиоцитов.

### 2.2.1.1. Цитопротекторные эффекты стимуляции МЗ-рецепторов

Работы китайских исследователей показали, что активация МЗ-рецепторов защищает кардиомиоциты от апоптоза, вызванного применением  $H_2O_2$ , а использование 4-DAMP полностью снимает эти эффекты. Аналогичные эффекты наблюдались при остром инфаркте у крыс, вызванном окклюзией коронарных артерий [Liu et al., 2004a; Liu et al., 2004b]. Дальнейшие исследования показали, что стимуляция МЗ-рецепторов посредством холина в условиях ишемии и оксидативного стресса вызывает уменьшение повреждения миокарда благодаря коррекции гемодинамических нарушений, предотвращению желудочковых аритмий и защиту кардиомиоцитов от апоптоза [Yang et al., 2005].

Существует несколько механизмов реализации кардиопротекторных эффектов в сердце. Активация МЗ-рецепторов на клеточном уровне повышает количество анти-апоптотических регуляторных молекул, таких как Bcl-2 и ERK (extracellular signal-regulated kinase), повышает уровень супероксиддисмутазы (SOD), которая является мощным антиоксидантом. Кроме того, стимуляция МЗ-рецепторов снижает плотность рецепторов смерти Fas на мембранах кардиомиоцитов, а также белка p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), который является проапоптотическим агентом [Liu et al., 2004b; Yang et al., 2005]. Наконец, МЗ-рецепторы тормозят развитие кальциевой перегрузки при возникновении патологических ситуаций. Это происходит за счет уменьшения экспрессии кальциевых каналов L-типа и Na/Ca обменника в кардиомиоцитах [Wang et al., 2012a]. Такое снижение внутриклеточного  $Ca^{2+}$  способствует восстановлению гемодинамических функций при ишемических повреждениях сердца, снижая риск повреждения клеток [Joseph et al., 2004; Liu et al., 2004b; Yang et al., 2005].

Другим возможным путем реализации цитокардиопротекторных свойств активации МЗ-рецепторов является внутриклеточная регуляция посредством микроРНК (miRNA). Исследования последних нескольких лет показывают, что микроРНК контролируют множество процессов в сердце от развития миокарда в ходе эмбриогенеза до возникновения различных патологических ситуаций, таких как сердечная недостаточность и гипертрофия [Thum, Catalucci, Bauersachs, 2008; Zhang, 2008; Wang, 2010; Ono, Kuwabara, Han, 2011]. При возникновении ишемических повреждений сердца происходит увеличение количества определенного вида РНК - miR-376b-5p. Она вызывает повреждение миокарда видимо за счет прямого ингибирования BDNF (brain derived neurotrophic factor – нейротрофический фактор мозга). При этом miR-376b-5p может быть подавлена при активации транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B), которая происходит при стимуляции МЗ-рецепторов [Pan et al., 2012].

### 2.2.1.2 Влияние активации МЗ-рецепторов на межклеточное взаимодействие

В желудочковом миокарде крысы была обнаружена физическая и функциональная связь между МЗ-рецепторами и коннексином 43 [Yue et al., 2006; Zhang et al., 2006]. Иммуногистохимическое окрашивание кардиомиоцитов показало колокализацию Cx43 и МЗ-рецепторов в зоне вставочных дисков. Также методом Western blotting установлено, что около 23% коннексина 43 (от общего количества Cx43) связано с МЗ-рецепторами. При ишемии миокарда происходит увеличение экспрессии МЗ-рецепторов. В то же самое время при ишемии происходит уменьшение экспрессии Cx43, что соответственно ведет к снижению количества щелевых контактов, и ухудшению проводимости в сердце. Кроме того снижается количество Cx43 связанного с МЗ-рецепторами. Аппликация холина за 15 мин до моделирования ишемической атаки частично восстанавливает количество коннексина 43, и положительно влияет на восстановление ассоциации Cx43 и МЗ-рецепторов [Yue et al., 2006]. Более поздние работы также указывают на эту ассоциацию. При ишемии миокарда происходит резкое увеличение дефосфорилированных форм Cx43, что приводит к разобщению электрической проводимости кардиомиоцитов. Предварительная аппликация холина (или холина с метоктрамином) сохраняет уровень фосфорилирования щелевых контактов и позволяет им эффективнее работать. Тот факт, что этот эффект снимается 4-DAMP, а не метоктрамином, позволяет утверждать, что поддержании эффективной работы щелевых контактов участвуют мускариновые рецепторы третьего типа [Zhao et al., 2010].

Другой белок, участвующий в межклеточной адгезии,  $\beta$ -катенин, также оказался чрезвычайно важным при ишемическом повреждении сердца. В работе Hahn и соавторов был осуществлен аденовирус-опосредованный перенос конститутивно-активного гена  $\beta$ -катенина в кардиомиоциты. Данный прием позволил увеличить экспрессию  $\beta$ -катенина в клетках. Оказалось, что введение конститутивно-активного гена  $\beta$ -катенина приводит к снижению уровня апоптоза. В модели ишемии миокарда у крыс локальное увеличение экспрессии  $\beta$ -катенина в зоне, пограничной с областью инфаркта, приводило к значительному снижению ишемического повреждения и размеров инфаркта [Hahn et al., 2006]. Кроме того оказалось, что  $\beta$ -катенин физически ассоциирован с МЗ-рецепторами. Эта связь была найдена между  $\beta$ -катенином и МЗ-рецепторами в зонах вставочных дисков при помощи исследований на конфокальном микроскопе [Wang et al., 2009]. При этом, предварительное введение животному холина до начала окклюзии коронарной артерии приводило не только к повышению экспрессии  $\beta$ -катенина, но и усиливало взаимосвязь между МЗ-рецепторов и белком межклеточной адгезии.

### 2.2.1.3 Ассоциация между РКС $\epsilon$ и МЗ-рецепторами

В модели ишемического повреждения миокарда было обнаружено специфическое взаимодействие между РКС $\epsilon$  и МЗ-рецепторами в желудочковых кардиомиоцитах крысы. При развитии ишемии происходит транслокация РКС из цитозоля к мембране, что, по всей видимости, способствует фосфорилированию этим ферментом МЗ-рецепторов. Этот эффект может быть заблокирован применением ингибитора РКС хелеритрина. В то же самое время и МЗ-рецепторы также влияют на РКС $\epsilon$  и увеличивают ее экспрессию при ишемии. Введение холина перед проведением экспериментальной окклюзии коронаров приводит к увеличению экспрессии как РКС $\epsilon$ , так и МЗ-рецепторов, а применение 4-DAMP блокирует этот эффект. Таким образом, была показана взаимообратная связь между протеинкиназой С и мускариновыми рецепторами, однако до сих пор до конца не ясна физиологическая роль подобной ассоциации [Hang et al., 2009].

### 2.2.2 Патологическая гипертрофия сердца и МЗ-рецепторы

Патологическая гипертрофия миокарда характеризуется увеличением массы сердца, а также развитием фиброза, сердечной дисфункции и гибелью кардиомиоцитов. Гипертрофия может развиваться как компенсаторный механизм в ответ на другие патологии (например, при ишемии или гипертензии) [Bernardo et al., 2010]. При развитии патологической гипертрофии сердца происходит увеличение экспрессии некоторых маркеров данного состояния, таких как предсердный натрийуретический пептид (atrial natriuretic peptide – ANP), тяжелая цепь  $\beta$ -миозина ( $\beta$ -myosin heavy chain -  $\beta$ -МНС), мозговой натрийуретический пептид (brain natriuretic peptide - BNP) и кальцинейрин, ключевая сигнальная молекула гипертрофии миокарда.

Исследования последних нескольких лет позволили доказать, что активация МЗ-рецепторов может облегчить тяжесть гипертрофических изменений в сердце. Так, в модели ангиотензин II-индуцированной гипертрофии предварительная аппликация холина снимала патологическое увеличение размеров клеток как в опытах *in vitro*, так и в естественных условиях. Происходило снижение уровня ANP,  $\beta$ -МНС, а также активных форм кислорода (АФК) и внутриклеточной концентрации кальция. Кроме того, холин ингибировал индуцированное АФК повышение экспрессии проапоптотического белка p38-МАРК, а также  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное увеличение синтеза кальцинейрина [Wang et al., 2012b]. Данные, полученные на мышах, показали, что холин способен улучшать физическое состояние гипертрофированной сердечной мышцы (происходит уменьшение веса сердца, уменьшение веса и толщины левого желудочка), а также снижать уровень биомаркеров гипертрофии. Кроме того, был показан возможный механизм снижения уровня кальцинейрина в кардиомиоцитах посредством увеличения синтеза miR-133a. Все эти эффекты снимались применением 4-DAMP

[Zhao et al., 2013]. Результаты экспериментов с использованием трансгенных мышей и линий клеток H9c2 с повышенной экспрессией М3-рецепторов ясно указывают на анти-гипертрофические свойства именно этого типа мускариновых рецепторов. Оверэкспрессия М3-рецепторов помимо эффектов, описанных выше, приводила к подавлению экспрессии рецептора ангиотензина II 1ого типа (АТ1) и как следствие ингибированию МАРК каскада внутриклеточной сигнализации, опосредующего гипертрофию [Liu et al., 2013].

Все эти данные указывают на возможность рассмотрения М3-рецепторов в качестве потенциальной терапевтической мишени при патологической гипертрофии миокарда.

## **2.2.3 Аритмия и мускариновые рецепторы**

### **2.2.3.1 Участие М-рецепторов в генезе фибрилляции предсердий**

Одним из наиболее распространенных видов аритмий является фибрилляция предсердий [Wyndham, 2000]. Как показывают результаты исследований, вклад в развитие и поддержание этого патологического состояния вносят несколько типов мускариновых рецепторов. Так в 2002 году была показана особая роль М1- и М3-рецепторов и тока  $I_{KAch}$ . Добреев и соавторы показали, что уровень  $I_{KAch}$  повышен у больных с фибрилляцией предсердий (ФП). При этом применение 10 нМ 4-DAMP уменьшает амплитуду этого тока у больных значительно сильнее (примерно на 62%), чем у здоровых людей (примерно на 30%). При этом авторы выдвинули предположение о том, что у больных с ФП взаимосвязь между М1-, М3-рецепторами и  $I_{KAch}$  выражена значительно сильнее, чем у здоровых людей [Dobreev et al., 2002]. Также работа Kovoog и коллег показала невозможность индукции аритмии предсердий у мышей нокаутных по гену GIRK каналов, в то время как у животных дикого типа в присутствии карбамилхолина на фоне высокочастотного навязанного ритма развивалась ФП. При этом желудочковая тахикардия не развивалась ни у одного из типов мышей [Kovoog et al., 2001].

Кроме того, по данным работы, проведенной на собаках с предсердной тахикардией и фибрилляцией предсердий, индуцированной навязыванием в течение 7-ми дней высокого ритма (400 ударов в минуту), показано изменение плотности калиевых токов и мускариновых рецепторов связанных с ними. Так, плотность токов  $I_{KAch}$  и  $I_{KM3}$  в кардиомиоцитах больных животных была снижена, и уровни экспрессии мембранных белков, соответствующих М2- и М3-рецепторам снижались по сравнению с контролем (примерно на 50%). При этом чувствительность токов к использованию характерных агонистов не изменялась [Yeh et al., 2007]. В другом исследовании, проведенном также на собаках, но с ФП, вызванной сердечной недостаточностью, были получены противоположные результаты, указывающие на особую роль М3-рецепторов и  $I_{KM3}$  в генезе и поддержании этого патологического состояния [Shi et al., 2004a]. Так, активация М3-рецепторов приводит к возникновению тока  $I_{KM3}$ , что в свою очередь вызывает укорочение длительности ПД и эффективного рефрактерного периода. Все это может

приводить к возникновению ранних постдеполяризационных ПД и нарушению ритма [Shi et al., 1999]. Также использование вещества матрина (растительного алкалоида, выделенного из растений рода *Sofora*) снижает частоту и длительность фибрилляции предсердий. Применение матрина приводит к снижению плотности МЗ-рецепторов и тока  $I_{KM3}$ , в то время как плотность  $Ca^{2+}$ -тока L-типа повышалась на 40%, как и количество каналов  $\alpha 1C/Cav1.2$ , что указывает на связь между снижением плотности МЗ-рецепторов и уменьшением ФП [Zhou et al., 2011]. Применение селективных блокаторов МЗ-рецепторов является важным направлением в лечение этого сердечного заболевания [Tuomi, Chidiac, Jones, 2010; Jones, Tuomi, Chidiac, 2012].

### 2.2.3.2 Кардиопротекторная роль МЗ-рецепторов при фибрилляции желудочков

С другой стороны в литературе встречаются данные, указывающие на кардиопротекторную роль МЗ-рецепторов при фибрилляции желудочков (ФЖ). Селективная активация МЗ-рецепторов приводит к значительному снижению аритмий, вызванных ишемией миокарда, длительности желудочковых тахикардий и общего количества экстрасистол. Это может быть связано со способностью МЗ-рецепторов предотвращать фосфорилирование  $Sx43$  и тем самым положительно влиять на проводимость сердечной ткани и снижать аритмогенность ишемии [Zhao et al., 2010].

При хронической аконитин/ $BaCl_2$ -индуцированной аритмии показано увеличение МЗ-рецепторов в мембранах кардиомиоцитов крыс, выделенных из больных животных [Liu et al., 2009]. Применение холина и пилокарпина оказывает антиаритмогенное действие на сердца крыс и морских свинок с аритмией, вызванной оубаином или аконитином. Блокада МЗ-рецепторов введением 4-DAMP ингибирует эти противоаритмические эффекты. Предполагается, что в данном случае эффект МЗ-рецепторов реализуется через снижение уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , и уменьшение плотности  $Ca^{2+}$ -тока L-типа [Liu et al., 2008]. Недавние результаты работ подтвердили предположение о связи уровня внутриклеточного  $Ca^{2+a}$  и МЗ-рецепторов. Было показано, что холин может оказывать заметный защитный эффект против аритмии, индуцированной ишемией миокарда, благодаря активации МЗ-рецепторов, приводящей к последующему снижению плотности тока  $I_{CaL}$  и натрий-кальциевого обменника NCX [Wang et al., 2012a].

Итак, мускариновые рецепторы (и особенно 3-го типа) играют особую роль при различных видах аритмий и фибрилляций. Однако эта роль может кардинально различаться в ткани предсердий и желудочков.

#### **2.2.4 Сердечная недостаточность и М3-рецепторы**

Терминальной стадией многих патологических состояний, таких как ишемия, гипертрофия, аритмия и фиброз может стать сердечная недостаточность, представленная в острой или хронической форме.

Было показано, что у животных во время развития сердечной недостаточности изменяется соотношение разных мускариновых рецепторов в сердце, а также связанных с ними калиевых токов. В экспериментах на собаках сердечную недостаточность моделировали хроническим навязыванием высокого ритма. Затем при помощи методики Western blotting и пэтч-кламп в конфигурации whole-cell определяли плотность рецепторных белков М2, М3 и М4, а также токов  $I_{KAch}$ ,  $I_{KM3}$  и  $I_{K4AP}$  в кардиомиоцитах этих животных. У собак с застойной сердечной недостаточностью наблюдалось повышение экспрессии М3-рецепторных белков в 2,3 раза по сравнению с контролем и на 50% увеличивается плотность калиевого тока, активируемого М3-рецепторами. В то же время в отношении М2-, М4-рецепторов и токов  $I_{KAch}$  и  $I_{K4AP}$  наблюдалась обратная ситуация - количество рецепторов и амплитуда тока была снижена [Shi et al., 2004a]. Также был описан клинический случай, когда применение мускаринового антагониста тиотропиума привело к улучшению признаков застойной сердечной недостаточности, таких как показания диастолического давления левого желудочка и уровня мозгового натрийуретического пептида [Kato, Komamura, Kitakaze, 2006].

Таким образом, в ходе многочисленных исследований было показано, что мускариновые рецепторы играют важную роль в развитии различных патологических ситуаций в сердце. Особое место в этом вопросе отводится М3-рецепторам, участие которых в этих процессах неоспоримо. Однако в зависимости от генеза заболевания активация М3-рецепторы могут как выполнять кардиопротекторную функцию, так и наоборот ухудшать течение болезни. Поэтому на данный момент М3-рецепторы являются стратегически важной фармакологической мишенью для решения различных проблем кардиогенного характера.

#### **2.3 Развитие холинергической регуляции в ходе онтогенеза**

В ходе онтогенеза холинергическая система сердца претерпевает значительные изменения. Однако, в отличие от симпатических, парасимпатические ганглии, к которым относится большая часть внутрисердечных нервных узлов, всегда были более сложными для изучения в силу меньшего размера, диффузности распределения и локализации в органах-мишенях. По этим же причинам долго оставались неясными особенности эмбриологического и

постнатального развития интрамуральных сердечных ганглиев и парасимпатической иннервации в целом.

Иннервация сердца в своем развитии проходит четыре этапа: миграция клеток нейронального гребня (neural crest cell - NCC) в область аорты, дифференциация NCC в нейроны, агрегация/миграция нейронов с образованием паравертебральной нервной цепочки, либо парасимпатических сердечных ганглиев, и, наконец, окончательное созревание нейронов и образование аксонов [Hasan, 2013]. Клетки нейронального гребня, которым суждено стать в последствии парасимпатической системой сердца, начинают отделяться от нервного гребешка на уровне заднего (ромбовидного) мозга, это происходит примерно на 9-ый день эмбрионального развития. Первые клетки в дорзальном миокарде мыши можно обнаружить уже на 10-ый день после оплодотворения.

Миграция клеток происходит в два этапа. Сначала клетки мигрируют в область артериального полюса, и в последствие развиваются в ножки пучка Гиса. Вторая волна миграции происходит примерно через сутки в область венозного полюса. Эти клетки дают начало проводящей системе синоатриального и атриовентрикулярного узлов, а также парасимпатическим ганглиям. Клетки холинергической системы проникают в сердце совместно с развивающимся вагусом [Chan et al., 2004; Poelmann et al., 2004; Hildreth et al., 2008]. Далее происходит дифференциация плюрипотентных нервных клеток в нейроны парасимпатических ганглиев. Запуск каскада дифференцировки клеток индуцируется факторами роста BMP (bone morphogenetic protein) [Müller, Rohrer, 2002].

На 10-ый день эмбрионального развития мыши в сердце обнаруживаются функциональные мускариновые рецепторы 2-го типа. Это было подтверждено иммуногистохимическими и фармакологическими методами. В экспериментах с использованием синтетического холиномиметика карбамилхолина наблюдалось снижение частоты сердечных сокращений [Chen, Klitzner, Weiss, 2006]. На 12-ый день эмбрионального развития преганглионарные эфферентные волокна блуждающего нерва и нейроны сердечных ганглиев окрашивались антителами к везикулярному транспортеру АЦХ (vesicular ACh transporter (VAChT), что указывает на их холинергический фенотип [Hildreth et al., 2008]. Однако полноценно работать клетки парасимпатических ганглиев начинают лишь незадолго до рождения. В работе Уильяма Марвина показано, что функциональная активность холинацетилтрансферазы достигается только на 19ый день внутриутробного развития (за 2 дня до рождения). После рождения активность ХАТ продолжает расти до 21-ого дня (далее исследование не проводилось) и оказывается неизменно выше в предсердиях, чем в желудочках [Marvin et al., 1980].

Эксперименты, проведенные на мышах, также показывают, что в течение первых трех недель постнатального развития происходят серьезные изменения в парасимпатических ганглиях, глиальных клетках и холинергических нервах. За это время происходит увеличение вдвое поперечного сечения холинергических ганглиев, продолжается рост нервных волокон в миокарде и увеличивается количество шванновских клеток. Также было обнаружено, что холинергическая иннервация пучка Гиса и АВУ развивается раньше по сравнению с синоатриальным узлом и другими структурами. Таким образом, оказывается, что регуляция атриовентрикулярной проводимости может развиваться до установления парасимпатической регуляции частоты сердечных сокращений [Fregoso, Hoover, 2012]. Авторы высказали предположение, что это может быть важно для нормального эмбрионального развития, поскольку уже на 10-ый день эмбрионального развития обнаруживаются функциональные адренорецепторы, при стимуляции которых изопротеренолом (синтетическим катехоламином) наблюдаются классические позитивные инотропные и дромотропные эффекты [Chen, Klitzner, Weiss, 2006]. Циркулирующие катехоламины способны активировать эти рецепторы при ишемии во время беременности. При этом парасимпатическая регуляция проводимости АВУ может быть очень важна для предотвращения чрезмерной частоты сокращений желудочков [Fregoso, Hoover, 2012].

Постнатальное развитие иннервации САУ у мышей происходит между 4-ым и 8-ым днем после рождения. При помощи иммуногистохимического окрашивания на везикулярный транспортер АЦХ было показано, что в этот период в области САУ увеличивается количество VAcHT-позитивных волокон [Fregoso, Hoover, 2012]. Также японский исследователь Sato в своей работе показал развитие переходной брадикардии в этом возрасте, что возможно связано с созреванием парасимпатических ганглиев и нервов [Sato, 2008]. При исследовании крысят первого месяца жизни также было выяснено, что созревание парасимпатических ганглиев и их иннервация происходит в течение 21-ого дня после рождения. Постепенно большинство ганглиев приобретают холинергический фенотип и начинают продуцировать разнообразные нейротрансмиттеры, характерные для внутрисердечного сплетения взрослого животного [Horackova, Slavikova, Vuczko, 2000]. Однако исследования, проведенные на человеке, показывают, что созревание интракардиальных ганглиев происходит во время беременности, и на момент рождения сердце имеет достаточно развитое интракардиальное нервное сплетение и полноценную автономную иннервацию [Chow et al., 1995; Saburkina, Pauziene, Pauza, 2009].

В процессе дальнейшей жизни общее количество ганглиев у крыс увеличивается [Batulevicius, Pauziene, Pauza, 2003]. С другой стороны в литературе встречаются данные указывающие на прижизненную дегенерацию интракардиальных ганглиев [Akamatsu, De-Souza, Liberti, 1999]. Такое противоречие может быть связано с различием в методике приготовления

препаратов. Кроме того, с возрастом растет количество жировой ткани в сердце, а как говорилось выше, именно в нее погружены ганглии ВПСп. Поэтому применяя технику whole-mount [Akamatsu, De-Souza, Liberti, 1999] достаточно сложно оценить количество нервных узлов, в то время как использование гистологических срезов позволяет точнее определить их наличие [Batulevicius, Pauziene, Pauza, 2003]. У других животных увеличения числа ганглиев с возрастом не наблюдается – у морских свинок количество ганглиев остается на прежнем уровне [Batulevicius, Pauziene, Pauza, 2005], у собак и людей - уменьшается [Pauza et al., 2000; Pauza, Skripka, Pauziene, 2002].

Если общее развитие холинергической системы сердца более или менее изучено, то данных о роли разных типов мускариновых рецепторов на разных стадиях онтогенеза в литературе практически не встречается. Однако в работах научной группы из Казани под руководством профессора Зефирова было показано, что блокада М3-рецепторов в ходе развития крысы (эксперименты проводились на крысятах в возрасте 1, 3, 6, 8 и 20 недель) приводит к разным физиологическим ответам. Так в возрасте 7-ми дней при ингибировании М3-рецепторов происходит увеличение R-R интервала, то есть снижение ЧСС. В 3,6 и 8 недель изменения R-R интервала при введении антагониста М3-рецепторов не значительны. В 20-ать недель, то есть у взрослого животного, блокада М3-рецепторов вызывает учащение сердцебиений и снижение артериального давления [Зефилов и др., 2007]. Затем в экспериментах на 7-дневных крысятах этой же группой исследователей было показано, что внутривенное введение блокатора М2-рецепторов галламина не вызывает существенного эффекта, в то время как использование пирензипина и 4-DAMP вызывает урежение сердечной сердцебиений. [Зиятдинова и др., 2012]. Таким образом, даже немногие имеющиеся исследования в этой области указывают на существенные изменения рецепторного механизма реализации холинергических влияний на миокард в ходе онтогенеза.

### **3. Методика**

Для всестороннего изучения функциональной активности, распределения в сердце, и исследования роли мускариновых рецепторов 3-го типа на разных стадиях онтогенеза использовалось несколько различных методик. Для определения наличия и локализации М2- и М3-холинорецепторов в различных отделах сердца использовали иммуногистохимическое окрашивание препаратов миокарда с последующим анализом на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе. При изучении сигнальных механизмов и исследовании влияния избирательной стимуляции М3-рецепторов на электрическую активность изолированных препаратов миокарда на разных стадиях онтогенеза использовали стандартный метод внутриклеточной регистрации электрической активности с помощью стеклянных микроэлектродов. И наконец, для оценки экспрессии генов мускариновых рецепторов в различных отделах сердца и на разных стадиях онтогенеза нами был выбран метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР).

Электрофизиологические эксперименты проходили на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Иммуногистохимическое исследование проводилось на базе Казанского института биохимии и биофизики РАН (Лаборатория биофизики синаптических процессов). Молекулярно-биологические исследования осуществлялись в Институте Биологии Гена.

#### **3.1. Объекты исследования**

В работе было использовано 117 самцов белых беспородных мышей (электрофизиологические эксперименты –  $n=80$ , иммуногистохимия –  $n=22$ , молекулярно-биологические исследования -  $n=15$ ) весом 18 - 21 грамм. Мыши были выбраны в качестве объекта исследования из-за относительно легкой доступности синоатриального узла для электрофизиологического и иммуногистохимического исследования, поскольку САУ мыши не скрыт слоями рабочего миокарда или соединительной ткани. Кроме того, топографическое расположение САУ мыши позволяет его отделить от тканей предсердия для последующей постановки РВ-ПЦР.

Эксперименты по изучению внутриклеточного каскада сигнализации, опосредованного активацией М3-рецепторов, и определению роли мускариновых рецепторов в онтогенезе проводились на крысах линии Вистар. Всего в работе было использовано 160 животных. Эксперименты проводили на взрослых крысах (электрофизиологические эксперименты – 94, молекулярно-биологические – 10, пэтч-кламп - 4), новорожденных (электрофизиологические

эксперименты – 12, молекулярно-биологические – 14) и трехнедельных крысах (электрофизиологические эксперименты – 12, молекулярно-биологические – 14). Выбор крыс для данных исследований был продиктован удобством проведения электрофизиологических экспериментов.

### **3.2. Препаровка**

Выделение сердца и дальнейшая препаровка на двух видах животных делалась сходным образом. Животных декапитировали с помощью гильотины или ножниц, после чего немедленно вскрывали грудную клетку. Сердце выделяли и промывали от крови физраствором с помощью шприца, вставленного в аорту. Сердце помещали в препаровальную ванночку, заполненную физиологическим раствором Тироде (состав в ммоль/л: NaCl 133,47, KCl 4,69, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 1,35, NaHCO<sub>3</sub> 16,31, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 1,18, CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 2,5, глюкоза 7,77; раствор продувался карбогеном (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>), pH составлял 7,4±0,1). Затем выделяли препараты миокарда.

#### **3.2.1. Препараты правого предсердия**

Препарат изолированного правого предсердия мыши использовали для иммуногистохимического окрашивания. Для выделения препарата сердце фиксировали в ванночке правым предсердием вверх, браншу ножниц вводили в нижнюю полую вену и делали разрез вблизи срастания стенки правого предсердия и атриовентрикулярной фиброзной прослойки, а затем – по краю ушка правого предсердия. После этого всю стенку предсердия отрезали, вскрывали верхнюю и нижнюю полые вены. Полученный препарат содержал как рабочий миокард ушка предсердия, так и межвенную область с САУ, поэтому мог сокращаться в собственном синусном ритме.

Выделение препарата изолированного ушка правого предсердия производили таким же образом, однако, после этого удаляли всю межвенную область с САУ. Такой препарат не имел собственного источника автоматии и мог работать только в навязанном ритме. Препарат ушка правого предсердия использовали в электрофизиологических экспериментах.

Для получения препарата межвенной области мыши, который использовали в электрофизиологических экспериментах и для молекулярно-биологических исследований, производили те же манипуляции, что и в первом случае, после чего удаляли ткань правого ушка для того, чтобы снять гиперполяризующее влияние рабочего миокарда на водитель ритма.

Кроме того для оценки уровня экспрессии генов мускариновых рецепторов необходимо было выделить ткань синоатриального узла мыши. Для этого вырезалась область размером

примерно 1,5X0,5мм из правого предсердия, расположенная в межвенной области и вытянутая вдоль пограничного гребешка. Это место соответствует расположению синоатриального узла у мыши по литературным данным [Liu et al., 2007] и по результатам электрофизиологических исследований, проведенных нами.

У новорожденных, трехнедельных и взрослых крыс выделяли правое предсердие способом, подробно описанным выше. Эти препараты использовали для работ по электрофизиологии и молекулярной биологии.

### **3.2.2. Препарат стенки правого желудочка**

Препараты изолированной стенки правого желудочка использовали в части электрофизиологических экспериментов, для иммуногистохимического окрашивания и РВ-ПЦР. Данные препараты получали из сердец мышей, новорожденных, трехнедельных и взрослых крыс. Для получения препарата делали надрез в нижней части правого желудочка, вставляли браншу ножниц в его полость и отрезали стенку по ее границе с межжелудочковой перегородкой. Затем при помощи пинцета отгибали стенку желудочка и отрезали совсем. Препарат работал только в навязанном ритме.

### **3.3. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов миокарда**

Методика иммуногистохимического окрашивания основана на обработке фиксированного препарата антителами, селективно связывающимися с исследуемым белком. Эти антитела называются первичными. Затем препарат обрабатывается вторичными антителами, которые связываются с первичными, при этом они конъюгированы с молекулами флуорохрома, способными флуоресцировать при возбуждении светом определенной длины волны. Для визуализации связанных с белком антител необходим микроскоп с соответствующим источником возбуждающего света. Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп дает наилучшее представление о локализации меченого антителами белка в исследуемом препарате.

В нашей работе иммуногистохимическое окрашивание проводилось в соответствии с протоколом, использованным ранее для исследования препаратов правого предсердия мыши [Liu et al., 2007].

### 3.3.1. Используемые антитела

При окраске тканей предсердий и желудочков мыши мы использовали следующие первичные поликлональные антитела (IgGs): anti-Cx43 – антитела к коннексину-43 (Cx43), выработанные в организме кролика против антигена мыши (rabbit, cat. no. sc-9059, в разведении 1:200, Santa Cruz Biotechnologies, USA), anti-M2 – козы антитела к M2-холинорецепторам мыши (goat, cat. no. sc-31483, в разведении 1:100, Santa Cruz Biotechnologies, USA), anti-M3 – козы антитела к M3-холинорецепторам мыши (goat, cat. no. sc-31486, в разведении 1:100, фирма Santa Cruz Biotechnologies, USA).

Для обнаружения локализации первичных IgGs, производилась окраска вторичными IgGs связанными с флуоресцентной меткой. Для связывания с первичными антителами к коннексину Cx43 использовали антитела, выработанные в организме осла против антигена кролика, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluro 647 (donkey anti-rabbit Alexa 647, cat. no. A31573, в разведении 1:100, Invitrogen, USA). Для выявления первичных антител как к M2-, так и к M3-рецепторам, использовали ослиные антитела к козьим IgG, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluro 488 (donkey anti-goat Alexa 488, cat. no. A11055, в разведении 1:100, Invitrogen, USA).

### 3.3.2. Протокол окраски

После препаровки, описанной в разделе 3.1, препараты правого предсердия и стенки правого желудочка фиксировали в 3% параформальдегиде 12 часов при температуре 4С°, после чего отмывали 0,01 М фосфатным буфером (PBS) три раза в течении часа. Для улучшения проницаемости мембран препараты инкубировали в PBS с добавлением 1% Triton X-100 12 часов при 4С°, после чего отмывали в PBS. Для предотвращения неспецифического связывания первичных антител препарат выдерживали 1 час при комнатной температуре в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) с добавлением 1% Triton X-100.

Затем проводили окраску первичными антителами (раздел 3.2.1), разведенными в 1% BSA на PBS при 4°С 24 часа. Каждый препарат инкубировали одновременно с двумя видами антител: к коннексину Cx43 и M2- (n=8), либо M3-рецепторам (n=14). После отмывки в PBS (3 раза в течении часа) производили инкубацию со вторичными антителами 2 часа при комнатной температуре. Затем отмывали 3 раза в PBS.

В качестве контроля использовали препараты, на которые воздействовали только вторичными антителами либо только первичными антителами. В обоих случаях существенного

окрашивания не наблюдалось. Это позволяет утверждать, что на полученных изображениях видны только меченые антитела, связавшиеся с белком.

Затем препараты помещали под покровное стекло. Для предотвращения выгорания флуорохромов дальнейшие манипуляции проводили без доступа света. Окрашенные ткани исследовали при помощи лазерного конфокального сканирующего микроскопа Zeiss LSM 510 META, оснащенного фотоэлектронным умножителем (ФЭУ). Использовался воздушный объектив 10x и маслоиммерсионный с 63x увеличением. Фотографии делали при помощи камеры LSM 510 Meta, изображения обрабатывали в ImageJ 1.45 (NIH, USA). При обработке изображения флуоресценция вторичных антител, связанных с первичными к Sx43, отмечалась красным псевдоцветом. Флуоресценция, соответствующая локализации M2- или M3-холинорецепторов, обозначалась зеленым псевдоцветом. Кроме того, делали снимки препаратов в видимом свете.

### **3.4. Молекулярно-биологические исследования уровня экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени**

Одним из методов количественной оценки уровня экспрессии генов является метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР). Он основан на многократном копировании определенного участка ДНК и одновременной регистрацией накопленной ДНК при помощи флуоресцентных меток. Ниже подробно рассмотрены все этапы работы и теоретические основы метода.

#### **3.4.1. Принцип метода**

Для проведения полимеразной цепной реакции сначала выделяли суммарную рибонуклеиновую кислоту (РНК) из интересующих образцов. Для того, чтобы избежать загрязнения образцов РНКазами, способными повредить выделяемую РНК, все манипуляции проводились с соблюдением соответствующих правил работы в молекулярно-биологической лаборатории. Для работ использовали специальный пластик, свободный от РНКаз и воду, обработанную диэтилпиракарбонатом (ДЭПК). Это агент, необратимо связывающийся с реакционными центрами большинства известных РНКаз, и тем самым полностью их ингибирующий. После обработки воду автоклавировали, при этом весь ДЭПК, который не связался с РНКазами, разлагается на углекислый газ и воду, и не мешает дальнейшим ферментативным реакциям. Все эти предосторожности соблюдались для максимально эффективного выделения высококачественной РНК.

Раствор, полученный в результате экстракции РНК, содержит некоторое количество геномной ДНК, что может в дальнейшем исказить результаты ПЦР. Поэтому после выделения РНК раствор обрабатывают ДНКазой I, которая полностью разрушает всю имеющуюся ДНК. Далее на РНК-матрице при помощи вирусной обратной транскриптазы (MMLV ревертаза) необходимо создать библиотеку комплементарной ДНК, которая может быть использована для последующей амплификации, является более устойчивой молекулой и долгое время хранится в замороженном состоянии. Для уменьшения погрешности при работе все образцы выравнивали по концентрации, и в реакцию обратной транскрипции брали одинаковое количество РНК.

Как уже говорилось, ПЦР представляет собой метод ферментативной наработки определенных, относительно коротких (до 25000 пар оснований) двуцепочечных фрагментов ДНК. В основе этого метода лежит принцип репликации ДНК, реализованный в живых организмах ДНК-полимеразой. В качестве затравки для начала синтеза ДНК используются пары праймеров, которые комплементарны каждой из цепей ДНК и будут ограничивать амплифицируемый участок интересующего нас гена. Для гибридизации праймеров необходимо сначала расплавить двуцепочечную структуру матричной молекулы ДНК. Для этого производят нагрев до 93-96<sup>0</sup>С. Затем реакционную смесь охлаждают до 60-75<sup>0</sup>С, и происходит связывание праймеров с одноцепочечной ДНК – отжиг. Температура отжига зависит от нуклеотидного состава праймеров и выбирается равной температуре их плавления. Следующий этап ПЦР – стадия элонгации, при которой происходит синтез комплементарной цепи ДНК. На этом этапе работает фермент, выделенный из эубактерий *Thermus aquaticus*, обитающих в термальных источниках. Их термостабильная ДНК-полимераза названа Taq-полимеразой. Этот этап происходит при 72<sup>0</sup>С. Схема полимеразной цепной реакции представлена на рисунке номер 7.

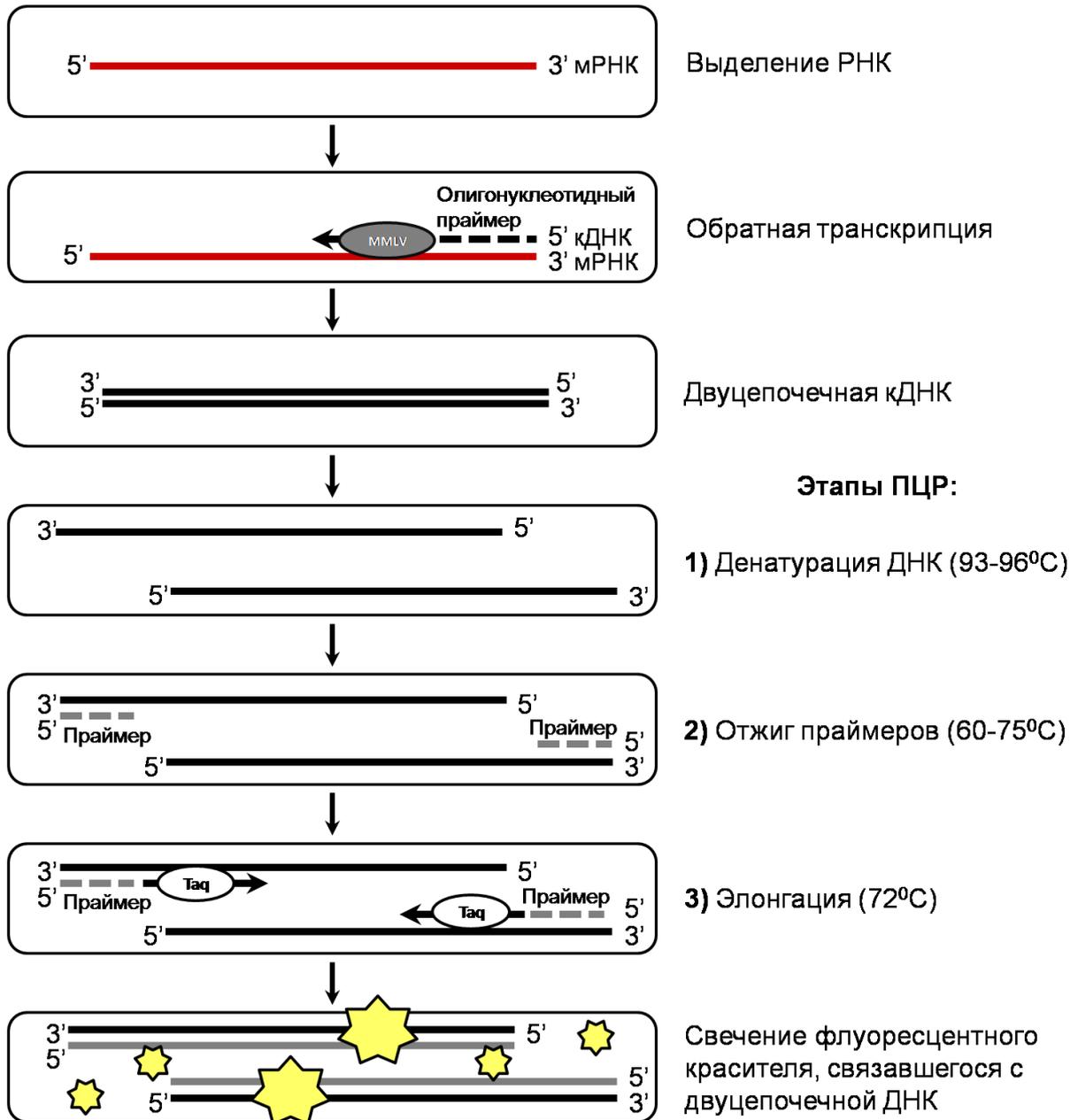


Рисунок 7. Схема полимеразной цепной реакции в реальном времени. Пояснения по каждой стадии эксперимента в тексте.

Таким образом, ПЦР состоит из трех температурных режимов, которые повторяются от 20 до 50 раз: денатурация ДНК (93-96°C), гибридизация праймеров (60-75°C) и синтез комплементарных цепей ДНК (72°C). При многократном повторении цикла, происходит накопление ДНК в геометрической прогрессии. При проведении «классической» ПЦР, наличие или отсутствие продукта оценивается в конечной точке по завершении амплификации. Присутствие ПЦР-продукта обычно определяется при помощи электрофореза в агарозном геле. Использование метода РВ-ПЦР позволяет регистрировать накопление продукта амплификации на протяжении всего процесса. Для этого используются различные ДНК-зонды или

интеркалирующие красители. В нашей работе мы использовали второй способ. Интеркалирующие красители – это соединения, приобретающие способность флуоресцировать при встраивании в двуцепочечную ДНК, точнее флуоресценция связанного красителя повышается в несколько раз, относительно свободного [Ребриков и др., 2009]. Таким образом, прибор детектирует уровень флуоресценции при прохождении каждого цикла ПЦР. График зависимости уровня флуоресценции от цикла амплификации имеет S-образный вид и выходит на плато, когда происходит резкое снижение эффективности реакции, вследствие истощения ресурсов (рис. 8а). По тому, как быстро растет уровень флуоресценции в пробе можно определить стартовое количество матрицы в образце.

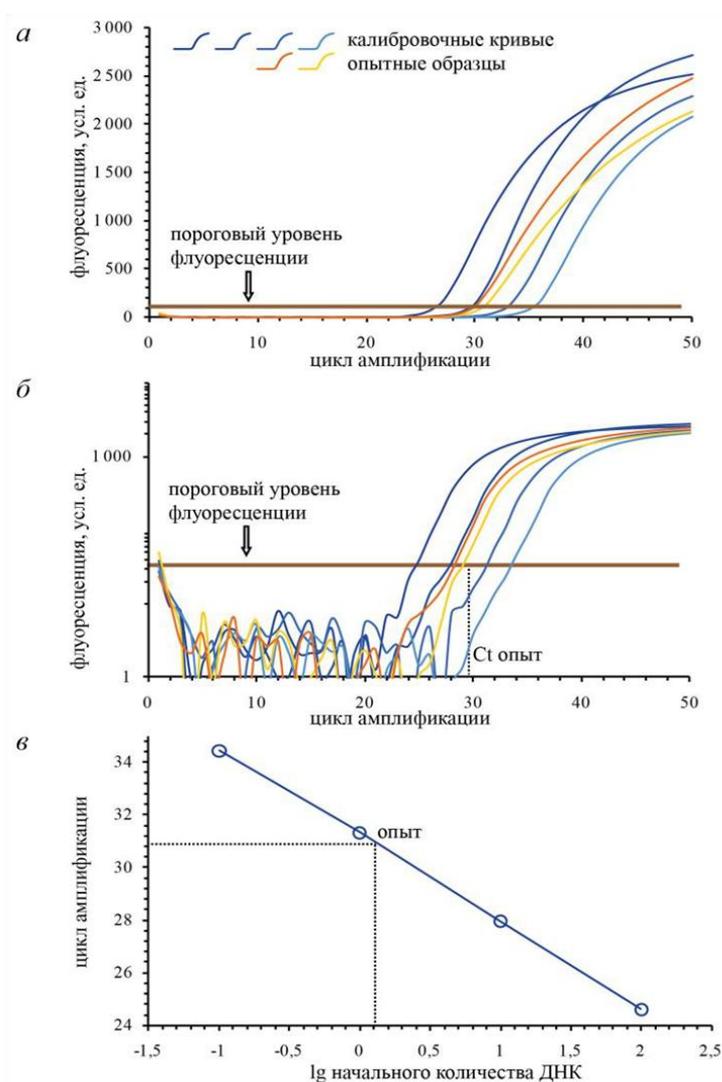


Рисунок 8. Пример анализа данных РВ-ПЦР. А) Пример типичных кривых, полученных в результате РВ-ПЦР. Оттенками синего обозначены калибровочные кривые, желтым и оранжевым, кривые, полученные в эксперименте. Б) Кривая нарастания флуоресценции, построенная в логарифмическом масштабе. В) График зависимости порогового цикла от исходной концентрации матриц. Пунктирной линией показан способ нахождения изначальной концентрации ДНК в опытном образце.

В качестве положительного контроля используют пробы с заранее известным количеством матриц. В наших экспериментах мы использовали геномную ДНК мыши и крысы в четырех последовательных 10-кратных разведениях (стартовали со 100 нг в точку). По данным полученным в результате амплификации контрольных образцов строится калибровочный график (рис. 8в). При анализе данных задается пороговое значение флуоресценции, которое отсекает участок «шумов». Это участок хорошо заметен при построении графика в логарифмическом масштабе (рис. 8б). На этом отрезке уровень шумов измерительного прибора выше уровня изменения флуоресценции в ходе реакции. Обычно пороговый уровень соответствует середине линейного участка на кривой нарастания флуоресценции, построенной в логарифмических координатах, который отвечает зоне экспоненциального роста флуоресценции [Ульянов, 2013]. Далее отмечается точка пересечения графика накопления ДНК с пороговой кривой и находится соответствующее значение порогового цикла (threshold cycle, Ct). Таким образом, зная какому Ct в калибровочных кривых соответствует какая концентрация, можно построить калибровочный график. Далее, зная на каком цикле, пересекают уровень пороговой флуоресценции кривые экспериментальных образцов, можно по графику найти стартовую концентрацию ДНК (рис. 8б). Этот метод сравнения графиков накопления ДНК получил название порогового.

Алгоритм анализа кривых флуоресценции при РВ-ПЦР интегрирован в программное обеспечение амплификатора, что позволяет значительно ускорить обработку данных, полученных в ходе эксперимента.

#### **3.4.2. Выделение тотальной РНК из препаратов сердечной мышцы**

Для выделения тотальной РНК использовались препараты синоатриального узла мыши (вырезалась область межвенного синуса в соответствии с описание представленным в литературном обзоре и найденная нами в ходе электрофизиологических экспериментов), ткань правого предсердия и желудочка мыши, новорожденных, трехнедельных и взрослых крыс. Соответствующая препаровка описана выше. Незамедлительно после выделения препараты ткани помещались в микроцентрифужную пробирку с фиксатором IntactRNA (Евроген, Россия, # BC031) для быстрой стабилизации клеточной РНК в тканях. Затем препараты в соответствии с протоколом работы с фиксатором IntactRNA помещались в холодильную камеру с температурой 4<sup>0</sup>С на сутки. До непосредственного выделения тотальной РНК пробирки с тканями хранились в морозильной камере при температуре -20<sup>0</sup>С.

Препараты различных отделов сердца, хранящиеся в фиксаторе IntactRNA, перед началом экспериментов размораживали при комнатной температуре. Затем при помощи пинцета кусочки ткани быстро переносили в пробирку с реагентом ExtractRNA (Евроген, Россия, # BC032) - монофазным водным раствором фенола и гуанидин-изотиоцианата,

предназначенным для быстрого выделения суммарной РНК. Препарат быстро гомогенизировали в 0,3 мл ExtractRNA при помощи стерильного пестика для пробирок (Axugen, USA, # PES-15-B-SI). Далее добавляли 0,7 мл реагента ExtractRNA, смывая останки ткани с поверхности пестика. Препараты инкубировались в растворе в течение 15 мин при комнатной температуре до полного лизиса клеток и высвобождения нуклеиновых кислот.

После инкубации образцы центрифугировали при 12000 g и комнатной температуре 10 мин для осаждения фрагментов разрушенных клеток. К супернатанту, добавляли 200 мкл хлороформа и интенсивно встряхивали в течение 15 с. Затем снова инкубировали 5 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая содержимое пробирок. Далее центрифугировали 15мин/4<sup>0</sup>C/20000g. В чистую пробирку отбирали водную фазу раствора, содержащую РНК.

РНК из водной фазы преципитировали равным объёмом изопропанола и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем образцы центрифугировали при 20мин/20<sup>0</sup>C/20000g. Супернатант удаляли, а осадок, содержащий РНК, отмывали 1 мл свежего 75% этанола. Далее снова центрифугировали 10мин/20<sup>0</sup>C/20000g. После этого максимально удаляли супернатант и осадок сушили на воздухе 5 мин. Полученную РНК растворяли в 50 мкл воды, обработанной ДЭПК.

### **3.4.3. Обработка ДНКазой I**

Для этого смешивали 50 мкл раствора РНК, 6,11 мкл 10x реакционного буфера и 5 мкл ДНКазы I (2 000 е.а./мл, NEB, USA, # M0303S), инкубировали в течение часа при 37<sup>0</sup>C.

