

УДК 576.5

АКТИВАЦИЯ САРКОЛЕММАЛЬНЫХ $\alpha 2$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ ПОДДЕРЖИВАЕТ Ca^{2+} -ГОМЕОСТАЗ И ПРЕДОТВРАЩАЕТ СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АРИТМИЮ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ В УСЛОВИЯХ СИМПАТИЧЕСКОГО СТРЕССА

© 2019 г. А.С. Аверин*, О.В. Накипова*, Л.С. Косарский*, О.Ю. Пименов**, М.Х. Галимова**, М.Н. Ненов** ***, А.В. Бережнов*, А.Е. Алексеев** ****

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

***Alzheimer's Center at Temple, Lewis Katz School of Medicine, Temple University, Philadelphia, PA, 19140, USA

****Department of Cardiovascular Medicine, Center for Regenerative Medicine, Stabile 5, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA
E-mail: averinas82@gmail.com

Поступила в редакцию 19.06.2019 г.

После доработки 19.06.2019 г.

Принята к публикации 08.07.2019 г.

Реакция организма на стресс опосредуется взаимодействием катехоламинов с адренергическими α - и β -рецепторами. Установлено, что в отличие от $\alpha 1$ - и β -адренорецепторов, $\alpha 2$ -адренорецепторы встроены в петли обратной связи симпато-адреналовой системы, контролирующей выброс катехоламинов (норадреналин, адреналин), что позволяет сохранять энергоресурсы и функцию периферических органов при перегрузке катехоламинами. Нарушения механизмов обратной связи ведут к различным патологиям, включая гипертрофическую перестройку сердца с последующим развитием сердечной недостаточности. Ранее мы обнаружили экспрессию $\alpha 2$ -адренорецепторов в плазматической мембране кардиомиоцитов, где они участвуют в регуляции внутриклеточного уровня Ca^{2+} . Мы предположили, что в дополнение к традиционному механизму, эти рецепторы способны локально контролировать реакцию сердечной мышцы на стресс. В данной работе нами показано, что контролируя уровень свободного Ca^{2+} в цитозоле, сарколеммальные $\alpha 2$ -адренорецепторы ограничивают положительный инотропный эффект адренергической стимуляции в папиллярных мышцах. Способность агонистов $\alpha 2$ -адренорецепторов подавлять внутриклеточные спонтанные Ca^{2+} -осцилляции повышает эффективность систолической функции папиллярных мышц и способствует уменьшению вероятности возникновения опасной вентрикулярной аритмии. Таким образом, $\alpha 2$ -адренорецепторы в сарколеммальной мембране кардиомиоцитов обладают собственным защитным потенциалом, который может найти применение в предотвращении патологической перестройки сердечной мышцы в условиях хронического стресса.

Ключевые слова: норадреналин, изопроterenол, гуанабенз, сократимость, Ca^{2+} канал L-типа, осцилляции внутриклеточного Ca^{2+} .

DOI: 10.1134/S000630291905020X

Физиологические системы, мобилизующие функции организма в условиях стресса, включают в себя адаптационные механизмы обратной связи, которые препятствуют перерасходу клеточных энергетических ресурсов [1,2]. Установлено, что нарушения механизмов обратных связей повышают риск развития патологических изменений в отдельных органах [2–4]. У человека

хронический стресс вызывает функциональную перегрузку сердца, что приводит вначале к перестройке сердечной мышцы (гипертрофия), а по истощению адаптационных ресурсов к развитию сердечной недостаточности [5–7]. Состояние сердечной недостаточности характеризуется утратой способности сердца удовлетворять потребности организма в адекватном кровоснабжении, что, в свою очередь, приводит к дальнейшей стимуляции работы сердца, усугубляя развитие болезни [5,6].

Сокращения: AR – адренергические рецепторы, I Ca L – входящий Ca^{2+} -ток Ca^{2+} -каналов L-типа, ПМ – папиллярная мышца.