После обработки ДНКазой I раствор необходимо было очистить от фермента. Для очистки мы использовали экстракцию РНК смесью фенола с хлороформом (v/v 1:1, pH 5,2). После инкубации в пробирки добавлялось 90 мкл воды и 150 мкл смеси фенол:хлороформ. Смесь активно встряхивали и центрифугировали 10мин/20<sup>0</sup>C/20000g. Далее преципитировали РНК по методике, описанной выше.

Качество и количество выделенной РНК определяли при помощи спектрофотометра Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, USA). Для определения целостности выделенной РНК проводился электрофорез в 1% агарозном геле, приготовленном на буфере TAE (40 mM Трис, (pH 8.0), 40 mM ацетат натрия, 1mM ЭДТА), с использованием интеркалирующего красителя бромида этидия (AppliChem, #1152,0025) в концентрации 0.5 мкг/мл. Перед нанесением на гель к образцам РНК добавляли равный объём 2X-буфера для нанесения проб (95% формамида, 0.025% SDS, 0.025% бромфенолового синего, 0.025% ксиленцианола, 0.025% бромида этидия, 0.5 mM EDTA), после чего пробы прогревали 10 мин. при 70<sup>0</sup>C и резко охлаждали на льду (3

мин.). Электрофорез проводили в буфере ТАЕ при напряжении электрического поля 8-10 В/см. РНК в геле визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 312 нм.

#### **3.4.4. Обратная транскрипция**

В реакцию обратной транскрипции брали 500 нг РНК. Исключение составили образцы, выделенные из синоатриального узла мыши. Поскольку препараты ткани были очень малы, то объем реакции при выделении РНК уменьшили в 2 раза. Выход РНК был не велик, поэтому в реакцию обратной транскрипции мы взяли 107 нг.

Для синтеза первой цепи кДНК мы пользовались набором реагентов фирмы Евrogen (Россия, каталожный номер SK021). Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями данными производителем реактивов. В пробирке готовилась смесь компонентов реакции: 6 мкл РНК, 2 мкл воды и 1 мкл смеси случайных декануклеотидных праймеров. Смесь инкубировали при 70<sup>0</sup>С в течение 2 мин для расплавления вторичных структур РНК, затем образцы быстро переносились на лед на 2-3 мин для отжига праймеров. После добавляли заранее приготовленную смесь реагентов; из расчета на одну пробирку: 4 мкл 5х реакционного буфера, 2 мкл смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, 2 мкл DTT (дитиотретиола), 1 мкл ингибитора РНКаз, 1 мкл воды, 1 мкл MMLV ревертазы. Для того чтобы удостовериться, что в образцах отсутствует геномная ДНК, для каждого образца готовили отрицательный контроль. В него вместо 1 мкл ревертазы добавляли 1 мкл стерильной, свободной от РНКаз воды. После соединения двух частей реакционной смеси, пробирки инкубировали при 42<sup>0</sup>С в течение 60 мин. Для остановки реакции смесь выдерживали при 70<sup>0</sup>С 10 мин. Объем смеси доводили до 55 мкл, разделяли на аликвоты по 6,4 мкл и хранили при -20<sup>0</sup>С.

#### **3.4.5. Выделение геномной ДНК**

В качестве калибровочных образцов в РВ-ПРЦ использовали разведения геномной ДНК, выделенной из печени крысы или мыши. Для этого пользовались набором реагентов GeneJet Genomic DNA purification Kit (Thermo Scientific, USA, # K0722). Печень выделяли одновременно с препаратами сердечной ткани, и хранили в жидком азоте.

Перед началом экстракции ткань печени размораживали при комнатной температуре, взвешивали 20 мг ткани и немедленно гомогенизировали при помощи пестика. Далее гомогенат ресуспендировали в 180 мкл Digestion Solution (рабочий раствор протеиназы К) и добавляли 20 мкл (400 мкг) протеиназы К для расщепления молекул белков на мелкие фрагменты. Смесь тщательно перемешивали и инкубировали ночь при 56<sup>0</sup>С в термостате с постоянным перемешиванием. На следующий день к раствору добавлялось 20 мкл (200 мкг) раствора РНКазы А и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Далее добавляли 200 мкл Lysis Solution (раствора для полной диссоциации ДНК-белковых комплексов) и в течение 15 с

активно перемешивали при помощи вортекса, затем добавляли 400 мкл 50% этанола. Полученный раствор переносили на специальные спин-колонки (GeneJET Purification Columns) и центрифугировали 1мин/20<sup>0</sup>С/8000g. В процессе центрифугирования ДНК сорбируется на силиконовом фильтре колонки. Колонку переносили в новую пробирку и добавляли 500 мкл Wash Buffer I (раствора для промывания ДНК на фильтре колонки). Центрифугировали 1мин/20<sup>0</sup>С/8000g. Добавляли 500 мкл Wash Buffer II и снова центрифугировали 3мин/20<sup>0</sup>С/20000g.. Колонку перенесли в эппендорф и добавили 200 мкл Elution Buffer (раствора для элюции ДНК с фильтра колонки), инкубировали 2 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1мин/20<sup>0</sup>С/8000g. Для того, чтобы увеличить суммарный выход ДНК, операцию повторили еще раз, добавив 100 мкл Elution Buffer. Концентрацию ДНК померили на приборе Nanodrop (Thermo Scientific,USA), раствор хранили при - 20<sup>0</sup>С.

#### **3.4.6. Праймеры, использованные в работе**

Праймеры для ПЦР подбирали при помощи программы Primer Premier (Premier BIOSOFT, USA). Праймеры подбирали к участкам на стыках интронов и экзонов, что позволило детектировать насцентные транскрипты, количество которых отражает интенсивность транскрипции данного гена. Праймеры синтезировались компанией ДНК-Синтез и Евроген, Россия. Последовательности праймеров приведены в таблице номер 1.

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе.

Название гена/вид животного	Нуклеотидная последовательность	Температура плавления, °С
M2-рецептор/ Mus musculus	Прямой праймер 5' GACACAGAAAAGGGACTGGGAA 3'	59.9
	Обратный праймер 5' GGACAATAAATACCACTTCAAATGTC 3'	56
M3-рецептор/ Mus musculus	Прямой праймер 5' TGTACSTTTGCTGAAGTTCAGAAT 3'	58.1
	Обратный праймер 5' CTCAAAACCATTCCTTCCA 3'	58.5
GAPDH/ Mus musculus	Прямой праймер 5' ATGGTGCAACAGTATCCACTCT 3'	58.1
	Обратный праймер 5' ATGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG 3'	57.8
M2-рецептор/ Rattus norvegicus	Прямой праймер 5' TCTACACTGTGATTGGTTACTGGC 3'	58.9
	Обратный праймер 5' GCTTAACTGGGTAGGTCAGAGGT 3'	58.8
M3-рецептор/ Rattus norvegicus	Прямой праймер 5' SAAGTGGTCTTCATTCCTTCT 3'	58.7
	Обратный праймер 5' GCCAGGCTTAAGAGGAAGTAGTT 3'	58.7
GAPDH/ Rattus norvegicus	Прямой праймер 5' CAGCGATGCTTTACTTTCTGAA 3'	58.0
	Обратный праймер 5' GATGGCAACAATGTCCACTTT 3'	57.4

### 3.4.7. Полимеразная цепная реакция

Перед проведением РВ-ПЦР мы оценивали качество полученных библиотек кДНК, а именно отсутствие контаминации геномной ДНК. Для этого ставили ПЦР, матрицами в которых, наряду с библиотеками кДНК, служили отрицательные контроли обратной транскрипции. Библиотеку кДНК признавали пригодной для дальнейшей работы в том случае, если в ПЦР с соответствующим отрицательным контролем не происходило накопление

продукта (или если продукт накапливался в значительно меньшем количестве, чем в ПЦР с данной библиотеки кДНК). Смесь реагентов из расчета на одну реакцию: 10 мкл 2,5X реакционной смеси для ПРЦ (Синтол, Россия, # М-428), 0,1 мкл каждого из праймеров (100 пкмоль/мкл), 12,8 мкл воды. К 23 мкл данной смеси добавляли 2 мкл библиотеки кДНК, в пробирку с негативным контролем добавляли 2 мкл воды. ПРЦ проводилась на приборе Mastercycler Gradient (Eppendorf). Условия проведения ПЦР представлены в таблице номер 2.

Таблица 2. Условия проведения качественной ПЦР.

Температура, °С	Время, минуты	Циклы
95	5	
95	1	35 циклов
60	0,5	
72	1	
72	10	

Наличие ПЦР продукта выявляли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле, приготовленным на буфере ТАЕ (40 мМ Трис, рН 8.0), 40 мМ ацетат натрия, 1мМ ЭДТА), с использованием интеркалирующего красителя бромида этидия (AppliChem, #1152,0025) в концентрации 0.5 мкг/мл. Далее по лункам в электрофоретическом геле разливали смесь, состоящую из 2 мкл 6X загрузочного буфера (0.05 % бромфеноловый синий, 30% сахароза) и 10 мкл образцов. Использовали маркер молекулярного веса ДНК в полосках GeneRuler 1kb ladder (Fermentas). Электрофорез проводили в буфере ТАЕ при напряжении электрического поля 8-10 В/см. ДНК в геле визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине вол-ны 312 нм.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени проводилась по аналогичному протоколу на приборе BioRad CFX96, но количество циклов было увеличено до 50. Исследования проводились на реактивах фирмы Синтол, в качестве флуоресцентного индикатора двуцепочечной ДНК использовался краситель EvaGreen (BIOTIUM, #31000), который добавляли в реакцию из расчета 0,5 мкл на 20 мкл реакционной смеси. В качестве положительного контроля использовалась геномная ДНК, негативного – вода, на которой была приготовлена смесь для проведения РВ-ПРЦ. Результаты, полученные в ходе РВ-ПЦР обрабатывались при помощи программного обеспечения поставляемого вместе с амплификатором и программы Microsoft Excel.

### 3.5. Эксперименты с регистрацией электрической активности

#### 3.5.1. Устройство установки

Для проведения экспериментов использовалась специальная установка для внутриклеточной регистрации ПД (Рис. 9). Она состояла из проточной системы, обеспечивающей жизнедеятельность препарата, и собственно регистрирующей части.

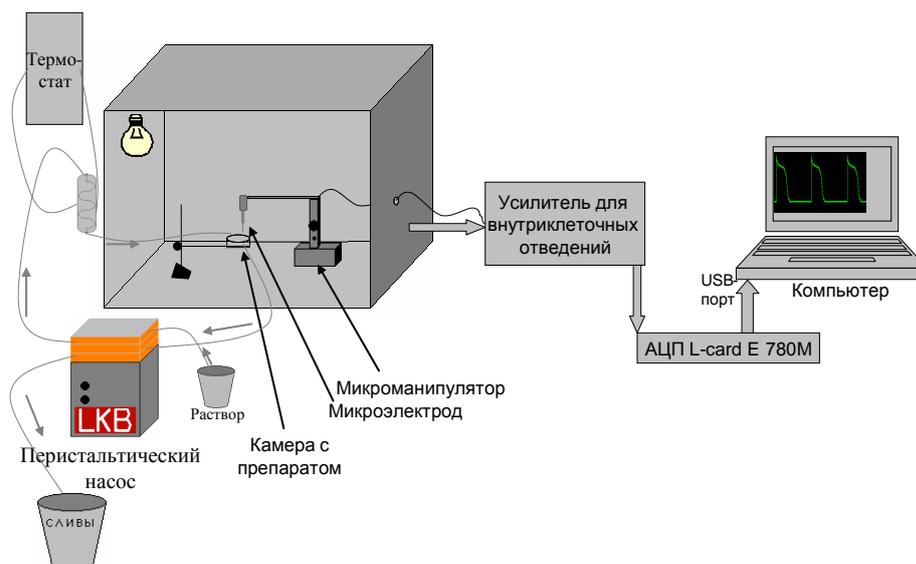


Рисунок 9. Блок-схема простейшей установки для внутриклеточной регистрации электрической активности.

Препарат располагался в суперфузионной камере, в которой поддерживался постоянный проток (12 мл/мин) физиологического раствора Тироде. Раствор с помощью перистальтического насоса BT100-2J (Longerpump, Китай) прокачивался в суперфузионную камеру по приносящей трубочке, другой конец которой помещался в резервуар с раствором, в котором раствор непрерывно окисливался карбогеном (смесь 95% кислорода и 5% углекислоты). Перед попаданием в камеру раствор проходил через змеевик, через рубашку охлаждения которого прокачивалась рабочая жидкость термостата LT-7WC (Лабтех, Россия). Благодаря этому в камере поддерживалась температура 37,5°C. Препарат помещали в суперфузионную камеру эндокардиальной стороной вверх и расправляли с помощью энтомологических булавок. В том случае, если эксперимент проводился на препарате ушка правого предсердия или стенки правого желудочка, на краю препарата устанавливали стимулирующие электроды, подключенные к стимулятору ЭСЛ-2 через изолирующий трансформатор.

Для регистрации ПД использовался классический метод внутриклеточных отведений электрической активности при помощи стеклянных микроэлектродов. Микроэлектрод – это микропипетка, заполненная раствором электролита (3М KCl). Микроэлектроды предварительно вытягивали на специальном пуллере из фабричных стеклянных капилляров (WPI, США) с внешним диаметром 1,2 мм, внутренним – 0,6 мм. Готовый микроэлектрод состоит из ствола и тонкой части, завершающейся кончиком с диаметром около 1 мкм. Перед работой микроэлектроды заполняли 3М раствором KCl.

Регистрирующая часть установки состояла из усилителя для внутриклеточных отведений и приборов для визуализации и записи сигнала. К головке усилителя подсоединялась серебряная проволока, покрытая хлоридом серебра (AgCl), которая вставлялась в ствол микроэлектрода. Кроме того, к головке подключался индифферентный электрод (также хлорсеребряный), который помещали в камеру с препаратом. Для введения кончика микроэлектрода внутрь мышечного волокна использовали микроманипулятор Narishige MM-3 (Япония), на котором микроэлектрод закрепляли с помощью специального держателя.

Выходной сигнал усилителя подавался на аналогово-цифровой преобразователь E14-140 (L-card, Россия), подключенный к компьютеру. Для наблюдения и регистрации сигнала на компьютере использовалась программа PowerGraph Professional 3.3.

### **3.5.2. Регистрация ПД. Протокол эксперимента**

Немедленно после выделения препараты ткани для электрофизиологических исследований закрепляли эндокардиальной стороной вверх при помощи энтомологических булавок в экспериментальной камере, в которую постоянно подавался раствор Тироде перманентно продуваемый карбогеном. Если препарат работал в навязанном ритме, то на край ткани устанавливали серебряные электроды, подключенные к стимулятору DL-340 (Neurobiolab). Параметры стимуляции были следующие длительность - 1 мс, частота для взрослых и 3-недельных - 6 Гц, для новорожденных - 4 Гц, амплитуда 5-10 В

Регистрацию ПД начинали не менее чем через 40 мин после выделения препарата для того, чтобы его электрофизиологические параметры достигли относительно стабильного состояния.

Для внутриклеточной регистрации электрической активности кончик микроэлектрода вводили в ткань препарата при помощи микроманипулятора. Сперва с помощью макровинта микроэлектрод опускали до поверхности препарата. После этого с помощью макровинта

добивались стабильной регистрации ПД. Для регистрации амплитуда ПД должна была составлять не менее 100 мВ для рабочего миокарда и не менее 60 мВ для ткани САУ.

После получения устойчивого отведения начинали перфузию раствором, содержащим исследуемые вещества в той или иной концентрации, при этом начинали запись электрической активности. В экспериментах на рабочем предсердном миокарде и САУ мускариновые рецепторы активировали с помощью их синтетического агониста пилокарпина, обладающего слабой селективностью в отношении М3-рецепторов, а также естественного агониста, АЦХ. Проводили регистрацию электрической активности при аппликации пилокарпина в норме и на фоне блокады М2-рецепторов метоктрамином ( $10^{-7}$ М). В экспериментах на рабочем миокарде использовали также блокатор М3-холинорецепторов – 4-DAMP ( $10^{-8}$ М). В ходе экспериментов по исследованию влияния избирательной активации М3-рецепторов сперва в течении 5 минут проводили аппликацию мускаринового агониста: пилокарпина или АЦХ. После отмыва (25 минут) апплицировали один или несколько селективных блокаторов М-рецепторов, затем в течении 5 минут регистрировали действие агониста на фоне блокаторов (рис. 10).

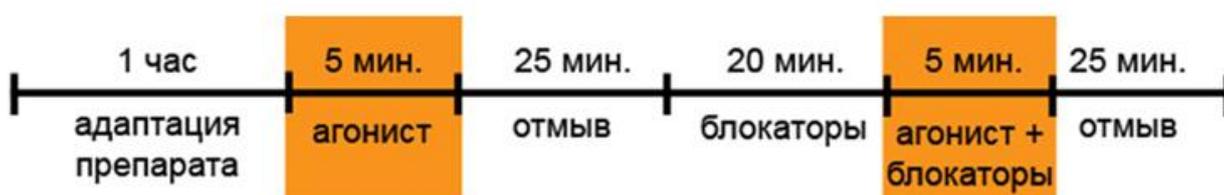


Рис. 10. Схема эксперимента по исследованию влияния избирательной активации М3-рецепторов.

### 3.5.3. Обработка результатов

Обработку записей работы предсердного миокарда проводили в программе MiniAnalysis v.3.1 (Synapthosoft, США). Определяли длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации мембраны (рис.11). Записи ПД истинного водителя ритма обрабатывали с помощью программы PowerGraph 3.3. По исходной записи сигнала определяли длительность сердечного цикла, частоту, а также длительность ПД. Затем сигнал дифференцировали и находили скорость нарастания МДД, и максимальную скорость нарастания переднего фронта ПД (максимальное значение  $dV/dt$ ). При первичном анализе экспериментальных записей находили время максимального развития холинергических эффектов, в дальнейшем работа проводилась именно с этими значениями.

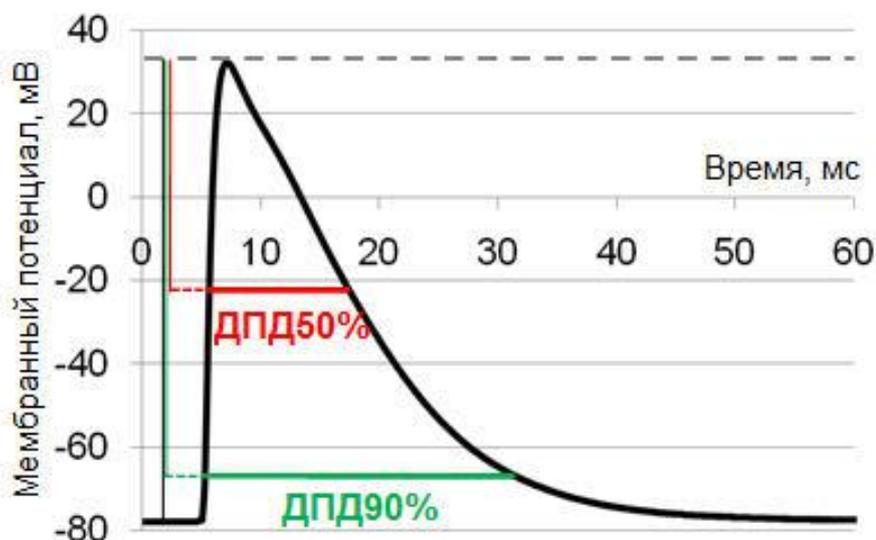


Рисунок 11. Длительность ПД (ДПД) на уровне 50% и 90% реполяризации.

Статистическая обработка проводилась в программе Statistica 6.0. Для оценки достоверности изменения исследуемых параметров под действием мускариновых агонистов по сравнению с величинами этих параметров в контроле, т.е. до аппликации агонистов, использовали непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок. Для оценки достоверности подавления эффектов мускариновых агонистов теми или иными блокаторами использовали критерий Манна-Уитни. Параметрические критерии не были использованы в связи с малым объемом выборки, не позволяющим гарантировать нормальность распределения.

### 3.6 Метод пэтч-кламп

#### 3.6.1 Выделение изолированных кардиомиоцитов крысы

Получение изолированных желудочковых и предсердных кардиомиоцитов крысы начиналось с забоя животного и выделения сердца по описанной выше схеме (раздел 3.2.1). За 20 минут до забоя животному внутрибрюшинно вводили 100 мкл раствора гепарина (5000 МЕ/мл). Затем сердце канюлировали через аорту, канюлю подключали к аппарату для ретроградной перфузии по Лангендорфу с постоянным протоком. Аппарат состоит из последовательно соединенных силиконовой трубкой резервуара с жидкостью, перистальтического насоса Longerpump BT100-2J, змеевика с внешним контуром, подключенным к стандартному жидкостному термостату, и металлической канюли с внешним диаметром 1,8 мм.

Первые 5-7 минут сердце перфузировали со скоростью 12 мл/мин (температура  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) бескальциевым раствором для выделения кардиомиоцитов следующего состава (мМ):

NaCl 113, KCl 4,7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,6,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,6,  $\text{MgCl}_2$  1,2,  $\text{NaHCO}_3$  20,5,  $\text{KHCO}_3$  10, HEPES 10, бутандион моноксим 10, таурин 30, глюкоза 5,5, индикатор pH феноловый красный 0,032. Раствор был насыщен карбогеном (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Затем сердце в течение 15 минут для выделения желудочковых кардиомиоцитов и 22 минут для выделения предсердных клеток перфузировали раствором аналогичного состава с добавлением 12,5 мкМ  $\text{CaCl}_2$  и 0,5 мг/мл коллагеназы II типа (Worthington Biochemicals, США). После завершения перфузии отделяли желудочковый, либо предсердный миокард, измельчали с помощью ножниц, после чего полученную массу пипетировали 10-15 раз с помощью пастеровской пипетки с диаметром кончика 2 мм. Затем суспензию пропускали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 100 мкм, после чего центрифугировали в течение 1 минуты на скорости 800 об/мин. Супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в растворе для выделения с добавлением 12,5 мкМ  $\text{CaCl}_2$  и 10% бычьей сыворотки (FBS). Затем в течение 16 минут проводили кальциевую реинтродукцию – постепенное доведение концентрации кальция в растворе до 1 мМ. Суспензию клеток хранили при комнатной температуре в атмосфере карбогена.

### **3.6.2 Регистрация кальциевого тока L-типа в изолированных кардиомиоцитах методом пэтч-кламп**

Кальциевый ток L-типа регистрировали методом пэтч-кламп в конфигурации whole cell при помощи усилителя Axopatch 200B (Molecular Devices, США). Регистрация данных и контроль управляющего сигнала усилителя производилась с использованием программы PatchCLAMP 10 (Molecular Devices, США). Кардиомиоциты помещали в экспериментальную камеру (RC-26; Warner Instrument Corp, Brunswick, CT, USA; объемом 150  $\mu\text{l}$ ) с постоянным протоком физиологического раствора (состав в ммоль·л<sup>-1</sup>: 150 NaCl, 5,4 KCl, 1,8  $\text{CaCl}_2$ , 1,2  $\text{MgCl}_2$ , глюкоза 10, HEPES 10, с pH 7,6 выровненным добавлением NaOH) с температурой  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Пэтч-пипетки изготавливали из боросиликатного стекла (Sutter Instruments, США) с помощью горизонтального пуллера P-1000 (Sutter Instruments, США) и оплавливали кончики за счет однократного нагрева филамента того же пуллера в течение 2 с. Готовые пипетки заполняли раствором следующего состава (ммоль·л<sup>-1</sup>): 110 CsOH, 90 аспарагиновая кислота, 10 тетраэтиламмония хлорид, 10 EGTA, 5 MgATP, 5 натрий-фосфокреатин, 0,4 ГТФ-трис, 0,1 лейпептин и 10 HEPES с pH 7,4 выровненным добавлением CsOH. Сопротивление пипеток составляло в среднем  $2,8 \pm 0,3$  МΩ.

Пипетки, соединенные посредством держателя с головкой усилителя Axopatch 200B, подводили с помощью гидравлического микроманипулятора Narishige MHW-3 вплотную к мембране кардиомиоцита так, чтобы измеряемое программой сопротивление пипетки

увеличилось в 1,5-2 раза за счет контакта с мембраной. Затем в полость ствола пипетки с помощью шприца подавали небольшое отрицательное давление, при этом между внутренней поверхностью пипетки и мембраной образовывался плотный контакт с сопротивлением выше 1 ГОма. После стабилизации сопротивления гигаомного контакта в полость ствола пипетки подавался резкий импульс отрицательного давления, в результате чего участок мембраны, контактирующий с кончиком пипетки прорывался. Для лучшей перфузии кардиомиоцита пипеточным раствором в пипетку подавали небольшое положительное давление. Перед началом регистрации компенсировали емкость пипетки, емкость клетки и сопротивление доступа, устанавливали поддерживаемый потенциал -80 мВ. Затем в перфузионную камеру подавали раствор для регистрации кальциевых токов следующего состава (ммоль·л<sup>-1</sup>): 125 N-метил-глюкамин, 5 4-аминопиридин, 20 тетраэтиламмония хлорид, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 глюкоза, 10 HEPES с рН 7,4, выровненным добавлением HCl. Данный состав внеклеточного и пипеточного растворов позволяет полностью исключить возникновение всех известных типов калиевых токов. Через 1 минуту приступали к регистрации кальциевого тока.

Для регистрации использовали два различных протокола изменения мембранного потенциала. Первый протокол: раз в десять с предполяризация до -40 мВ в течение 100 мс, затем – деполяризация до +10 мВ в течение 250 мс, затем возврат к поддерживаемому потенциалу -80 мВ. Предполяризация позволяла инактивировать каналы быстрого натриевого тока и кальциевого тока Т-типа, поэтому дальнейшая деполяризация приводила к развитию исключительно тока L-типа. Второй протокол представлял собой модификацию первого с тем отличием, что амплитуда деполяризации увеличивалась от -30 мВ на 10 мВ с каждым очередным повтором. Максимальное значение деполяризации составляло +40 мВ, после этого протокол останавливался. В то время как первый протокол использовали для наблюдения за развитием эффекта тестируемых соединений, второй применяли для получения вольт-амперных кривых кальциевого тока в контроле и после развития эффекта вещества.

## **4. Результаты и обсуждение**

### **4.1. Доказательства наличия и функциональной активности М3-рецепторов в сердце**

Основные исследования по функциональной активности мускариновых рецепторов третьего типа проводились на сердце собаки и морской свинки [Shi et al., 1999; Wang et al., 1999; Meyer et al., 2001; Shi et al., 2003; Shi et al., 2004a; Shi et al., 2004b]. При этом в литературе практически отсутствуют данные относительно М3-рецепторов в миокарде основных модельных объектов физиологических исследований – крысы и мыши. Кроме того, до сих пор остается открытым вопрос о том, как распределяются эти рецепторы в сердце, поскольку проведенные на эту тему исследования не дают четких представлений [Krejčí, Tušek, 2002; Pérez et al., 2006]. Мы в своей работе постарались заполнить этот пробел и показать не только наличие, но физиологические эффекты стимуляции М3-рецепторов в различных отделах сердца с использованием нескольких методик.

#### **4.1.1. Исследование эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов в рабочем миокарде крысы**

##### **4.1.1.1. Действие пилокарпина на параметры электрической активности в рабочем предсердном миокарде крысы. Развитие эффекта во времени**

Синтетический мускариновый агонист пилокарпин в концентрации  $10^{-5}$  М вызывал выраженное уменьшение длительности ПД на уровне 50% и 90% реполяризации. Известно, что пилокарпин обладает лишь слабой селективностью по отношению к М3-рецепторам [Dhein et al., 2001], и в концентрации  $10^{-5}$  М он также активизирует М2-рецепторы. Поэтому данные эффекты пилокарпина могут быть обусловлены активацией не только М3-, но и М2-рецепторов.

Действие пилокарпина развивалось в течение 100-150 с момента начала поступления раствора, содержащего пилокарпин, в экспериментальную камеру. На рис.12 изображено развитие относительного укорочения ПД на уровне 50% и 90% реполяризации, выраженного в процентах от исходной длительности ПД, зарегистрированной до аппликации пилокарпина, под действием этого мускаринового агониста. Время отсчитывается с момента начала аппликации пилокарпина.

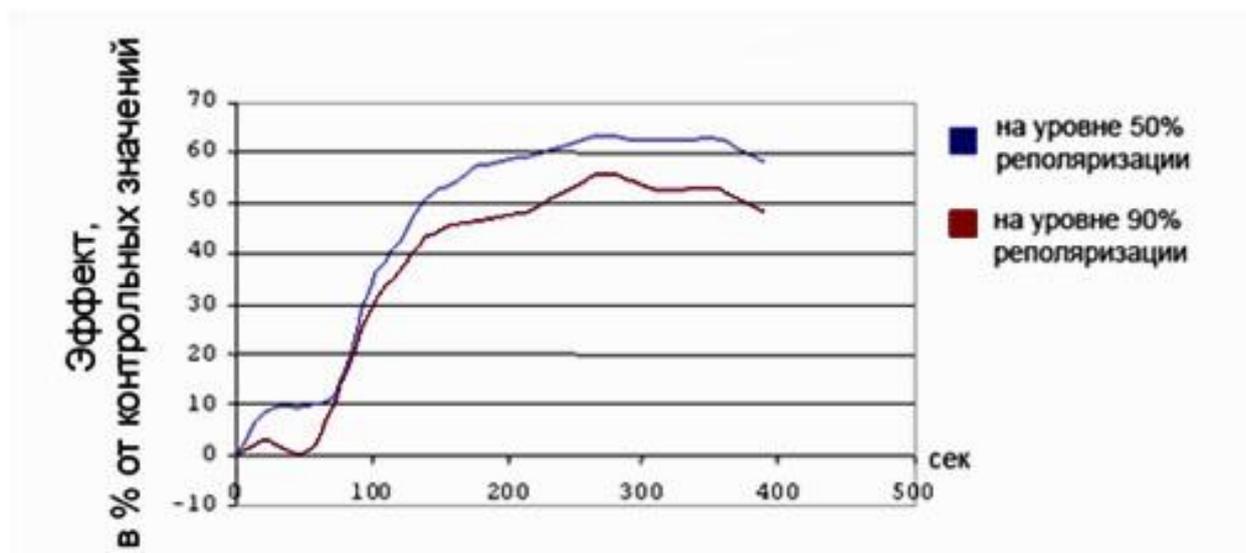


Рисунок. 12. Зависимость уменьшения ДПД от времени суперфузии препарата раствором пилокарпина  $10^{-5}$  М (данные из одного репрезентативного эксперимента).

При использовании всех прочих протоколов экспериментов с пилокарпином, то есть в экспериментах с различными блокаторами, ход кривой развития эффектов во времени был аналогичным, поэтому соответствующих рисунков мы не приводим. При анализе и сравнении действия пилокарпина в различных условиях мы учитывали только максимальные по выраженности эффекты, которые, как правило, достигались на 250-300 секунде от начала подачи агониста в экспериментальную камеру.

#### 4.1.1.2. Эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов в предсердном рабочем миокарде крысы

Для того, чтобы выяснить, присутствуют ли в предсердиях крысы М3-рецепторы, и как их активация изменяет параметры ПД, мы провели серию опытов с применением пилокарпина, а также блокаторов М3- и М2-рецепторов: 4-DAMP и метоктрамина соответственно.

Для своей работы мы выбрали такие концентрации действующих веществ, в которых эти вещества проявляют наибольшую селективность. Эти концентрации использовали другие научные группы в своих электрофизиологических работах по исследованию функциональной роли М3-рецепторов в миокарде [Shi et al., 1999; Wang et al., 1999; Meyer et al., 2001; Shi et al., 2003; Shi et al., 2004a; Shi et al., 2004b].

Результаты экспериментов представлены на рис.13, 14. Как уже отмечалось, пилокарпин проявляет лишь слабую селективность к М3-холинорецепторам, он способен также активировать М2-рецепторы. На рис. 13А представлено сопоставление конфигурации ПД в контроле и во время максимального эффекта  $10^{-5}$ М пилокарпина (приведены данные одного из

репрезентативных экспериментов). В среднем, в условиях суммарной активации М2- и М3-рецепторов пилокарпином укорочение ПД составило  $56,4 \pm 7,6\%$  от контрольной длительности на уровне 50% реполяризации и  $47,9 \pm 8,6\%$  на уровне 90% реполяризации (см. рис. 14).

Для избирательной активации М3-рецепторов мы применяли пилокарпин в сочетании с блокатором М2-рецепторов метоктрамином. Метоктрамин в концентрации  $10^{-7}$  М сам по себе вызывал лишь незначительное увеличение длительности ПД, которое не было достоверным и в данной работе не обсуждается. Пилокарпин ( $10^{-5}$  М), апплицированный на фоне  $10^{-7}$  М метоктрамина вызывал достоверное уменьшение длительности ПД (см. рис. 13Б), которое в среднем составило  $14,4 \pm 2,4\%$  от контрольной длительности ПД (на фоне  $10^{-7}$  М метоктрамина) на уровне 50% реполяризации и  $12,9 \pm 1,4\%$  на уровне 90% реполяризации (см. рис. 14).

Чтобы исключить действие пилокарпина через М1-рецепторы на ДПД, мы провели серию экспериментов с блокированием М1-рецепторов пирензепином. Пилокарпин ( $10^{-5}$  М) в присутствии пирензепина в концентрации  $10^{-7}$  М и метоктрамина ( $10^{-7}$  М) вызывал уменьшение ДПД на  $13,2 \pm 2,2\%$  на уровне 50% реполяризации и на  $12,6 \pm 1,6\%$  на уровне 90% реполяризации ( $n=5$ ), что не отличалось достоверно от эффекта пилокарпина при отсутствии блокирования М1-рецепторов (данные не показаны).

Несколько экспериментов было проведено с использованием концентрации метоктрамина  $5 \times 10^{-7}$  М ( $n=4$ ), что является фактически верхней границей диапазона концентраций, в котором метоктрамин проявляет свои селективные свойства. В этих экспериментах мы не обнаружили никаких достоверных изменений в выраженности эффекта пилокарпина. Поэтому можно заключить, что с одной стороны, метоктрамин уже в концентрации  $10^{-7}$  М полностью блокирует М2-рецепторы, а, с другой стороны, метоктрамин в использованных концентрациях действительно проявляет свою селективность, иначе эффект пилокарпина исчез бы на фоне  $5 \times 10^{-7}$  М метоктрамина или, во всяком случае, был бы существенно ослаблен.

Для того, чтобы дополнительно проверить, вызваны ли наблюдаемые эффекты именно избирательной активацией М3-холинорецепторов, были проведены эксперименты с одновременной аппликацией как метоктрамина, так и высокоселективного антагониста М3-рецепторов 4-DAMP.

Эффект уменьшения длительности ПД под действием  $10^{-5}$  М пилокарпина на фоне блокирования М2-рецепторов практически полностью снимался 4-DAMP в концентрации  $10^{-8}$  М (см. рис. 13В). При совместном применении 4-DAMP и метоктрамина ПД укорачивался в среднем всего лишь на  $4 \pm 1,4\%$  от контрольной длительности ПД (на фоне  $10^{-7}$  М метоктрамина и  $10^{-8}$  М 4-DAMP) на уровне 50% реполяризации и на  $4,1 \pm 1,6\%$  на уровне 90% реполяризации,

что достоверно отличается от соответствующих величин эффектов пилокарпина на фоне одного метоктрамина (см. рис. 14).

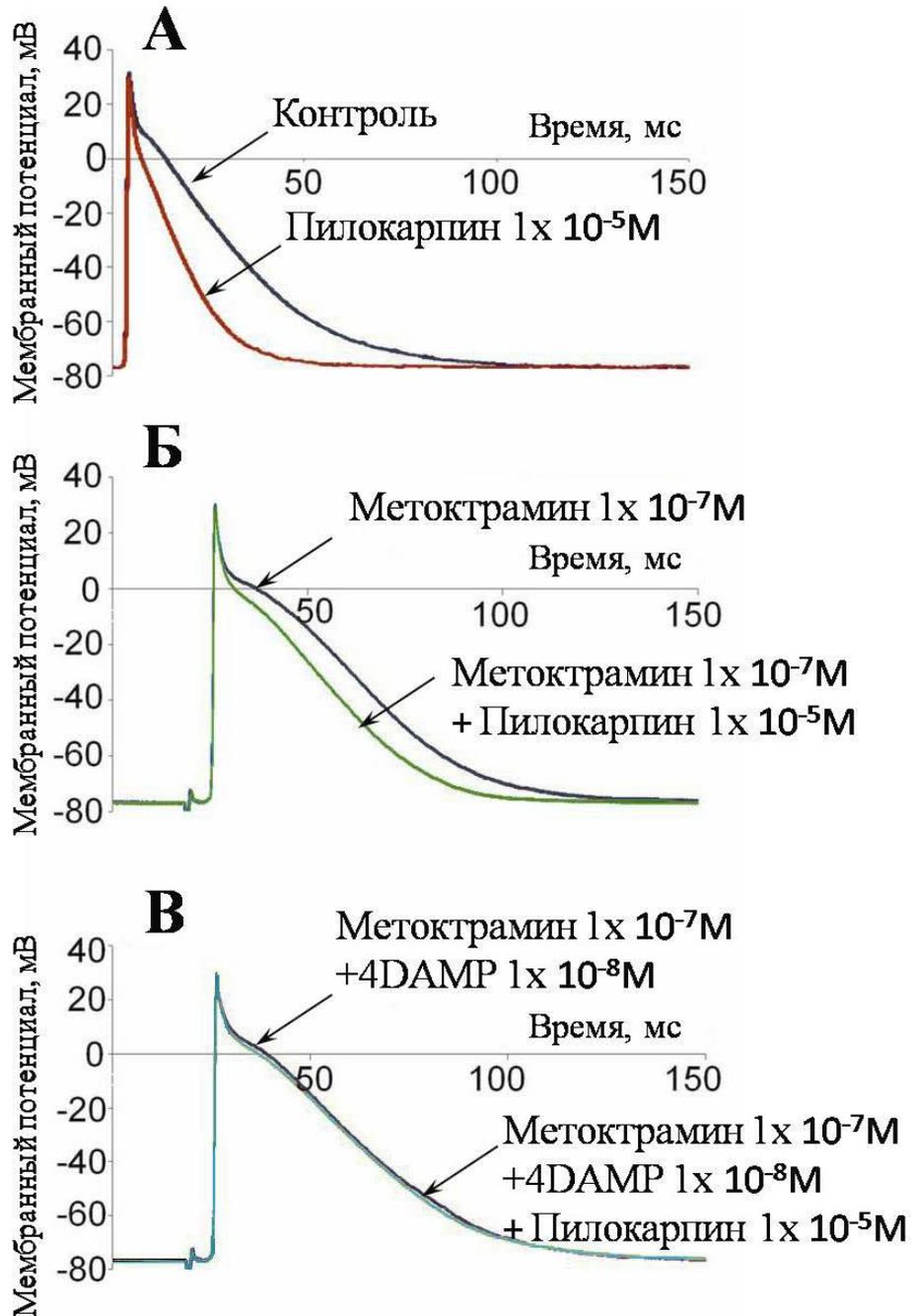


Рисунок 13. Изменение конфигурации ПД в предсердии под действием  $10^{-5}$  М пилокарпина (А), пилокарпина в условиях блокирования М2-рецепторов метоктрамином в концентрации  $10^{-7}$  М (Б), пилокарпина в условиях блокирования М2-рецепторов  $10^{-7}$  М метоктрамина и М3-рецепторов  $10^{-8}$  М 4-DAMP (В). По оси абсцисс – время, мс; по оси ординат – мембранный потенциал, мВ. Оригинальные записи из одного репрезентативного эксперимента.

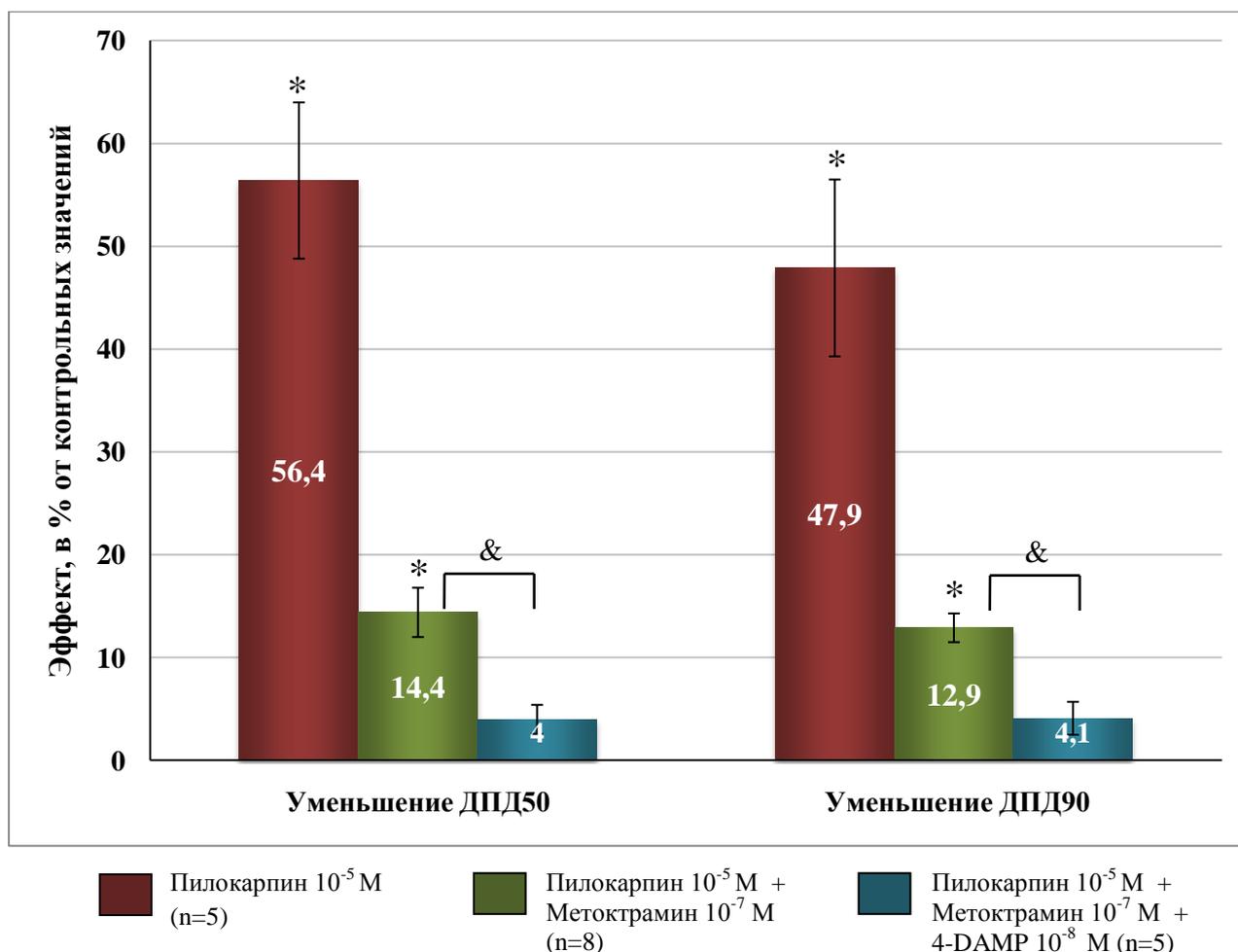


Рисунок 14. Уменьшение ДПД в миокарде предсердия под действием пилокарпина. Влияние блокирования М2-рецепторов метоктрамином и одновременного блокирования М2- и М3-рецепторов метоктрамином совместно с 4-DAMP на эффект пилокарпина. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ , & - достоверность различия, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

Таким образом, наши данные показывают, что в рабочем миокарде правого предсердия крысы присутствуют М3-холинорецепторы, которые могут быть селективно активированы с помощью аппликации пилокарпина в присутствии селективного блокатора М2-рецепторов метоктрамина. Избирательная стимуляция М3-рецепторов приводит к изменению конфигурации ПД, а именно – к уменьшению ДПД на уровне 50% и 90% реполяризации.

#### 4.1.1.3. *Исследование эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов в рабочем миокарде стенки правого желудочка крысы*

В работе Perez и соавторов при помощи нескольких биохимических и иммунологических методик было показано, что в сердечной ткани человека общее количество М-рецепторов в предсердиях выше, чем в желудочках. Для М2-рецепторов, основных мускариновых рецепторов в сердце, так же было справедливо это соотношение. Однако для М3-рецепторов

ситуация была противоположна – уровень экспрессии в предсердиях был ниже, чем в желудочках [Pérez et al., 2006]. Эти данные указывают на вероятно более значительную роль МЗ в желудочковом миокарде по сравнению с суправентрикулярным. Для проверки этого предположения была проведена серия экспериментов на препаратах стенки правого желудочка крысы с применением пилокарпина, метоктрамина и 4-DAMP, аналогичная описанной выше в разделе 4.1.1.2. Тем более, с точки зрения возможного практического применения данных исследований наибольший интерес представляет именно изучение рецепторных механизмов действия АЦХ на желудочковый миокард. Результаты представлены на рис. 15-16.

Как и в случае экспериментов на миокарде предсердий, пилокарпин в концентрации  $10^{-5}$  М вызывал уменьшение длительности ПД в субэндокардиальном миокарде правого желудочка крысы (см. рис. 15А). Время развития максимального эффекта пилокарпина в желудочках так же, как и в предсердиях, составило около 250-300 с. В среднем уменьшение ДПД под действием  $10^{-5}$  М пилокарпина составило  $11,3 \pm 2,9\%$  от контрольного значения на уровне 50% реполяризации и  $13,3 \pm 3,5\%$  на уровне 90% реполяризации (см. рис. 16). Эти изменения ДПД достоверны.

При избирательной активации МЗ-рецепторов пилокарпином на фоне блокирования М2-рецепторов  $10^{-7}$  М метоктрамина наблюдалось достоверное уменьшение длительности ПД (см. рис. 15Б) в среднем на  $5,4 \pm 1,4\%$  на уровне 50% реполяризации и на  $6,0 \pm 1,3\%$  на уровне 90% реполяризации (см. рис. 16). Таким образом, избирательная стимуляция МЗ-рецепторов в желудочковом миокарде приводит к укорочению ПД, как и в случае миокарда предсердия, однако в желудочке этот эффект выражен слабее.

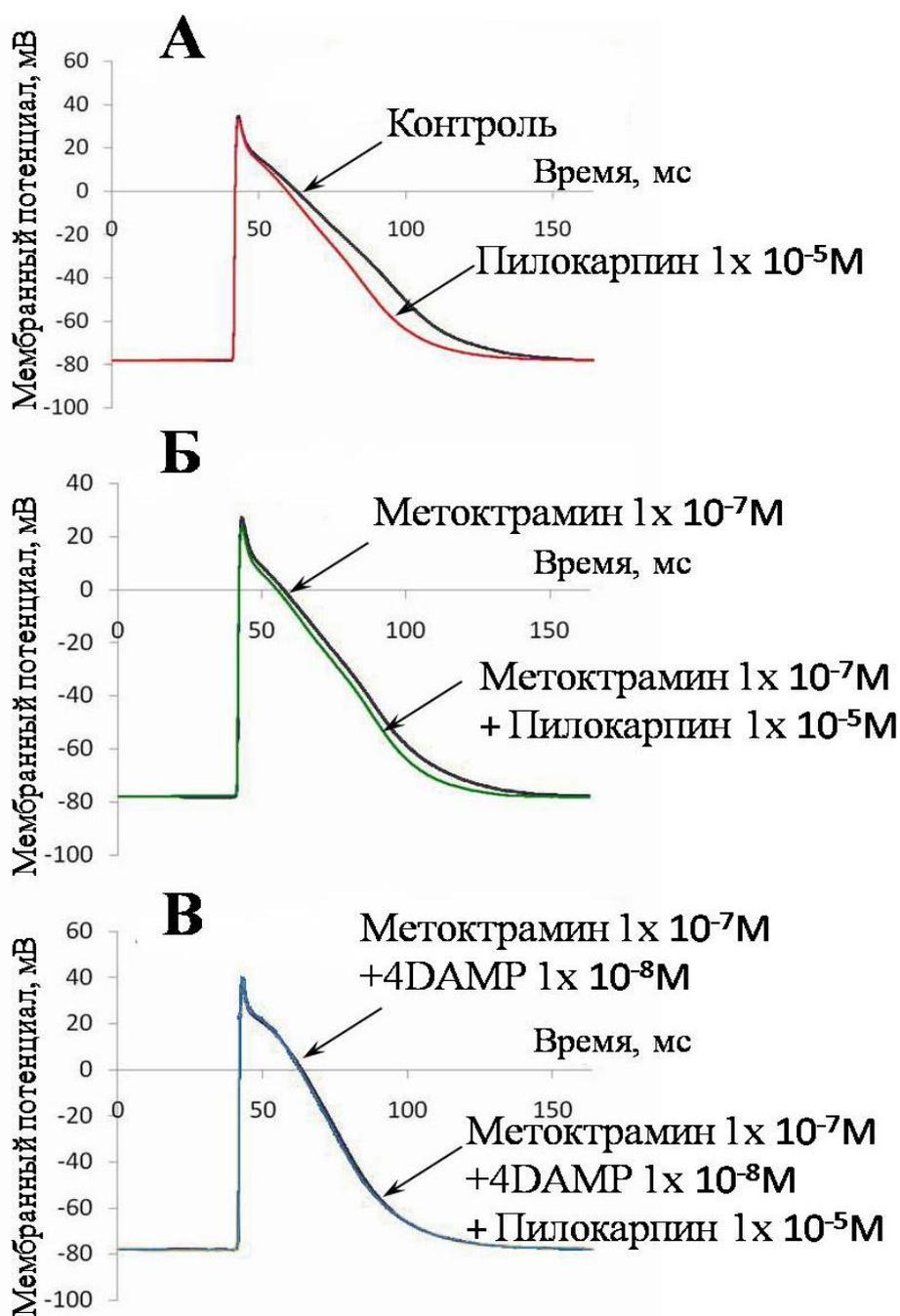


Рис. 15. Изменение конфигурации ПД в миокарде желудочка под действием пилокарпина  $10^{-5}$  М (А), пилокарпина при блокировании М2-рецепторов метоктрамином  $10^{-7}$  М (Б), пилокарпина при блокировании М2-рецепторов метоктрамином  $10^{-7}$  М и М3-рецепторов 4-DAMP  $10^{-8}$  М (В). По оси абсцисс – время, мс; по оси ординат – мембранный потенциал, мВ. Оригинальные записи из репрезентативных экспериментов.

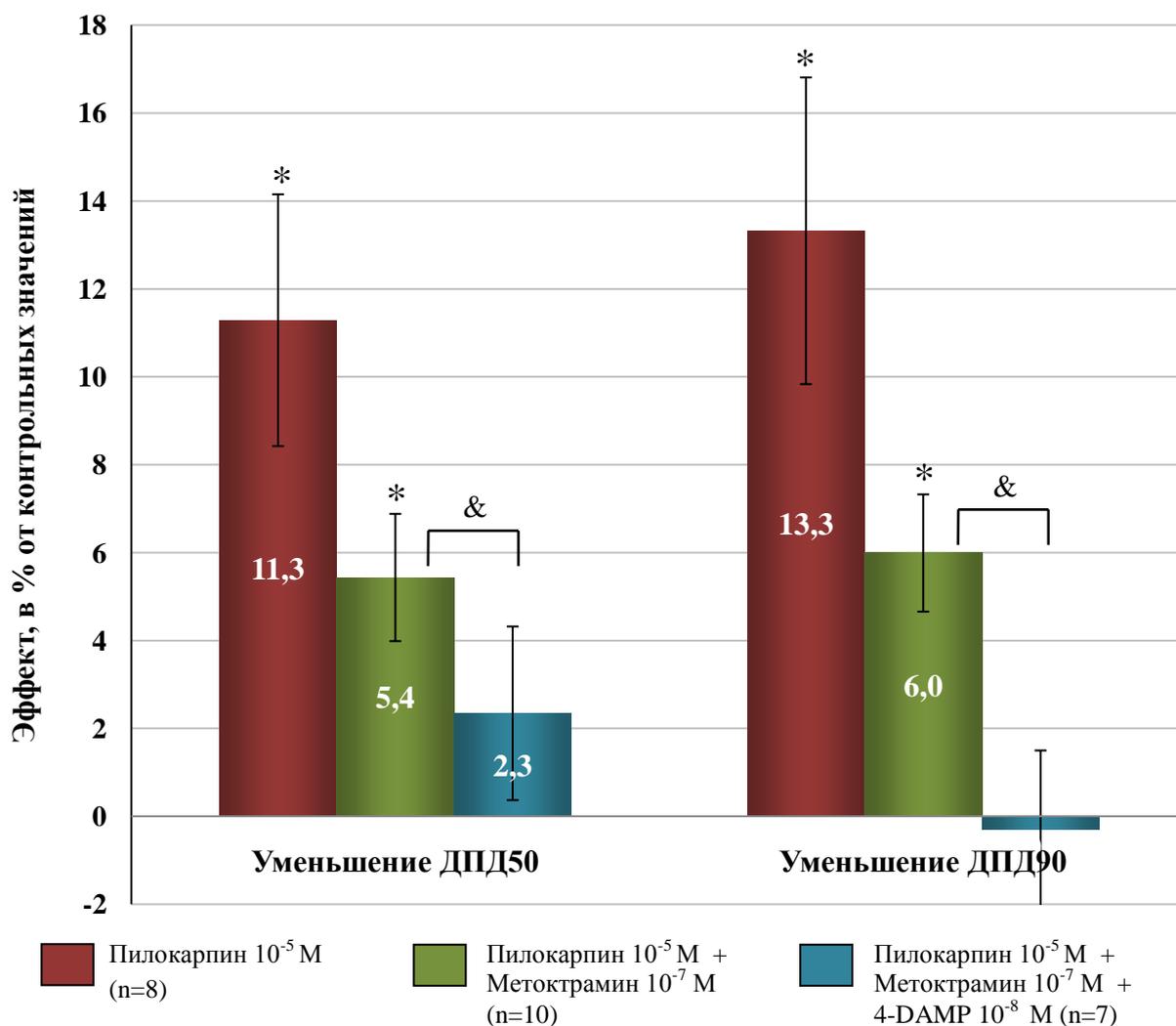


Рисунок 16. Уменьшение ДПД в миокарде желудочков под действием пилокарпина. Влияние блокирования М2-рецепторов метоктрамином и одновременного блокирования М2- и М3-рецепторов метоктрамином совместно с 4-DAMP на эффект пилокарпина. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ , & - достоверность различия, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

Для того чтобы дополнительно проверить, вызваны ли наблюдаемые эффекты именно избирательной активацией М3-холинорецепторов, мы решили провести эксперименты с одновременной аппликацией как метоктрамина, так и высокоселективного антагониста М3-рецепторов 4-DAMP. Эффект уменьшения длительности ПД под действием  $10^{-5}$ М пилокарпина на фоне блокирования М2-рецепторов практически полностью снимался 4-DAMP в концентрации  $10^{-8}$ М (см. рис. 15В, 16). При совместном применении 4-DAMP и метоктрамина ПД укорачивался в среднем всего лишь на  $2,3 \pm 2,0\%$  от контрольной длительности ПД (на фоне  $10^{-7}$ М метоктрамина и  $10^{-8}$ М 4-DAMP) на уровне 50% реполяризации и вообще не укорачивался на уровне 90% реполяризации. Отличия от соответствующих величин эффектов пилокарпина на фоне одного метоктрамина достоверны (см. рис. 16).

Таким образом, наши данные показывают, что в рабочем миокарде правого желудочка крысы присутствуют М3-холинорецепторы, которые могут быть селективно активированы с помощью аппликации пилокарпина в присутствии селективного блокатора М2-рецепторов метоктрамина. Избирательная стимуляция М3-рецепторов приводит к изменению конфигурации ПД, а именно – к уменьшению ДПД на уровне 50% и 90% реполяризации.

#### 4.1.1.4. Сравнение влияния пилокарпина на конфигурацию ПД в предсердиях и желудочках крысы

Итак, и в предсердиях, и в желудочках пилокарпин уменьшал ДПД на уровне 50% и 90% реполяризации, как при совместной активации М2- и М3-рецепторов, так и при избирательной активации М3-рецепторов. 4-DAMP полностью блокировал данный эффект пилокарпина в присутствии метоктрамина как в предсердиях, так в желудочках (см. таблицы 3-4).

Таблица 3. Уменьшение ДПД под действием пилокарпина на уровне 50% реполяризации. \*P>0,05 по сравнению с контрольными значениями.

<i>Вещества</i>	<i>Предсердия</i>	<i>Желудочки</i>
Pil	56,4±7,6% *	11,3±2,9% *
Pil + Met	14,4±2,4% *	5,4±1,4% *
Pil + Met + 4-DAMP	4,0±1,4%	2,3±2,0%

Таблица 4. Уменьшение ДПД под действием пилокарпина на уровне 90% реполяризации. \*P>0,05 по сравнению с контрольными значениями.

<i>Вещества</i>	<i>Предсердия</i>	<i>Желудочки</i>
Pil	47,9±8,6% *	13,3±3,5% *
Pil + Met	12,9±1,4% *	6,0±1,3% *
Pil + Met + 4-DAMP	-0,3±1,8%	4,1±1,6%

Рассмотрим суммарный эффект активации М2- и М3-рецепторов. На уровне 50% реполяризации уменьшение ДПД в желудочках составило 11,3±2,9% , в предсердиях - 56,4±7,6%, т.е. в предсердиях эффект значительно более выражен. На уровне 90% реполяризации укорочение ПД в желудочках составило 13,3±3,5% , в предсердиях - 47,9±8,6%, т.е. так же более выражено в предсердиях. Эти различия достоверны и позволяют

предположить, что в правом предсердии крысы больше плотность М-рецепторов, чем в правом желудочке.

При избирательной стимуляции М3-рецепторов пилокарпином на фоне метоктрамина были получены следующие результаты: на уровне 50% реполяризации уменьшение ДПД составило  $5,4 \pm 1,4\%$  в желудочках,  $14,4 \pm 2,4\%$  в предсердиях; на уровне 90% реполяризации –  $6,0 \pm 1,3\%$  в желудочках,  $12,9 \pm 1,4\%$  в предсердиях. Таким образом, изменение конфигурации ПД при активации М3-рецепторов более выражено в предсердиях, чем в желудочках, что может говорить о том, что в правом предсердии крысы больше плотность М3-рецепторов, чем в правом желудочке. Дальнейшие молекулярно-биологические исследования помогут подтвердить это предположение.

Можно оценить вклад М3-рецепторов в уменьшение ДПД под действием пилокарпина, взяв отношение уменьшения ДПД при избирательной стимуляции М3-рецепторов к суммарному значению этого эффекта при активации М2- и М3-рецепторов. Для предсердий на уровне 90% реполяризации мы получим отношение 0,27, для желудочков – 0,45. На уровне 50% реполяризации: соответственно 0,26 для предсердий, 0,48 для желудочков. Можно сделать предположение, что в правом желудочке крысы М3-рецепторы составляют большую часть популяции М-рецепторов, чем в правом предсердии. Другим объяснением описанного феномена может быть различное состояние рецепторов и элементов их сигнальных каскадов в миокарде предсердий и желудочков, в связи, с чем наше предположение требует дальнейшей проверки другими методами исследования.

#### **4.1.2. Действие избирательной активации М3-рецепторов на параметры электрической активности различных отделов сердца мыши**

В предыдущей части работы мы при помощи электрофизиологических методик показали наличие и физиологическую значимость М3-рецепторов в предсердии и желудочке крысы. Однако, в качестве модельного объекта для исследования М3-рецепторов в области синоатриального узла крыса не подходит из-за особенностей строения пейсмекера и сложности проведения электрофизиологических экспериментов на нем. Поэтому в качестве объекта нами была выбрана мышь, поскольку помимо доступности узловая ткань мыши по некоторым своим характеристикам ближе к ткани САУ человека, чем, например, классический объект подобных исследований – кролик. Для того чтобы удостовериться, что функционально активные М3-рецепторы присутствуют во всех отделах сердца мыши, нами также были проведены исследования на рабочем предсердном и желудочковом миокарде мыши.

#### **4.1.2.1. Действие избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на параметры электрической активности синоатриального узла мыши**

При работе на сердечной ткани мыши мы использовали аналогичную схему избирательной активации М3-холинорецепторов. Пилокарпин ( $10^{-5}$ М) подавался совместно с блокатором М2-рецепторов метоктрамином ( $10^{-7}$ М). Затем, для того чтобы удостовериться, что наблюдаемый эффект опосредуется М3-рецепторами, подавался раствор, содержащий как метоктрамин, так и 4-DAMP ( $10^{-8}$ М).

В ходе работы с помощью внутриклеточной регистрации электрической активности были получены записи ПД в различных частях САУ (рис.17А,Б). Обращают на себя внимание различия в конфигурации электрической активности в центре и на периферии САУ. В центральной части САУ в норме наблюдается типичный паттерн электрической активности истинного пейсмекера с плавным переходом от МДД к переднему фронту ПД, скорость нарастания которого невелика. На периферии, которая занимает большую часть области САУ, наблюдается электрическая активность латентного пейсмекера с резким переходом, меньшей скоростью МДД и большей скоростью переднего фронта. В наших экспериментах мы использовали только отведения электрической активности истинного пейсмекера или промежуточного типа.

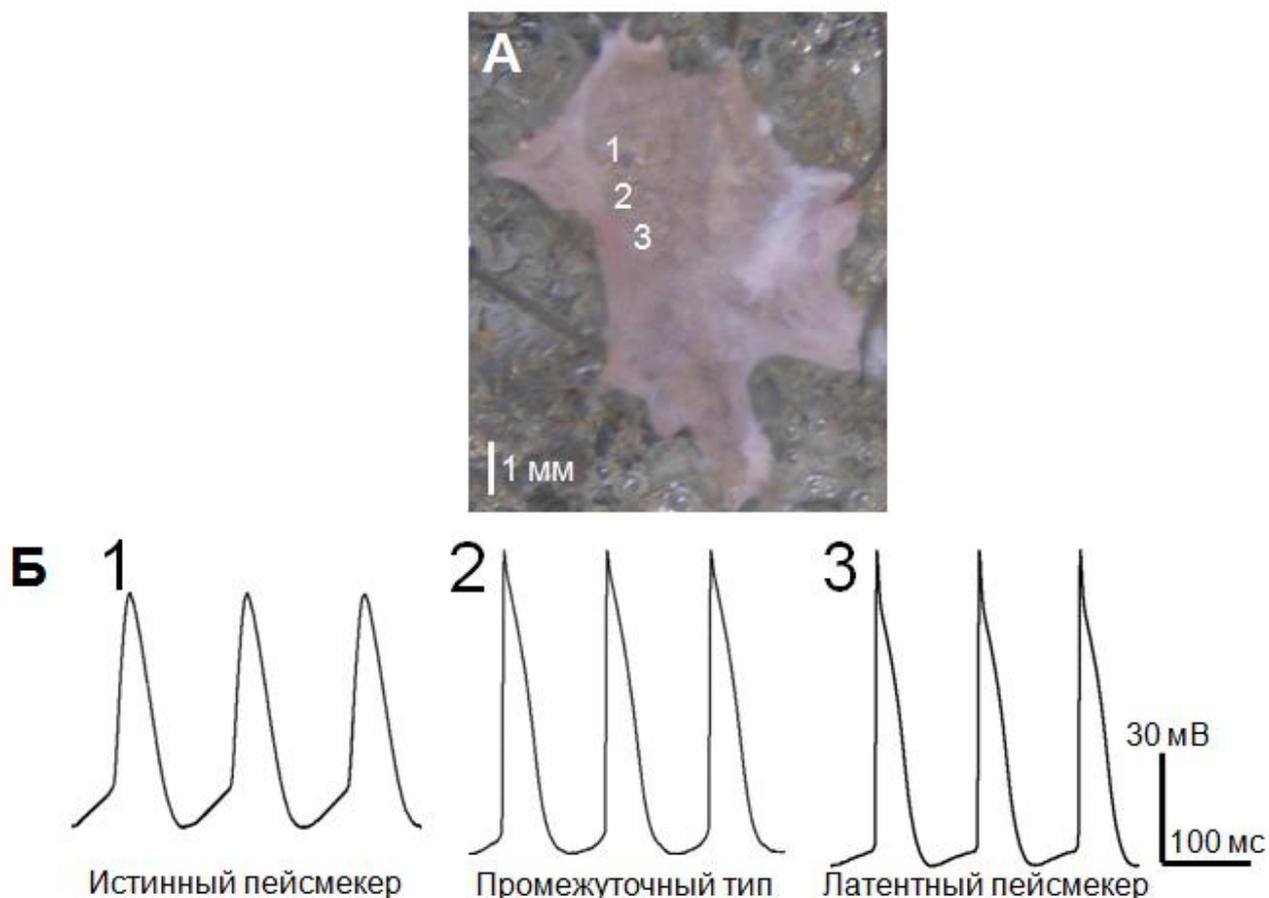


Рисунок 17. Региональные различия конфигурации электрической активности в САУ мыши. А – препарат межвенной области мыши, места регистрации ПД обозначены цифрами. Б – репрезентативные примеры записей ПД в центральной части САУ (1), на периферии САУ (3), а также промежуточный тип электрической активности.

В нормальных условиях пилокарпин вызывал в САУ мыши типичные холинергические эффекты: замедление ритма, сопровождающееся уменьшением крутизны МДД. В контроле частота следования ПД составляла 450 – 500 ударов в минуту, тогда как при действии пилокарпина 10 мкМ она падала до 350 – 400 ударов. Замедление ритма происходило в основном за счет уменьшения крутизны МДД (на  $37 \pm 9,8\%$  от нормы) и, кроме того, сопровождалось увеличением скорости нарастания переднего фронта ПД (на  $18,4 \pm 7,3\%$  от нормы) (рис. 18, 19). При блокаде М2-рецепторов метоктрамином, позволяющей достичь избирательной активации М3-холинорецепторов, все эффекты пилокарпина были выражены значительно слабее, однако даже в этом случае все они были достоверны. Снижение частоты следования ПД происходило всего лишь на  $7,3 \pm 1,5\%$ , скорость МДД уменьшалась на  $16,1 \pm 2,7\%$ , а скорость нарастания переднего фронта ПД увеличивалась на  $7,4 \pm 2,4\%$ . Можно предположить, что увеличение максимальной скорости нарастания переднего фронта возникает

за счет вовлечения в процесс деполяризации большего количества натриевых каналов, обусловленного небольшой гиперполяризацией клеток САУ при активации М-рецепторов.

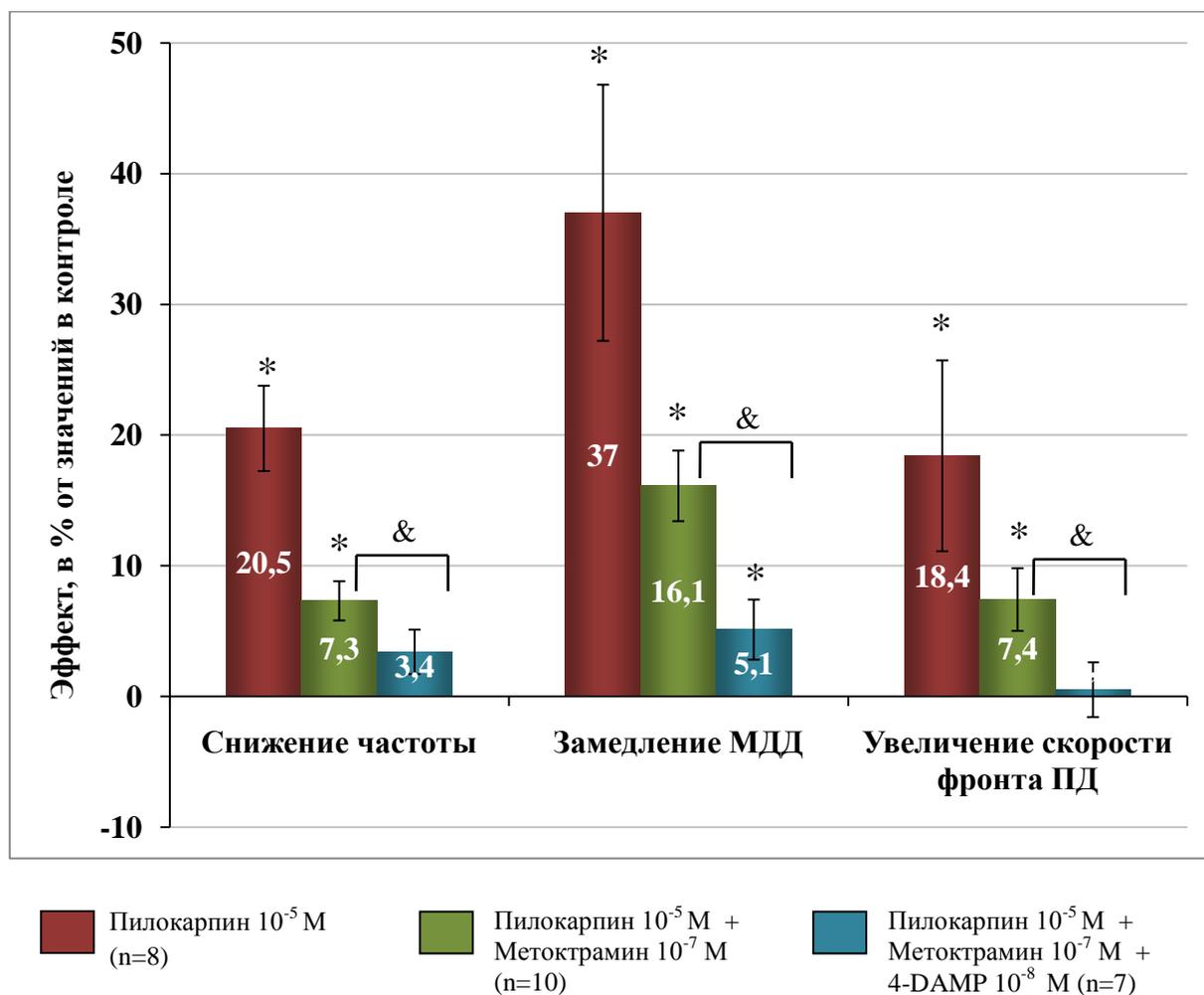


Рисунок 18. Эффекты избирательной стимуляции М3-холинорецепторов в САУ мыши пилокарпином: уменьшение частоты, замедление МДД и увеличение скорости нарастания переднего фронта ПД в норме, а так же на фоне селективной блокады М2-рецепторов метоктрамином. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона, & - достоверность различия, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

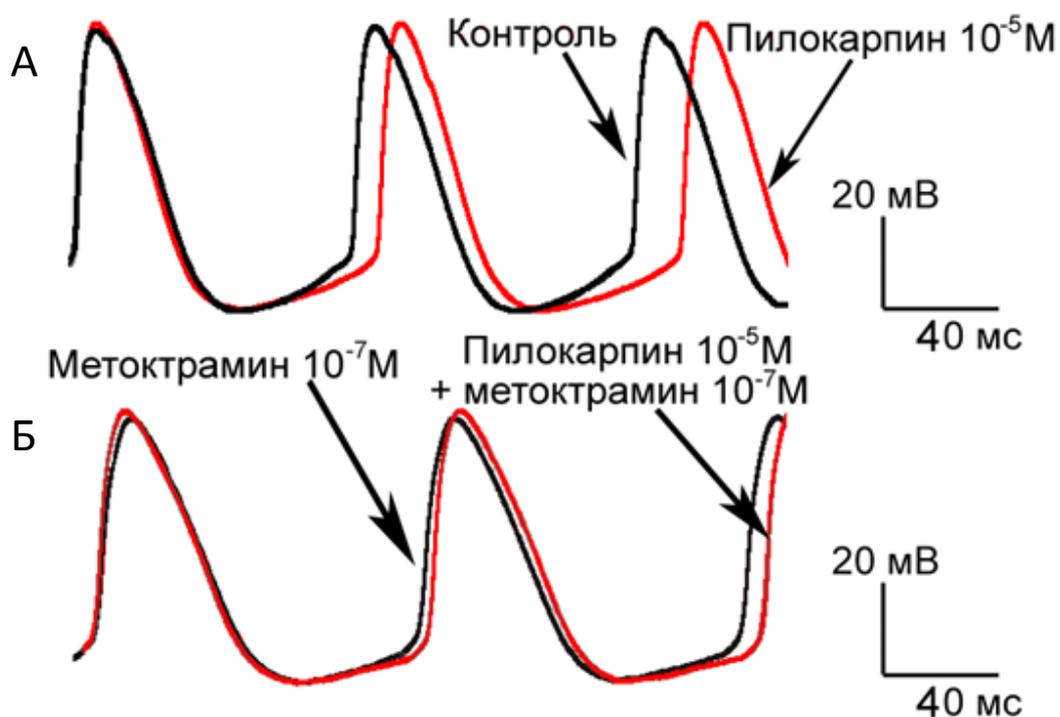


Рисунок 19. Оригинальные записи электрической активности САУ мыши в контроле и при стимуляции холинорецепторов  $10^{-5}$ М пилокарпина в норме (А), а также на фоне блокады М2-рецепторов метоктрамином (Б).

Таким образом, полученные нами в электрофизиологических экспериментах результаты позволяют предположить, что М3-холинорецепторы могут участвовать в опосредовании типичных холинергических эффектов в пейсмекере сердца мыши. Эти эффекты следующие: замедление ритма САУ, уменьшение крутизны МДД и увеличение скорости нарастания фронта ПД в САУ. Замедление ритма при стимуляции М3-рецепторов может быть связано с изменениями работы механизма «кальциевых часов». Путем активации фосфоинозитидного каскада внутриклеточной сигнализации стимуляция М3-рецепторов приводит к выходу  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума через инозитолтрифосфатные рецепторы. Следовательно, уровень кальция в цистернах ретикулума снижается, а значит и увеличивается время, необходимое для их наполнения до порогового уровня, при котором возникает локальный выброс кальция (ЛВК). С другой стороны, активация  $I_{\text{KM3}}$  может приводить к небольшой гиперполяризации мембраны клеток САУ, которую мы не смогли обнаружить вследствие несовершенства методики. Гиперполяризация с одной стороны способствует замедлению ритма за счет увеличения МДП, с другой стороны делает возможным выход из инактивированного состояния и последующую потенциалзависимую активацию каналов быстрого натриевого тока нейронального типа, присутствующих в клетках центральной части САУ мыши [Maier et al.,

2003]. Последнее обстоятельство приводит к увеличению крутизны переднего фронта ПД, наблюдаемой при стимуляции М3-рецепторов.

Вместе с тем нельзя не отметить скромные величины наблюдаемых эффектов селективной активации М3-рецепторов в САУ мыши. Качественных отличий этих эффектов от изменений электрической активности под действием неизбирательной активации М-рецепторов обнаружено не было. Поэтому, несмотря на полученные первые свидетельства в пользу возможного участия М3-рецепторов в парасимпатической регуляции синусного ритма, окончательное решение этого вопроса требует более комплексного экспериментального подхода.

#### **4.1.2.2. Исследование влияния избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на параметры ПД в препарате ушка правого предсердия мыши**

Для оценки возможного вклада М1-рецепторов в наблюдаемые эффекты нами была проведена серия экспериментов с использованием пирензепина ( $10^{-7}$ М) на фоне аппликации пилокарпина. Результаты оказались сходными с полученными на сердце крысы. Селективная блокада М1-рецепторов приводит к незначительным изменениям выраженности эффектов пилокарпина.

В рабочем предсердном миокарде мыши пилокарпин вызывает выраженное уменьшение длительности ПД рабочего миокарда, как в норме, так и на фоне блокады М2-холинорецепторов (рис. 20). При использовании метоктрамина действие пилокарпина на ДПД50 и ДПД90 (длительность потенциала действия на уровне 50% и 90% реполяризации) составляет соответственно  $14,1 \pm 3,63\%$  и  $25,3 \pm 3,84\%$ , а при одновременном использовании метоктрамина и 4-DAMP уменьшение ДПД50 и ДПД90 полностью подавляется. Это по всей видимости показывает, что в данном случае метоктрамин полностью подавляет активность М2-рецепторов, и все наблюдаемые эффекты обусловлены активацией М3-рецепторов.

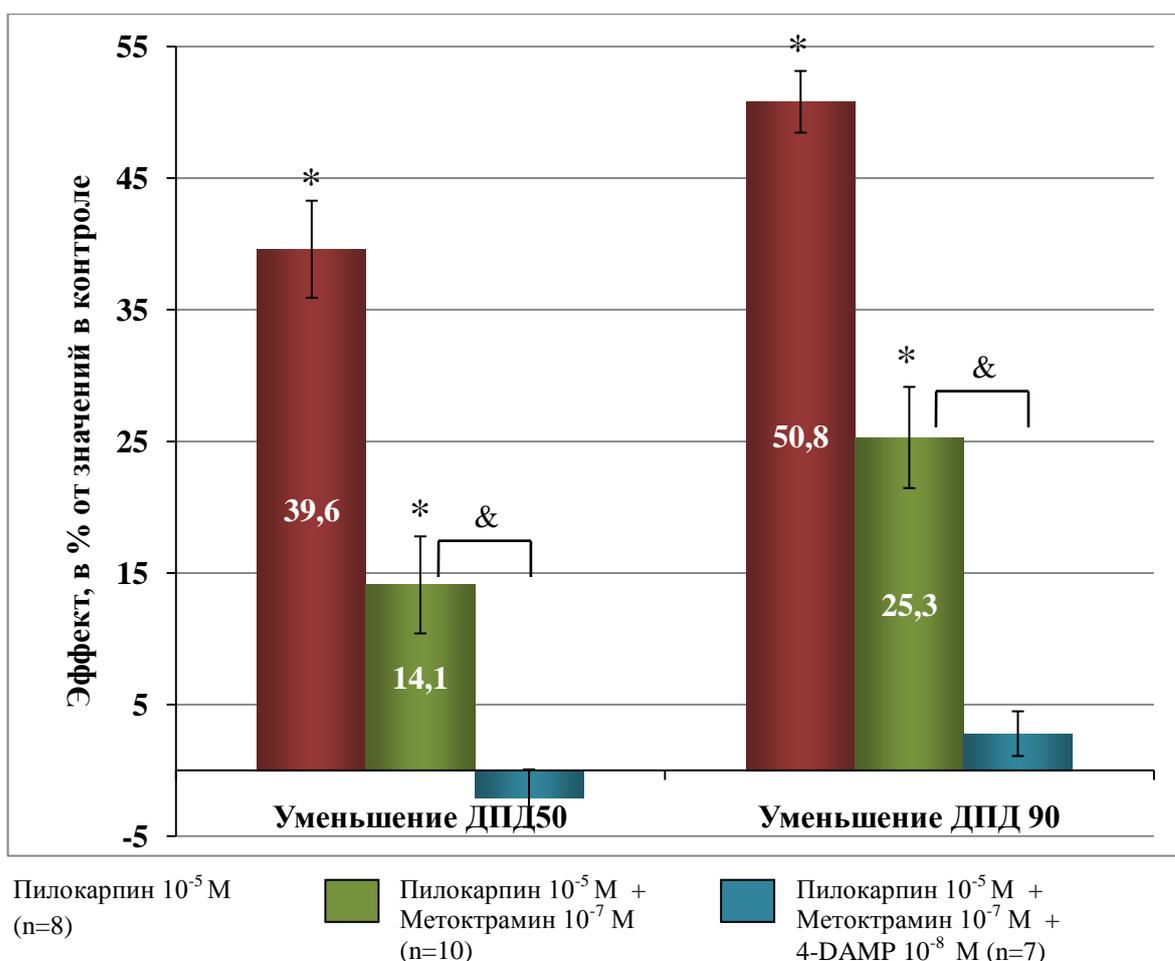


Рисунок 20. Эффекты избирательной стимуляции М3-холинорецепторов в рабочем предсердном миокарде мыши пилокарпином, а также уменьшение этих эффектов при блокаде М3-рецепторов  $10^{-8}$ М 4-DAMP: укорочение ПД на уровне 50% и 90% реполяризации под действием пилокарпина в норме, на фоне блокады М2-рецепторов метоктрамином, на фоне блокады М2- и М3-холинорецепторов. По оси ординат: соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ , & - достоверность различия, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

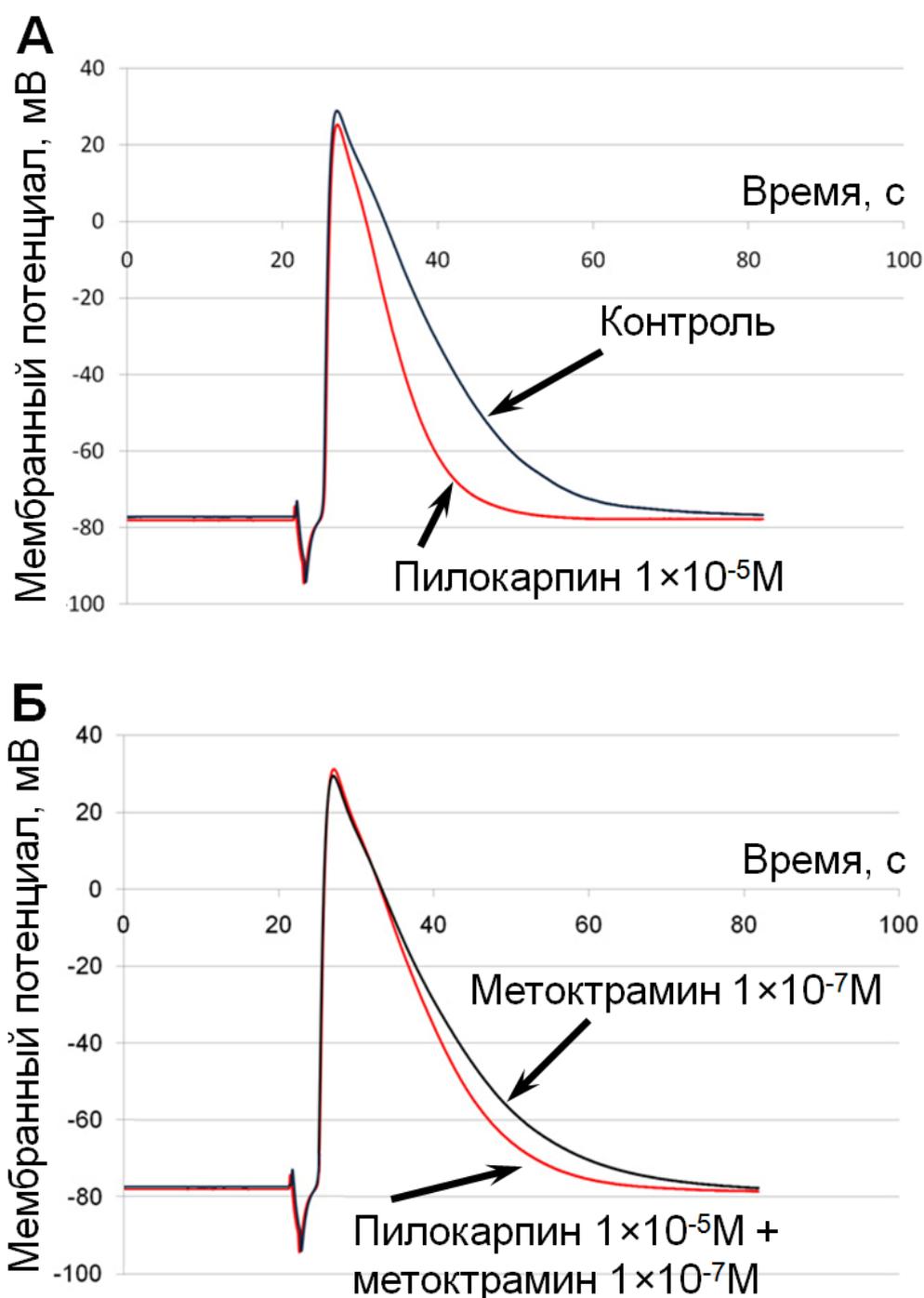


Рисунок 21. Оригинальные записи электрической активности, демонстрирующие изменение конфигурации ПД в рабочем миокарде правого предсердия мыши при стимуляции холинорецепторов  $10^{-5} \text{M}$  пилокарпином в норме (А) и на фоне блокады М2-рецепторов метоктрамином  $10^{-7} \text{M}$  (Б).

Таким образом, синтетический холиномиметик пилокарпин вызывает уменьшение ДПД в рабочем предсердном миокарде мыши на фоне аппликации блокатора М2-рецепторов метоктрамина. При этом видно, что выбранная нами схема избирательной стимуляции М3-рецепторов работает хорошо, поскольку все эффекты, наблюдаемые при совместной

аппликации пилокарпина и метокрамина, полностью снимаются применением селективного агониста М3-рецепторов 4-DAMP.

#### **4.1.2.3. Действие избирательной активации М3-рецепторов пилокарпином на электрическую активность правого желудочка мыши**

Для оценки холинэргических влияний в сердце мыши на завершающем этапе электрофизиологических исследований необходимо было оценить влияние избирательной активации М3-холинорецепторов на параметры электрической активности в правом желудочке, поскольку именно влияния на желудочковый миокард наиболее важны для регуляции насосной функции сердца.

Для оценки влияния веществ на желудочковый миокард определяли изменения длительности ПД (на уровне 50% и 90% реполяризации, соответственно ДПД50 и ДПД90), в нормальных условиях и во время перфузии раствором, содержащим синтетический агонист мускариновых рецепторов пилокарпин в концентрации  $10^{-5}$  М и содержащим антагонисты М2- и М3-рецепторов метоктрамин  $10^{-7}$  М и 4-DAMP  $10^{-8}$  М соответственно.

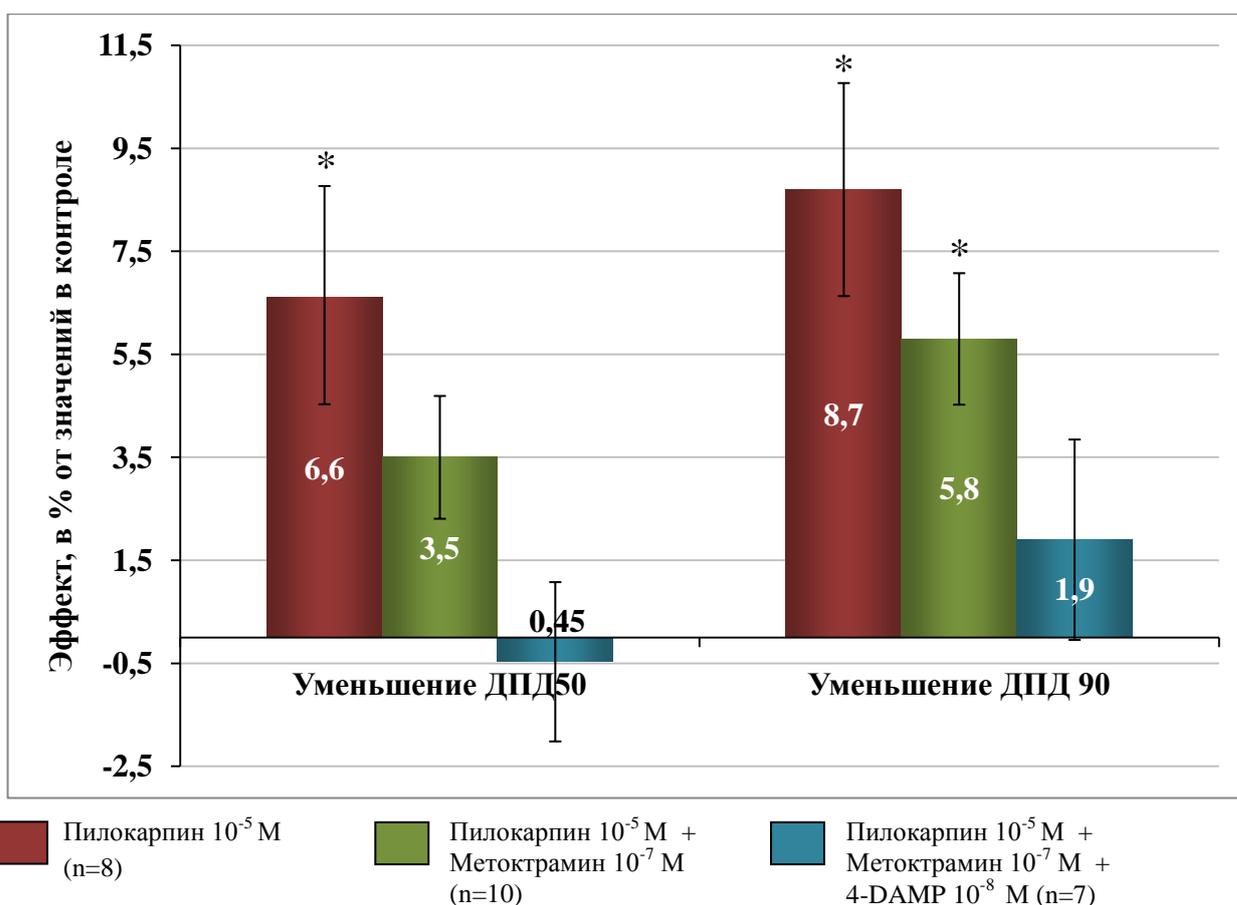


Рисунок 22. Эффекты избирательной стимуляции М3-холинорецепторов в рабочем желудочковом миокарде мыши пилокарпином, а также уменьшение этих эффектов при блокаде М3-рецепторов  $10^{-8}$ М 4-DAMP: укорочение ПД на уровне 50 и 90% реполяризации под действием пилокарпина в норме, на фоне блокады М2-рецепторов метоктрамином, на фоне блокады М2- и М3-холинорецепторов. По оси ординат: соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ , & - достоверность различия, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

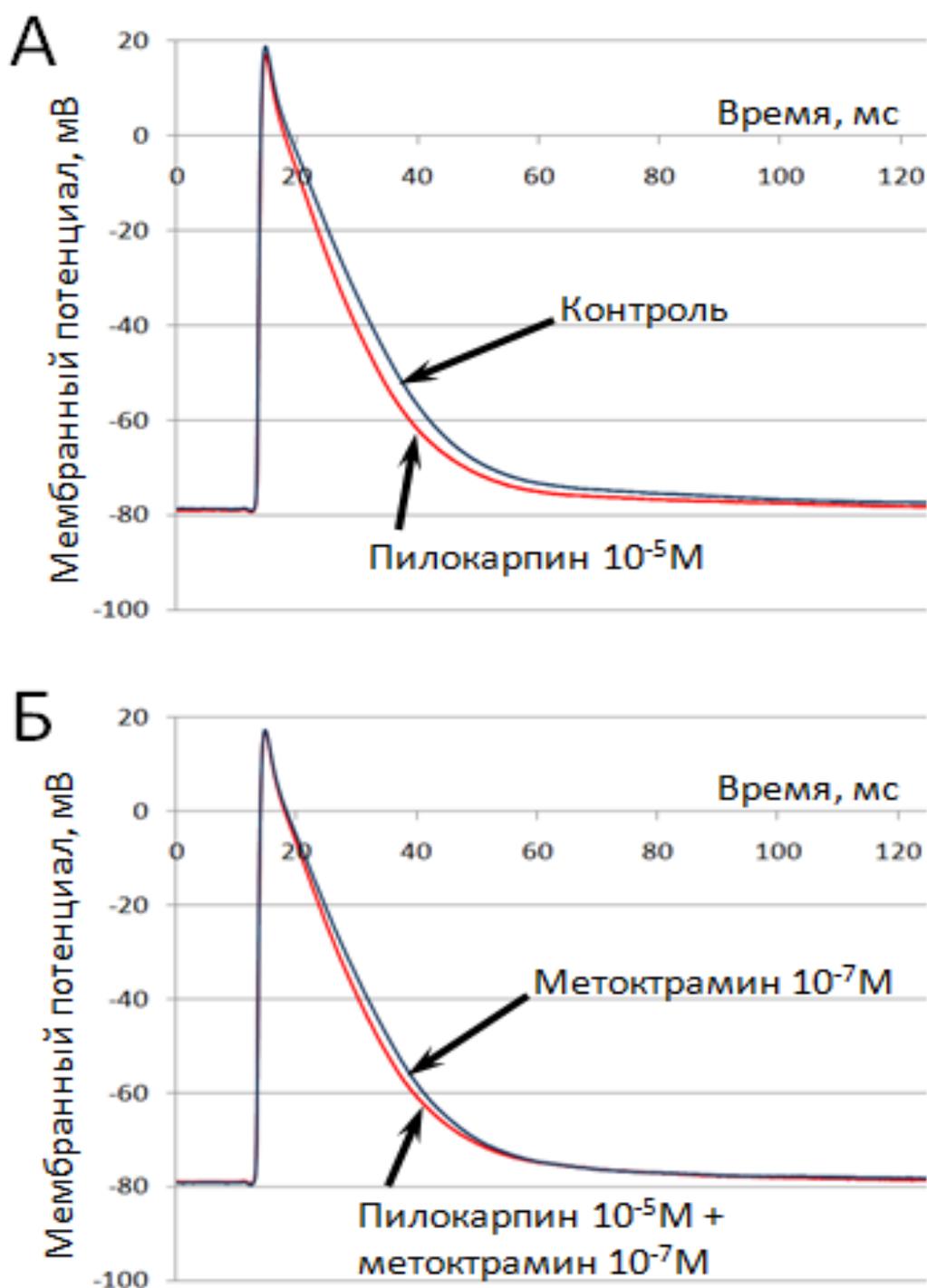


Рисунок 23. Оригинальные записи электрической активности, демонстрирующие изменения конфигурации ПД в рабочем миокарде правого желудочка мыши при стимуляции холинорецепторов  $10^{-5}$ М пилокарпином в норме (А) и на фоне блокады М2-рецепторов метоктрамином  $10^{-7}$ М (Б).

Как показано на рис. 22 и 23, пилокарпин вызывает слабо выраженное уменьшение длительности ПД рабочего желудочкового миокарда как в норме, так и на фоне блокады М2-холинорецепторов. Причем если в первом случае достоверно как уменьшение ДПД50, так и ДПД90, то в присутствие метоктрамина достоверный эффект наблюдался лишь на уровне 90%

реполяризации. При одновременном использовании метоктрамина и 4-DAMP уменьшение как ДПД50, так и ДПД90 становится незначительным. Отметим, что полного подавления холинергических эффектов при использовании 4-DAMP совместно с метоктрамином, наблюдаемого в рабочем предсердном миокарде, в желудочковом миокарде не происходит.

#### 4.1.2.4. Сравнение действия пилокарпина на параметры электрической активности предсердий и желудочков мыши

Полученные нами в электрофизиологических экспериментах результаты позволяют предположить, что М3-холинорецепторы могут участвовать в опосредовании типичных холинергических эффектов, в рабочем миокарде как желудочков, так и предсердий (таблицы 6-7). Происходит уменьшение длительности ПД как на уровне 50%, так и 90% реполяризации.

Таблица 6. Уменьшение ДПД в предсердиях и желудочках под действием пилокарпина на уровне 50 % реполяризации.

\*P>0,05 по сравнению с контрольными значениями.

<i>Вещества</i>	<i>Предсердия</i>	<i>Желудочки</i>
Pil	39,6+/-3,69	6,6+/-2,16
Pil+Met	14,1+/-3,71	3,5+/-1,19
Pil+Met+4-DAMP	-2,1+/-2,18	-0,47+/-1,54

Таблица 7. Уменьшение ДПД в предсердиях и желудочках мыши под действием пилокарпина на уровне 90 % реполяризации.

\*P>0,05 по сравнению с контрольными значениями.

<i>Вещества</i>	<i>Предсердия</i>	<i>Желудочки</i>
Pil	50,8+/-2,34	8,7+/-2,06
Pil+Met	25,3+/-3,84	5,8+/-1,27
Pil+Met+4-DAMP	2,8+/-1,7	1,9+/-1,94

Как видно из таблицы 6 и 7 при совместной активации М2- и М3-рецепторов на уровне 50% (предсердия - 39,6+/-3,69%, желудочки - 6,6+/-2,16%) и 90% (предсердия - 50,8+/-2,34%, желудочки - 8,7+/-2,06%) реполяризации эффекты пилокарпина выражены значительно сильнее в предсердиях, чем в желудочках. Эти различия достоверны в обоих случаях, поэтому у мыши,

как и у крысы, по всей видимости, количество М-рецепторов в предсердиях выше, чем в желудочках.

Избирательная стимуляция МЗ-рецепторов так же приводит к уменьшению ДПД, однако эффект значительно менее выражен. На уровне 50% реполяризации эффект пилокарпина на фоне блокады М2-рецепторов составил для предсердий  $14,1 \pm 3,71\%$ , для желудочков  $3,5 \pm 1,19\%$ . На 90% -  $25,3 \pm 3,84\%$  и  $5,8 \pm 1,27\%$  для предсердий и желудочков, соответственно. Таким образом, для МЗ-рецепторов наблюдается аналогичная ситуация – в правом предсердии плотность рецепторов выше, чем в правом желудочке.