Роль сигнальных молекул, опосредующих стресс-реакцию организма, играют катехоламины — адреналин и норадреналин. Основными мишенями для эндогенных катехоламинов являются α - и β -адренергические рецепторы (AR) [8,9]. В ответ на выброс адреналина и норадреналина сигналы от $\alpha 1$ -AR и β -AR, помимо мобилизации различных клеточных процессов, вызывают дополнительное фосфорилирование Ca^{2+} -каналов L-типа, что значительно стимулирует входящий Ca^{2+} ток (I_{CaL}) и, как следствие, сократимость, с целью увеличения сердечного выброса, необходимого для поддержания уровня активности, требуемого организмом в состоянии стресса [7,10,11]. Установлено, что в отличие от других адренорецепторов симпатoadреналовой системы, которые стимулируют нейрональную активность и выброс катехоламинов, $\alpha 2$ -AR ограничивают выброс норадреналина симпатическими нейронами нервной системы и хромаффинными клетками надпочечников [12,13]. Генетически-вызванный дефицит $\alpha 2$ -AR повышает уровень циркулирующих катехоламинов и увеличивает смертность мышей вследствие развития сердечной недостаточности при фиброзе и гипертрофии левого желудочка [12,14]. Более того, пациенты с наследуемой мутацией Del322–325 в структуре $\alpha 2$ -AR, уменьшающей способность этих рецепторов подавлять выброс норадреналина, и мутацией в $\beta 1$ -AR, повышающей их чувствительность к катехоламинам, подвержены более высокому риску развития сердечной недостаточности [15]. Поэтому, активация $\alpha 2$ -AR традиционно рассматривается как механизм отрицательной обратной связи в симпатических нейронах, призванный уменьшать адренергическую стимуляцию сердца при перегрузке катехоламинами.

Однако недавние исследования показали, что ранее не рассматриваемая активация периферических $\alpha 2$ -AR в сарколемме кардиомиоцитов стимулирует эндотелиальную NO-синтазу через активацию PI_3K –Akt/PKB сигнального каскада, что, через механизм S-нитролирования фосфоламбана и Ca^{2+} -насоса (SERCA), ускоряет закачку Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум [16]. Реализация этого сигнального механизма в условиях реального сопряжения возбуждения и сокращения должна поддерживать запасы Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме и, по-видимому, способствовать сократительной устойчивости миокарда. Помимо этого, активация этого же сигнального пути от $\alpha 2$ -AR через PI_3K –Akt/PKB–NO–cGMP–PKG приводит к блокированию I_{CaL} [17]. Эти данные указывают на то, что, в дополнение к контролю активности симпатических нейронов, $\alpha 2$ -AR на внешней мембране кардиомиоцитов могут обладать собственным защитным потенциалом, что может найти приме-

нение в лечении патологических перестроек сердечной мышцы в условиях избыточной адренергической стимуляции [19]. Тем не менее вклад $\alpha 2$ -AR в регуляцию сократимости сердца при адренергической стимуляции остается малоизученным. В данной работе мы оценили вклад активации сарколеммальных $\alpha 2$ -AR в изометрическую сократимость папиллярной мышцы (ПМ) сердца крыс при физиологических частотах сокращения и эффект антиаритмического действия $\alpha 2$ -AR в изолированных кардиомиоцитах и папиллярной мышце крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования, описанные в данной работе, проводили на сердцах крыс.

Электрофизиологические эксперименты. Токи через мембраны изолированных кардиомиоцитов измеряли при помощи метода фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации «perforated patch-clamp» от целой клетки. Кардиомиоциты выделяли методом протеолитической дисперсии перфузируемых сердец, как описано ранее [17]. Электрический доступ к целой клетке достигался перфорацией клеточной мембраны амфотерецином В (200–250 мкг/мл), добавленным в измерительные электроды, имеющие сопротивление 3–5 МОм и заполненные раствором следующего состава (в мМ): CsCl – 130, MgSO_4 – 5, HEPES – 10, pH 7,25. Раствор, омывающий клетки в измерительной камере, содержал (в мМ): NaCl – 80, CaCl_2 – 2, MgSO_4 – 5, KH_2PO_4 – 1,2, CsCl – 10, хлорид тетраэтиламония (TEA-Cl) – 20, глюкозу – 20, L-аргинина – 1,0, HEPES – 10, pH 7,25. Токи измеряли при помощи усилителя Axopatch 200B (Molecular Devices, США). Протокол стимуляции, вычисление клеточных параметров и оцифровку данных осуществляли с использованием программного обеспечения BioQuest [17] цифроаналогово/аналого-цифрового преобразователя L-154 («L-Card», Москва). Для экспериментов использовали только клетки, в которых перфорирование обеспечивало сопротивление доступа менее 30 МОм. Сопротивление доступа, скомпенсированное на 40–50%, и некомпенсированную электрическую емкость клетки измеряли на основе анализа емкости перезарядки клеточной мембраны в ходе всего эксперимента для оценки стабильности клеточного клемпирования. Измерения проводили при $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