Если оценивать вклад МЗ-рецепторов в эффекты, вызванные пилокарпином в предсердиях и желудочках, то наблюдается следующая картина – отношение для предсердий составит 0,36 для 50% реполяризации и 0,5 для 90%, для желудочков - 0,53 и 0,67 соответственно. Мы можем предположить, что в желудочках МЗ-рецепторы составляют несколько большую часть от общего количества мускариновых рецепторов, чем в предсердиях. Однако эти различия не столь велики, как мы наблюдали у крысы. Поэтому только дополнительные иммуногистохимические и молекулярно-биологические исследования помогут ответить на этот вопрос.

Итак, мы показали электрофизиологическими методами наличие мускариновых рецепторов третьего типа в предсердиях и желудочках мышцы. Эффекты избирательной стимуляции МЗ-рецепторов оказались аналогичными увиденными нами у крысы – пилокарпин на фоне метокрамина вызывает уменьшение ДПД на уровне 50% и 90% реполяризации. Так же основываясь на полученные нами данные можно предположить, что и общая плотность мускариновых рецепторов и количество МЗ-рецепторов в предсердиях выше, чем в желудочках. Однако эти предположения требуют дополнительных исследований.

#### **4.1.3. Иммуногистохимическое исследование миокарда различных отделов сердца мышцы на наличие рецепторных белков М2- и МЗ-рецепторов**

В предыдущем исследовании мы показали, что МЗ-рецепторы содержатся во всех структурах сердца грызунов. Однако электрофизиологические методы позволяют лишь косвенно оценить уровень экспрессии рецепторных белков мускариновых рецепторов различных отделах сердца, поскольку разница в уровне выраженности физиологических эффектов, так же может быть связана с различной интенсивностью работы внутриклеточных каскадов, задействованных в их реализации. Поэтому логичным следующим шагом в нашем исследовании стало использование метода иммуногистохимического окрашивания на наличие

M2- и M3-холинорецепторов в рабочем предсердном и желудочковом миокарде, а также в области САУ мыши. В ходе работы использовалось двойное окрашивание препаратов – окраска на соответствующий тип мускариновых рецепторов, и на коннексин Сх43. Окраска на коннексин Сх43, использовалась с одной стороны для определения центральной части САУ, как области, лишенной этого коннексина [Liu et al., 2007]. С другой – для проверки полученных ранее на изолированных кардиомиоцитах человека данных о колокализации Сх43 и M3-рецепторов во вставочных дисках рабочих кардиомиоцитов [Wang et al., 2001].

#### **4.1.3.1. Иммуногистохимическое окрашивание препарата правого предсердия мыши**

Данные о наличии и распределении того или иного типа мускариновых рецепторов в правом желудочке мыши отсутствуют. Хотя ранее методом автордиографии было показано наличие и локализация M-рецепторов в САУ и рабочем предсердном миокарде млекопитающих [Beau et al., 1995; Rodefeld et al., 1996], остается неясной принадлежность этих рецепторов к тем или иным подтипам.

На рис.24 представлены репрезентативные фотографии межвенной области правого предсердия, окрашенной антителами к коннексину 43 и M2-рецепторам (объектив 10х, масштаб 200мкм). Отсутствие окраски на коннексин 43 в центре фотографии (рис 24, Б) говорит о местоположении центральной части САУ на данном препарате. При этом отчетливо видно, что в центральной области САУ интенсивность зеленой окраски существенно выше, чем в окружающем рабочем миокарде (рис.24,А). Это обстоятельство по-видимому указывает на большую плотность M2-рецепторов в синоатриальной ткани по сравнению с рабочим миокардом.

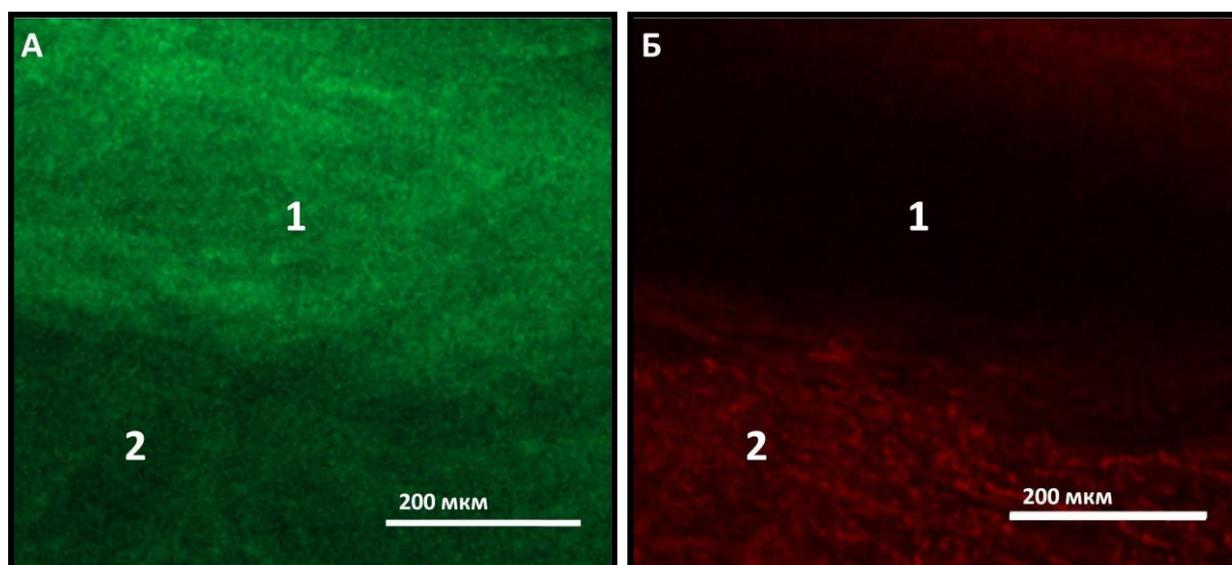


Рисунок 24. Иммуногистохимическое окрашивание участка межвенной области правого предсердия на M2-рецепторы (А) и коннексин 43 (Б). Виден переход от ткани САУ к рабочему предсердному миокарду. 1 – область САУ, 2 – рабочий миокард. Объектив 10х.

Аналогичную картину можно наблюдать и на препаратах, окрашенных на коннексин и M3-рецепторы (рис.25). На представленной фотографии, сделанной при десятикратном увеличении хорошо видна граница между САУ и рабочим миокардом (рис.25, Б). Заметны пучки волокон, экспрессирующих коннексин 43, которые вдаются и проникают в ткань САУ, клетки которого не прокрашиваются anti-Cx43. На границе САУ и рабочего миокарда возникает переходная область, где содержатся клетки обоих типов. При этом в случае с окраской на M3-рецепторы наблюдается более плавный переход и отсутствует столь резкая граница между тканью САУ и рабочим миокардом (рис.25, А). По-видимому, плотность рецепторов постепенно снижается в направлении от центра синусного узла к рабочему миокарду.

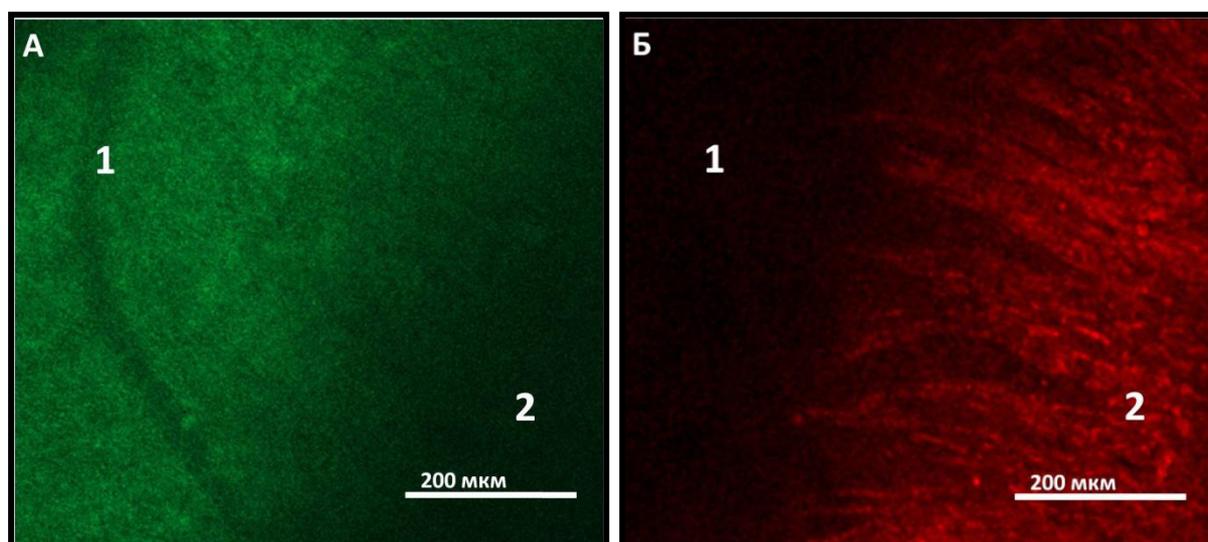


Рисунок 25. Иммуногистохимическое окрашивание участка межвенной области правого предсердия на М3-рецепторы (А) и коннексин 43 (Б). Виден переход от ткани САУ к рабочему предсердному миокарду. 1 – область САУ, 2 – рабочий миокард. Объектив 10х.

На следующей серии фотографий показан участок центральной части САУ при большом увеличении. О принадлежности этого участка к синоатриальной ткани говорит практически полное отсутствие окраски на коннексин (рис. 26Б). На фотографии, полученной при освещении видимым светом, заметно, что клетки САУ не имеют палочковидной формы и поперечной исчерченности, которая характерна для рабочих кардиомиоцитов (рис.26А).

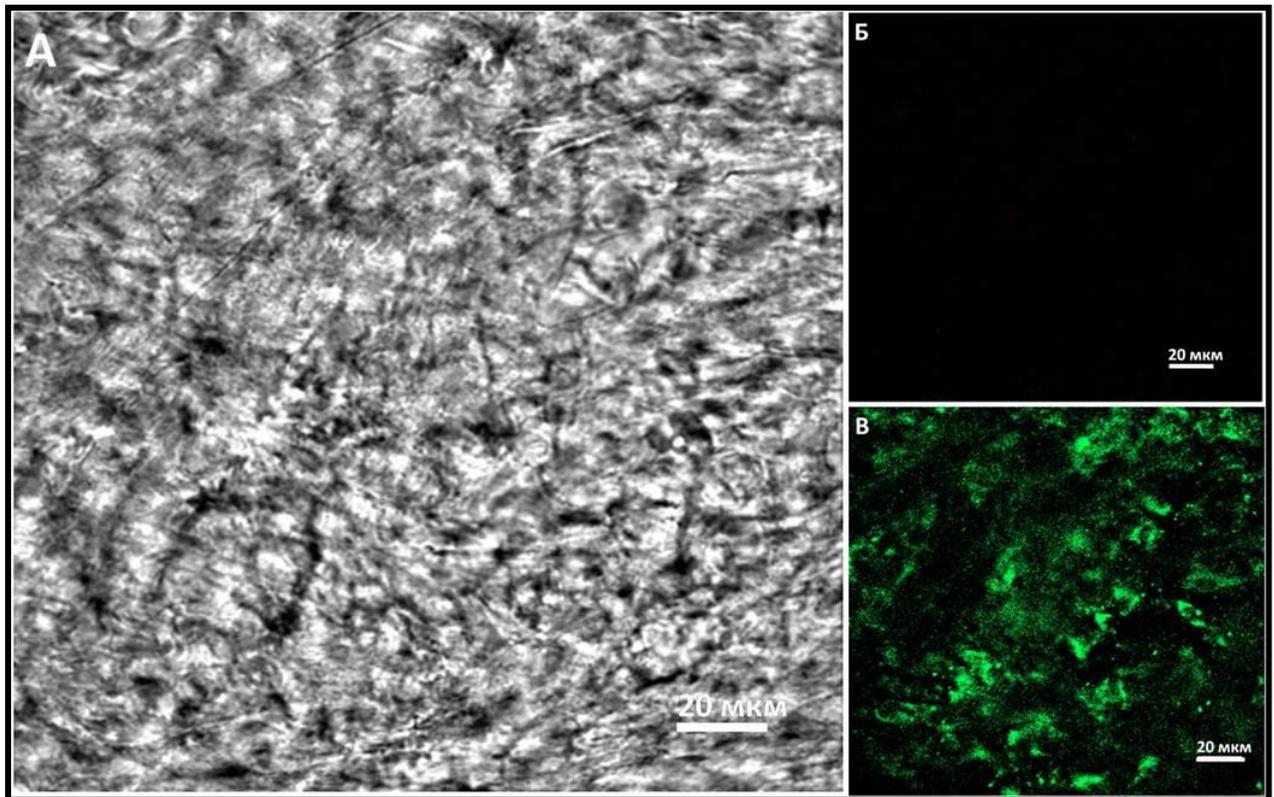


Рисунок 26. Иммуногистохимическое окрашивание участка центральной части САУ мыши на коннексин Сх43 (Б) и МЗ-рецепторы (В). А – фотография, полученная при видимом свете. Маслоиммерсионный объектив 63х.

На границе области САУ и рабочего миокарда можно наблюдать волокна, маркированные Сх43, внедряющиеся в ткань САУ. Пример такого изображения представлен на рис. 27. Видно волокно рабочего миокарда, интенсивно окрашенное на коннексин Сх43 (рис. 27Б) и имеющее характерную для сердечной мышцы поперечнополосатую исчерченность (рис. 27А), окруженное тканью САУ, не экспрессирующей Сх43. Хорошо заметно, что МЗ-рецепторы экспрессируются как в этом волокне, так и собственно в клетках САУ.

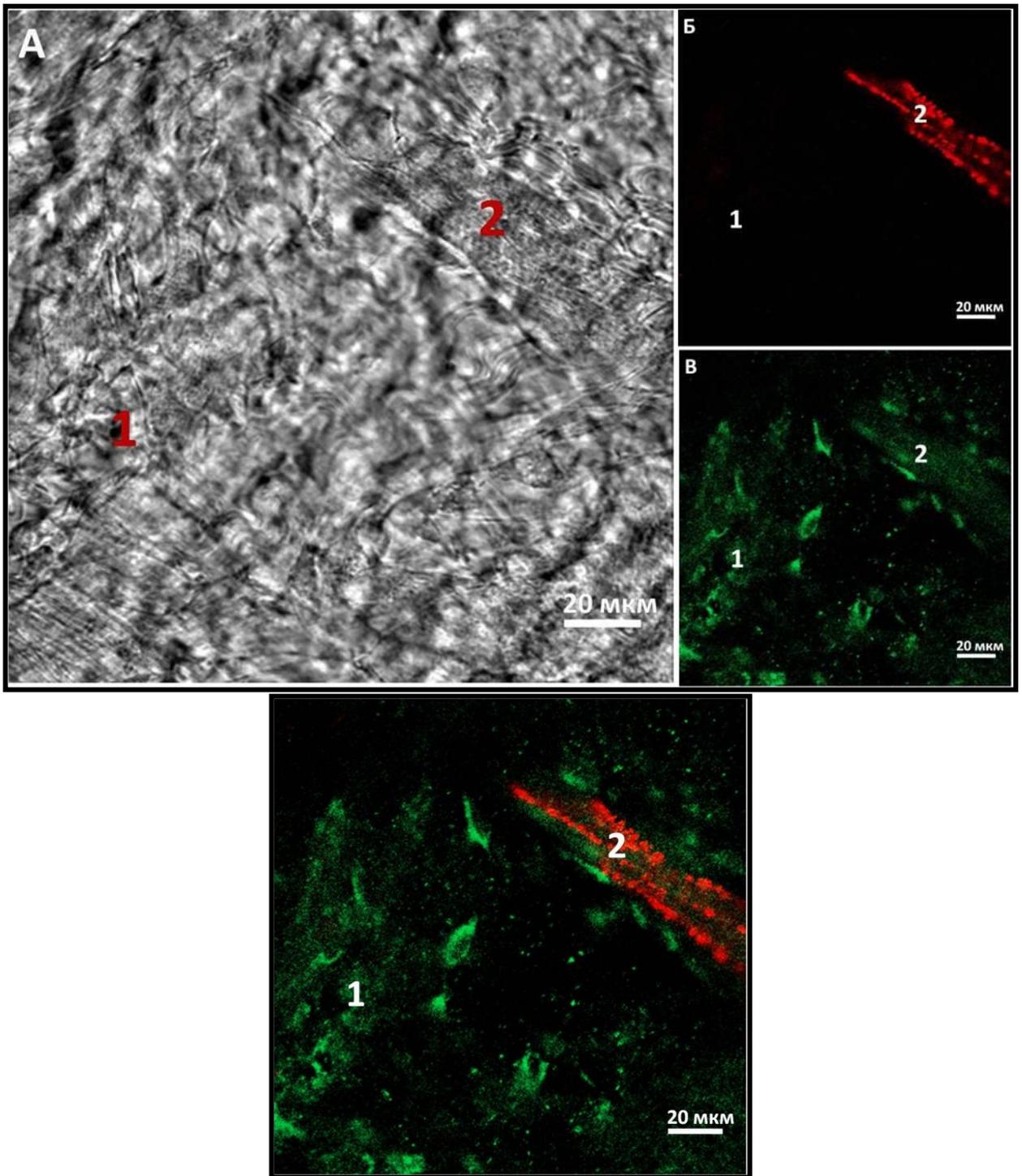


Рисунок 27. Иммуногистохимическое окрашивание участка периферии САУ мыши на коннексин Сх43 (Б) и М3-рецепторы (В). А – фотография, полученная при видимом свете. Г – изображение с наложением окраски на Сх43 и М3-рецепторы. Маслоиммерсионный объектив 63х. 1 – ткань САУ, 2 – волокно, имеющее поперечную исчерченность.

При исследовании изображений области рабочего миокарда правого предсердия наблюдаются волокна, имеющие четко выраженную поперечнополосатую исчерченность (рис.28А). В этой области присутствуют как Сх43, так и М3-холинорецепторы (рис.28Б,В).

Хорошо заметно, что окраска на коннексин Сх43 распределена по участку миокарда крайне неравномерно: видны небольшие яркие скопления коннексина (рис. 28Б). Напротив, окраска на М3-рецепторы распределена достаточно равномерно, без плотных скоплений.

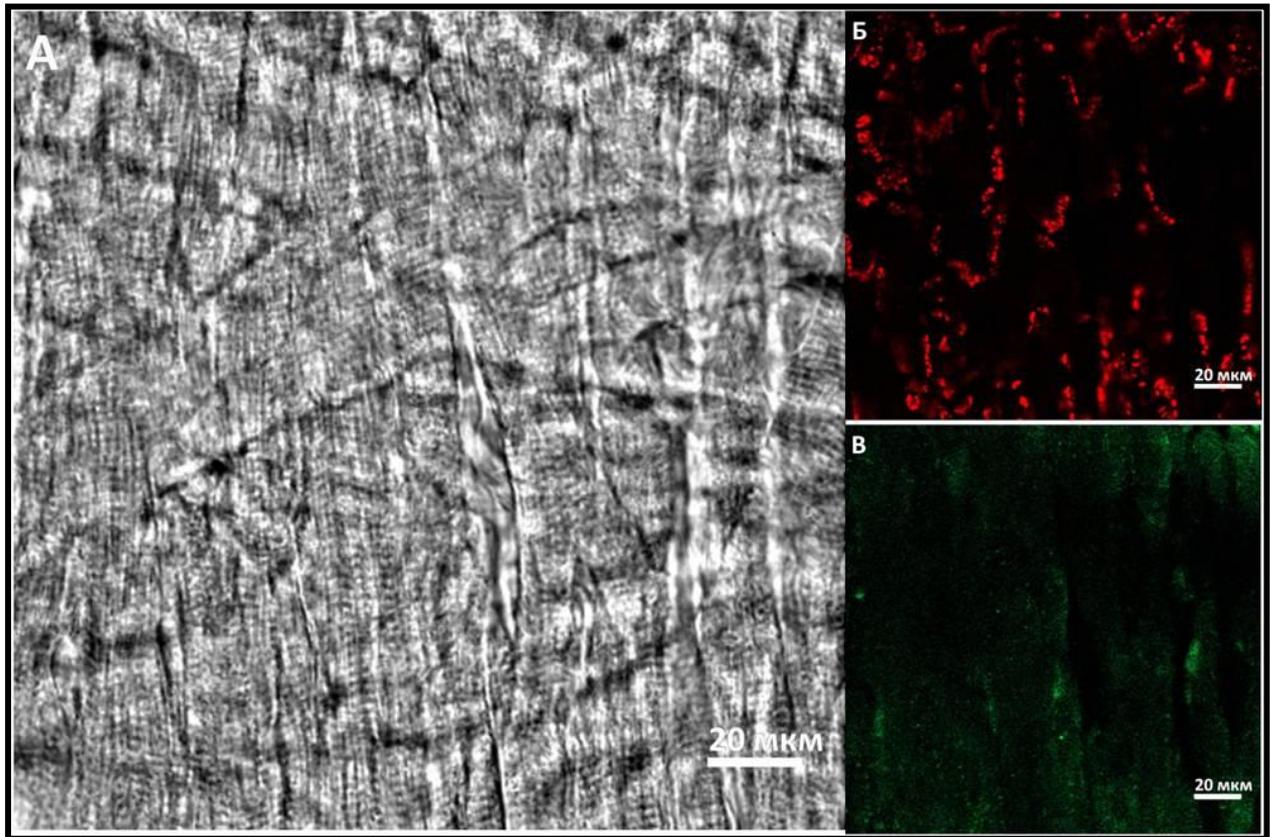


Рисунок 28. Иммуногистохимическое окрашивание участка рабочего миокарда правого предсердия мыши на коннексин Сх43 (Б) и М3-рецепторы (В). А – фотография, полученная при видимом свете. Маслоиммерсионный объектив 63х.

Ниже представлены изображения участков САУ (рис. 29), рабочего предсердного миокарда (рис. 31) и пограничной области (рис. 30), окрашенных на Сх43 и М2-рецепторы. Наблюдаются те же закономерности, что и в случае М3-рецепторов. Однако, М2-рецепторы в рабочем миокарде образуют в отличие от М3-рецепторов плотные яркие скопления, которые однако меньше по размеру, чем скопления Сх43 и не колокализуются с ними (рис. 31).

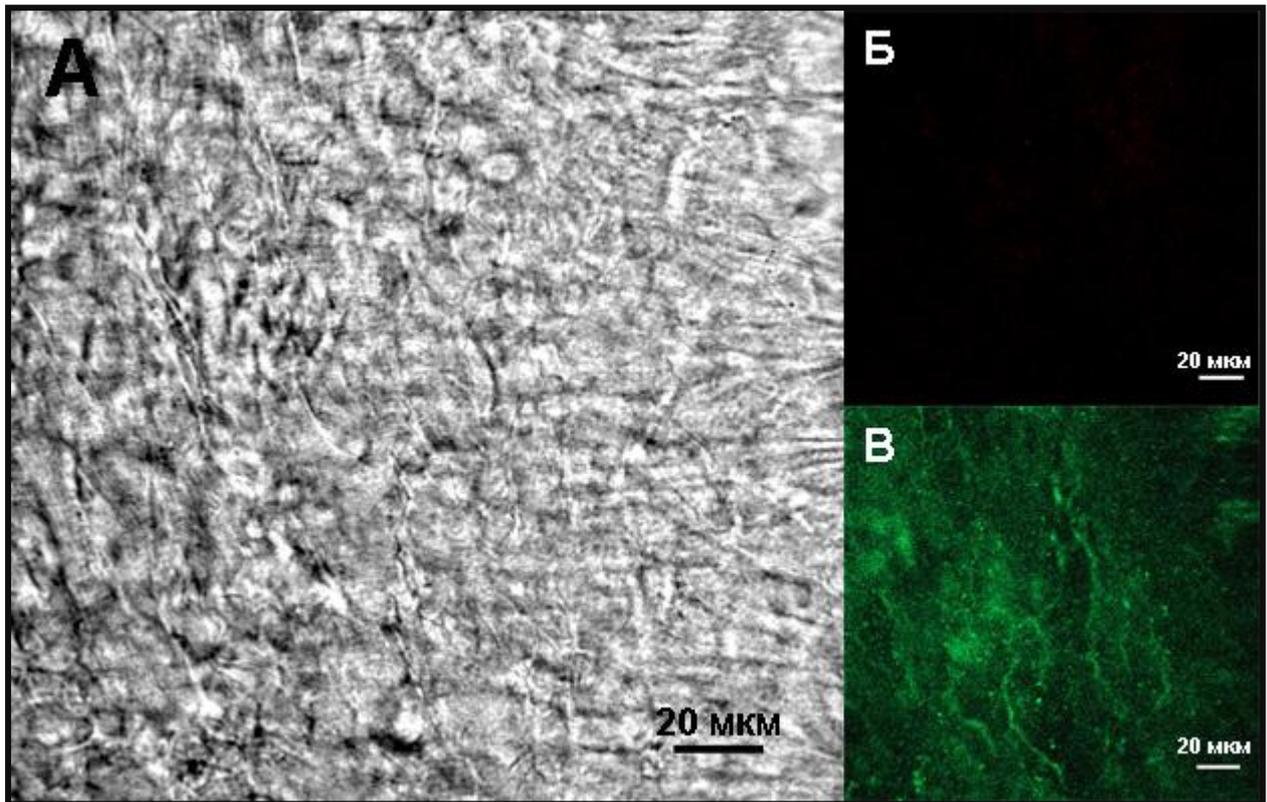


Рисунок 29. Иммуногистохимическое окрашивание участка центральной части САУ мыши на коннексин Сх43 (Б) и М2-рецепторы (В). А – фотография, полученная при видимом свете. Маслоиммерсионный объектив 63х.

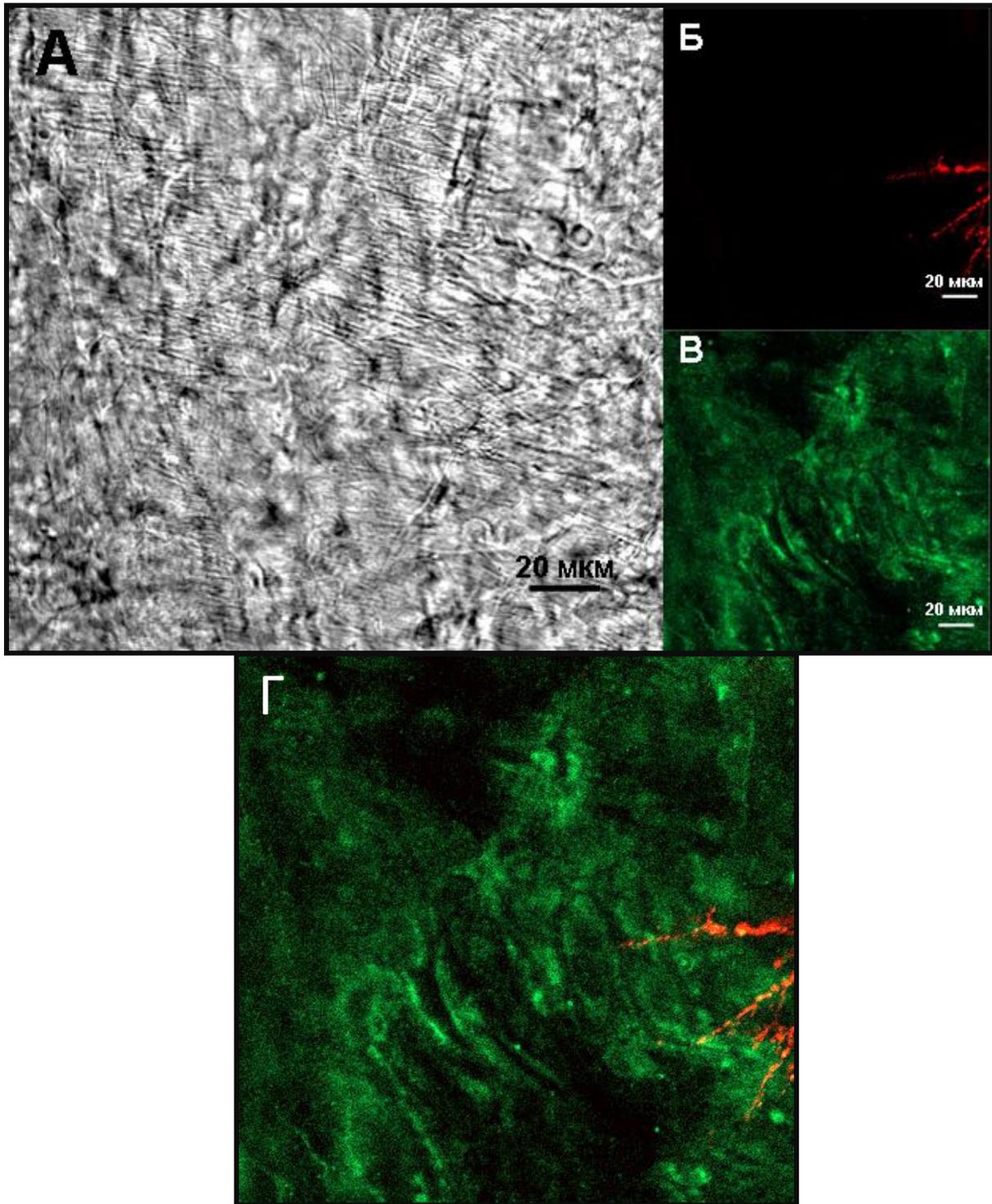


Рисунок 30. Иммуногистохимическое окрашивание участка периферии САУ мышцы на коннексин Сх43 (Б) и М2-рецепторы (В). А – фотография, полученная при видимом свете. Г – изображение с наложением окраски на Сх43 и М2-рецепторы. Маслоиммерсионный объектив 63х.

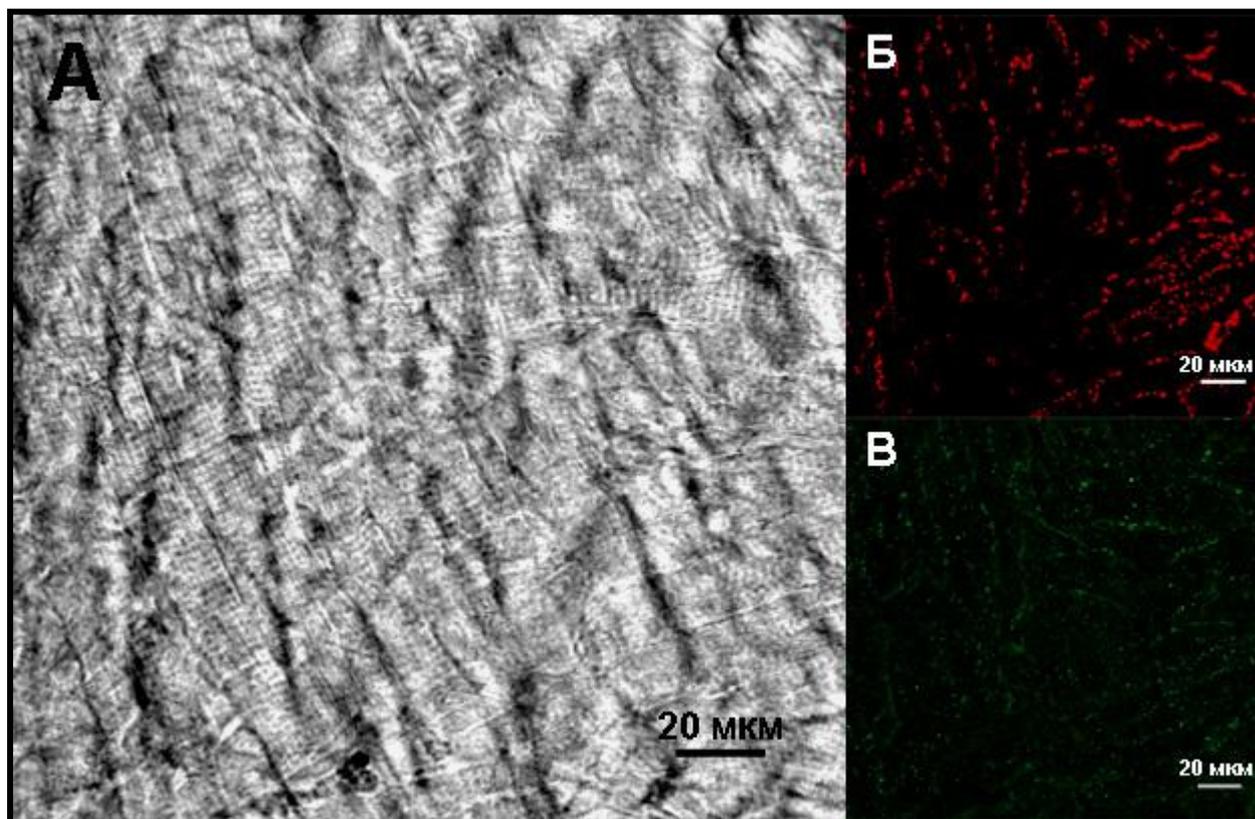


Рисунок 31. Иммуногистохимическое окрашивание участка рабочего миокарда правого предсердия мыши на коннексин Сх43 (Б) и М2-рецепторы (В). А – фотография, полученная при видимом свете. Маслоиммерсионный объектив 63х.

Таким образом, как М2-, так и М3-холинорецепторы обнаруживаются методом иммуногистохимического окрашивания во всех исследованных отделах сердца мыши. Поскольку распределение М-рецепторов в межвенной области представляет особый интерес, мы сопоставили относительную интенсивность флуоресцентной окраски на М2- и М3-рецепторы в центральной части САУ, лишенной коннексина Сх43, и рабочем предсердном миокарде. Оказалось, что интенсивность окраски на М2-рецепторы в центральной части САУ составляет  $181,5 \pm 7,6\%$  ( $n=8$ ) от интенсивности окраски рабочего миокарда. Интенсивность окраски на М3-рецепторы в центре САУ составляет  $232,6 \pm 15,58\%$  ( $n=14$ ). Можно заключить, что плотность мускариновых рецепторов, в особенности 3-го типа, в САУ значительно выше, чем в окружающем рабочем миокарде.

#### 4.1.3.2. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов правого желудочка мыши

Окрашивание желудочков маркерами anti-Сх43 и anti-М2 показало наличие коннексина 43 и М2-рецепторов в ткани (рис. 32). Кардиомиоциты желудочков имеют четко выраженную структуру сердечных волокон, характеризующуюся чередованием актиновых и миозиновых

филаментов (рис. 33А, рис. 35А). При большем увеличении видно, что М2-рецепторы образуют достаточно выраженные скопления, однако не колокализуются с коннексином Сх43 (рис. 33Б,В).

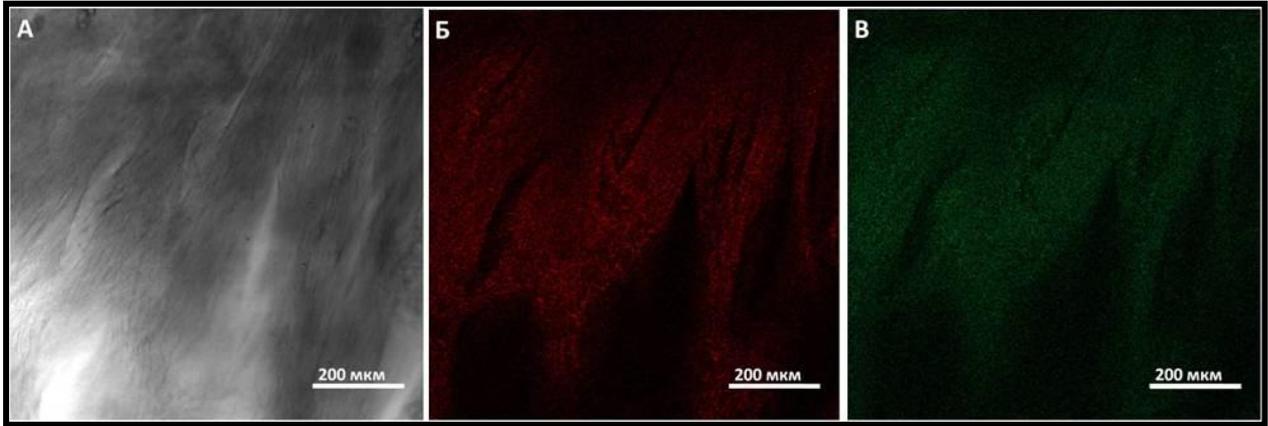


Рисунок 32. Иммуногистохимическое окрашивание миокарда правого желудочка на М2-рецепторы (Б) и коннексин 43 (В). Объектив 10х, масштаб 200мкм.

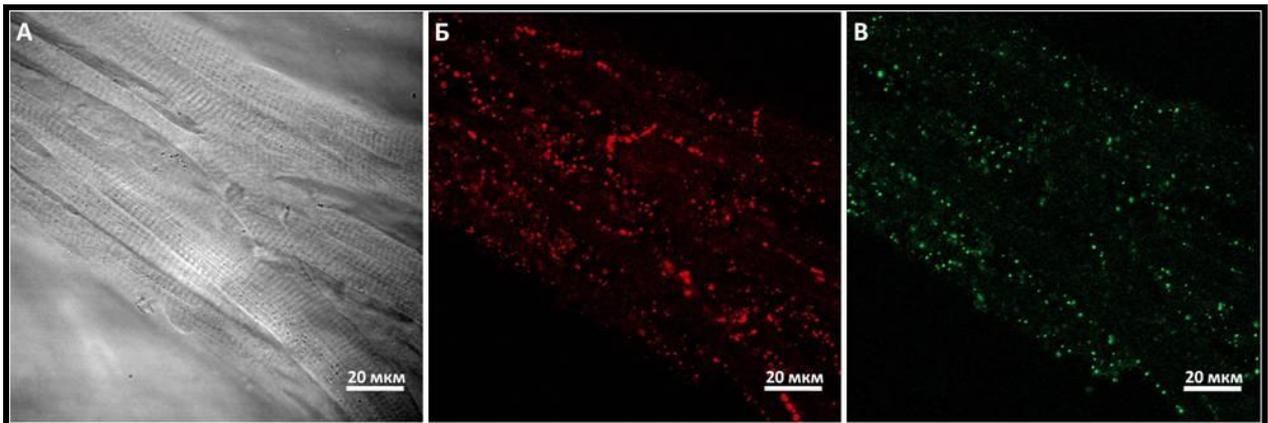


Рисунок 33. Иммуногистохимическое окрашивание миокарда правого желудочка на М2-рецепторы (Б) и коннексин 43 (В). Объектив 63х, масштаб 20мкм.

М3-рецепторы так же присутствуют в рабочем миокарде правого желудочка мыши (рис. 34В). Однако, они локализованы несколько иначе, нежели М2-. При сравнении фотографий рис. 20БВ и рис.22БВ видно, что М3-рецепторы расположены более диффузно нежели М2-. Их локализация также не совпадает с местами контакта между клетками, где мы можем наблюдать коннексин 43.

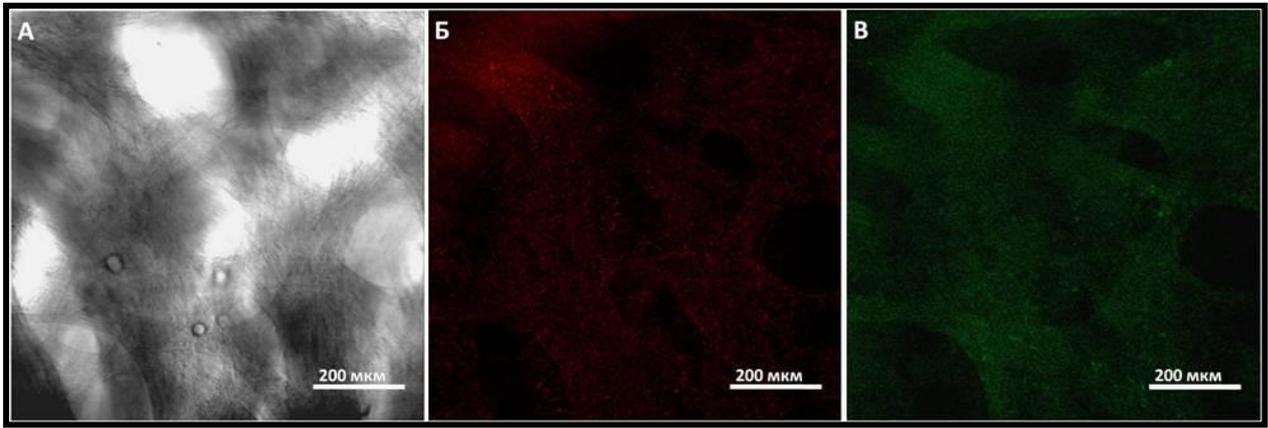


Рисунок 34. Иммуногистохимическое окрашивание миокарда правого желудочка на М3-рецепторы (Б) и коннексин 43 (В). Объектив 10х, масштаб 200мкм.

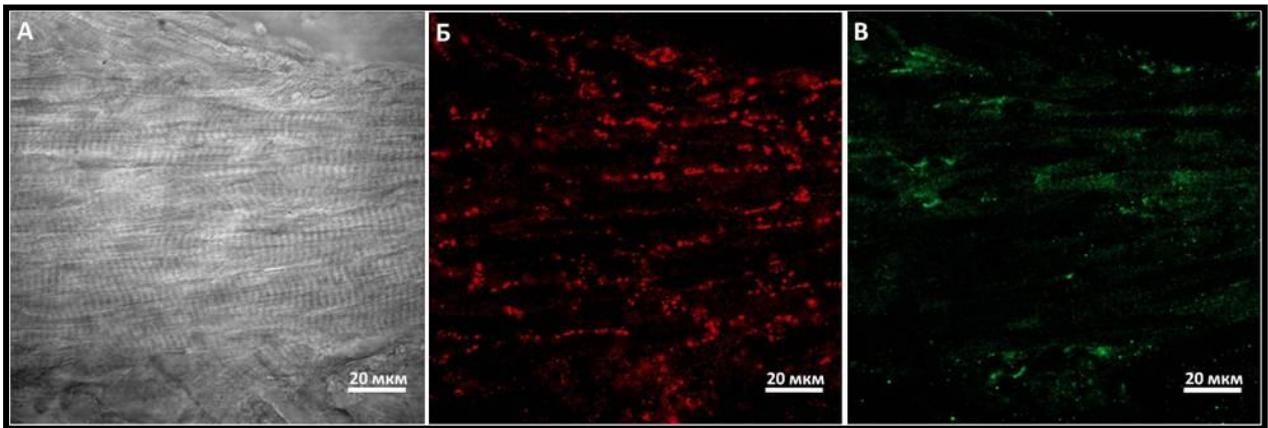


Рисунок 35. Иммуногистохимическое окрашивание миокарда правого желудочка на М3-рецепторы (Б) и коннексин 43 (В). Объектив 10х, масштаб 200мкм.

Таким образом, результаты иммуногистохимического окрашивания препаратов различных отделов сердца мыши можно толковать в пользу сосуществования М2- и М3-рецепторов как в рабочем, так и в пейсмекерном миокарде. Однако, существует ряд существенных ограничений этого метода. В первую очередь нельзя быть абсолютно уверенным в селективности первичных антител, использованных в работе. Инкубация препаратов с BSA позволяла снизить уровень неспецифического связывания антител, но полностью быть уверенным в его отсутствии невозможно.

При анализе данных иммуногистохимии обращает на себя внимание большая плотность окраски на М2- и М3-рецепторы в ткани САУ по сравнению с окружающим рабочим миокардом. Мы посчитали возможным провести количественное сравнение интенсивности окраски в этих двух частях межвенной области, поскольку речь в данном случае идет о разных зонах одного и того же препарата. Полученные данные говорят о том, что плотность М3- и М2-

рецепторов, которая коррелирует с окраской, выше в синоатриальной ткани почти в 2 раза. Это обстоятельство может быть связано с показанной ранее более высокой плотностью иннервации САУ по сравнению с окружающим миокардом [Roberts et al., 1989]. В центральной части САУ плотность нервных окончаний особенно велика, причем их сеть образует «корзину», в которой и заключен центр САУ. Кроме того, ранее при изучении мембранных гомогенатов области САУ и других частей правого предсердия радиолигандным методом было установлено, что наивысшая плотность мускариновых рецепторов в правом предсердии наблюдается именно в САУ [Kurogouchi et al., 2002], однако, не была известна их принадлежность к определенным типам.

Поскольку иммуногистохимическое исследование в нашей работе проводилось не на выделенных клетках, а на ткани миокарда, оно не дает представления относительно субклеточной локализации М2- и М3-холинорецепторов. Однако, имеющиеся изображения не подтверждают данные о колокализации М3-рецепторов и Сх43 в областях вставочных дисков. Скорее наоборот, М2-рецепторы образуют более плотные скопления, иногда колокализующиеся с Сх43, а М3-распределены равномерно.

#### **4.1.4. Измерение уровня экспрессии генов мускариновых рецепторов второго и третьего типа методом ПЦР в реальном времени**

При помощи электрофизиологических и иммуногистохимических методик мы показали наличие мускариновых рецепторов в различных структурах сердца. Однако оба эти подхода не дают надежных представлений о соотношении количества М2- и М3-рецепторов в разных отделах сердца. О недостатке электрофизиологических методов мы говорили ранее. При иммуногистохимических исследованиях в первую очередь перед нами встает проблема кросс-реактивности антител из-за высокой гомологии всех подтипов мускариновых рецепторов [Jositsch et al., 2009]. И хотя для идентификации М3-рецепторов мы использовали антитела к N-концу белка, который сильно отличается по аминокислотной последовательности у второго и третьего типа мускариновых рецепторов, мы не можем исключить эффекта перекрестного окрашивания. Кроме того, этот метод не позволяет сравнивать результаты, полученные для образцов разных тканей – предсердной и желудочковой. Поэтому следующим этапом нашей работы стало применение метода ПЦР в реальном времени (далее РВ-ПЦР), который является значительно более точным. Как уже говорилось, в работе мы использовали праймеры, подобранные к участкам гена, расположенным на стыке интрона и экзона, что позволяет измерять количество только что синтезированных и не сплайсированных мРНК, которые не

могут накапливаться в клетке. Это позволяет более точно оценить уровень транскрипции интересующих нас генов.

#### 4.1.4.1. Измерение уровня экспрессии генов M2- и M3-рецепторов в сердце крысы

Результаты измерения уровня транскрипции генов M2-рецепторов показаны на рисунке 36. Как видно из рисунка, уровень транскрипции мРНК в предсердиях значительно выше, чем в желудочках: 649,85 +/- 198,88 отн. ед. и 56,62 +/- 37,7 отн. ед., соответственно. Таким образом, экспрессия гена M2-рецепторов в предсердиях крысы более чем в 10 раз выше, чем в желудочках. Эти данные согласуются с полученными ранее для сердца человека [Wang et al., 2001; Pérez et al., 2006].

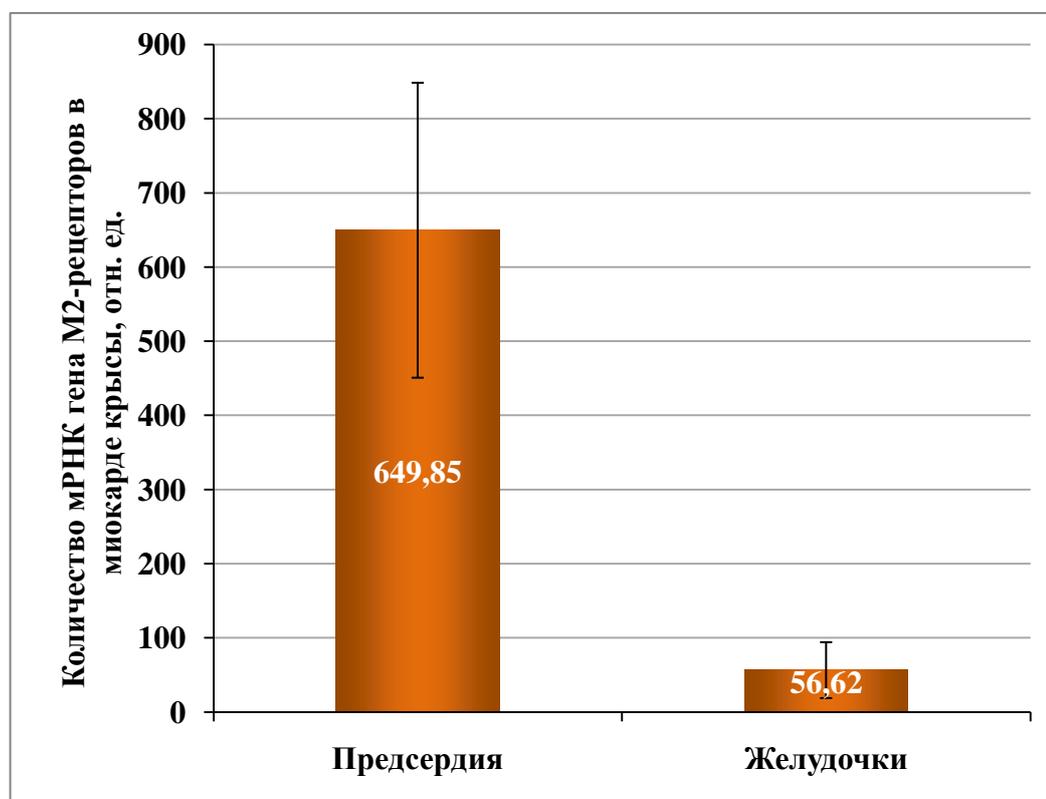


Рисунок 36. Относительный уровень транскрипции гена M2-рецептора (n=6) в миокарде взрослой крысы. По оси ординат отложено относительное количество мРНК в образцах, вычисленное по результатам РВ-ПЦР. Результаты нормированы на количество РНК, выделенной из образцов. Результаты приведены в относительных единицах прибора, на котором проводился РВ-ПЦР.

Для M3-рецепторов ситуация выглядит похожим образом (рис. 37). Относительный уровень экспрессии M3-рецепторов в предсердиях крыс составил 0,99+/-0,29 отн. ед., а в желудочках 0,24+/-0,17 отн. ед. Стоит отметить, что в желудочках мРНК детектировалась не во всех образцах, и ее уровень был очень низок, однако выше, чем в отрицательном контроле. Полученные нами данные противоположны результатам, полученным на тканях сердца

человека, где было показано, что уровень МЗ-рецепторов в желудочках выше, чем в предсердиях [Pérez et al., 2006]. Но результаты молекулярно-биологического исследования, подтверждают данные полученные нами ране в ходе электрофизиологических экспериментов.

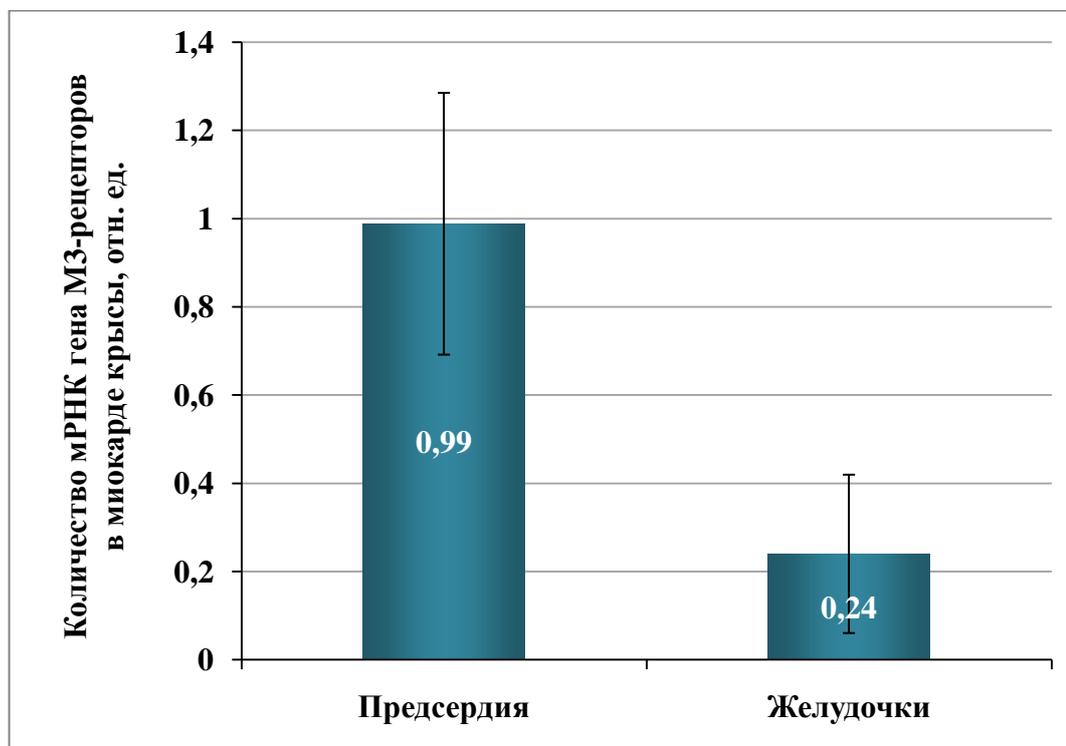


Рисунок 37. Относительный уровень транскрипции гена МЗ-рецептора (n=6) в миокарде взрослой крысы. По оси ординат отложено относительное количество мРНК в образцах, вычисленное по результатам РВ-ПЦР. Результаты нормированы на количество РНК, выделенной из образцов. Результаты приведены в относительных единицах прибора, на котором проводился РВ-ПЦР.

Нормирование результатов проводили на количество РНК, взятое в реакцию обратной транскрипции. Изначально мы собирались производить нормировку результатов на уровень транскрипции гена домашнего хозяйства GAPDH (глицеральдегидфосфат дегидрогеназа, фермент гликолиза). Эти гены выбираются в качестве контрольных, поскольку считается, что уровень их транскрипции одинаков во всех клетках организма. Однако нормировка на референсный ген дала неадекватные результаты, поскольку уровень транскрипции гена GAPDH отличался в предсердиях и желудочках почти на порядок. По всей видимости, это свидетельствует в пользу того, что в клетках желудочков и предсердий различается уровень метаболизма. Поэтому результаты приведены в относительных единицах прибора, на котором проводился РВ-ПЦР.

Итак, методом РВ-ПЦР мы показали, что мРНК обоих исследуемых типов мускариновых рецепторов присутствует и в предсердиях, и в желудочках крысы. Однако в желудочках обнаружено очень малое количество мРНК М3-рецепторов. Уровень транскрипции мРНК и в случае М2-, и в случае М3-рецепторов оказался выше в предсердиях, чем в желудочках. Так, для М2-рецепторов отношение уровня транскрипции в предсердиях к уровню в желудочках составило 11,47, в то время как для М3-рецепторов это отношение 5,7. Также необходимо было оценить отношение М3-рецепторов к М2-рецепторам в сердце (рис. 38). Как видно из представленной диаграммы относительное количество мРНК М3-рецепторов в желудочках оказалось выше (0,42%), чем в предсердиях (0,15%), как мы и предполагали исходя из данных электрофизиологических экспериментов.

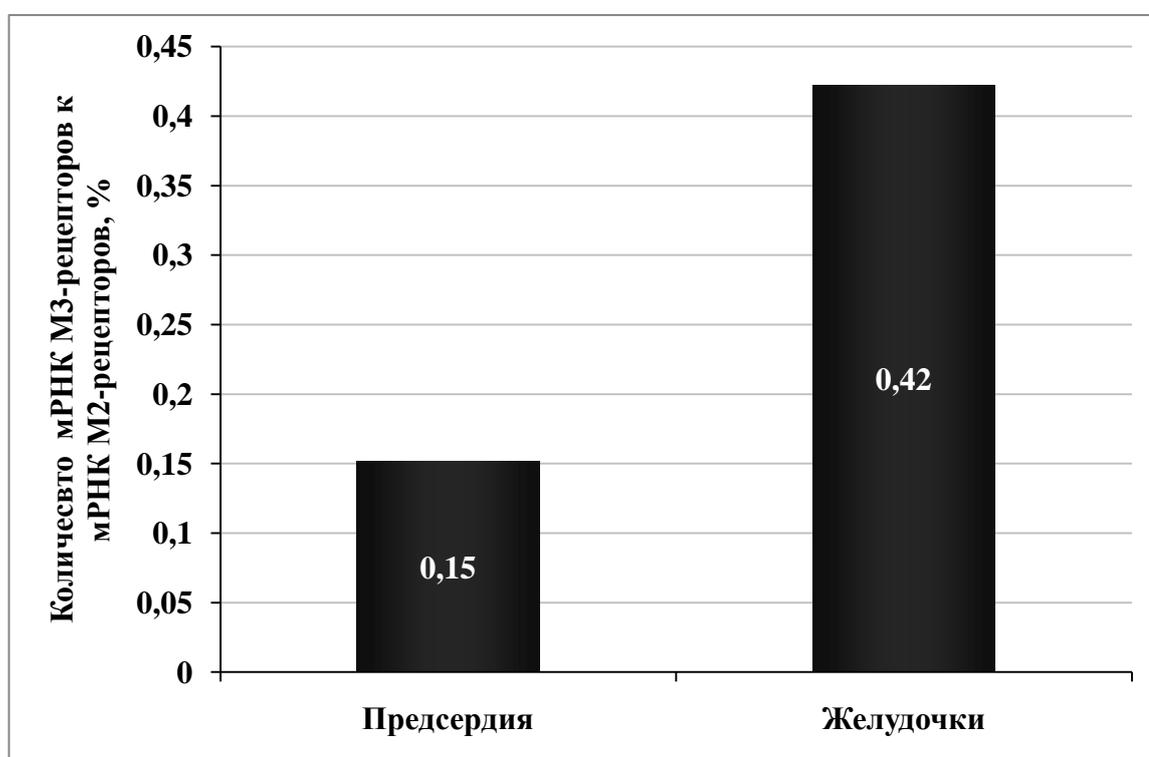


Рисунок 38. Отношение количества мРНК генов М3-рецепторов количеству мРНК М2-рецепторов в предсердиях и желудочках крысы.

Таким образом, мы подтвердили основные результаты электрофизиологических экспериментов. Однако следует отметить, что различия в эффектах стимуляции мускариновых рецепторов многократно ниже, чем различия в уровне экспрессии генов соответствующих рецепторов. Возможно, это связано с посттранскрипционной деградацией мРНК М2-рецепторов или с различиями в эффективности работы внутриклеточных каскадов сигнализации М2- и М3-рецепторов. Для окончательного ответа на этот вопрос в будущем предстоит оценить

относительное количество синтезированных белков M2- и M3-рецепторов доступными методами, например вестерн-блоттингом.

#### 4.1.4.2. Измерение уровня экспрессии генов M2- и M3-рецепторов в различных отделах сердца мыши

Кроме того, мы провели исследования уровня экспрессии генов M2- и M3-рецепторов в синоатриальном узле, рабочем предсердном и желудочковом миокарде мыши. Данные этих экспериментов представлены на рисунках 39 и 40.

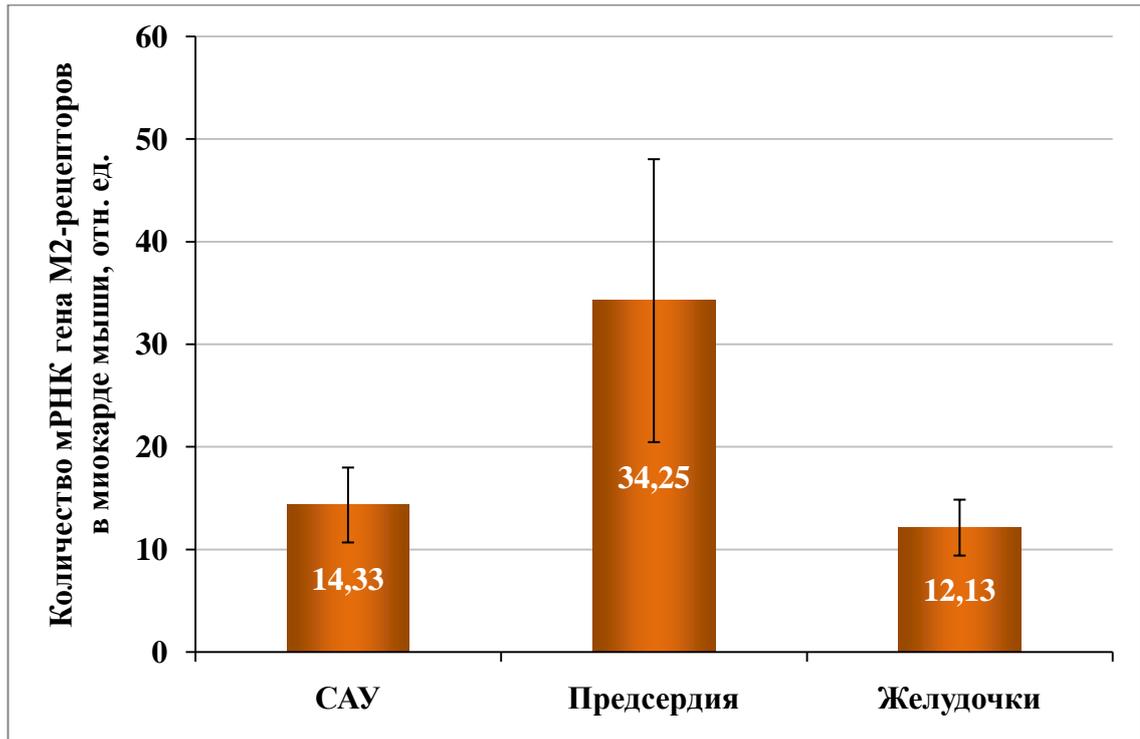


Рисунок 39. Относительный уровень экспрессии гена M2-рецепторов в САУ, рабочем предсердном и желудочковом миокарде мыши (n=7). По оси ординат отложено относительное количество мРНК в образцах, вычисленное по результатам РВ-ПЦР. Результаты нормированы на количество РНК, выделенной из образцов. Результаты приведены в относительных единицах прибора, на котором проводился РВ-ПЦР.

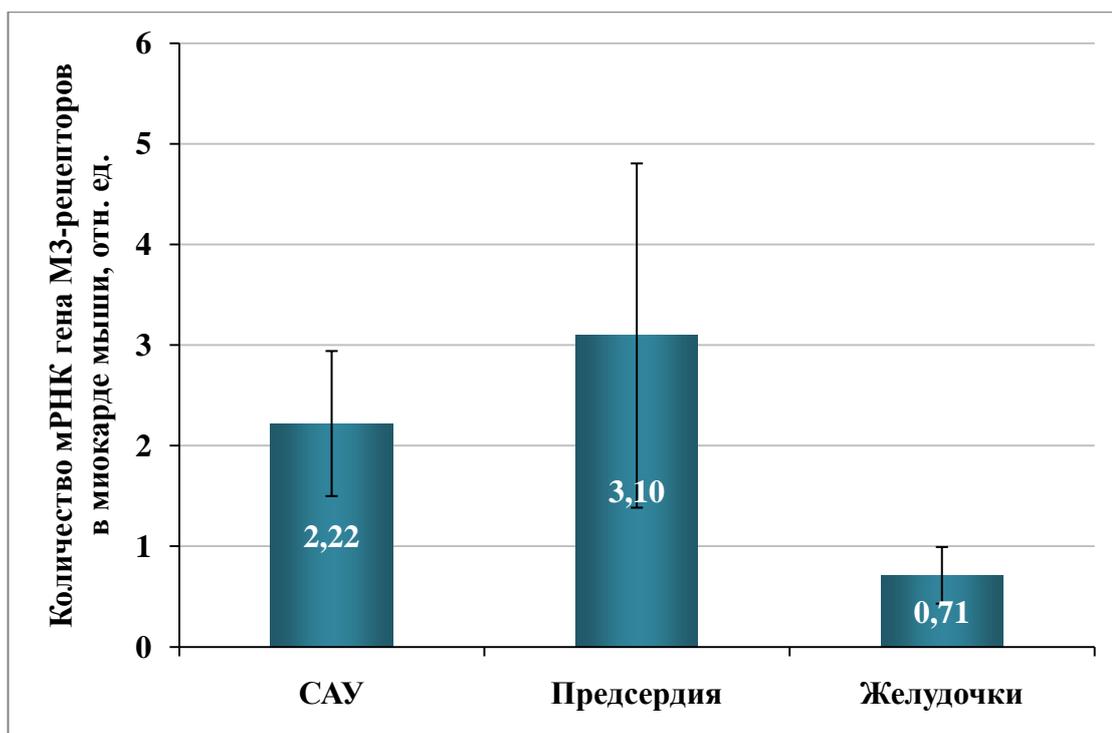


Рисунок 40. Относительный уровень экспрессии гена М3-рецепторов в САУ, рабочем предсердном и желудочковом миокарде мыши (n=7). По оси ординат отложено относительное количество мРНК в образцах, вычисленное по результатам РВ-ПЦР. Результаты нормированы на количество РНК, выделенной из образцов. Результаты приведены в относительных единицах прибора, на котором проводился РВ-ПЦР.

Как видно из рисунков 39 и 40 гены как М2-, так и М3-рецепторов экспрессируются во всех отделах сердца мыши. Уровень экспрессии М2-рецепторов несколько выше в предсердиях, чем в остальных отделах сердца (САУ – 14,33±/–3,6 отн. ед., предсердия – 34,25±/–13,8 отн. ед. и желудочки 12,12±/–2,7 отн. ед.). Также стоит отметить, что уровень экспрессии М2-рецепторов в желудочках ниже, чем в предсердиях, что подтверждает наши данные полученные электрофизиологическими методами.

Для М3-рецепторов наблюдается несколько другая картина, и хотя уровень транскрипции выше в предсердиях, чем в САУ, эти данные нельзя считать достоверными, что также может быть связано с неточностью выделения области синоатриального узла. Экспрессия гена М3-рецепторов в предсердиях составила 3,09±/–1,7 отн. ед., а в желудочках 0,71±/–0,28 отн. ед. Этот результат подтверждает наше предположение о том, что плотность М3-рецепторов в суправентрикулярном миокарде мыши выше, чем в желудочках.

Рассмотрим отношение уровня экспрессии генов М3-рецепторов количеству мРНК М2-рецепторов (рис. 41). Из представленной диаграммы видно, что наибольший вклад М3-рецепторы вносят в работу синоатриального узла, поскольку их количество в этой области составляет почти 15%. Наименьшее относительное количество мРНК М3-рецепторов в

желудочках, их обнаружено всего 5% от количества М2-рецепторов. Это несколько противоречит результатам, полученным в ходе электрофизиологических экспериментов. Предположение о том, что в правом желудочке М3-рецепторы составляют бóльшую часть популяции, чем в правом предсердии, также не подтверждается. Таким образом, разница в наблюдаемых электрофизиологических эффектах может быть обусловлена разным сродством рецепторов в предсердиях и желудочках к агонистам или различиями во внутриклеточных сигнальных каскадах.

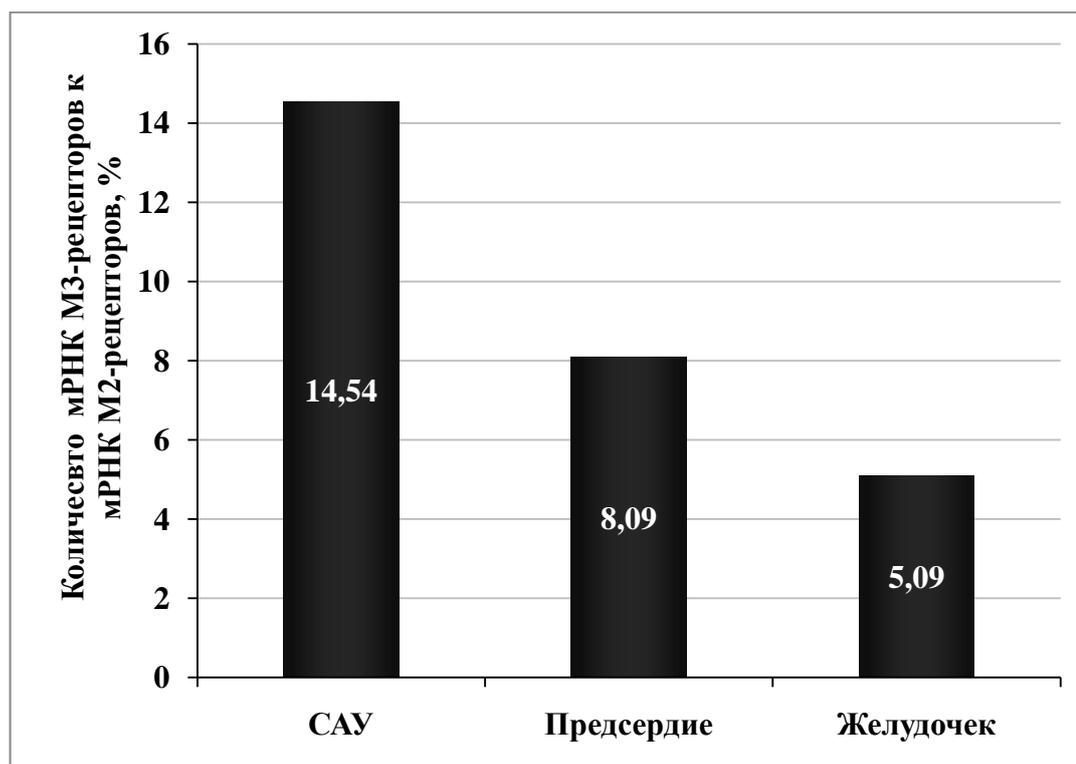


Рисунок 41. Отношение количества мРНК генов М3-рецепторов к количеству мРНК М2-рецепторов в различных отделах сердца мыши.

Итак, в этой части исследования мы показали, что гены М2- и М3-рецепторов транскрибируются во всех отделах сердца крысы и мыши. Нами впервые показано наличие мускариновых рецепторов третьего типа в пейсмекере сердца мыши. Кроме того, мы подтвердили данные, полученные на других видах животных и показали, что у обоих видов грызунов уровень экспрессии генов М2-рецепторов значительно выше в предсердиях, чем в желудочках. Однако уровень транскрипции генов М3-рецепторов у мыши и крысы, в отличие, например, от человека, в предсердиях оказался тоже выше, чем в желудочках. Также стоит отметить, что относительное количество М3-рецепторов в предсердиях и желудочках крысы значительно ниже, чем у мыши. Так в предсердии крысы М3-рецепторы составили только 0,15% от общей популяции мускариновых рецепторов, в то время как у мыши это значение составило 8,09 %, для желудочков это соотношение было: у крысы 0,42, у мыши 5,09.

Поскольку электрофизиологические эффекты стимуляции МЗ-рецепторов были сходны по величине у этих видов, остается предположить, что отношение между М2- и МЗ-рецепторами существенно изменяется у крысы, либо у мыши, уже на уровне трансляции.

Таким образом, мы в этой части работы представили убедительные доказательства в пользу существования мускариновых рецепторов третьего типа в сердце крысы и мыши.

## **4.2. Механизмы, опосредующие эффекты избирательной стимуляции МЗ-рецепторов**

В прошлой главе мы показали наличие мускариновых рецепторов третьего типа при помощи оценки электрофизиологических эффектов селективной МЗ-стимуляции, а также иммуногистохимически и методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Далее была поставлена задача проследить основные пути каскада внутриклеточной сигнализации, который задействуется при активации МЗ-рецепторов, при помощи внутриклеточной регистрации электрической активности, а так же методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell.

### **4.2.1. Исследование механизма воздействия стимуляции МЗ-рецепторов на параметры электрической активности в миокарде**

#### **4.2.1.1. Исследование роли фосфолипазы С в опосредовании эффектов избирательной активации МЗ-рецепторов**

Как обсуждалось в разделе 2.1.3.2.5 обзора литературы, активация МЗ-рецепторов в миокарде вызывает появление тока  $I_{KMЗ}$ , а также посредством  $\alpha$ -субъединицы  $G_q$ -белка стимулирует фосфолипазу С, что приводит к запуску фосфоинозитидного каскада внутриклеточной сигнализации. Накопление  $IP_3$  ведёт к выбросу  $Ca^{2+}$  из депо, а DAG активирует протеинкиназу С.

Для того, чтобы выяснить, участвует ли фосфоинозитольный каскад в реализации эффектов, наблюдаемых при избирательной стимуляции МЗ-рецепторов, мы провели две серии экспериментов с использованием двух различных ингибиторов фосфолипазы С: U-73122 ( $10^{-6}$  М) и неомицина ( $5 \times 10^{-4}$  М). Результаты экспериментов представлены на рис. 15-16.

U-73122 является высокоселективным ингибитором PLC, легко проникающим внутрь клетки благодаря своим липофильным свойствам. U-73122 сам по себе не оказывал достоверного влияния на исследуемые электрофизиологические параметры. При применении U-73122 уменьшение длительности ПД под действием пилокарпина относительно контрольного значения (на фоне U-73122 и метоктрамина) составило в среднем  $5,7 \pm 2,4\%$  на уровне 50% реполяризации и  $4,7 \pm 2,4\%$  на уровне 90% реполяризации (см. рис. 16). Таким образом, U-73122

на 60,4% достоверно снижал выраженность укорочения ПД на уровне 50% реполяризации при избирательной активации МЗ-рецепторов. На уровне 90% реполяризации это снижение также было достоверным и составило 63,5%, то есть эффект стимуляции МЗ-рецепторов при блокировании PLC уменьшался более чем в 2 раза.

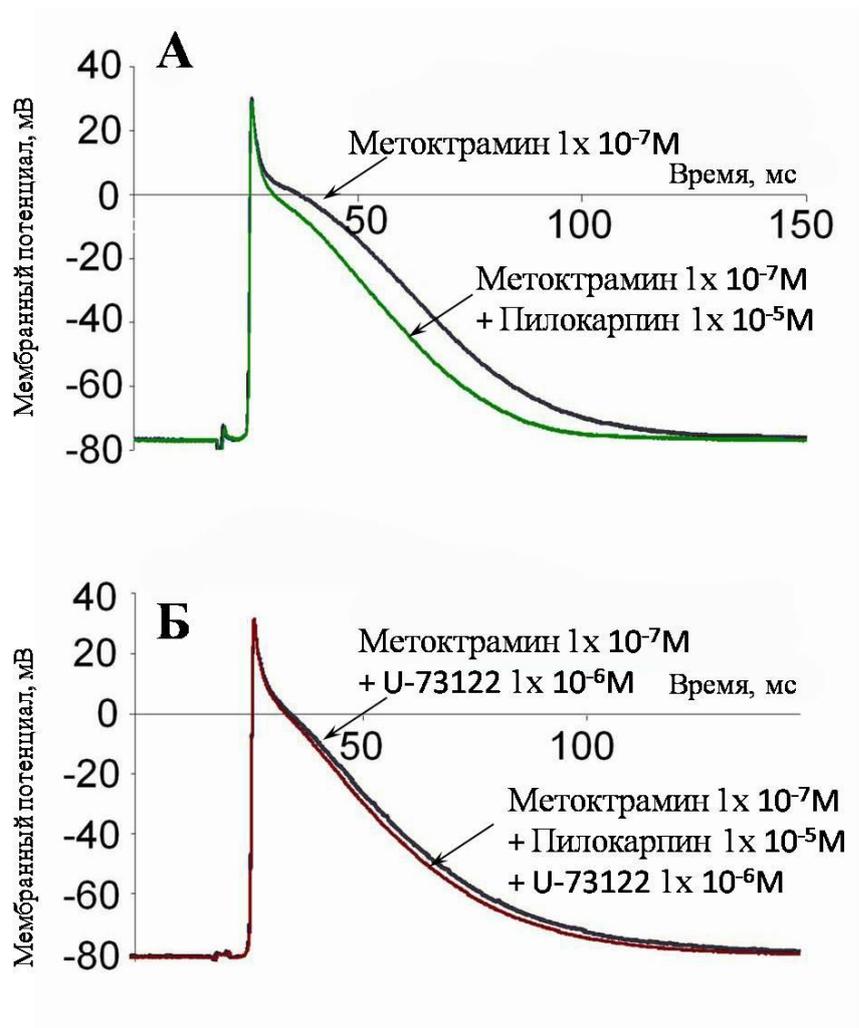


Рисунок 42. Влияние избирательной активации МЗ-рецепторов на конфигурацию ПД в условиях ингибирования PLC. (А) полный эффект активации МЗ-рецепторов, (Б) при дополнительном ингибировании PLC с помощью U-73122  $10^{-6} \text{M}$  этот эффект практически исчезает. Оригинальные записи из двух репрезентативных экспериментов.

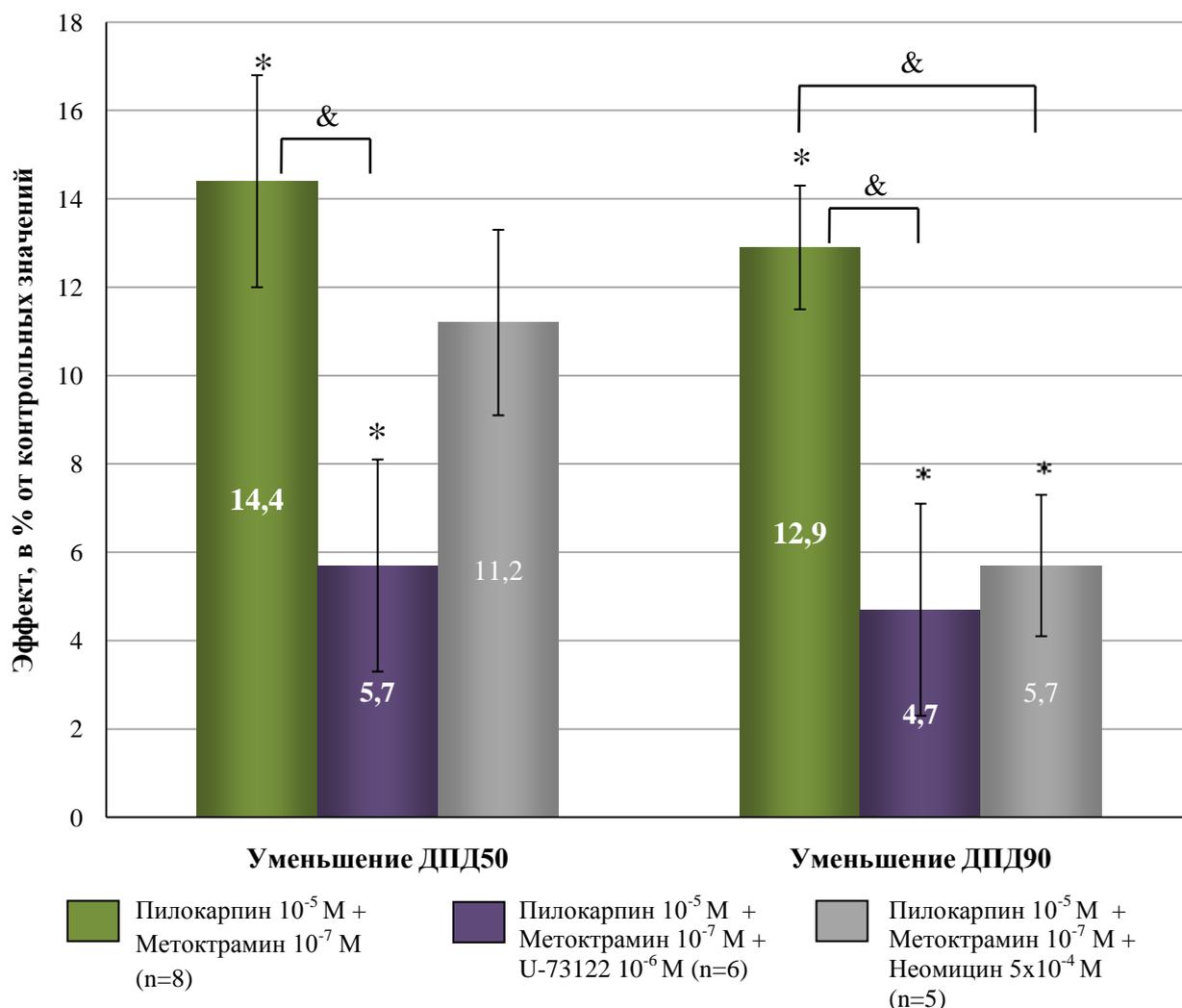


Рисунок 43. Ослабление эффекта избирательной активации М3-рецепторов под действием блокаторов фосфолипазы С U-73122 и неомидина. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона, & - достоверность различия между эффектами, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

Таким образом, результаты экспериментов с U-73122 говорят, что фосфоинозитольный путь внутриклеточной сигнализации опосредует уменьшение ДПД при активации М3-рецепторов более чем наполовину.

Второй взятый в качестве ингибитора PLC препарат – неомидин - является мощным антибиотиком из группы аминогликозидов. В наших экспериментах он проявил множество побочных эффектов. В концентрации  $5 \times 10^{-4}$  М неомидин сам по себе изменял конфигурацию ПД (происходило уменьшение амплитуды ПД), в двух экспериментах из серии наблюдалось полное прекращение электрической активности препарата. Неомидин вызывал также уменьшение выраженности эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов (см. рис. 43). На уровне 90% реполяризации этот эффект неомидина был достоверным, а на уровне 50%

реполяризации – нет. Таким образом, выявить четкий эффект именно от ингибирования PLC неомицином не удалось, однако этот пробел восполняют данные опытов с U-73122.

Ванг и соавторы в своих работах связывали уменьшение длительности ПД с током  $I_{KM3}$ , активируемым  $\beta\gamma$ -субъединицей Gq-белка [Wang et al., 1999; Wang et al., 2004], однако полученные нами результаты говорят о том, что активность фосфолипазы C (а следовательно, фосфоинозитольный путь внутриклеточной сигнализации) в значительной степени (более, чем на 50%) опосредует эффект активации M3-рецепторов.

В дальнейшем мы задались целью определить, какая именно часть каскада фосфолипазы C опосредует изменение конфигурации ПД при активации M3-рецепторов. Это мог быть как  $IP_3$ , который действует через специфические рецепторы на СПР, так и РКС, активируемая DAG.

#### **4.2.1.2. Исследование роли саркоплазматических рецепторов $IP_3$ в опосредовании эффектов избирательной активации M3-холинорецепторов**

В следующей серии экспериментов мы попытались проверить гипотезу о возможной роли  $IP_3$  в опосредовании наблюдаемых нами эффектов избирательной стимуляции M3-холинорецепторов предсердного миокарда крысы (рис.44).

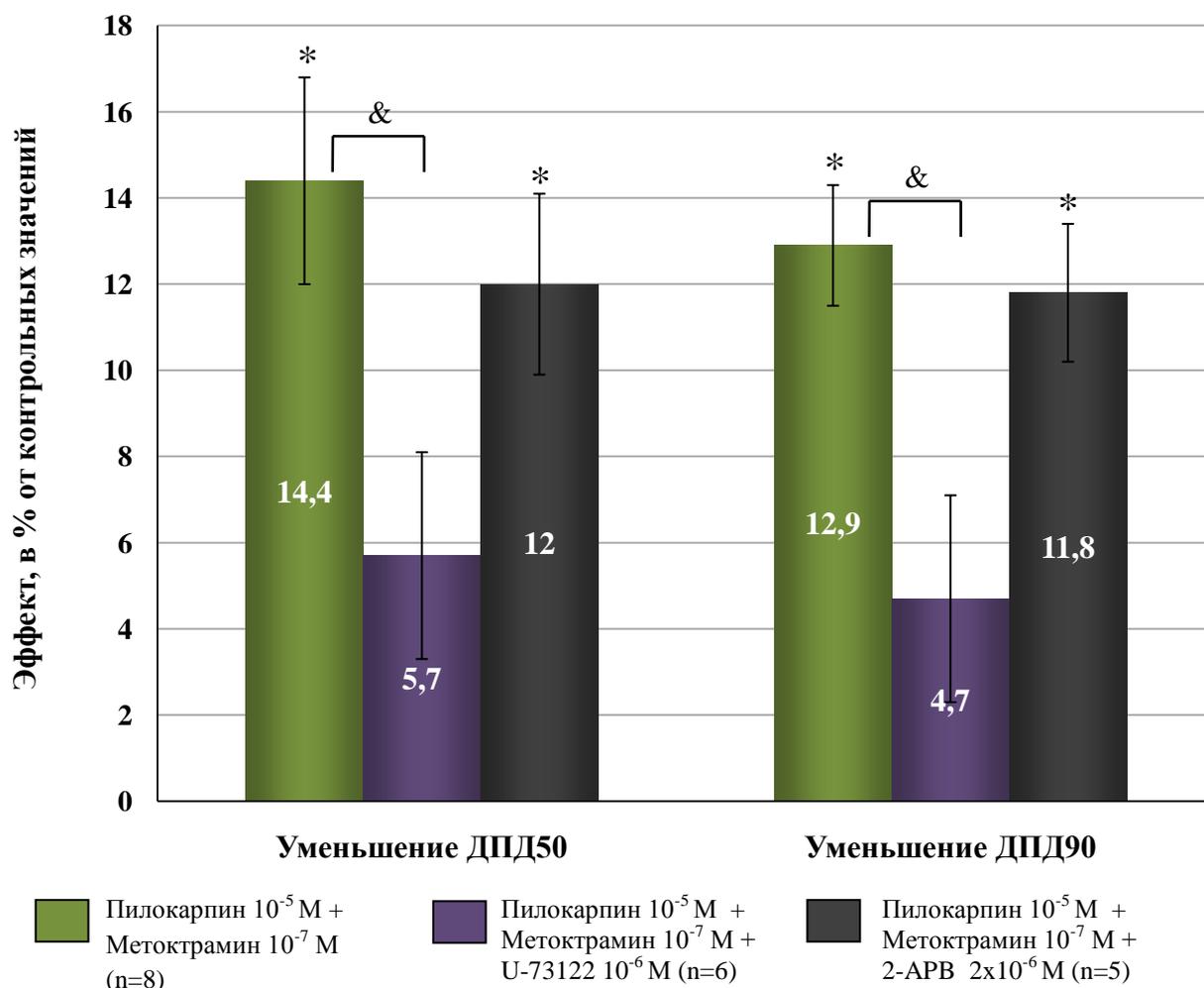


Рисунок 44. Изменение эффекта избирательной активации М3-рецепторов в миокарде предсердий при ингибировании фосфолипазы С (с помощью U-73122) и отдельно IP<sub>3</sub>-рецепторов СПР (с помощью 2-АРВ). \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона, & - достоверность различия между эффектами, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

Поскольку основной мишенью IP<sub>3</sub> в кардиомиоцитах являются специфические рецепторы, расположенные на мембране СПР (IP<sub>3</sub>-Rs), для проверки нашего предположения мы воспользовались селективным блокатором этих рецепторов 2-АРВ. Благодаря своей липофильности 2-АРВ легко проникает через клеточную мембрану. На рис. 44 отображены результаты этой серии экспериментов: при избирательной стимуляции М3-рецепторов  $10^{-5}$  М пилокарпина в присутствии  $10^{-7}$  М метоктрамина и  $2 \times 10^{-6}$  М 2-АРВ наблюдалось уменьшение длительности ПД на  $12 \pm 2,1\%$  по сравнению с контрольным уровнем (на фоне метоктрамина и 2-АРВ) на уровне 50% реполяризации и на  $11,8 \pm 1,6\%$  на уровне 90% реполяризации.

Таким образом, достоверных отличий эффекта избирательной стимуляции М3-рецепторов при блокировании IP<sub>3</sub>-рецепторов от такого же эффекта в нормальных условиях обнаружено не было. Из этого можно сделать вывод, что IP<sub>3</sub>-рецепторы не опосредуют эффект

активации М3-холинорецепторов. Поэтому мы сделали предположение, что уменьшение длительности ПД в рабочем миокарде предсердий, наблюдаемое при стимуляции М3-рецепторов, связано с активацией протеинкиназы С DAG при участии ионов кальция.

#### **4.2.1.3. Исследование роли протеинкиназы С в опосредовании эффектов избирательной активации М3-холинорецепторов**

Для проверки последнего предположения мы провели серию экспериментов, в которых определяли эффект избирательной стимуляции М3-рецепторов в присутствии ингибитора протеинкиназы С хелеретрина в концентрации  $2 \times 10^{-6}$  М. Такая концентрация достаточна для эффективного подавления активности РКС [Herbert et al., 1990], в то время как активность 5-фосфатазы при этом не затрагивается, то есть хелеретрин не влияет на метаболизм  $IP_3$  [Le Corvoisier et al., 2002]. Имеются данные о том, что хелеретрин может частично ингибировать АЦХ-зависимый калиевый ток  $I_{KACH}$  по РКС-независимому механизму [Cho et al., 2002], скорее всего за счет воздействия непосредственно на сами калиевые ацетилхолинзависимые каналы. Этот эффект начинает проявляться уже при концентрации хелеретрина  $2 \times 10^{-6}$  М, которую мы использовали в своей работе. Поскольку, как обсуждалось в разделе 2.1.3.1.2 литературного обзора, выходящий ток  $I_{KACH}$  в значительной степени опосредует действие АЦХ через М2-рецепторы, ускоряя фазу реполяризации ПД, его ингибирование привело бы увеличению длительности ПД. Однако данный побочный эффект хелеретрина был бы заметен лишь на фоне активации М2-рецепторов, а в наших экспериментах М2-рецепторы были заблокированы с помощью метоктрамина.

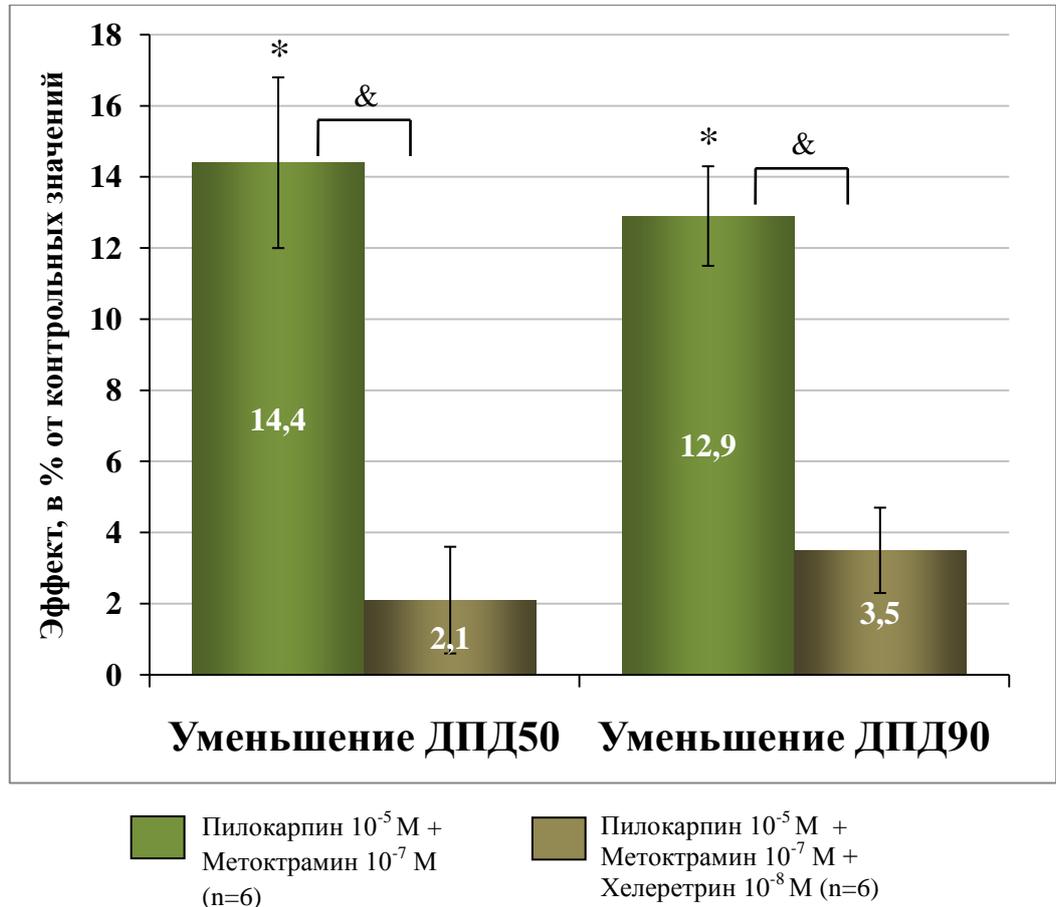


Рисунок 45. Уменьшение ДПД в рабочем миокарде правого предсердия крысы при избирательной активации М3-рецепторов пилокарпином в присутствии метоктрамина. Влияние ингибитора РКС хелеретрина на выраженность этого эффекта. \* $P < 0,05$  по сравнению с контрольными значениями. & $P < 0,05$  для различия между эффектами.

При аппликации пилокарпина ( $10^{-5}$  М) на фоне метоктрамина ( $10^{-7}$  М) и хелеретрина ( $2 \times 10^{-6}$  М) укорочение ПД относительно контрольного значения (на фоне метоктрамина и хелеретрина) составило  $2,1 \pm 1,5\%$  на уровне 50% реполяризации и  $3,5 \pm 1,2\%$  на уровне 90% реполяризации (см. рис. 45). Отличия от эффекта активации М3-рецепторов в отсутствие блокирования РКС достоверны, поэтому можно предположить, что РКС участвует в реализации описанных нами эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов.

Среди известных на сегодняшний день путей действия РКС в миокарде, рассмотренных в разделе 2.1.3.2.4, фосфорилирование кальциевых каналов L-типа может вести к ослаблению  $I_{CaL}$ -тока [McHugh et al., 2000; Zhang et al., 1997], который обеспечивает фазу плато ПД в рабочем миокарде желудочков и, в меньшей степени, - предсердий. Можно предположить, что это - один из возможных механизмов описанного нами уменьшения длительности ПД в предсердиях при избирательной стимуляции М3-рецепторов. Поэтому следующим шагом в

наших исследованиях стало изучение роли кальциевого тока L-типа при стимуляции МЗ-рецепторов.

#### **4.2.2. Действие стимуляции МЗ-холинорецепторов на кальциевый ток в предсердных и желудочковых рабочих кардиомиоцитах крысы**

Итак, в свете имеющихся данных относительно модуляции кальциевого тока L-типа через фосфорилирование каналов  $Ca_v1.2$  протеинкиназой С [Puri et al., 1997] мы решили напрямую проверить возможность регуляции тока  $I_{CaL}$  за счет стимуляции МЗ-рецепторов. Для этого была проведена серия экспериментов с регистрацией  $I_{CaL}$  в изолированных желудочковых и предсердных миоцитах крысы методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell.

На рисунке 46 показаны репрезентативные записи тока  $I_{CaL}$  в контроле и на фоне действия  $10^{-5}$ М пилокарпина в желудочковых кардиомиоцитах крысы. На фоне аппликации пилокарпина наблюдались лишь незначительные изменения амплитуды тока, направленные в сторону увеличения в некоторых клетках и в противоположную сторону – в других. В целом никакого достоверного воздействия пилокарпина на выраженность  $I_{CaL}$  в желудочковых миоцитах обнаружено не было. Аппликация  $10^{-5}$ М пилокарпина на фоне М2-блокатора метоктрамина ( $10^{-7}$ М) также не приводила к значимым изменениям  $I_{CaL}$ .

В предсердных кардиомиоцитах напротив наблюдались значительные эффекты МЗ-стимуляции. Средняя амплитуда  $I_{CaL}$  в контрольных условиях составляла в предсердных миоцитах  $-12,82 \pm 1,15$  пА/пФ при максимальной активации тока, достигавшейся на деполяризации до +10 мВ. Пилокарпин ( $10^{-5}$ М) вызывал существенное снижение амплитуды  $I_{CaL}$ , регистрируемого при всех тестовых потенциалах (от -30 до +40 мВ, шаг 10 мВ) (рис. 47, 48). Амплитуда  $I_{CaL}$  на +10 мВ снизилась в среднем на  $20,1 \pm 1,8\%$  от контрольной.

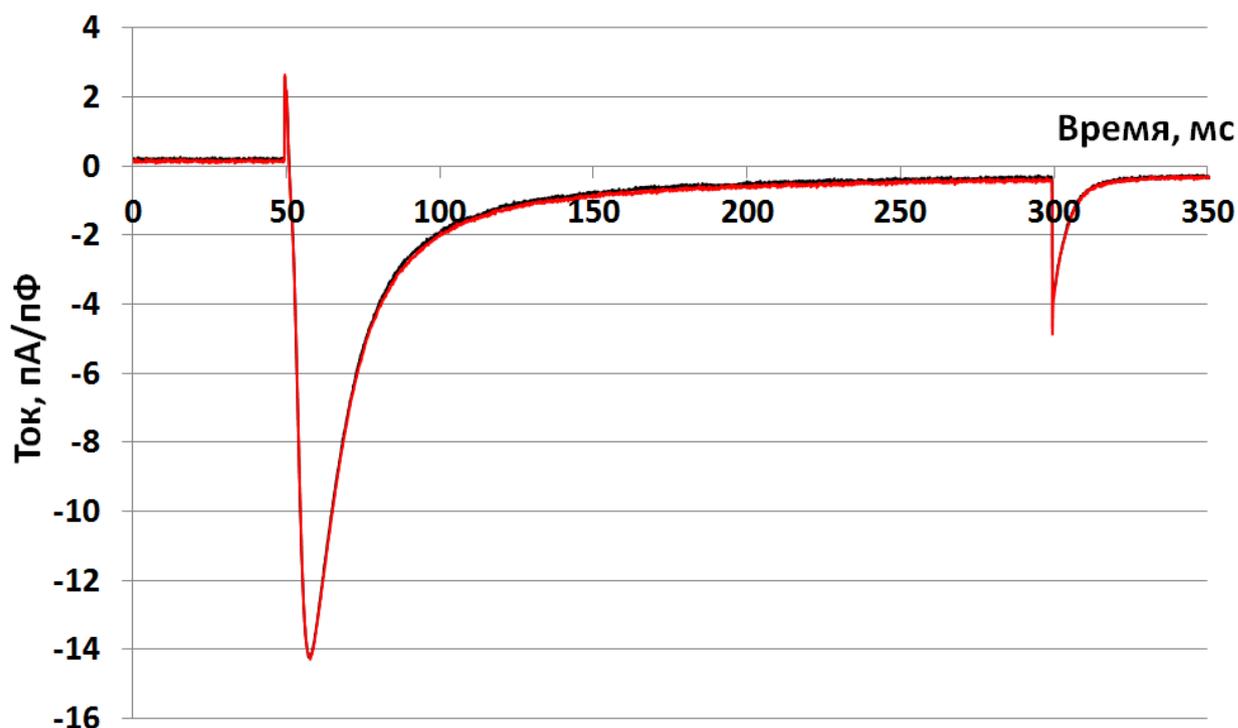


Рисунок 46. Кальциевый ток L-типа в желудочковых кардиомиоцитах крысы в контроле и на фоне действия пилокарпина. Пример репрезентативных записей  $I_{CaL}$ , полученных при деполяризации до +10 мВ после предполяризации -40 мВ в контроле (черная кривая) и на фоне аппликации  $10^{-5}$ М пилокарпина (красная кривая).

Для того, чтобы выявить действие избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на  $I_{CaL}$ , пилокарпин апплицировали в присутствии  $10^{-7}$ М метоктрамина, постоянно содержащегося в рабочем перфузионном растворе. На фоне метоктрамина средняя амплитуда  $I_{CaL}$  не отличалась достоверно от зарегистрированной в контрольных условиях и составляла  $-12,24 \pm 1,25$  пА/пФ при деполяризации до +10 мВ. Как и в нормальных условиях, аппликация пилокарпина ( $10^{-5}$ М) приводила к достоверному, хотя и менее выраженному в отсутствие метоктрамина, снижению амплитуды  $I_{CaL}$  (рис. 49). Оно составило в среднем  $12,5 \pm 1,57\%$  от контрольной амплитуды тока. В третьей серии экспериментов пилокарпин апплицировали на фоне  $10^{-7}$ М метоктрамина и  $10^{-8}$ М 4-DAMP. В этих условиях снижение амплитуды  $I_{CaL}$  не было статистически значимо (рис. 49).

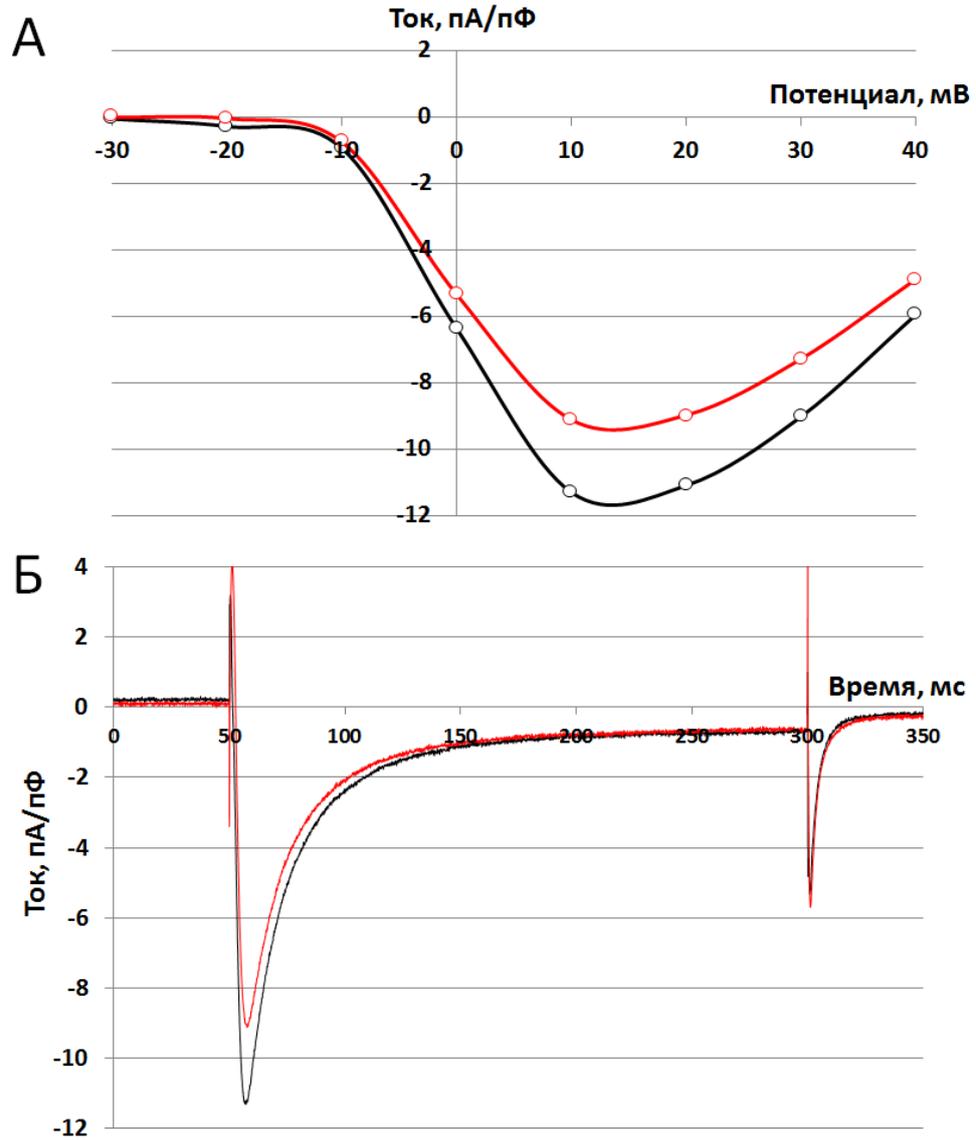


Рисунок 47. Влияние мускаринового агониста пилокарпина на кальциевый ток L-типа в предсердных миоцитах крысы. Пример репрезентативного эксперимента. А – вольт-амперная кривая  $I_{CaL}$  в контроле (черная) и на фоне аппликации  $10^{-5}$ М пилокарпина (красная). Натриевый ток и кальциевый ток T-типа инактивировались предполяризацией от поддерживаемого потенциала -80 мВ до -40 мВ длительностью 100 мс. Ток  $I_{CaL}$  индуцировался последующей ступенчатой деполяризацией от -40 мВ до уровня -30-+40 мВ с шагом 10 мВ, длительность ступеньки – 250 мс. Амплитуда тока определялась как разность между пиковым значением и величиной тока в конце деполяризующей ступеньки. Б – записи  $I_{CaL}$ , полученные в том же кардиомиоците при деполяризации до +10 мВ в контроле (черная кривая) и на фоне аппликации  $10^{-5}$ М пилокарпина (красная кривая).

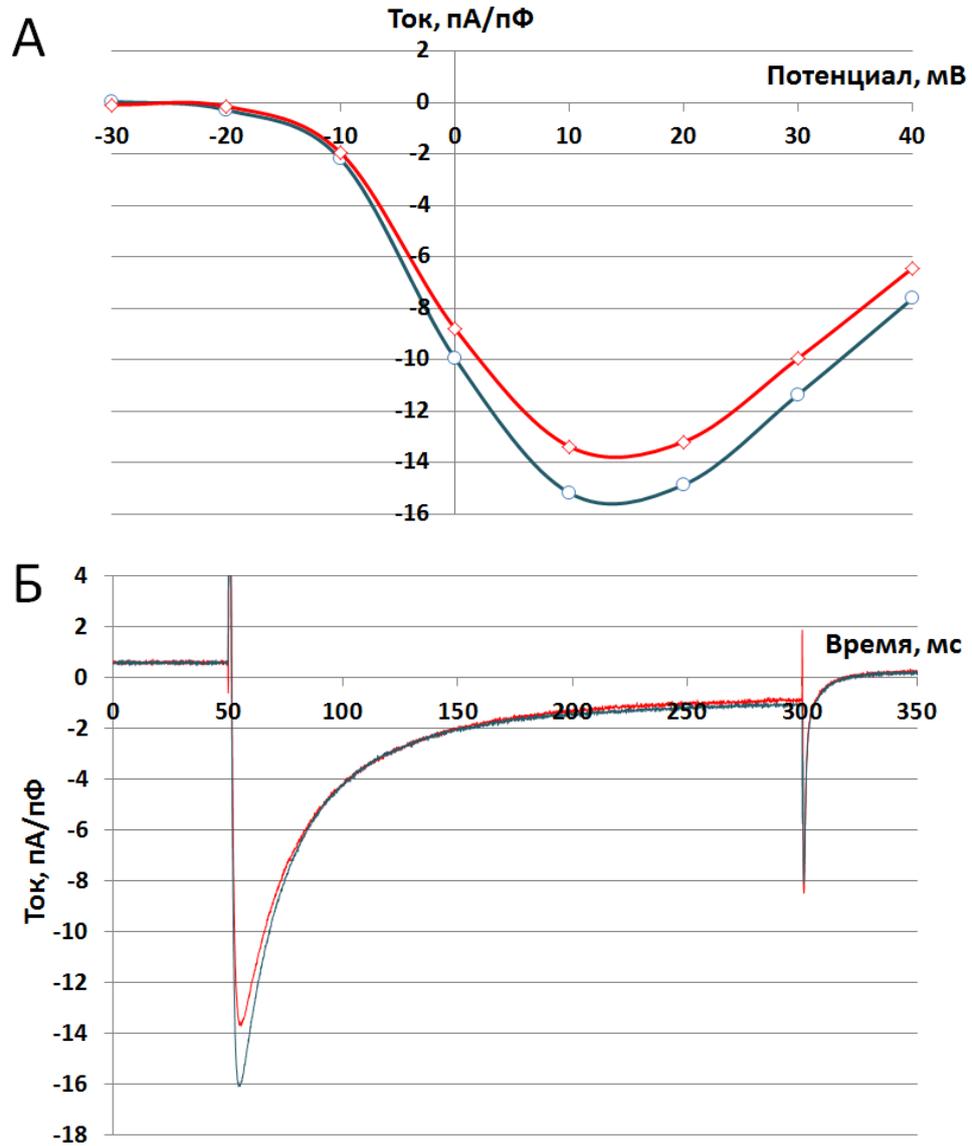


Рисунок 48. Влияние избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на кальциевый ток L-типа в предсердных миоцитах крысы. Пример репрезентативного эксперимента. А – вольт-амперная кривая  $I_{CaL}$  в присутствии  $10^{-7}$ М блокатора М2-рецепторов метоктрамина (черная) и после добавления  $10^{-5}$ М пилокарпина (красная). Натриевый ток и кальциевый ток Т-типа инактивировались предеполяризацией от поддерживаемого потенциала -80 мВ до -40 мВ длительностью 100 мс. Ток  $I_{CaL}$  индуцировался последующей ступенчатой деполяризацией от -40 мВ до уровня -30/+40 мВ с шагом 10 мВ, длительность ступеньки – 250 мс. Амплитуда тока определялась как разность между пиковым значением и величиной тока в конце деполяризующей ступеньки. Б – записи  $I_{CaL}$ , полученные в том же кардиомиоците при деполяризации до +10 мВ в присутствии  $10^{-7}$ М блокатора М2-рецепторов метоктрамина (черная кривая) и после добавления  $10^{-5}$ М пилокарпина (красная кривая).

Таким образом, наряду с ранее описанной активацией тока  $I_{KM3}$  стимуляция М3-холинорецепторов приводит к ослаблению кальциевого тока L-типа, которое может выступать в качестве одного из ионных механизмов уменьшения длительности ПД, опосредованного М3-стимуляцией.

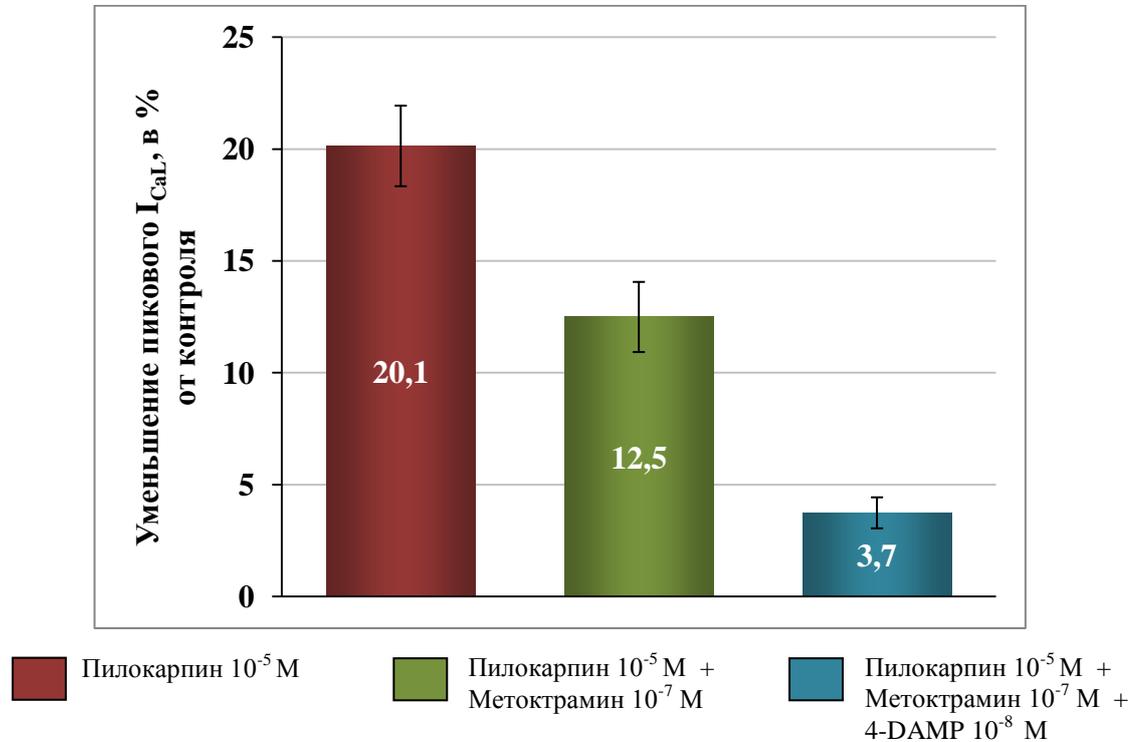


Рисунок 49. Уменьшение кальциевого тока L-типа в предсердных миоцитах крысы, измеренного при деполяризации до +10 мВ, под действием пилокарпина в нормальных условиях, на фоне блокирования М2-рецепторов, а также совместного блокирования М2- и М3-рецепторов. Относительная величина уменьшения  $I_{CaL}$  выражена в % от амплитуды  $I_{CaL}$  до аппликации пилокарпина (n=9).

Таким образом, наряду с ранее описанной активацией тока  $I_{KM3}$  стимуляция М3-холинорецепторов посредством фосфоинозитидного каскада внутриклеточной сигнализации, обеспечивающего активацию РКС, приводит к ослаблению кальциевого тока L-типа, которое может выступать в качестве одного из ионных механизмов уменьшения длительности ПД, опосредованного М3-стимуляцией. Данный вывод не умаляет значение механизма укорочения ПД посредством индукции тока  $I_{KM3}$ , но существенно дополняет представления о функционировании М3-рецепторов в миокарде. Схема реализации кардиотропных холинэргических эффектов посредством стимуляции М3-рецепторов показана на рис. 50

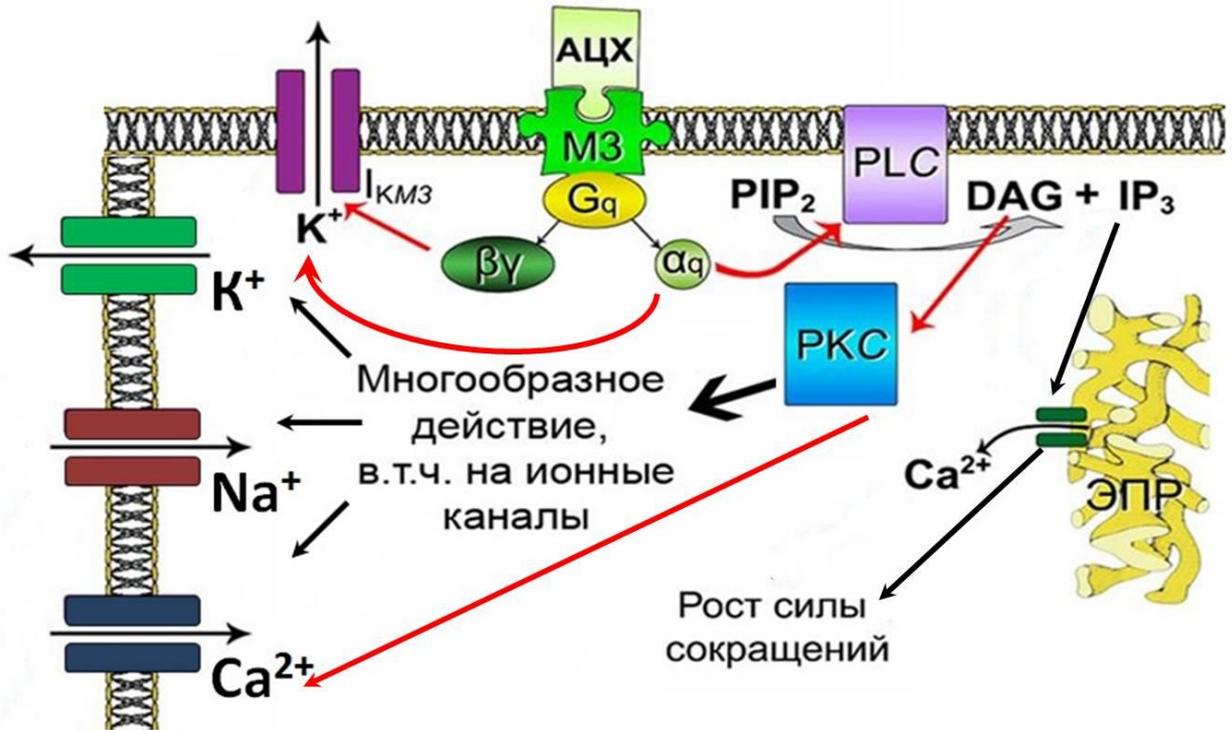


Рисунок 50. Схема реализации кардиотропных холинергических эффектов посредством стимуляции М3-рецепторов. При стимуляции М3-рецепторов, помимо активации тока  $I_{KM3}$ , происходит активация фосфоинозитидного каскада внутриклеточной сигнализации, который обеспечивает активацию PKC, что приводит к ослаблению кальциевого тока L-типа.

#### 4.3. Особенности развития холинергической системы в онтогенезе.

Итак, в ходе исследования нам удалось описать действие стимуляции М3-рецепторов на параметры электрической активности в рабочем предсердном и желудочковом миокарде мыши и крысы, а также пейсмекере мыши, в значительной мере раскрыть механизмы М3-опосредованных эффектов. Тем не менее, сравнительно небольшая величина этих эффектов, а также их сонаправленность с действием М2-стимуляции, заставляют усомниться в их существенности для холинергической регуляции миокарда. Однако важной чертой проведенного исследования является выполнение всех описанных выше экспериментов на взрослых крысах и мышах. В то же время хорошо известно, что в ходе индивидуального постнатального развития происходит перестройка и доразвитие холинергической системы. В течение первых трех недель после рождения у крыс и мышей происходит созревание парасимпатических ганглиев в сердце и их иннервация, продолжается рост нервных волокон, а так же растёт активность различных ферментов участвующих в метаболизме медиаторов [Marvin et al., 1980; Horackova, Slavikova, Vyczko, 2000; Fregoso, Hoover, 2012]. Кроме того,

после рождения по мере созревания организма может меняться физиологический ответ на стимуляцию разных типов мускариновых рецепторов [Зиятдинова et al., 2012]. Поэтому для изучения становления холинэргической системы в постнатальном онтогенезе мы провели ряд электрофизиологических экспериментов на сердце новорожденных и 21-дневных крыс. Также нами было проведено измерение экспрессии генов мускариновых рецепторов второго и третьего типа в сердцах новорожденных и 21-дневных крыс. Крыса была выбрана в качестве объекта, поскольку размер новорожденного мышонка не позволяет изготовить жизнеспособный препарат миокарда.

#### **4.3.1. Исследование влияния избирательной стимуляции М3-рецепторов на параметры электрической активности различных отделов сердца новорожденных крысят**

##### **4.3.1.1. Действие избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на параметры ПД в рабочем предсердном миокарде новорожденных крысят**

В предсердном рабочем миокарде новорожденных крысят, работающем в собственном ритме, пилокарпин вызывал характерные эффекты холинэргической стимуляции (рис. 51, 52). Происходило уменьшение длительности ПД на уровне 50% реполяризации на  $16,2 \pm 2,6\%$ , и на уровне 90% -  $18,5 \pm 2,35\%$ , а также удлинение цикла на  $8,2 \pm 1\%$ . При совместной аппликации пилокарпина с метоктрамином наблюдалось уменьшение длительности ПД, которое составило  $10,9 \pm 1,6\%$  для 50% реполяризации,  $10,6 \pm 1,2\%$  для 90%, при этом цикл удлинился на  $4,5 \pm 1,2\%$ . Эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов полностью снимались 4-DAMP.

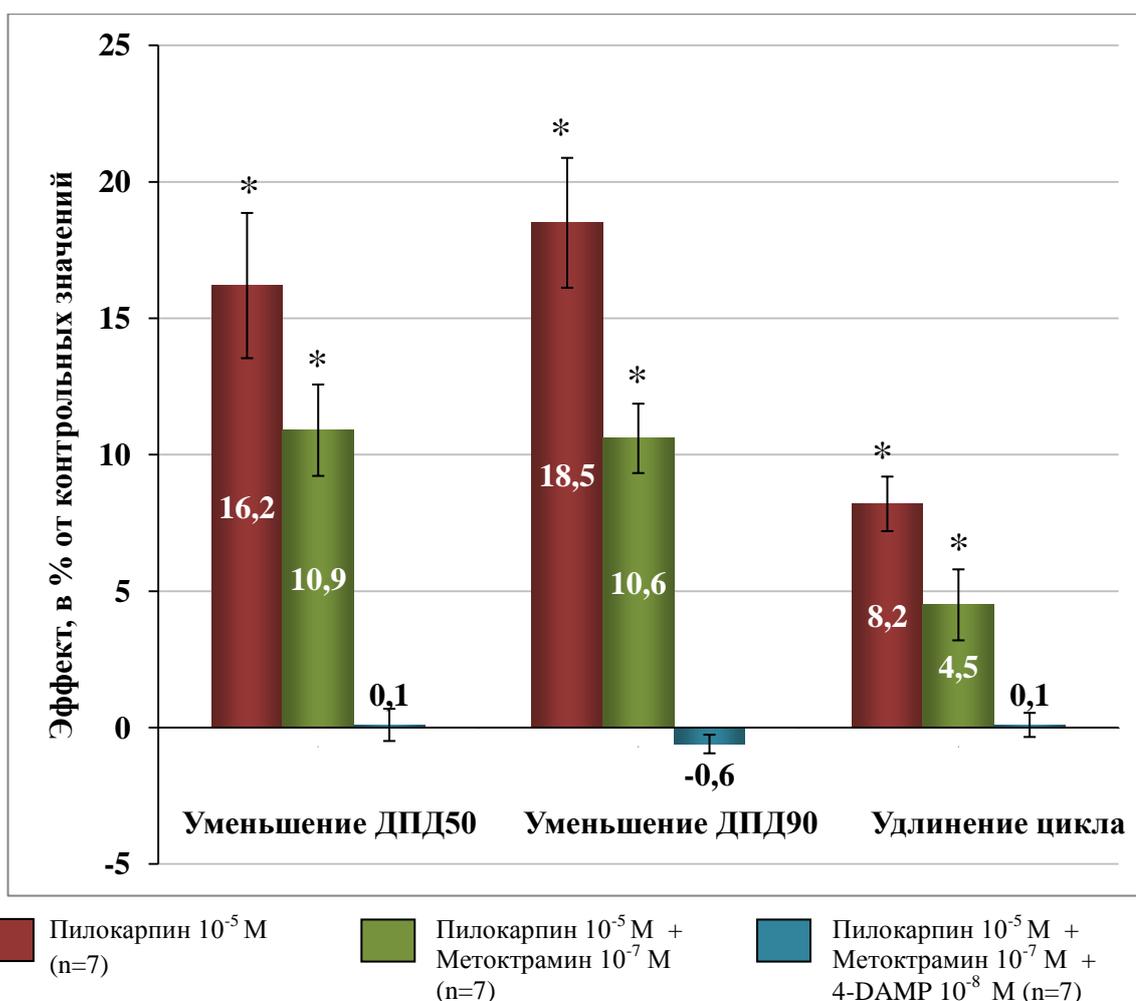


Рисунок 51. Эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов в предсердном рабочем миокарде новорожденной крысы (синусный ритм) пилокарпином. Происходит уменьшение длительности ПД на уровне 50% и 90% реполяризации, и удлинение цикла. Эффекты полностью снимаются блокадой М3-рецепторов 4-DAMP. По оси ординат: соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ .

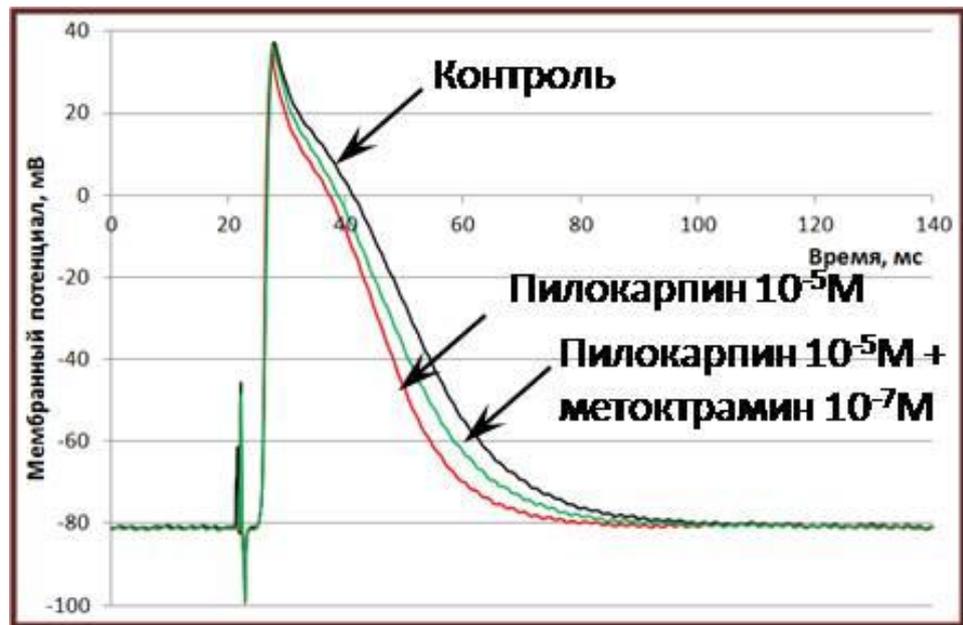


Рисунок 52. Оригинальные записи электрической активности, демонстрирующие изменения конфигурации ПД в рабочем миокарде правого предсердия новорожденной крысы при стимуляции холинорецепторов  $10^{-5}\text{M}$  пилокарпином в норме (красная линия) и на фоне блокады М2-рецепторов метоктрамином  $10^{-7}\text{M}$  (зеленая линия).

В экспериментах на препаратах предсердного миокарда, работающих в навязанном ритме, наблюдались аналогичные эффекты пилокарпина и селективной стимуляции М3-холинорецепторов (рис. 53). Стоит отметить, что как при работе в собственном, так и в навязанном ритме эффекты пилокарпина в предсердном миокарде новорожденных были выражены значительно слабее, чем у взрослой крысы и отличались более чем в 2,5 раза. При этом эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов у новорожденных и взрослых крыс практически не различались.

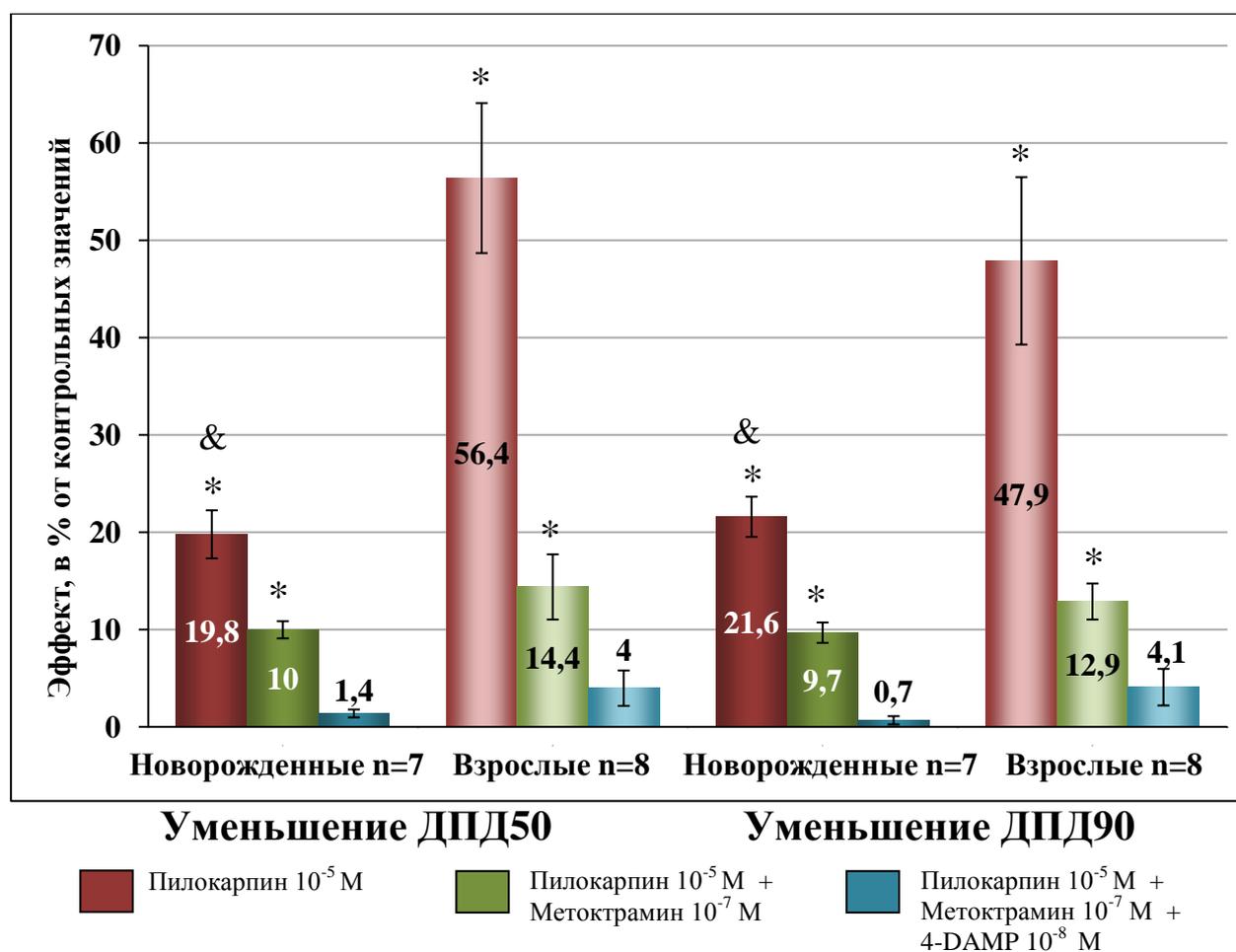


Рисунок 53. Сравнение эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов в предсердном миокарде новорожденной и взрослой крысы, работающем в навязанном ритме. Происходит уменьшение длительности ПД на уровне 50% и 90% реполяризации. По оси ординат: соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ , & - достоверность отличия от взрослых, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

#### 4.3.1.2. Действие избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на параметры ПД в рабочем желудочковом миокарде новорожденных крысят

В желудочковом миокарде наблюдалась другая картина (рис. 54, 55). Общий эффект пилокарпина в миокарде новорожденных оказался выражен сильнее, чем у взрослых. Уменьшение длительности ПД при аппликации пилокарпина в концентрации  $10^{-5}$  М на уровне 50% и 90% реполяризации у новорожденных составило  $19,3 \pm 2,7$  и  $17,9 \pm 3,65$  соответственно, а у взрослых крыс эти значения составили только  $11 \pm 1,8$ % и  $11,8 \pm 1,3$ %. Эффект избирательной стимуляции М3-рецепторов у новорожденных превосходил таковой у взрослых крыс почти в 3 раза. Уменьшение длительности ПД на фоне метоктрамина в миокарде новорожденных составило  $15,7 \pm 2,7$ % и  $13,4 \pm 2,5$ % на уровне 50% и 90% реполяризации, у

взрослых крыс  $4,7 \pm 0,4\%$  и  $4,85 \pm 0,55\%$  соответственно. Наблюдаемые эффекты избирательной стимуляции практически полностью подавлялись блокатром МЗ-рецепторов 4-DAMP, а следовательно, опосредованы активацией МЗ-рецепторов.

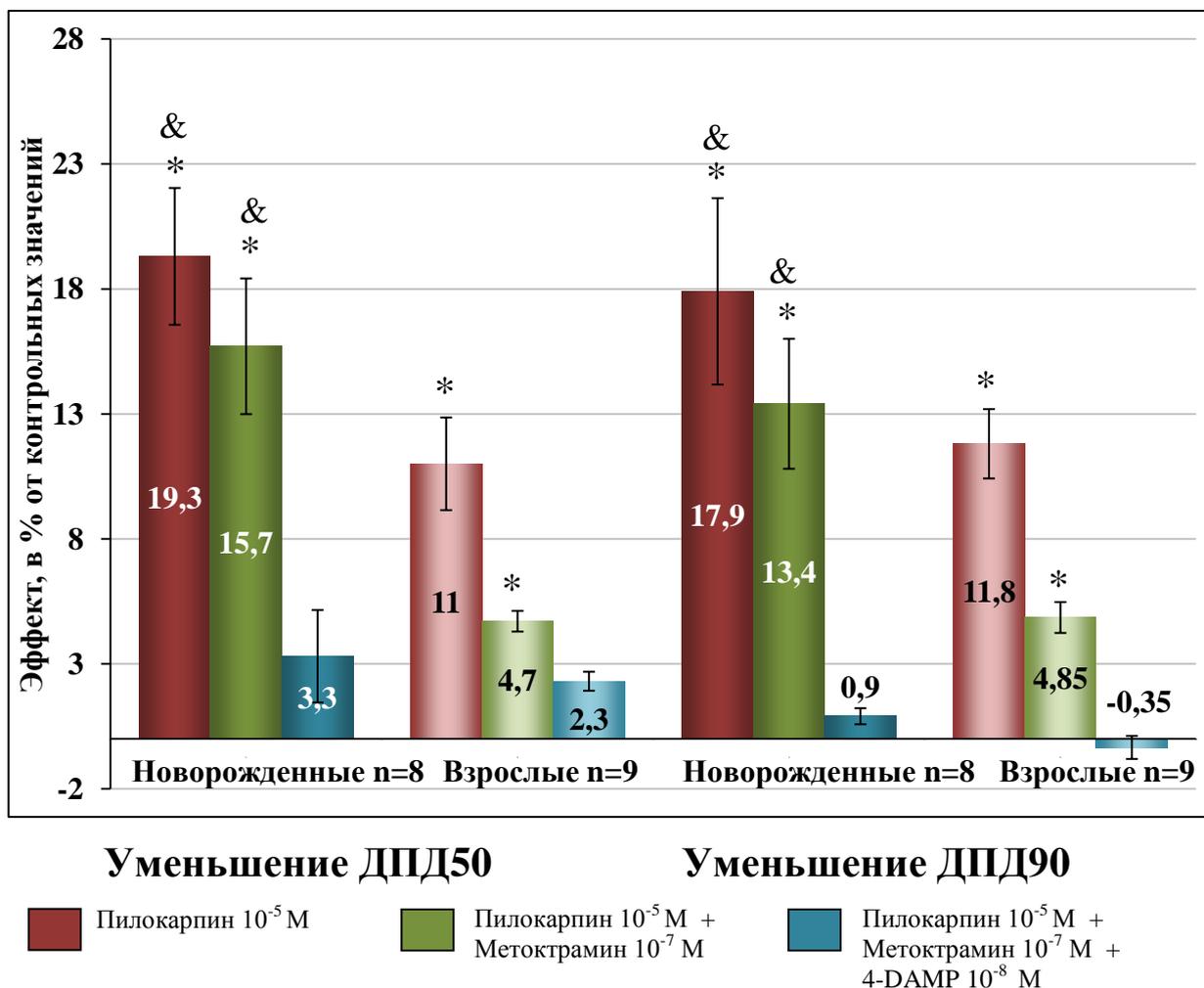


Рисунок 54. Сравнение эффектов избирательной стимуляции МЗ-рецепторов в желудочковом миокарде новорожденной и взрослой крысы. Происходит уменьшение длительности ПД на уровне 50% и 90% реполяризации. По оси ординат: соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ , & - достоверность отличия от взрослых, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

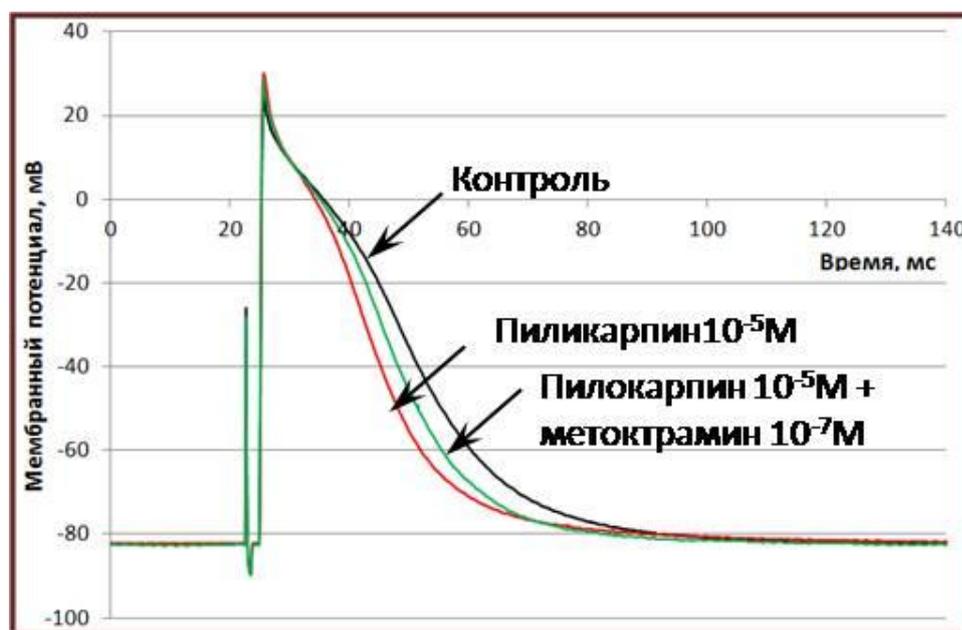


Рисунок 55. Оригинальные записи электрической активности, демонстрирующие изменения конфигурации ПД в рабочем миокарде правого желудочка новорожденной крысы при стимуляции холинорецепторов  $10^{-5}$ М пилокарпином в норме (красная линия) и на фоне блокады М2-рецепторов метоктрамином  $10^{-7}$ М (зеленая линия).

#### 4.3.2. Исследование избирательной стимуляции М3-рецепторов на параметры электрической активности миокарда различных отделов сердца трехнедельных крысят

Поскольку во многих работах показано, что в сердце грызунов активное доразвитие парасимпатической системы сердца продолжается в течение трех недель после рождения [Marvin et al., 1980; Horackova, Slavikova, Vyczko, 2000; Fregoso, Hoover, 2012], нами было принято решение исследовать действие избирательной стимуляции М3-рецепторов на параметры ПД в сердце трехнедельных крысят, то есть сразу по окончанию этого процесса.

##### 4.3.2.1. Действие избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на параметры ПД в рабочем предсердном миокарде трехнедельных крысят

При аппликации пилокарпина в рабочем предсердном миокарде, работающем в собственном ритме, происходит достоверное уменьшение длительности ПД на уровне 50% и 90% реполяризации, а также удлинение цикла (рис. 56). Длительность ПД уменьшается на уровне 50% реполяризации на  $31,65 \pm 6,8\%$ , и на  $33,93 \pm 5,8\%$  на уровне 90%, а цикл удлиняется при этом на  $23,74 \pm 4,25\%$ . Таким образом, мы наблюдаем характерное действие пилокарпина на миокард 21-дневных крысят, однако оно выражено несколько слабее, чем в предсердиях взрослых животных. При избирательной стимуляции М3-рецепторов уменьшение длительности ПД оказалось недостоверным, но при этом удлинение цикла произошло на  $9,82 \pm$

2,49%, что достоверно по сравнению с контролем по критерию Вилкоксона. При совместной аппликации блокаторов М2- и М3-рецепторов наблюдаемые эффекты также оказались недостоверными.

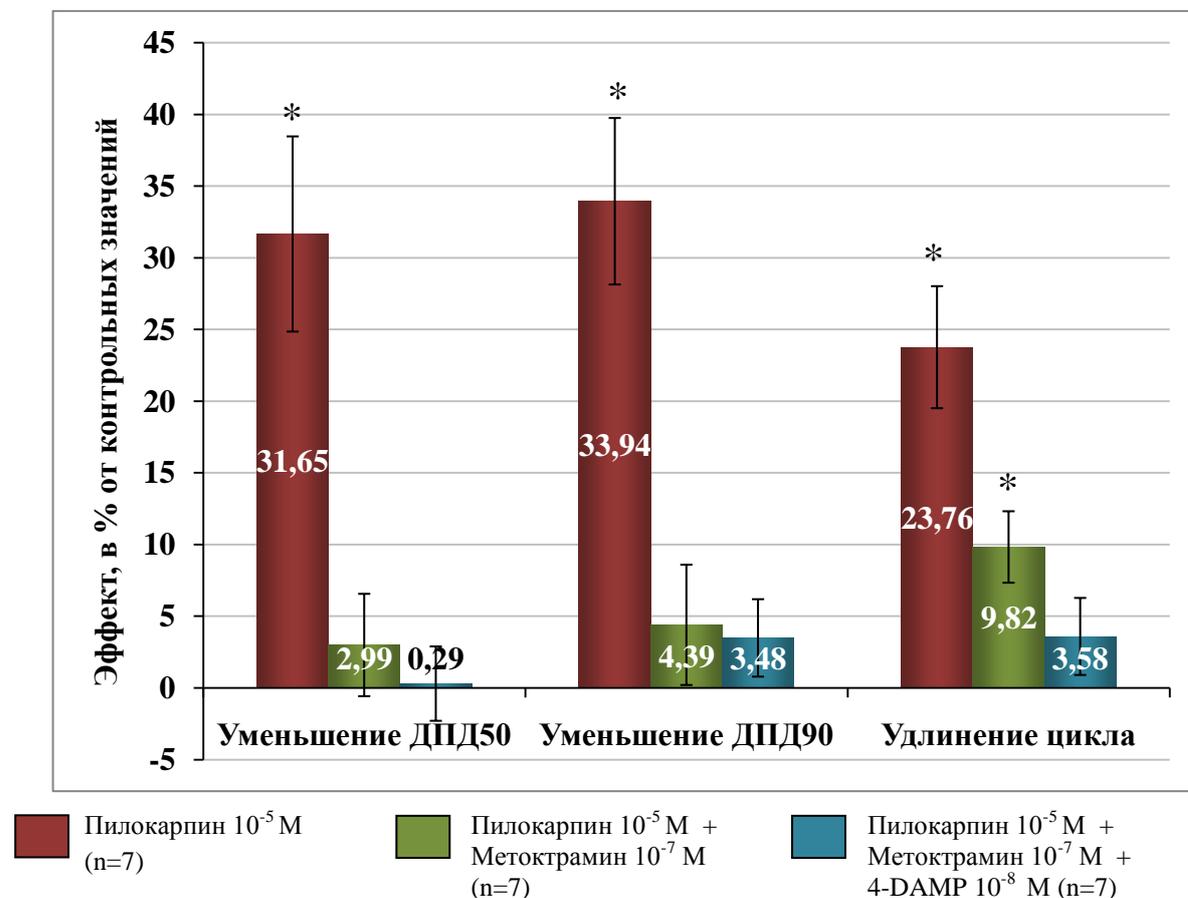


Рисунок 56. Эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов в предсердном рабочем миокарде 21-дневного крысенка (синусный ритм) пилокарпином. Происходит достоверное удлинение цикла. По оси ординат: соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ .

В экспериментах на препаратах правого предсердия трехнедельных крысят, работавших в навязанном ритме, эффекты пилокарпина оказались аналогичны эффектам, наблюдавшимся при работе в синусном ритме (рис. 57). Однако при действии как метоктрамина, так и пилокарпина не только не наблюдалось уменьшение длительности ПД, а даже наоборот происходило некоторое удлинение ДПД, хотя эти изменения оказались недостоверны.

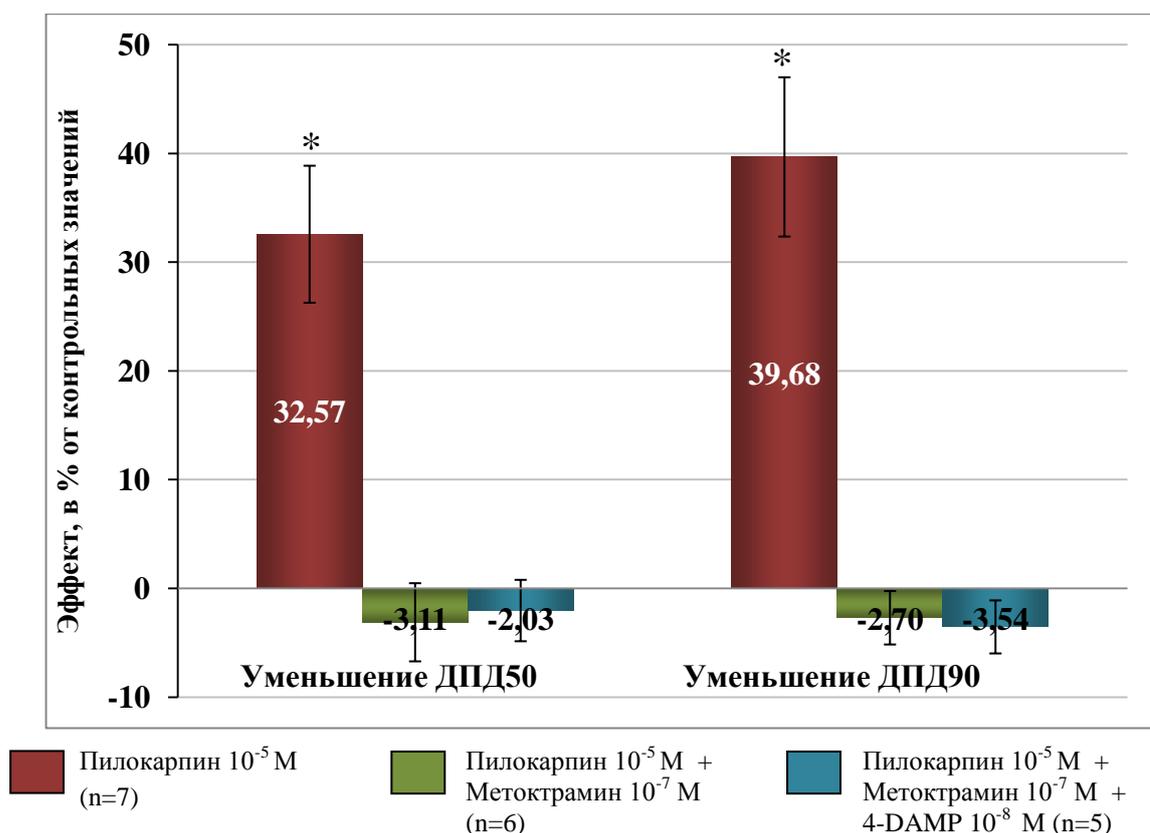


Рисунок 57. Эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов в предсердном рабочем миокарде 21-дневного крысенка (навязанный ритм) пилокарпином. Достоверных эффектов на миокард при действии пилокарпина на фоне метоктрамина не наблюдается. По оси ординат: соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ .

Таким образом, наши данные показывают, что в предсердиях трехнедельных крысят не обнаруживаются достоверные электрофизиологические эффекты стимуляции мускариновых рецепторов третьего типа.

#### 4.3.2.2. Действие избирательной стимуляции М3-холинорецепторов на параметры ПД в желудочковом миокарде трехнедельных крысят

В желудочковом миокарде крысы пилокарпин вызвал достоверное уменьшение длительности ПД только на уровне 50% реполяризации ( $9,63 \pm 2,97$ ). При избирательной стимуляции М3-рецепторов в желудочковом, также как и в предсердном миокарде, работающем в навязанном ритме, происходило недостоверное увеличение длительности ПД. На фоне блокаторов метоктрамина и 4-DAMP наблюдаемые эффекты так же оказались недостоверны (рис. 58).

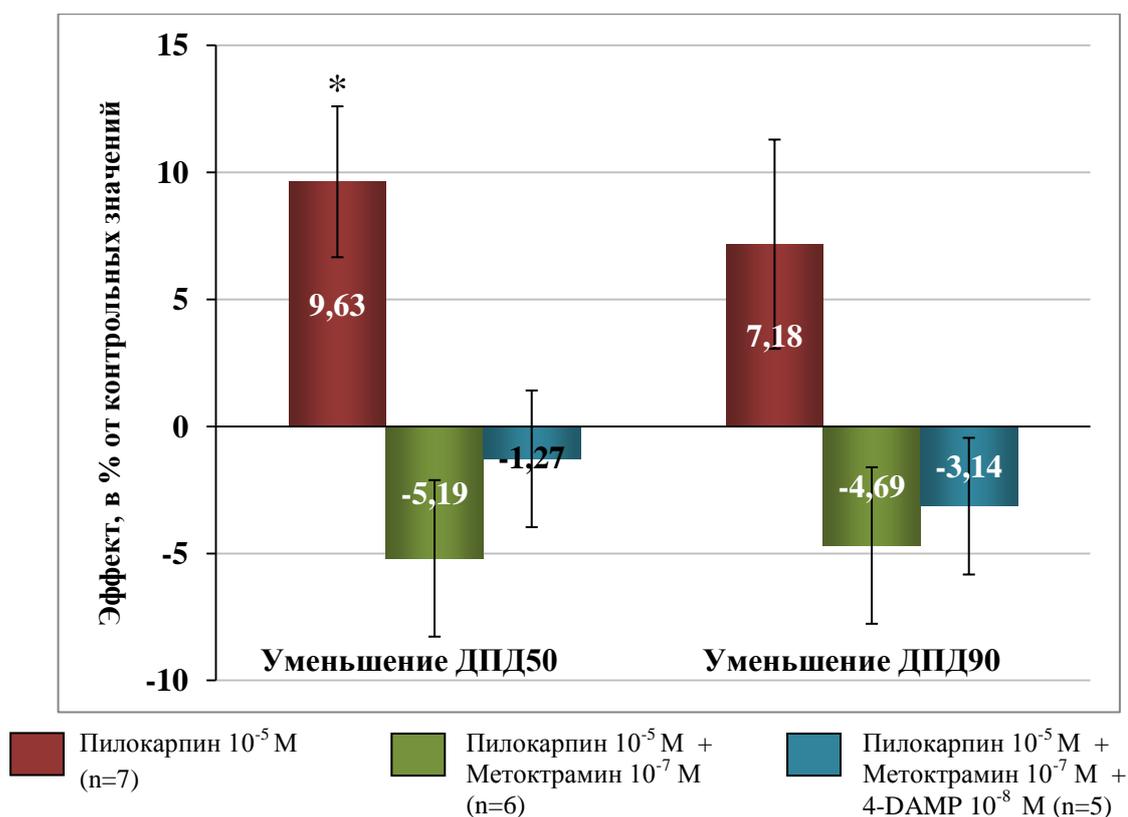


Рисунок 58. Эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов в желудочковом рабочем миокарде 21-дневного крысенка пилокарпином. Достоверных эффектов на миокард при действии пилокарпина на фоне метоктрамина не наблюдается. По оси ординат: соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ .

Итак, по результатам, полученным в ходе электрофизиологических экспериментов, оказалось, что в желудочковом миокарде трехнедельных крысят физиологически значимые М3-рецепторы также не обнаруживаются, а эффекты пилокарпина выражены слабее, чем в миокарде взрослых животных.

#### 4.3.3. Сравнение эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов на параметры электрической активности миокарда на разных стадиях постнатального развития крысы

Сравнение эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов в предсердном миокарде представлено на рисунке 59. Наиболее выраженное действие пилокарпин на длительности ПД оказывает в предсердном миокарде взрослых животных. У новорожденных и трехнедельных крысят эти эффекты выражены слабее в 2,5 и 1,7 раза соответственно. При сравнении эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов в предсердном миокарде становится видно, что эффекты пилокарпина на фоне метоктрамина у новорожденных и

трехнедельных крысят также выражены слабее, чем у взрослых животных. Кроме того, у 21-дневных животных эти изменения не являются достоверными.

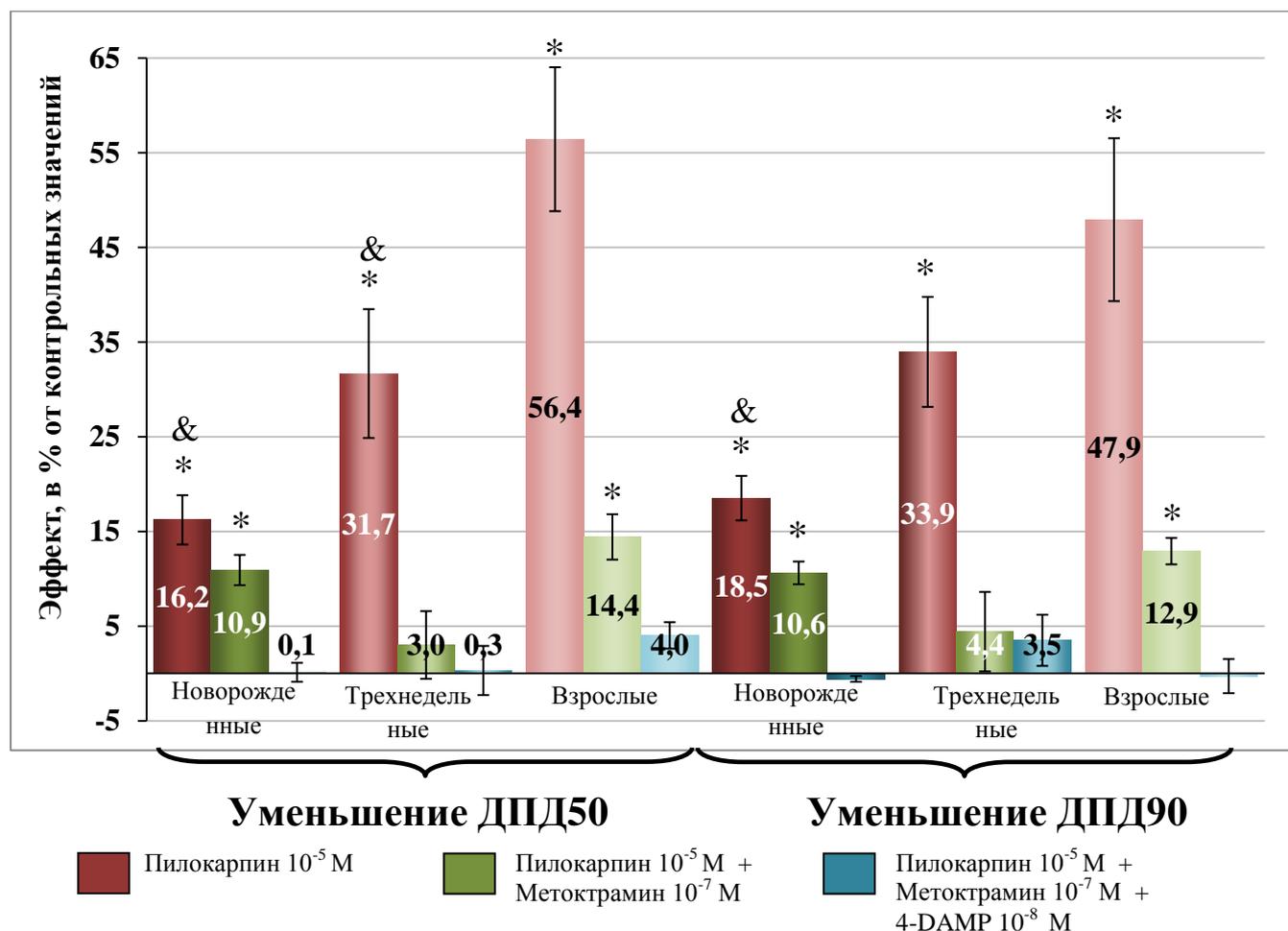


Рисунок 59. Сравнение эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов в предсердном миокарде новорожденной, трехнедельной и взрослой крысы, работающем в собственном ритме. Происходит уменьшение длительности ПД на уровне 50% и 90% реполяризации. По оси ординат: соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ , & - достоверность отличия от взрослых, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

Однако в желудочках ситуация кардинальным образом отличается от того, что мы наблюдали в предсердиях (рис. 60). Эффекты пилокарпина в желудочковом миокарде оказались выражены почти в 2 раза сильнее, чем у взрослых животных. При этом у трехнедельных крысят уменьшение ДПД происходит на уровне взрослых особей. При избирательной стимуляции М3-рецепторов у новорожденных особей эффект пилокарпина превосходит эффекты у взрослых животных почти в 3 раза, в то время как у трехнедельных крысят уменьшения ДПД не наблюдается ни на уровне 50% ни 90% реполяризации.

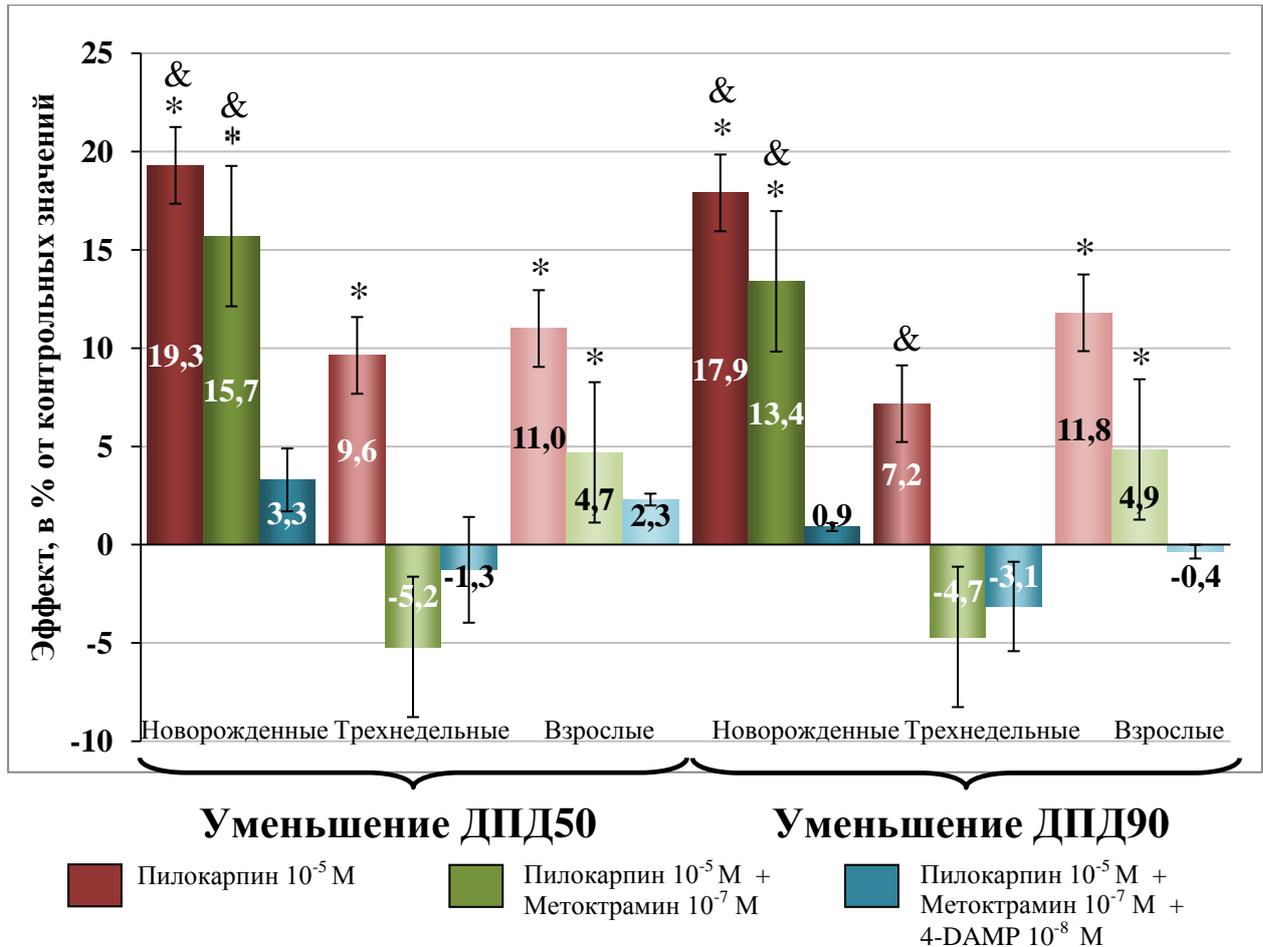


Рисунок 60. Сравнение эффектов избирательной стимуляции М3-рецепторов в желудочковом миокарде новорожденной, трехнедельной и взрослой крысы. По оси ординат: соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле. \* - достоверность эффекта по сравнению с контролем до действия вещества, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ , & - достоверность отличия от взрослых, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

Таким образом, наши результаты электрофизиологических экспериментов показывают, что в миокарде новорожденных крысят М3-рецепторы играют важную роль в опосредовании холинергических эффектов холиномиметиков в желудочковом миокарде.

#### 4.3.4. Измерение уровня транскрипции генов M2- и M3-рецепторов в миокарде крысы на разных стадиях постнатального развития

Следующим этапом нашей работы стало измерение уровня транскрипции генов M2-и M3-рецепторов в предсердии и желудочке крысы на разных стадиях постнатального развития.

##### 4.3.4.1. Измерение уровня транскрипции генов M2- и M3-рецепторов в миокарде новорожденных крысят

Результаты измерения уровня транскрипции генов M2-рецепторов в предсердиях и желудочках новорожденных крысят показаны на рисунке. 61. Как видно из диаграммы уровень экспрессии генов M2-рецепторов в разных отделах сердца практически не различается и составляет  $760,37 \pm 375,6$  отн. ед. для предсердий и  $761,22 \pm 602,1$  отн. ед. для желудочков. Уровень синтеза мРНК сильно отличался у разных особей, с чем связан значительный разброс данных, но был примерно одинаков в предсердии и желудочке одного животного.

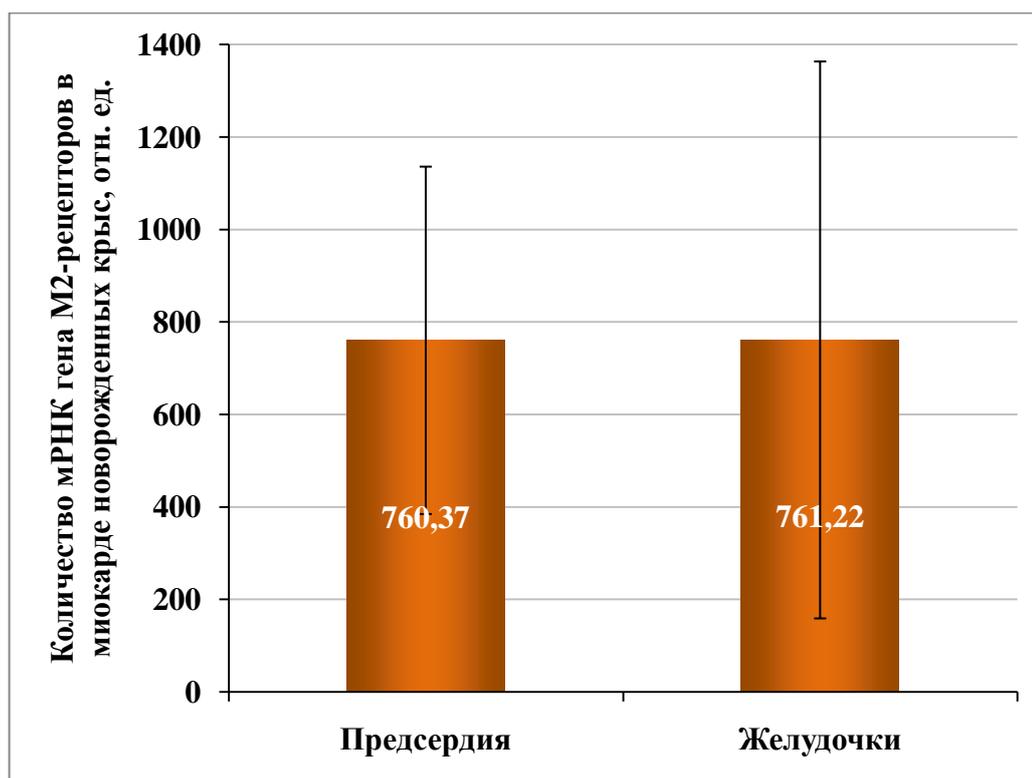


Рисунок 61. Относительный уровень транскрипции гена M2-рецептора (n=6) в предсердиях и желудочках новорожденных крысят. По оси ординат отложено относительное количество мРНК в образцах, вычисленное по результатам РВ-ПЦР. Результаты нормированы на количество РНК, выделенной из образцов. Результаты приведены в относительных единицах прибора, на котором проводился РВ-ПЦР.

Уровень экспрессии генов М3-рецепторов также оказался примерно на одинаковом уровне в ткани предсердий (5,36 $\pm$ 3,8 отн.ед.) и желудочков (4,99 $\pm$ 4,4) (рис.62). Стоит отметить, что уровень транскрипции М3-рецепторов оказался значительно выше в миокарде новорожденных крысят, чем в предсердиях и желудочках взрослых животных. Так в предсердиях количество синтезированной мРНК М3-рецепторов у новорожденных увеличено более чем в 5 раз относительно взрослых, а в желудочках более чем в 20 раз. Данные молекулярно-биологических исследований согласуются с результатами, полученными нами в ходе работы по внутриклеточной регистрации потенциала действия, и указывают на особую роль мускариновых рецепторов третьего типа в работе сердец новорожденных крыс.

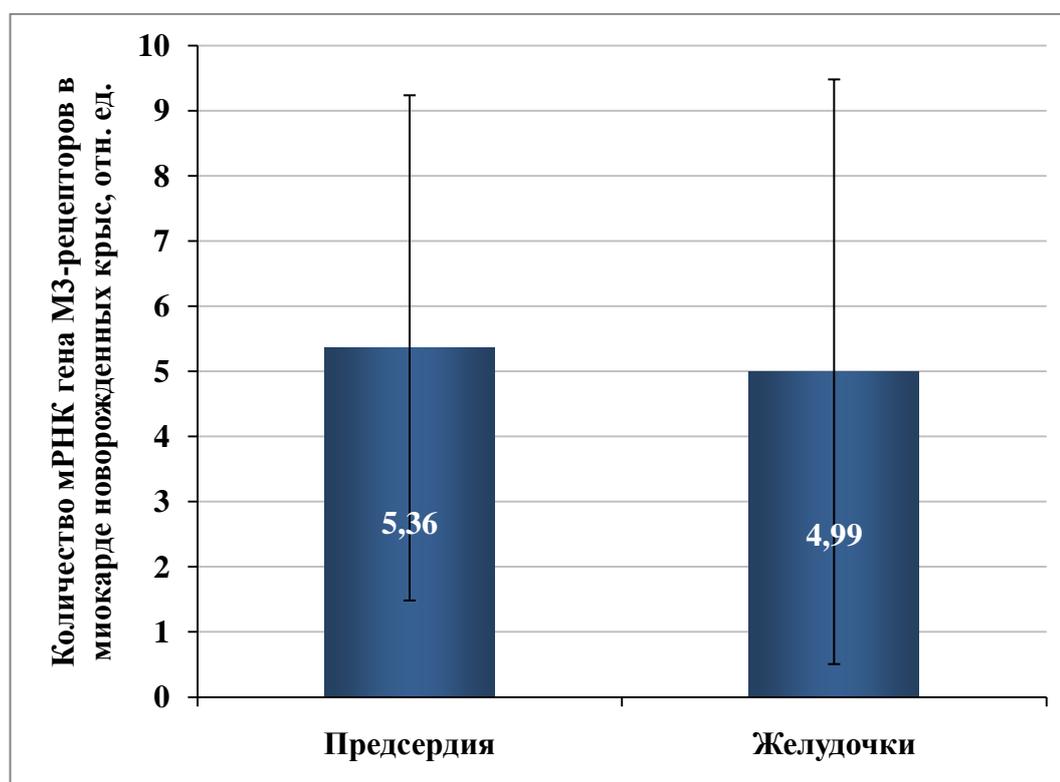


Рисунок 62. Относительный уровень транскрипции гена М3-рецептора (n=6) в предсердиях и желудочках новорожденных крысят. По оси ординат отложено относительное количество мРНК в образцах, вычисленное по результатам РВ-ПЦР. Результаты нормированы на количество РНК, выделенной из образцов. Результаты приведены в относительных единицах прибора, на котором проводился РВ-ПЦР.

Во всех экспериментах уровень транскрипции генов мы нормировали на количество тотальной РНК выделенной из образцов и взятое в реакцию обратной транскрипции. Нормировка на ген домашнего хозяйства GAPDH, как и в случае с взрослыми животными, оказалась невозможной, поскольку уровень транскрипции этого гена отличался на несколько порядков на разных стадиях постнатального развития крысы. По всей видимости, у животных

разного возраста принципиально отличается уровень метаболизма, поэтому поиск адекватного референсного для подобных задач является темой отдельно работы.

Таким образом, мы показали, что и в предсердиях и в желудочках синтезируется мРНК как M2- так и M3-рецепторов. При этом в отличие от миокарда взрослых животных уровень экспрессии генов мускариновых рецепторов оказался примерно одинаков в разных отделах миокарда. Уровень экспрессии гена M2-рецепторов в сердце в примерно 140 раз выше, чем M3-рецепторов.

#### 4.3.4.2. Измерение уровня транскрипции генов M2- и M3-рецепторов в миокарде трехнедельных крыс

Уровень транскрипции M2-рецепторов в предсердиях трехнедельных крысят составил  $2589,51 \pm 644,9$  отн.ед., а в желудочках  $1661,39 \pm 472,92$  отн.ед. Из диаграммы, представленной на рисунке 63, видно, что уровень экспрессии гена M2-рецепторов, в предсердиях несколько выше, чем в желудочках, однако эти различия не являются достоверными. Также стоит отметить, что у трехнедельных крысят уровень синтеза мРНК M2-рецепторов повышен по сравнению с взрослыми животными в предсердиях почти в 4 раза, а в желудочках почти в 30 раз.

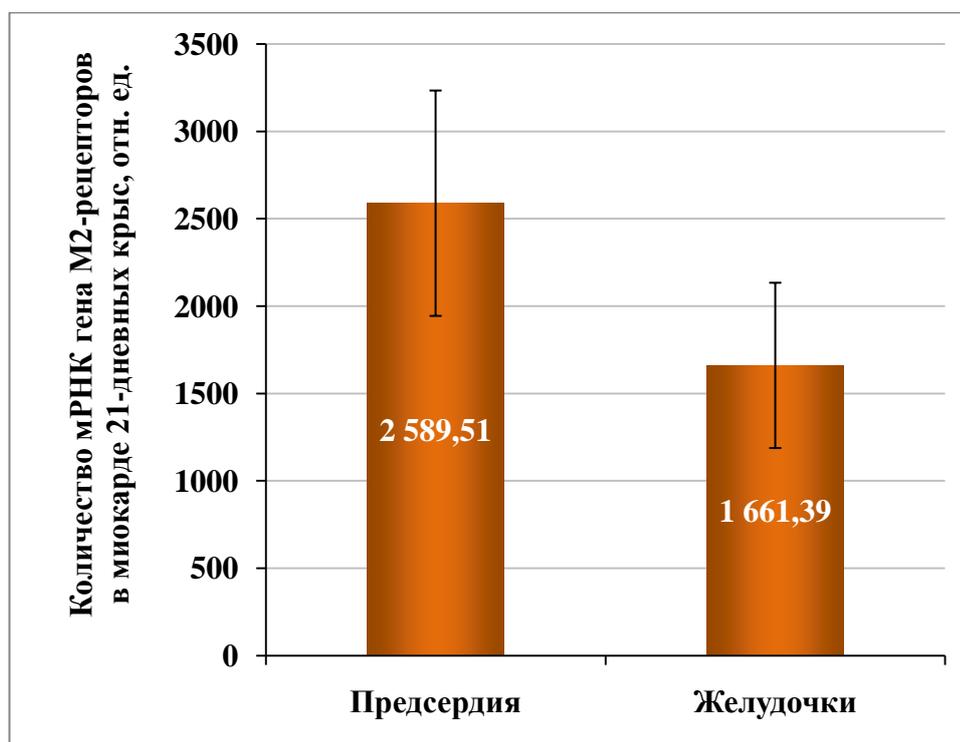


Рисунок 63. Относительный уровень транскрипции гена M2-рецептора (n=6) в предсердиях и желудочках трехнедельных крысят. По оси ординат отложено относительное количество мРНК в образцах, вычисленное по результатам РВ-ПЦР. Результаты нормированы на количество РНК,

выделенной из образцов. Результаты приведены в относительных единицах прибора, на котором проводился РВ-ПЦР.

Эксперименты показали, что уровень транскрипции М3-рецепторов составил в предсердиях  $6,0,1 \pm 2,9$  отн.ед., а в желудочках  $3,96 \pm 1,31$  отн.ед (рис. 64). Уровень экспрессии гена М3-рецептора в сердце трехнедельных крысят, также как и М2-, оказался выше чем в миокарде взрослых животных.

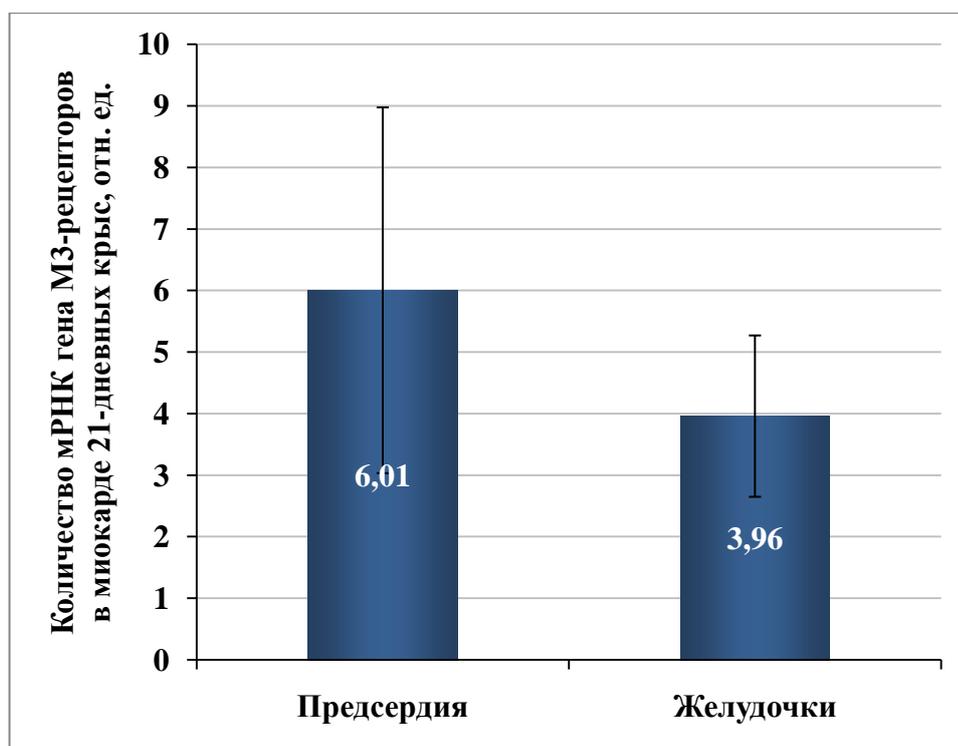


Рисунок 64. Относительный уровень транскрипции гена М3-рецептора ( $n=6$ ) в предсердиях и желудочках трехнедельных крысят. По оси ординат отложено относительное количество мРНК в образцах, вычисленное по результатам РВ-ПЦР. Результаты нормированы на количество РНК, выделенной из образцов. Результаты приведены в относительных единицах прибора, на котором проводился РВ-ПЦР.

Результаты наших экспериментов показывают, что мРНК исследуемых типов мускариновых рецепторов присутствует в предсердном и желудочковом миокарде 21-дневных крыс. Уровень экспрессии как М2- так и М3-рецепторов оказался несколько выше в суправентрикулярном миокарде, однако эти различия недостоверны. Количество мРНК М2-рецепторов в предсердиях более чем в 400 раз выше нежели в желудочках.

#### 4.3.4.3. Сравнение уровня экспрессии генов М2- и М3-рецепторов в миокарде крысы на разных стадиях постнатального развития

В ходе нашей работы мы обнаружили, что мРНК мускариновых рецепторов второго и третьего типа синтезируется тканях предсердий и желудочков крыс разных возрастов. На рис.

65 представлено сравнение относительного уровня транскрипции гена M2-рецепторов в миокарде новорожденных, трехнедельных и взрослых крыс. Как видно из диаграммы наибольшее количество мРНК M2-рецепторов детектировано в предсердии 21-дневных крыс. В предсердиях и желудочках новорожденных животных уровень экспрессии генов M2-рецепторов оказался примерно одинаков, в то время как у взрослых животных в предсердиях синтезировалось в 11 раз мРНК M2-рецепторов, чем в желудочках.

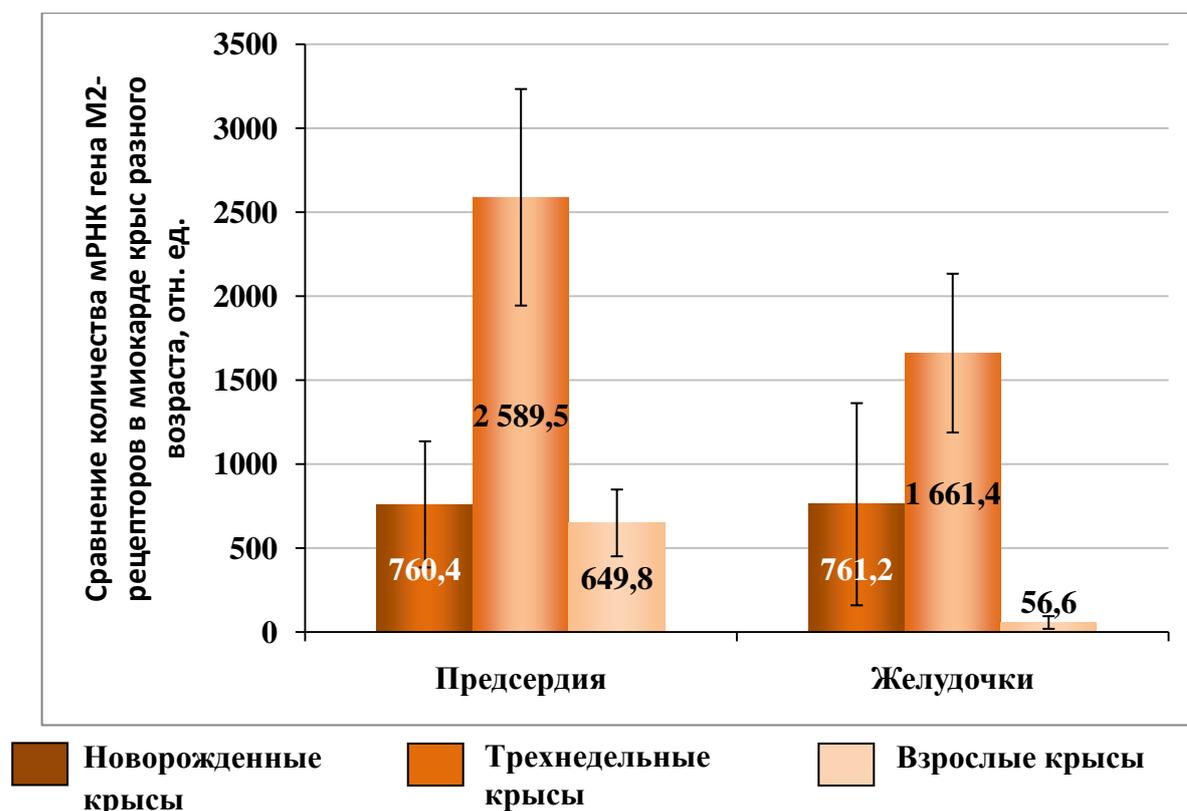


Рисунок 65. Относительный уровень транскрипции гена M2-рецептора в предсердиях и желудочках новорожденных, трехнедельных и взрослых крыс. По оси ординат отложено относительное количество мРНК в образцах, вычисленное по результатам РВ-ПЦР. Результаты нормированы на количество РНК, выделенной из образцов. Результаты приведены в относительных единицах прибора, на котором проводился РВ-ПЦР.

Количество мРНК M3-рецепторов у новорожденных и трехнедельных крысят оказалось на одном уровне в предсердиях и желудочках (рис.66). Также стоит отметить, что уровень экспрессии гена M3-рецептора в миокарде крысят в несколько раз выше, чем в миокарде взрослых животных. Особенно эти различия заметны в тканях желудочков, где количество мРНК у взрослых животных почти в 20 раз ниже, чем у молодых особей.

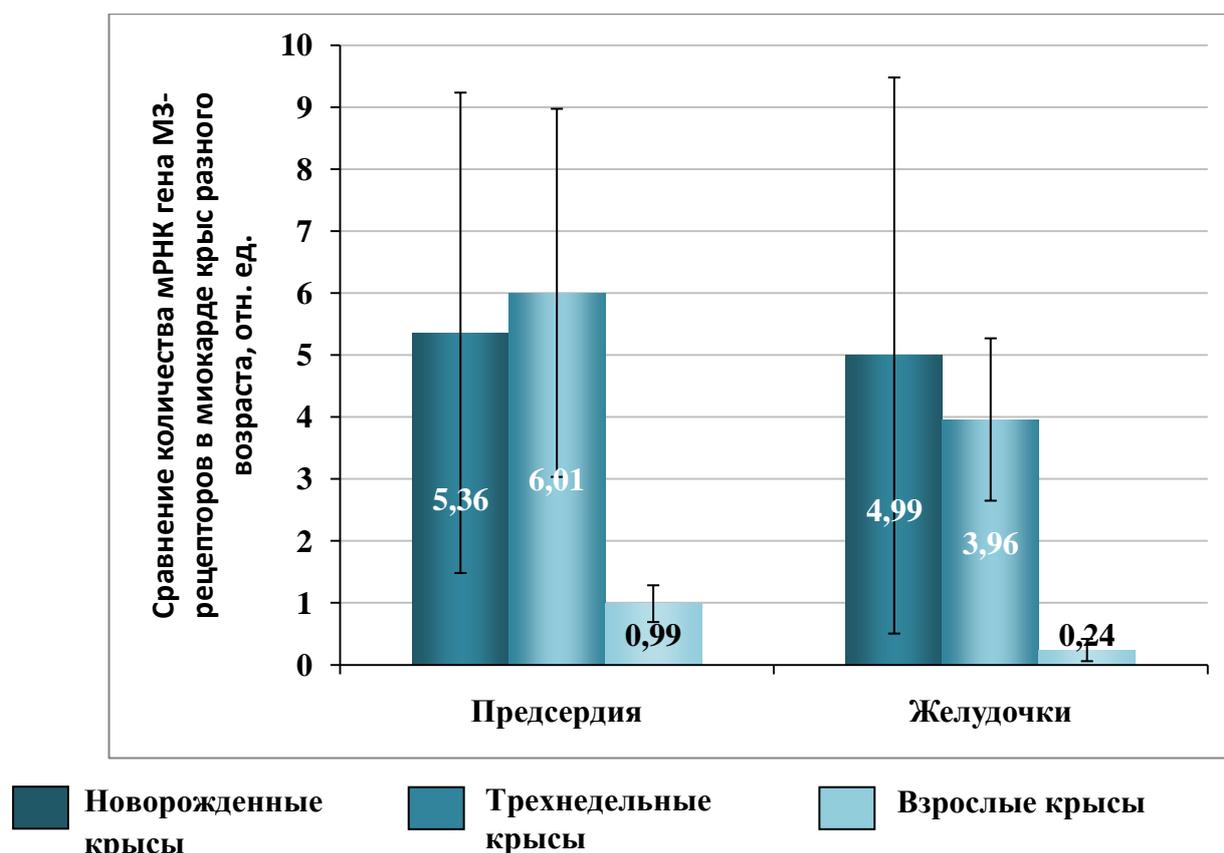


Рисунок 66. Относительный уровень транскрипции гена М3-рецептора в предсердиях и желудочках новорожденных, трехнедельных и взрослых крыс. По оси ординат отложено относительное количество мРНК в образцах, вычисленное по результатам РВ-ПЦР. Результаты нормированы на количество РНК, выделенной из образцов. Результаты приведены в относительных единицах прибора, на котором проводился РВ-ПЦР.

При этом относительное количество мРНК в миокарде новорожденных оказалось в несколько раз выше, чем у трехнедельных и взрослых крыс (рис. 67). Если судить по данным РВ-ПЦР, то М3-рецепторы составляют около 0,7% от количества М2-рецепторов в сердце новорожденного крысенка. Это хорошо коррелирует с результатами полученными в ходе электрофизиологических экспериментов, где было показано, что миокард новорожденных крыс значительно более чувствителен к селективной активации М3-рецепторов по сравнению со взрослыми и трехнедельными животными. С другой стороны М3-рецепторы в предсердиях трехнедельных животных составляют лишь 0,23% относительно количества М2-рецепторов, что так же подтверждают электрофизиологические данные. Как было показано нами, эффекты селективной активации М3-рецепторов в миокарде трехнедельных крысят практически не развиваются. В отличие от молодых крыс, у которых вклад М3-рецепторов в работу предсердий и желудочков оказался примерно на одном уровне, у взрослых крыс относительный уровень М3-рецепторов в желудочках более чем в 2 раза выше, чем в суправентрикулярном миокарде.

Однако стоит отметить, что по всей видимости уровни трансляции рецепторных белков в миокарде трехнедельных и взрослых крыс несколько отличаются, поскольку не смотря на достаточную экспрессию генов М3-рецепторов у трехнедельных крыс физиологический эффект их активации нам обнаружить не удалось. В то же время у взрослых животных эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов были выражены достаточной степени.

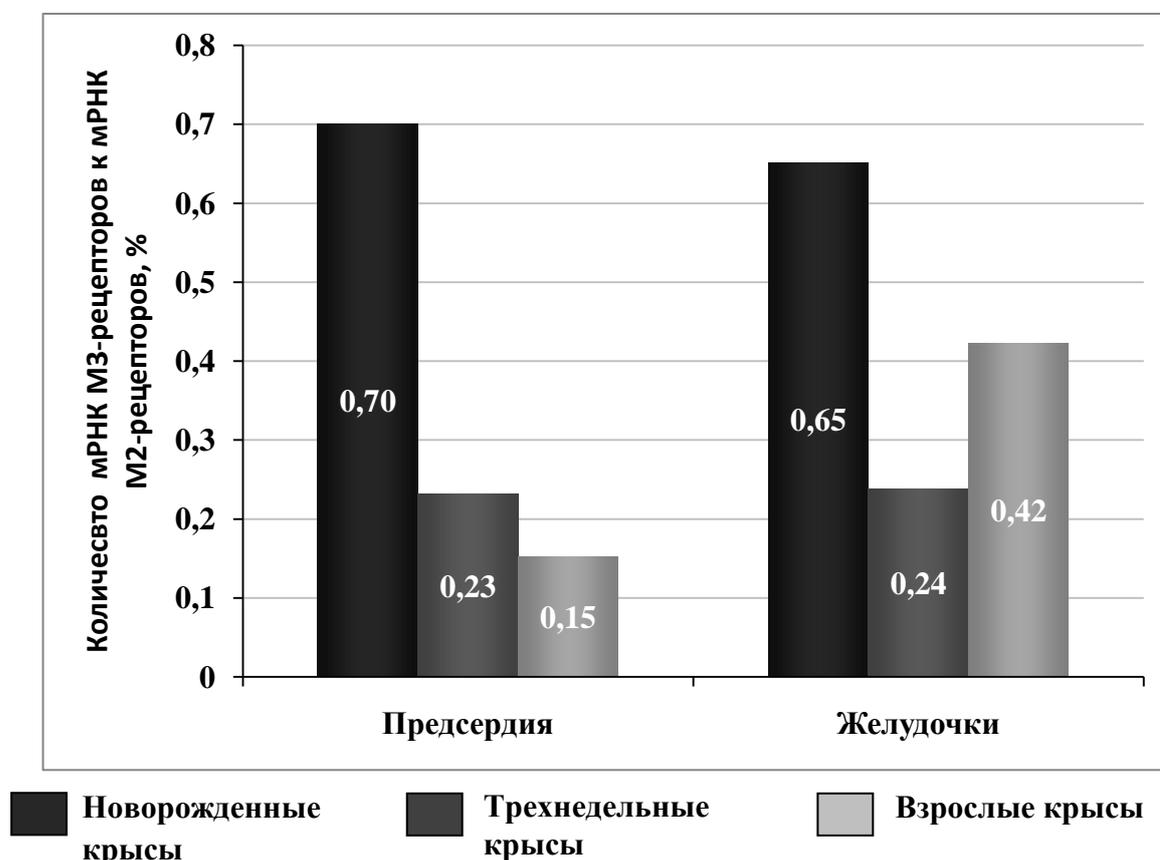


Рисунок 67. Отношение количества мРНК генов М3-рецепторов к количеству мРНК М2-рецепторов в предсердиях и желудочках новорожденных, трехнедельных и взрослых крыс.

#### 4.4 Недостатки используемых экспериментальных методик

В данной работе было использовано несколько различных методик для определения наличия М3-рецепторов и выяснения влияния селективной активации этих рецепторов на электрическую активность миокарда. Основной недостаток селективной активации М3-рецепторов, которую мы использовали при внутриклеточной регистрации электрической активности микроэлектродным методом и кальциевого тока методом пэтч-кламп, является не достаточная селективность использованных блокаторов и агонистов мускариновых рецепторов. Большинство используемых на данный момент агонистов и антагонистов обладают селективностью только в узком диапазоне концентраций. И хотя мы пользовались веществами в концентрациях для которых в других работах была показана достаточная селективность [Shi et

al., 1999; Wang et al., 1999; Meyer et al., 2001; Shi et al., 2003; Shi et al., 2004a; Shi et al., 2004b), исключать неполную блокаду мускариновых рецепторов того или иного типа мы не можем.

На работу выполненную методом иммуногистохимического окрашивания накладывает ограничение селективность антител. Из-за высокой гомологии известных типов мускариновых рецепторов, антитела могут работать не достаточно эффективно и мы не можем исключать кросс-реактивное окрашивание сердечной ткани [Jositsch et al., 2009].

Методика РВ-ПЦР для измерения уровня синтеза мРНК является точной, однако, и тут мы столкнулись с некоторыми трудностями. В первую очередь это связано с невозможностью использовать стандартный метод нормирования данных на уровень экспрессии генов домашнего хозяйства, поскольку, по всей видимости, уровень метаболизма в предсердиях и желудочках грызунов разных возрастов принципиально различается. Задача нахождения адекватного референсного гена для работ на ткани различных отделов сердца, а также животных разных возрастов, является на наш взгляд темой отдельной работы. Поэтому наши результаты мы нормировали на тотальное количество РНК, взятое в реакцию обратной транскрипции. Кроме того уровень экспрессии того или иного гена может не соответствовать уровню белкового продукта, который кодирует этот ген, поскольку в клетке существует множество механизмов посттранскрипционной регуляции.

Таким образом, использование только одной из перечисленных методик не могло бы достоверно показать наличие М3-рецепторов. Однако применение нескольких подходов к решению данной задачи мы считаем убедительным доказательством в пользу наличия и функциональной значимости мускариновых рецепторов третьего типа в миокарде лабораторных грызунов.

#### **4.5 Возможное физиологическое значение М3-рецепторов**

В ходе данной работы было показано, что в процессе постнатального развития происходят существенные изменения рецепторного механизма реализации холинергических влияний на миокард. Электрофизиологическими методами было показано, что эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов в миокарде новорожденных животных существенно выше, чем у взрослых. Особенно сильно эти эффекты выражены в желудочковом миокарде. Эти данные подтвердились и молекулярно-биологическими методами, оказалось, что уровень экспрессии гена М3-рецепторов значительно выше в миокарде новорожденных. С другой стороны миокард трехнедельных крысят оказался нечувствительным к избирательной стимуляции и относительное количество мРНК М3-рецепторов было значительно ниже в миокарде новорожденных. Полученные нами результаты позволяют предположить, что в ходе онтогенеза мускариновые рецепторы третьего типа могут выполнять особую роль. Ранее в работах нескольких авторов было показано, что М3-рецепторы могут оказывать

кардиопротекторное действие в условиях окислительного стресса [Liu et al., 2004a; Liu et al., 2004b]. Исходя из этих данных, можно предположить, что в миокарде новорожденных животных МЗ-рецепторы также выполняют кардиопротекторную функцию и защищают сердце от окислительного стресса, который развивается во время родов. Затем, в процессе развития, необходимость в защите подобного рода стресса отпадает и количество МЗ-рецепторов уменьшается, что мы и наблюдаем у трехнедельных крысят. Также и в миокарде взрослых крыс наблюдаются крайне скромные эффекты селективной активации МЗ-рецепторов.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, в нашей работе было показано наличие и функциональная значимость в сердце лабораторных грызунов мускариновых рецепторов третьего типа. Кроме того, показана их особая роль в регуляции сердечной деятельности в ходе онтогенеза.

Нами при помощи методик РВ-ПЦР и иммуногистохимического окрашивания было показано, что М2- и М3-рецепторы присутствуют во всех отделах сердца мыши и крысы. В частности впервые показано наличие М3-рецепторов в области синоатриального узла мыши. Также при помощи внутриклеточной микроэлектродной регистрации ПД нами была подтверждена физиологическая значимость третьего типа мускариновых рецепторов в сердце. Так, при избирательной стимуляции М3-рецепторов в рабочем миокарде происходит уменьшение длительности ПД, а в синоатриальном узле это приводит к небольшому замедлению ритма за счет торможения медленной диастолической деполяризации пейсмекерных клеток.

При исследовании внутриклеточных механизмов, которые могут обуславливать наблюдаемые эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов в сердце, нами было показано, что помимо активации ранее описанного тока  $I_{KM3}$  [Shi, Wang, Wang, 1999a; Shi et al., 1999; Shi, Wang, Wang, 1999b; Wang et al., 1999; Shi et al., 2004a; Shi et al., 2004b; Shi et al., 2004b], укорочение деполяризации в значительной степени может быть вызвано активацией протеинкиназы С посредством фосфоинозитидного пути внутриклеточной сигнализации. Также описанное нами воздействие М3-стимуляции на конфигурацию электрической активности можно объяснить подавлением кальциевого тока, однако это справедливо лишь в отношении предсердного миокарда, что было показано нами при помощи методики пэтч-кламп в конфигурации whole-cell.

В экспериментах на миокарде новорожденных, трехнедельных и взрослых крыс мы показали особую роль М3-рецепторов в работе желудочкового миокарда новорожденных животных, что возможно связано с ранее описанной кардиопротекторной функцией М3-рецепторов [Liu et al., 2004a; Liu et al., 2004b]. Также нами было показано, что относительное количество М3-рецепторов в ходе онтогенеза уменьшается и их вклад в работу сердца снижается.

Таким образом, данная работа существенно дополняет представления о механизмах холинергической регуляции сердца лабораторных грызунов. Участие мускариновых рецепторов третьего типа в опосредовании парасимпатических влияний необходимо принимать во внимание в последующих исследованиях механизмов функционирования и регуляции миокарда этих животных, а также при использовании патофизиологических моделей с участием крыс и мышей.

## 6. Выводы

1. Стимуляция М3-холинорецепторов приводит к уменьшению длительности ПД в предсердном и желудочковом рабочем миокарде крысы и мыши, а также к замедлению автоматической активности в синоатриальном узле мыши.
2. Во всех этих типах миокарда обнаруживается мРНК как М2-, так и М3-холинорецепторов.
3. М2- и М3-рецепторы обнаруживаются с помощью окраски мечеными антителами в рабочем и пейсмекерном миокарде мыши.
4. Описанное действие М3-стимуляции на электрическую активность в значительной степени опосредуется фосфоинозитидным сигнальным каскадом и протеинкиназой С, и по крайней мере частично связано с уменьшением кальциевого тока L-типа.
5. Эффекты стимуляции М3-рецепторов в желудочковом миокарде новорожденных крысят выражены значительно сильнее, чем у взрослых крыс и, в особенности, трехнедельных животных. Это различие обусловлено более выраженной экспрессией гена М3-рецепторов в миокарде новорожденных крысят.

## 6. Список использованной литературы

1. Зефилов и др. МЗ-холинорецепторы участвуют в постнатальном развитии холинергической регуляции работы сердца крыс. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2007. – Т. 8.- с.135-137.
2. Зиятдинова Н.И. и др. Особенности влияния блокады М1-, М2- и М3-холинорецепторов на хронотропную функцию сердца крыс в неонатальном периоде // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2012. - Т. 154. - № 7. - с. 4–6.
3. Ребриков Д.В. ПЦР «в реальном времени» // Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др., под ред. Д.В Ребрикова – 2е изд., испр. и доп., - М: Бином. Лаборатория знаний, 2009. - с.223.
4. Ульянов С.В. Роль пространственной организации геномного локуса в феномене переключения экспрессии глобиновых генов: дис. канд. биол.наук: 03.01.03 // Ульянов Сергей Владимирович – М., 2013 – с.108.
5. Шуклин А.В., Швалев В.Н. Но-синтаза во внутрисердечных ганглиях человека в норме и при ишемии миокарда // Морфология. - 2006. - № 3. - С. 34–36.
6. Adabag A.S. et al. Sudden cardiac death: epidemiology and risk factors // Nat Rev Cardiol. - 2010. - V. 7. - № 4. - P. 216–225.
7. Akamatsu F.E., De-Souza R.R., Liberti E.A. Fall in the number of intracardiac neurons in aging rats // Mech. Ageing Dev. - 1999.- V. 109. - № 3. - P. 153–161.
8. Aliev R.R., Fedorov V.V., Rozenshtraukh L.V. Study of the effect of acetylcholine on ion currents in single cells of true and latent pacemakers of rabbit sinus node using computer simulation // Dokl. Biol. Sci. - 2004. - V. 397. - P. 288–291.
9. Ardell J.L., Quillen J.H., Armour J.A. Basic and Clinical Neurocardiology. : Oxford University Press, - 2004. - P. 492.
10. Armour J.A. Activity of in situ middle cervical ganglion neurons in dogs, using extracellular recording techniques // Can. J. Physiol. Pharmacol. - 1985. - V. 63. - № 6. - P. 704–716.
11. Armour J.A. Activity of in situ stellate ganglion neurons of dogs recorded extracellularly // Can. J. Physiol. Pharmacol. - 1986. - V. 64. - № 2. - P. 101–111.
12. Armour J.A. Functional anatomy of intrathoracic neurons innervating the atria and ventricles // Heart Rhythm. - 2010. - V. 7. - № 7. - P. 994–996.
13. Armour J.A. The little brain on the heart. // Cleveland Clinic Journal of Medicine. - 2007. - V. 74. - № Suppl 1. – P. S48.
14. Armour J.A., Hopkins D.A. Activity of canine in situ left atrial ganglion neurons // American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. - 1990. - V. 259. - № 4. - P. 1207–1215.

15. Baldwin J.M. Structure and function of receptors coupled to G proteins // *Curr. Opin. Cell Biol.* - 1994. - V. 6. - № 2. – P. 180–190.
16. Bałuk P., Gabella G. Some parasympathetic neurons in the guinea-pig heart express aspects of the catecholaminergic phenotype in vivo // *Cell Tissue Res.* - 1990. - V. 261. - № 2. - P. 275–285.
17. Bare D.J. et al. Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II // *J. Biol. Chem.* - 2005. - V. 280. - № 16. - P. 15912–15920.
18. Barros F. et al. Modulation of human erg K<sup>+</sup> channel gating by activation of a G protein-coupled receptor and protein kinase C // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1998. - V. 511. - P. 333–346.
19. Batulevicius D. et al. Topography of the porcine epicardiac nerve plexus as revealed by histochemistry for acetylcholinesterase // *Autonomic Neuroscience.* - 2008. - V. 138. - № 1–2. - P. 64–75.
20. Batulevicius D., Pauziene N., Pauza D.H. Architecture and age-related analysis of the neuronal number of the guinea pig intrinsic cardiac nerve plexus // *Ann. Anat.* - 2005. - V. 187. - № 3. - P. 225–243.
21. Batulevicius D., Pauziene N., Pauza D.H. Topographic morphology and age-related analysis of the neuronal number of the rat intracardiac nerve plexus // *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger.* - 2003. - V. 185. - № 5. - P. 449–459.
22. Bean B.P., Nowycky M.C., Tsien R.W. Beta-adrenergic modulation of calcium channels in frog ventricular heart cells // *Nature.* - 1984. - V. 307. - № 5949. - P. 371–375.
23. Beau S.L., Hand D.E., Schuessler R.B. et al. Relative densities of muscarinic cholinergic and  $\beta$ -adrenergic receptors in the canine sinoatrial node and their relation to sites of pacemaker activity // *Circ. Res.* - 1995. - V.77. - P.957–963.
24. Bernardo B.C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies // *Pharmacol. Ther.* - 2010. - V. 128. № 1. - P. 191–227.
25. Bogoyevitch M.A., Parker P.J., Sugden P.H. Characterization of protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Protein kinase C-epsilon is a major isotype present, and it is activated by phorbol esters, epinephrine, and endothelin. // *Circulation Research.* - 1993. - V. 72. - № 4. - P. 757–767.
26. Bootman M.D. et al. An update on nuclear calcium signalling // *J. Cell. Sci.* - 2009. - V. 122. - № Pt 14. - P. 2337–2350.
27. Bourinet E. et al. Protein kinase C regulation of cardiac calcium channels expressed in *Xenopus oocytes* // *Pflugers Arch.* - 1992. - V. 421. - № 2-3. - P. 247–255.

28. Bowling N. et al. Increased Protein Kinase C Activity and Expression of Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Isoforms in the Failing Human Heart // *Circulation*. - 1999. - V. 99. - № 3. - P. 384–391.
29. Braz J.C. et al. PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) // *J. Cell Biol.* - 2002. - V. 156. - № 5. - P. 905–919.
30. Bucchi A. et al. Modulation of rate by autonomic agonists in SAN cells involves changes in diastolic depolarization and the pacemaker current // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 2007. - V. 43. - № 1. - P. 39–48.
31. Butler C.K. et al. Cardiac responses to electrical stimulation of discrete loci in canine atrial and ventricular ganglionated plexi // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. - 1990. - V. 259. - № 5. - P. H1365–H1373.
32. Cabrera-Vera T.M. et al. Insights into G protein structure, function, and regulation // *Endocr. Rev.* - 2003. - V. 24. - № 6. - P. 765–781.
33. Calupca M.A., Vizzard M.A., Parsons R.L. Origin of neuronal nitric oxide synthase (NOS)-immunoreactive fibers in guinea pig parasympathetic cardiac ganglia // *J. Comp. Neurol.* - 2000. - V. 426. - № 3. - P. 493–504.
34. Castro R.R.T. et al. Cholinergic stimulation with pyridostigmine protects against exercise induced myocardial ischaemia // *Heart Br. Card. Soc.* - 2004. - V. 90. - № 10. - P. 1119–1123.
35. Caulfield M.P., Birdsall N.J.M. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors // *Pharmacol Rev.* - 1998. - V. 50. - № 2. - P. 279–290.
36. Chan W.Y. et al. Cardiac neural crest of the mouse embryo: axial level of origin, migratory pathway and cell autonomy of the splotch (Sp2H) mutant effect // *Development*. - 2004. - V. 131. - № 14. - P. 3367–3379.
37. Chen F., Klitzner T.S., Weiss J.N. Autonomic regulation of calcium cycling in developing embryonic mouse hearts // *Cell Calcium*. - 2006. - V. 39. - № 5. - P. 375–385.
38. Cho H. et al. Acetylcholine-induced Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Depletion Does Not Cause Short-term Desensitization of G Protein-gated Inwardly Rectifying K<sup>+</sup> Current in Mouse Atrial Myocytes // *J. Biol. Chem.* - 2002. - V. 277. - № 31. - P. 27742–27747.
39. Cho H., Youm J.B., Earm Y.E., Ho W.K. Inhibition of acetylcholine-activated K<sup>(+)</sup> current by chelerythrine and bisindolylmaleimide I in atrial myocytes from mice // *Eur. J. Pharmacol.* - 2001. - V. 424. - P. 173-178.
40. Choate J.K. et al. Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* - 2001. - V. 281. - № 6. - P. H2310–2317.

41. Chow L.T. et al. The innervation of the human myocardium at birth. // *J Anat.* – 1995. – V. 187. – № Pt 1. – P. 107–114.
42. Conlon K., Kidd C. Neuronal nitric oxide facilitates vagal chronotropic and dromotropic actions on the heart // *Journal of the Autonomic Nervous System.* – 1999. – V. 75. – № 2–3. – P. 136–146.
43. Corey S., Clapham D.E. The Stoichiometry of Gbeta gamma binding to G-protein-regulated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – № 14. – P. 11409–11413.
44. Curtis C.A. et al. Propylbenzylcholine mustard labels an acidic residue in transmembrane helix 3 of the muscarinic receptor // *J. Biol. Chem.* – 1989. – V. 264. – № 1. – P. 489–495.
45. Dempsey E.C. et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses // *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* – 2000. – V. 279. – № 3. – P. L429–L438.
46. Deo R., Albert C.M. Epidemiology and Genetics of Sudden Cardiac Death // *Circulation.* – 2012. – V. 125. – № 4. – P. 620–637.
47. Dhein S., Koppen C.J. van, Brodde O.E. Muscarinic receptors in the mammalian heart // *Pharmacol. Res.* – 2001. V. 44. № 3. P. 161–182.
48. DiFrancesco D., Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP // *Nature.* – 1991. – V. 351. – № 6322. – P. 145–147.
49. DiFrancesco D., Tromba C. Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes // *J. Physiol. (Lond.).* – 1988. – V. 405. – P. 493–510.
50. Digby G.J. et al. Novel allosteric agonists of M1 muscarinic acetylcholine receptors induce brain region-specific responses that correspond with behavioral effects in animal models // *J. Neurosci.* – 2012. – V. 32. – № 25. – P. 8532–8544.
51. Disatnik M.H., Buraggi G., Mochly-Rosen D. Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes // *Exp. Cell Res.* – 1994. – V. 210. – № 2. – P. 287–297.
52. Doble B.W., Ping P., Kardami E. The epsilon subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation // *Circ. Res.* – 2000. – V. 86. – № 3. – P. 293–301.
53. Dobrev, D., Knuschke, D., Richter, F., Wettwer, E., Christ, T., Knaut, M. & Ravens, U. Functional identification of m1 and m3 muscarinic acetylcholine receptors in human atrial myocytes: influence of chronic atrial fibrillation // *Circulation.* - 2002. - V. 19. - P. II–154.
54. Domeier T.L. et al. IP3 receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – V. 294. – № 2. – P. H596–604.

55. Doods H.N. et al. Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand and in vivo experiments for the putative M1, M2 and M3 receptors // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1987. – V. 242. – № 1. – P. 257–262.
56. Dörje F., Levey A.I., Brann M.R. Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m1-m5) in rabbit peripheral tissues // *Mol. Pharmacol.* – 1991. – V. 40. – № 4. – P. 459–462.
57. Dorn G.W. et al. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes  $\epsilon$  protein kinase C translocation // *PNAS.* – 1999. – V. 96. – № 22. – P. 12798–12803.
58. Du X.Y. et al. Characterization of the positive and negative inotropic effects of acetylcholine in the human myocardium // *Eur. J. Pharmacol.* – 1995. – V. 284. – № 1-2. – P. 119–127.
59. Dvorakova M.C., Kruzliak P., Rabkin S.W. Role of neuropeptides in cardiomyopathies // *Peptides.* – 2014. – V. 61C. – P. 1–6.
60. Ferreira J.C.B., Brum P.C., Mochly-Rosen D.  $\beta$ IIPKC and  $\epsilon$ PKC isozymes as potential pharmacological targets in cardiac hypertrophy and heart failure // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2011. – V. 51. – № 4. – P. 479–484.
61. Fischmeister R., Hartzell H.C. Mechanism of action of acetylcholine on calcium current in single cells from frog ventricle // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1986. – V. 376. – P. 183–202.
62. Ford A.P., Eglén R.M., Whiting R.L. Analysis of muscarinic cholinergic receptors mediating phosphoinositide hydrolysis in guinea pig cardiac muscle // *Eur. J. Pharmacol.* – 1992. – V. 225. – № 2. – P. 105–112.
63. Fregoso S.P., Hoover D.B. Development of cardiac parasympathetic neurons, glial cells, and regional cholinergic innervation of the mouse heart // *Neuroscience.* – 2012. – V. 221. – P. 28–36.
64. Gabella G. *Autonomic Nervous System* // eLS. : John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
65. Gagliardi M. et al. Activity of in vivo canine cardiac plexus neurons // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* – 1988. – V. 255. – № 4. – P. H789–H800.
66. Gallo M.P. et al. M1 muscarinic receptors increase calcium current and phosphoinositide turnover in guinea-pig ventricular cardiocytes. // *J Physiol.* 1993. V. 471. P. 41–60.
67. Gentry P.R. et al. Discovery, synthesis and characterization of a highly muscarinic acetylcholine receptor (mAChR)-selective M5-orthosteric antagonist, VU0488130 (ML381): a novel molecular probe // *ChemMedChem.* 2014. – V. 9. – № 8. – P. 1677–1682.
68. George W.J. et al. Elevation of Guanosine 3,5-Cyclic Phosphate in Rat Heart after Perfusion with Acetylcholine\* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1970. – V. 66. – № 2. – P. 398–403.
69. George W.J., Wilkerson R.D., Kadowitz P.J. Influence of acetylcholine on contractile force and cyclic nucleotide levels in the isolated perfused rat heart // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1973. – V. 184. – № 1. – P. 228–235.

70. Gómez A.M. et al. Ca(2+) fluxes involvement in gene expression during cardiac hypertrophy // *Curr Vasc Pharmacol.* 2013. V. 11. № 4. P. 497–506.
71. Haga K., Haga T., Ichiyama A. Phosphorylation by protein kinase C of the muscarinic acetylcholine receptor // *J. Neurochem.* 1990. V. 54. № 5. P. 1639–1644.
72. Hahn J.-Y. et al. Beta-catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – № 41. – P. 30979–30989.
73. Hall J.M. et al. Receptor subtypes or species homologues: relevance to drug discovery // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1993. – V. 14. – № 10. – P. 376–383.
74. Hang P. et al. Novel insights into the pervasive role of M(3) muscarinic receptor in cardiac diseases // *Curr Drug Targets.* – 2013. – V. 14. – № 3. – P. 372–377.
75. Hang P. et al. Reciprocal regulation between M3 muscarinic acetylcholine receptor and protein kinase C-epsilon in ventricular myocytes during myocardial ischemia in rats // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2009. – V. 380. – № 5. – P. 443–450.
76. Hardouin S.N. et al. Altered cardiovascular responses in mice lacking the M(1) muscarinic acetylcholine receptor // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2002. – V. 301. – № 1. – P. 129–137.
77. Harvey R.D. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cardiovascular function // *Handb Exp Pharmacol.* – 2012. – № 208. – P. 299–316.
78. Harvey R.D., Belevych A.E. Muscarinic regulation of cardiac ion channels // *Br J Pharmacol.* – 2003. – V. 139. – № 6. – P. 1074–1084.
79. Harvey R.D., Clark C.D., Hume J.R. Chloride current in mammalian cardiac myocytes. Novel mechanism for autonomic regulation of action potential duration and resting membrane potential // *J. Gen. Physiol.* – 1990. – V. 95. – № 6. – P. 1077–1102.
80. Harvey R.D., Hume J.R. Autonomic regulation of a chloride current in heart // *Science.* – 1989. – V. 244. – № 4907. – P. 983–985.
81. Harvey R.D., Hume J.R. Autonomic regulation of delayed rectifier K+ current in mammalian heart involves G proteins // *Am. J. Physiol.* – 1989b. – V. 257. – № 3 – Pt 2. – P. H818–823.
82. Harvey R.D., Hume J.R. Isoproterenol activates a chloride current, not the transient outward current, in rabbit ventricular myocytes // *Am. J. Physiol.* 1989a. – V. 257. – № 6 – Pt 1. – P. C1177–1181.
83. Harzheim D. et al. Increased InsP3Rs in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca2+ transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2009. – V. 106. – № 27. – P. 11406–11411.

84. Hasan W. Autonomic cardiac innervation // *Organogenesis*. – 2013. – V. 9. – № 3. – P. 176–193.
85. Hellgren I. et al. Muscarinic M3 receptor subtype gene expression in the human heart // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2000. – V. 57. – № 1. – P. 175–180.
86. Henning R.J., Sawmiller D.R. Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects // *Cardiovascular Research*. – 2001. – V. 49. – № 1. – P. 27–37.
87. Herbert J.M., Augereau J.M., Gleye J., Maffrand J.P. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1990. – V. 172. – P. 993–999.
88. Hildreth V. et al. Cells migrating from the neural crest contribute to the innervation of the venous pole of the heart // *J Anat.* – 2008. – V. 212. – № 1. – P. 1–11.
89. Hogan K., Markos F. Muscarinic type 1 receptors mediate part of nitric oxide's vagal facilitatory effect in the isolated innervated rat right atrium // *Nitric Oxide*. – 2007. – V. 16. – № 1. – P. 110–117.
90. Honoré E. et al. Cloning, expression, pharmacology and regulation of a delayed rectifier K<sup>+</sup> channel in mouse heart // *EMBO J.* 1991. – V. 10. – № 10. – P. 2805–2811.
91. Hoover D.B. et al. Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia // *Neuroscience*. – 2009. – V. 164. – № 3. – P. 1170–1179.
92. Horackova M., Armour J.A., Byczko Z. Distribution of intrinsic cardiac neurons in whole-mount guinea pig atria identified by multiple neurochemical coding. A confocal microscope study // *Cell Tissue Res.* – 1999. – V. 297. – № 3. – P. 409–421.
93. Horackova M., Slavikova J., Byczko Z. Postnatal development of the rat intrinsic cardiac nervous system: a confocal laser scanning microscopy study in whole-mount atria // *Tissue Cell*. – 2000. – V. 32. – № 5. – P. 377–388.
94. Hu J. et al. Structural basis of G protein-coupled receptor–G protein interactions // *Nat Chem Biol*. – 2010. – V. 6. – № 7. – P. 541–548.
95. Hu K., Mochly-Rosen D., Boutjdir M. Evidence for functional role of epsilonPKC isozyme in the regulation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2000. – V. 279. – № 6. – P. H2658–2664.
96. Hulme E.C., Birdsall N.J.M., Buckley N.J. Muscarinic Receptor Subtypes // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 1990. – V. 30. – № 1. – P. 633–673.
97. Humbert J.-P. et al. Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Is Located to the Inner Nuclear Membrane Vindicating Regulation of Nuclear Calcium Signaling by Inositol 1,4,5-Trisphosphate discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – № 1. – P. 478–485.

98. Ibarra C. et al. Local control of nuclear calcium signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal insulin-like growth factor 1 receptors // *Circ. Res.* – 2013. – V. 112. – № 2. – P. 236–245.
99. Inagaki K., Churchill E., Mochly-Rosen D. Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – V. 70. – № 2. – P. 222–230.
100. Inoguchi T. et al. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation // *PNAS.* – 1992. – V. 89. – № 22. – P. 11059–11063.
101. Iwamoto T. et al. Phosphorylation-dependent regulation of cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger via protein kinase C // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – № 23. – P. 13609–13615.
102. Jaiswal N. et al. Effect of M2 muscarinic receptor antagonist 4-DAMP, on prostaglandin synthesis and mechanical function in the isolated rabbit heart // *Gen. Pharmacol.* – 1989. – V. 20. – № 4. – P. 497–502.
103. Jerusalinsky D. et al. Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system // *Toxicol.* – 2000. – V. 38. – № 6. – P. 747–761.
104. Jones C.K. et al. Novel Selective Allosteric Activator of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Regulates Amyloid Processing and Produces Antipsychotic-like Activity in Rats // *J Neurosci.* – 2008. – V. 28. – № 41. – P. 10422–10433.
105. Jones D.L., Tuomi J.M., Chidiac P. Role of Cholinergic Innervation and RGS2 in Atrial Arrhythmia // *Front Physiol.* – 2012. – V. 3. – P. 239.
106. Jones P.G., Curtis C.A.M., Hulme E.C. The function of a highly-conserved arginine residue in activation of the muscarinic M1 receptor // *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology.* – 1995. – V. 288. – № 3. – P. 251–257.
107. Joseph J.A. et al. The M3 muscarinic receptor i3 domain confers oxidative stress protection on calcium regulation in transfected COS-7 cells // *Aging Cell.* – 2004. – V. 3. – № 5. – P. 263–271.
108. Jositsch G. et al. Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2009. – V. 379. – № 4. – P. 389–395.
109. Kameyama M., Hofmann F., Trautwein W. On the mechanism of beta-adrenergic regulation of the Ca channel in the guinea-pig heart // *Pflugers Arch.* 1985. V. 405. № 3. P. 285–293.
110. Kan H., Ruan Y., Malik K U. Localization and characterization of the subtypes(s) of muscarinic receptor involved in prostacyclin synthesis in rabbit heart // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1996. – V. 276. – № 3. – P. 934–941.

111. Kato M., Komamura K., Kitakaze M. Tiotropium, a novel muscarinic M3 receptor antagonist, improved symptoms of chronic obstructive pulmonary disease complicated by chronic heart failure // *Circ. J.* – 2006. – V. 70. – № 12. – P. 1658–1660.
112. Kawabe J. et al. Differential activation of adenylyl cyclase by protein kinase C isoenzymes. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 24. – P. 16554–16558.
113. King T.S., Coakley J.B. The intrinsic nerve cells of the cardiac atria of mammals and man // *J Anat.* – 1958. – V. 92. – № Pt 3. – P. 353–376.3.
114. Klimaschewski L. et al. Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart // *Circ. Res.* – 1992. – V. 71. – № 6. – P. 1533–1537.
115. Kobrinsky E. et al. Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP2 leads to K<sup>+</sup>-current desensitization // *Nat. Cell Biol.* – 2000. – V. 2. – № 8. – P. 507–514.
116. Kockskämper J. et al. Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2008. – V. 45. – № 2. – P. 128–147.
117. Koppen C.J. van, Nathanson N.M. Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function // *J. Biol. Chem.* – 1990. – V. 265. – № 34. – P. 20887–20892.
118. Korth M., Kühlkamp V. Muscarinic receptor-mediated increase of intracellular Na<sup>+</sup>-ion activity and force of contraction // *Pflugers Arch.* – 1985. – V. 403. – № 3. – P. 266–272.
119. Korth M., Kuhlkamp V. Muscarinic receptors mediate negative and positive inotropic effects in mammalian ventricular myocardium: differentiation by agonists. // *Br J Pharmacol.* 1987. V. 90. № 1. P. 81–90.
120. Kovoor P. et al. Evaluation of the role of I(KACh) in atrial fibrillation using a mouse knockout model // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2001. – V. 37. – № 8. – P. 2136–2143.
121. Krapivinsky G. et al. The G-protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+) channel proteins // *Nature.* – 1995. – V. 374. – № 6518. – P. 135–141.
122. Krejčí A., Tuček S. Quantitation of mRNAs for M1 to M5 Subtypes of Muscarinic Receptors in Rat Heart and Brain Cortex // *Mol Pharmacol.* – 2002. – V. 61. – № 6. – P. 1267–1272.
123. Kruse A.C. et al. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development // *Nat Rev Drug Discov.* – 2014. – V. 13. – № 7. – P. 549–560.
124. Kubo T. et al. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor // *Nature.* – 1986. – V. 323. – № 6087. – P. 411–416.
125. Kubo T. et al. Location of a region of the muscarinic acetylcholine receptor involved in selective effector coupling // *FEBS Lett.* – 1988. – V. 241. – № 1-2. – P. 119–125.

126. Kurachi Y. et al. G protein activation of cardiac muscarinic K<sup>+</sup> channels // *Prog. Neurobiol.* – 1992. – V. 39. – № 3. – P. 229–246.
127. Kurogouchi F., Nakane T., Furukawa Y. et al. Heterogeneous distribution of  $\beta$ -adrenoreceptors and muscarinic receptors in the sinoatrial node and right atrium of the dog // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2002 - V.29 - P.666-672.
128. Kwak B.R., Jongasma H.J. Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions // *Mol. Cell. Biochem.* – 1996. – V. 157. – № 1-2. – P. 93–99.
129. Lang N. et al. NO underlies the muscarinic receptor-mediated inhibition of If in early embryonic heart cells // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2007. – V. 20. – № 5. – P. 293–302.
130. Le Corvoisier P., Lacotte J., Laplace M., Crozatier B. Interaction of chelerythrine with inositol phosphate metabolism // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 2002. – V. 16. –P. 31-37.
131. Leite M.F. et al. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2003. – V. 100. – № 5. – P. 2975–2980.
132. Levy M.N., Martin P.J. Autonomic Neural Control of Cardiac Function // *Physiology and Pathophysiology of the Heart Developments in Cardiovascular Medicine.* – 1989. – P. 361–379.
133. Li X. et al. Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP<sub>3</sub>)-receptor type 2-deficient mice // *Circ. Res.* – 2005. – V. 96. – № 12. – P. 1274–1281.
134. Lipp P. et al. Functional InsP<sub>3</sub> receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart // *Curr. Biol.* – 2000. – V. 10. – № 15. – P. 939–942.
135. Liu Y. et al. [Relationship between M<sub>3</sub> receptor and myocyte apoptosis induced by acute myocardial infarction] // *Yao Xue Xue Bao.* – 2004a. – V. 39. – № 5. – P. 338–341.
136. Liu Y. et al. Choline produces antiarrhythmic actions in animal models by cardiac M<sub>3</sub> receptors: improvement of intracellular Ca<sup>2+</sup> handling as a common mechanism // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2008. – V. 86. – № 12. – P. 860–865.
137. Liu Y. et al. Protective effect of M<sub>3</sub> receptor on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -induced apoptosis of rat myocardial cells in vitro // *Yao Xue Xue Bao.* – 2004b. – V. 39. – № 11. – P. 887–891.
138. Liu Y. et al. Role of M<sub>3</sub> receptor in aconitine/barium-chloride-induced preconditioning against arrhythmias in rats // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2009. – V. 379. – № 5. – P. 511–515.
139. Liu Y. et al. Upregulation of M<sub>3</sub> muscarinic receptor inhibits cardiac hypertrophy induced by angiotensin II // *Journal of Translational Medicine.* – 2013. – V. 11. –№ 1. – P. 209.

140. Lu Z.-L. et al. The Role of the Aspartate-Arginine-Tyrosine Triad in the m1 Muscarinic Receptor: Mutations of Aspartate 122 and Tyrosine 124 Decrease Receptor Expression but Do Not Abolish Signaling // *Mol Pharmacol.* – 1997. – V. 51. – № 2. – P. 234–241.
141. Mackenzie L. et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the heart // *Biol. Res.* – 2004. – V. 37. – № 4. – P. 553–557.
142. Maier S.K.G., Westenbroek R.E., Yamanushi T.T. et al. An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node // *PNAS.* – 2003 - V.100(6) - P.3507-3512.
143. Malhotra A. et al. Molecular biology of protein kinase C signaling in cardiac myocytes // *Mol. Cell. Biochem.* – 2001. – V. 225. – № 1. – P. 97–107.
144. Malviya A.N. The nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors // *Cell Calcium.* – 1994. – V. 16. – № 4. – P. 301–313.
145. Marvin W.J. et al. Ontogenesis of cholinergic innervation in the rat heart // *Circ. Res.* – 1980. – V. 46. – № 5. – P. 690–695.
146. Matsumoto K., Pappano A.J. Sodium-dependent membrane current induced by carbachol in single guinea-pig ventricular myocytes // *J. Physiol. (Lond.).* – 1989. – V. 415. – P. 487–502.
147. Mawe G.M. et al. Expression of choline acetyltransferase immunoreactivity in guinea pig cardiac ganglia // *Cell Tissue Res.* – 1996. – V. 285. – № 2. P. 281–286.
148. McHugh D., Sharp E.M., Scheuer T., Catterall W.A. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2000. - V. 97. - P.12334-12338.
149. Medina I. et al. A Switch Mechanism for G $\beta\gamma$  Activation of IK<sub>ACh</sub> // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – № 38. – P. 29709–29716.
150. Meiklejohn J. On the Topography of the Intracardiac Ganglia of the Rat's Heart // *J Anat Physiol.* – 1914. – V. 48. – № Pt 4. – P. 378–390.
151. Méry P.F. et al. Nitric oxide regulates cardiac Ca<sup>2+</sup> current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 35. – P. 26286–26295.
152. Meyer T. et al. Depletion of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate by Activation of Phospholipase C-coupled Receptors Causes Slow Inhibition but Not Desensitization of G Protein-gated Inward Rectifier K<sup>+</sup> Current in Atrial Myocytes // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – № 8. – P. 5650–5658.
153. Mitchell G.A.G. The innervations of the heart // *Br Heart J.* – 1953. – V. 15. – № 2. – P. 159–171.

154. Mizeres N.J. The origin and course of the cardioaccelerator fibers in the dog // *Anat. Rec.* – 1958. – V. 132. – № 3. – P. 261–279.
155. Moschella M.C., Marks A.R. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in cardiac myocytes // *J. Cell Biol.* – 1993. – V. 120. – № 5. – P. 1137–1146.
156. Müller F., Rohrer H. Molecular control of ciliary neuron development: BMPs and downstream transcriptional control in the parasympathetic lineage // *Development.* – 2002. – V. 129. – № 24. – P. 5707–5717.
157. Münster P.N., Weingart R. Effects of phorbol ester on gap junctions of neonatal rat heart cells // *Pflugers Arch.* – 1993. – V. 423. – № 3-4. – P. 181–188.
158. Murray K.T. et al. Functional effects of protein kinase C activation on the human cardiac Na<sup>+</sup> channel // *Circ. Res.* – 1997. – V. 80. – № 3. – P. 370–376.
159. Myslivecek J., Nováková M., Klein M. Receptor subtype abundance as a tool for effective intracellular signalling // *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* – 2008. – V. 8. – № 1. – P. 66–79.
160. Nakamura T.Y. et al. Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward K<sup>+</sup> current, by PKC // *Am. J. Physiol.* – 1997. – V. 273. – № 4 Pt 2. – P. H1775–1786.
161. Narita M. et al. Functional participation in M1 receptor subtype on chronotropic and dromotropic responses to vagus stimulation in anesthetized dogs. // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1991. – V. 258. – № 1. – P. 166–170.
162. Nishimaru K. et al. Positive and negative inotropic effects of muscarinic receptor stimulation in mouse left atria // *Life Sci.* – 2000. – V. 66. – № 7. – P. 607–615.
163. Nishimura M. et al. Ionic basis of depressed automaticity and conduction by acetylcholine in rabbit AV node // *Am. J. Physiol.* – 1988. – V. 255. – № 1 – Pt 2. – P. H7–14.
164. Oberhauser V. et al. Acetylcholine release in human heart atrium: influence of muscarinic autoreceptors, diabetes, and age // *Circulation.* – 2001. – V. 103. – № 12. – P. 1638–1643.
165. Ono K., Kuwabara Y., Han J. MicroRNAs and cardiovascular diseases // *FEBS J.* – 2011. – V. 278. – № 10. – P. 1619–1633.
166. Pan Z. et al. M3 subtype of muscarinic acetylcholine receptor promotes cardioprotection via the suppression of miR-376b-5p // *PLoS ONE.* – 2012. – V. 7. – № 3. – P. 32571.
167. Pardini B.J. et al. Location, distribution and projections of intracardiac ganglion cells in the rat // *Journal of the Autonomic Nervous System.* – 1987. – V. 20. – № 2. – P. 91–101.
168. Parsons R.L. Mammalian Cardiac Ganglia as Local Integration Centers: Histochemical and Electrophysiological Evidence // *Neural Mechanisms of Cardiovascular Regulation* / под ред. N.J. Dun, B.H. Machado, P.M.P. B.M.B.S. : Springer US, – 2004. – P. 335–356.

169. Pauza D.H. et al. Comparative quantitative study of the intrinsic cardiac ganglia and neurons in the rat, guinea pig, dog and human as revealed by histochemical staining for acetylcholinesterase // *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. – 2002. – V. 184. – № 2. – P. 125–136.
170. Pauza D.H. et al. Hilum of the heart // *Anat. Rec.* – 1997. – V. 248. – № 3. – P. 322–324.
171. Pauza D.H. et al. Morphology, distribution, and variability of the epicardiac neural ganglionated subplexuses in the human heart // *Anat. Rec.* – 2000. – V. 259. – № 4. – P. 353–382.
172. Pauza D.H., Skripka V., Pauziene N. Morphology of the intrinsic cardiac nervous system in the dog: a whole-mount study employing histochemical staining with acetylcholinesterase // *Cells Tissues Organs (Print)*. – 2002. – V. 172. – № 4. – P. 297–320.
173. Peralta E.G. et al. Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. // *EMBO J.* – 1987b. – V. 6. – № 13. – P. 3923–3929.
174. Peralta E.G. et al. Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor // *Science*. – 1987a. – V. 236. – № 4801. – P. 600–605.
175. Pérez C.C.N. et al. Kinetic and molecular evidences that human cardiac muscle express non-M2 muscarinic receptor subtypes that are able to interact themselves // *Pharmacol. Res.* – 2006. – V. 54. – № 5. – P. 345–355.
176. Petit-Jacques J. et al. Mechanism of muscarinic control of the high-threshold calcium current in rabbit sino-atrial node myocytes // *Pflugers Arch.* – 1993. – V. 423. – № 1-2. – P. 21–27.
177. Petraitiene V., Pauza D.H., Benetis R. Distribution of adrenergic and cholinergic nerve fibres within intrinsic nerves at the level of the human heart hilum // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2014. – V. 45. – № 6. – P. 1097–1105.
178. Poelmann R.E. et al. The neural crest is contiguous with the cardiac conduction system in the mouse embryo: a role in induction? // *Anat. Embryol.* – 2004. – V. 208. – № 5. – P. 389–393.
179. Pönicke K., Heinroth-Hoffmann I., Brodde O.-E. Demonstration of functional M3-muscarinic receptors in ventricular cardiomyocytes of adult rats // *Br. J. Pharmacol.* – 2003. – V. 138. – № 1. – P. 156–160.
180. Pucéat M. et al. Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 24. – P. 16938–16944.
181. Puri T.S. et al. Differential effects of subunit interactions on protein kinase A- and C-mediated phosphorylation of L-type calcium channels // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36. – № 31. – P. 9605–9615.

182. Randall W.C. et al. Vagal postganglionic innervation of the canine sinoatrial node // *Journal of the Autonomic Nervous System*. – 1987. – V. 20. – № 1. – P. 13–23.
183. Randall W.C., Ardell J.L. Selective parasympathectomy of automatic and conductile tissues of the canine heart // *Am. J. Physiol.* – 1985. – V. 248. – № 1 – Pt 2. –P. H61–68.
184. Richardson R.J., Grkovic I., Anderson C.R. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart // *Cell Tissue Res.* – 2003. – V. 314. – № 3. – P. 337–350.
185. Roberts I.A., Slocum G.R., Riley D.A. Morphological study of the innervation pattern of the rabbit sinoatrial node // *Am. J. Anat.* – 1989 – V.185 – P.74-88.
186. Rodefeld M.D. et al. Beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor densities in the human sinoatrial node: identification of a high beta 2-adrenergic receptor density // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 1996. – V. 7. – № 11. – P. 1039–1049.
187. Rosenshtraukh L. et al. Mechanisms for vagal modulation of ventricular repolarization and of coronary occlusion-induced lethal arrhythmias in cats // *Circ. Res.* – 1994. – V. 75. – № 4. – P. 722–732.
188. Rybin V.O., Steinberg S.F. Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart // *Circ. Res.* – 1994. – V. 74. – № 2. – P. 299–309.
189. Rysevaite K. et al. Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations // *Heart Rhythm*. – 2011. – V. 8. – № 5. – P. 731–738.
190. Saburkina I. et al. Epicardial neural ganglionated plexus of ovine heart: Anatomic basis for experimental cardiac electrophysiology and nerve protective cardiac surgery // *Heart Rhythm*. – 2010. – V. 7. – № 7. P. 942–950.
191. Saburkina I., Pauziene N., Pauza D.H. Prenatal development of the human epicardiac Ganglia // *Anat Histol Embryol.* – 2009. – V. 38. – № 3. – P. 194–199.
192. Sadjia R., Alagem N., Reuveny E. Graded contribution of the G $\beta\gamma$  binding domains to GIRK channel activation // *PNAS*. – 2002. – V. 99. – № 16. – P. 10783–10788.
193. Sakai R., Shen J.B., Pappano A.J. Elevated cAMP suppresses muscarinic inhibition of L-type calcium current in guinea pig ventricular myocytes // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1999. – V. 34. – № 2. – P. 304–315.
194. Sato S. Quantitative evaluation of ontogenetic change in heart rate and its autonomic regulation in newborn mice with the use of a noninvasive piezoelectric sensor // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – V. 294. – № 4. – P. H1708–1715.
195. Schmitz J. et al. Dualsteric muscarinic antagonists-orthosteric binding pose controls allosteric subtype selectivity // *J. Med. Chem.* – 2014. – V. 57. – № 15. – P. 6739–6750.

196. Serone A.P., Angus J.A. Neuropeptide Y is a prejunctional inhibitor of vagal but not sympathetic inotropic responses in guinea-pig isolated left atria // *Br J Pharmacol.* – 1999. – V. 127. – № 2. – P. 383–390.
197. Sharma V.K. et al. Molecular and functional identification of m1 muscarinic acetylcholine receptors in rat ventricular myocytes // *Circ. Res.* – 1996. – V. 79. – № 1. – P. 86–93.
198. Shi H. et al. Choline modulates cardiac membrane repolarization by activating an M3 muscarinic receptor and its coupled K<sup>+</sup> channel // *J. Membr. Biol.* – 1999. – V. 169. – № 1. – P. 55–64.
199. Shi H. et al. Differential alterations of receptor densities of three muscarinic acetylcholine receptor subtypes and current densities of the corresponding K<sup>+</sup> channels in canine atria with atrial fibrillation induced by experimental congestive heart failure // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2004a. – V. 14. – № 1-2. – P. 31–40.
200. Shi H. et al. Electrophysiological characterization of cardiac muscarinic acetylcholine receptors: different subtypes mediate different potassium currents // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2003. – V. 13. – № 2. – P. 59–74.
201. Shi H. et al. The M3 receptor-mediated K(+) current (IKM3), a G(q) protein-coupled K(+) channel // *J. Biol. Chem.* – 2004b. – V. 279. – № 21. – P. 21774–21778.
202. Shi H., Wang H., Wang Z. Identification and characterization of multiple subtypes of muscarinic acetylcholine receptors and their physiological functions in canine hearts // *Mol. Pharmacol.* – 1999a. – V. 55. – № 3. – P. 497–507.
203. Shi H., Wang H., Wang Z. M3 muscarinic receptor activation of a delayed rectifier potassium current in canine atrial myocytes // *Life Sci.* – 1999b. – V. 64. – № 21. – P. PL251–257.
204. Singer-Lahat D. et al. Modulation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels in *Xenopus* oocytes by protein kinase C // *FEBS Lett.* – 1992. – V. 306. – № 2-3. – P. 113–118.
205. Spalding T.A. et al. Acetylcholine mustard labels the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 6. – P. 4092–4097.
206. Steele P.A. et al. Multiple populations of neuropeptide-containing intrinsic neurons in the guinea-pig heart // *Neuroscience.* – 1994. – V. 62. – № 1. – P. 241–250.
207. Strasser R.H. et al. Two Distinct Mechanisms Mediate a Differential Regulation of Protein Kinase C Isozymes in Acute and Prolonged Myocardial Ischemia // *Circulation Research.* – 1999. – V. 85. – № 1. – P. 77–87.
208. Sun L.S. et al. Muscarinic receptor heterogeneity in neonatal rat ventricular myocytes in culture // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1996. – V. 27. – № 4. – P. 455–461.
209. Sunahara R.K., Dessauer C.W., Gilman A.G. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1996. – V. 36. – P. 461–480.

210. Suwa A. et al. Discovery of N-sulfonyl-7-azaindoline derivatives as potent, orally available and selective M(4) muscarinic acetylcholine receptor agonists // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2014. – V. 24. – № 13. – P. 2909–2912.
211. Takai K. et al. Discovery of N-substituted 7-azaindoline derivatives as potent, orally available M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors selective agonists // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2014. – V. 24. – № 14. – P. 3189–3193.
212. Thum T., Catalucci D., Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease // *Cardiovascular Research*. – 2008. – V. 79. – № 4. – P. 562–570.
213. Tietje K.M., Nathanson N.M. Embryonic chick heart expresses multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes. Isolation and characterization of a gene encoding a novel m2 muscarinic acetylcholine receptor with high affinity for pirenzepine // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – № 26. – P. 17382–17387.
214. Trautwein W. et al. Modulation of calcium channel function by phosphorylation in guinea pig ventricular cells and phospholipid bilayer membranes // *Circ. Res.* – 1987. – V. 61. – № 4 Pt 2. – P. 117–23.
215. Tseng G.N., Boyden P.A. Different effects of intracellular Ca and protein kinase C on cardiac T and L Ca currents // *Am. J. Physiol.* – 1991. – V. 261. – № 2 – Pt 2. – P. H364–379.
216. Tuomi J.M., Chidiac P., Jones D.L. Evidence for enhanced M3 muscarinic receptor function and sensitivity to atrial arrhythmia in the RGS2-deficient mouse // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2010. – V. 298. – № 2. – P. H554–561.
217. Varnum M.D. et al. The min K channel underlies the cardiac potassium current IKs and mediates species-specific responses to protein kinase C // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1993. – V. 90. – № 24. – P. 11528–11532.
218. Vijayaragavan K., Boutjdir M., Chahine M. Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase A and protein kinase C // *J. Neurophysiol.* – 2004. – V. 91. – № 4. – P. 1556–1569.
219. Wang D.-Z. MicroRNAs in cardiac development and remodeling // *Pediatr Cardiol.* – 2010. – V. 31. – № 3. – P. 357–362.
220. Wang H. et al. Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart // *Mol. Pharmacol.* – 2001. – V. 59. – № 5. – P. 1029–1036.
221. Wang H. et al. Pilocarpine modulates the cellular electrical properties of mammalian hearts by activating a cardiac M3 receptor and a K<sup>+</sup> current // *Br J Pharmacol.* – 1999. – V. 126. – № 8. – P. 1725–1734.
222. Wang H., Lu Y., Wang Z. Function of cardiac M3 receptors // *Auton Autacoid Pharmacol.* – 2007. – V. 27. – № 1. – P. 1–11.

223. Wang S. et al. Activation of cardiac M3 muscarinic acetylcholine receptors has cardioprotective effects against ischaemia-induced arrhythmias // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2012a. – V. 39. – № 4. – P. 343–349.
224. Wang S. et al. Choline inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by intracellular calcium signal and p38 MAPK pathway // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2012b. – V. 385. – № 8. – P. 823–831.
225. Wang Y.-P. et al. M3 muscarinic acetylcholine receptor is associated with beta-catenin in ventricular myocytes during myocardial infarction in the rat // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2009. – V. 36. – № 10. – P. 995–1001.
226. Wang Z., Shi H., Wang H. Functional M3 muscarinic acetylcholine receptors in mammalian hearts // *Br J Pharmacol.* – 2004. – V. 142. – № 3. – P. 395–408.
227. Weihe E. et al. Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system // *J. Comp. Neurol.* – 2005. – V. 492. – № 3. – P. 370–379.
228. Wess J. et al. Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers // *Mol. Pharmacol.* – 1990. – V. 38. – № 4. – P. 517–523.
229. Wess J. et al. Structural basis of receptor/G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems // *Life Sci.* – 1997. – V. 60. – № 13-14. – P. 1007–1014.
230. Winstel R. et al. Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. – V. 93. – № 5. – P. 2105–2109.
231. Woo S.-H. et al. Excitatory effect of M1 muscarinic acetylcholine receptor on automaticity of mouse heart // *Arch. Pharm. Res.* – 2005. – V. 28. – № 8. – P. 930–935.
232. Wu X. et al. Local InsP3-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling // *J Clin Invest.* – 2006. – V. 116. – № 3. – P. 675–682.
233. Wyndham C.R.C. Atrial Fibrillation: The Most Common Arrhythmia // *Tex Heart Inst J.* – 2000. – V. 27. – № 3. – P. 257–267.
234. Yamada J. et al. Up-regulation of inositol 1,4,5 trisphosphate receptor expression in atrial tissue in patients with chronic atrial fibrillation // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2001. – V. 37. – № 4. – P. 1111–1119.
235. Yang B. et al. Choline produces cytoprotective effects against ischemic myocardial injuries: evidence for the role of cardiac m3 subtype muscarinic acetylcholine receptors // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2005. – V. 16. – № 4-6. – P. 163–174.
236. Yang C.M. et al. Characterization of muscarinic receptor subtypes in canine left ventricular membranes // *J. Recept. Res.* – 1992. – V. 12. – № 4. – P. 427–449.

237. Yatani A., Brown A.M. Rapid beta-adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G protein pathway // *Science*. – 1989. – V. 245. – № 4913. – P. 71–74.
238. Yazawa K., Kameyama M. Mechanism of receptor-mediated modulation of the delayed outward potassium current in guinea-pig ventricular myocytes. // *J Physiol*. – 1990. – V. 421. – P. 135–150.
239. Yeh Y.-H. et al. Atrial tachycardia induces remodelling of muscarinic receptors and their coupled potassium currents in canine left atrial and pulmonary vein cardiomyocytes // *Br. J. Pharmacol*. 2007. – V. 152. – № 7. – P. 1021–1032.
240. Yue D.T., Herzig S., Marban E. Beta-adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1990. – V. 87. – № 2. – P. 753–757.
241. Yue P. et al. Ischemia impairs the association between connexin 43 and M3 subtype of acetylcholine muscarinic receptor (M3-mAChR) in ventricular myocytes // *Cell. Physiol. Biochem*. – 2006. – V. 17. – № 3-4. – P. 129–136.
242. Zaza A., Robinson R.B., DiFrancesco D. Basal responses of the L-type Ca<sup>2+</sup> and hyperpolarization-activated currents to autonomic agonists in the rabbit sino-atrial node. // *J Physiol*. – 1996. – V. 491. – № Pt 2. – P. 347–355.
243. Zhang C. MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease // *Clin. Sci*. 2008. V. 114. № 12. P. 699–706.
244. Zhang Y. et al. [Integration between M3 muscarinic acetylcholine receptor and connexin 43 as antiarrhythmic targets in rat ventricular myocardium] // *Yao Xue Xue Bao*. – 2006. – V. 41. – № 5. – P. 395–400.
245. Zhang Y., Cribbs L.L., Satin J. Arachidonic acid modulation of alpha1H, a cloned human T-type calcium channel // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. – 2000. – V. 278. – № 1. – P. H184–193.
246. Zhang Z.H. et al. C2 region-derived peptides of beta-protein kinase C regulate cardiac Ca<sup>2+</sup> channels // *Circ. Res*. – 1997. – V. 80. – № 5. – P. 720–729.
247. Zhao J. et al. Activation of cardiac muscarinic M3 receptors induces delayed cardioprotection by preserving phosphorylated connexin43 and up-regulating cyclooxygenase-2 expression // *Br. J. Pharmacol*. – 2010. – V. 159. – № 6. – P. 1217–1225.
248. Zhao Y. et al. Choline protects against cardiac hypertrophy induced by increased after-load // *Int. J. Biol. Sci*. – 2013. – V. 9. – № 3. – P. 295–302.
249. Zhou Y. et al. Matrine Inhibits Pacing Induced Atrial Fibrillation by Modulating IKM3 and ICa-L // *Int J Biol Sci*. – 2011. – V. 8. – № 1. – P. 150–158.

250. Zhu S.Z. et al. An arginine residue conserved in most G protein-coupled receptors is essential for the function of the m1 muscarinic receptor // *Mol. Pharmacol.* – 1994. – V. 45. – № 3. P. 517–523.
251. Zima A.V., Blatter L.A. Inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent Ca(2+) signalling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias // *J. Physiol. (Lond.)*. – 2004. – V. 555. – № Pt 3. – P. 607–615.
252. Zimerman L.I. et al. Acute electrophysiologic consequences of pyridostigmine inhibition of cholinesterase in humans // *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica Al.* – 2010. – V. 43. – № 2. – P. 211–216.