Измерение внутриклеточного Ca^{2+} . Спонтанные Ca^{2+} -осцилляции измеряли в нестимулируемых одиночных кардиомиоцитах, нагруженных 5 мкМ Fluo4-AM, на длине волны 530 нм при возбуждении на длине волны 490 нм при помощи флуоресцентной станции «Cell observer», оснащенной инвертированным микроскопом

Axiovert 200M и монохромной CCD-камерой AxioCam HSM (Carl Zeiss, Германия), как описано ранее [18]. Выделенные кардиомиоциты в измерительной камере омывались сбалансированным раствором Хенкса, содержащим (в мМ): NaCl – 138; CaCl₂ – 1,3; MgSO₄ – 0,4; MgCl₂ – 0,5; KCl – 5,3; KH₂PO₄ – 0,45; NaHCO₃ – 4; Na₂HPO₄ – 0,3; глюкозу – 10; L-аргинин – 1; HEPES – 10, pH 7,4. Измерения проводили при 30 ± 0,5°C.

Сократимость папиллярных мышц. Силу изометрического сокращения измеряли на выделенных ПМ правого желудочка диаметром 0,2–0,5 мм и длиной 1,0–3,0 мм при температуре 30 ± 0,1°C. ПМ помещали в аэрируемый (95% O₂ + 5% CO₂) раствор Тироде, содержащий (в мМ): NaCl – 135, KCl – 4, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 1,8, NaHCO₃ – 13,2, NaH₂PO₄ – 1,8, L-аргинин – 1, глюкозу – 11, pH 7,4. Силу сокращения F в ответ на стимуляцию ПМ прямоугольными стимулами регистрировали при помощи компьютеризированной установки с механотроном 6X-2M [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях симпатической стимуляции норадреналином, агонистом как β- так и α-адреноцепторов, йохимбин, антагонист α2-AR, значительно увеличивает I_{CaL} при концентрациях норадреналина, превышающих 10 нМ (рис. 1а,б). Подгонка параметров уравнения Хилла для описания полученных зависимостей выявила константу полуэффекта K_{0,5} = 31 ± 11 нМ при максимальной активации 105 ± 15% от контрольных значений, вызванных только норадреналином, и K_{0,5} = 9 ± 2 нМ с максимальным эффектом 140 ± 5% от контрольных значений, вызванных норадреналином в присутствии 10 мкМ йохимбина [17]. Адренергическая стимуляция ПМ вызывает ожидаемый значительный положительный инотропный эффект, который, однако, потенцируется при блокировании α2-AR йохимбином (рис. 1в). На частотах стимуляции, близких к физиологическим для сердца крыс (~3 Гц), вклад α2-AR в контроль прироста сократимости ПМ сохраняется (рис. 1г). Это указывает на то, что в дополнение к известной роли нейрональных α2-AR в подавлении активности симпатических нейронов сарколеммальные α2-AR в кардиомиоцитах действуют в противовес α1- и β-адренергической стимуляции, препятствуя клеточной Ca²⁺-перегрузке, которая, как известно, может вызывать гипертрофические перестройки сердца и приводить к развитию сердечной недостаточности [21,22].

Было показано, что продолжительная активация α1-AR и β-AR катехоламинами через увеличение внутриклеточного Ca²⁺ и формирование

комплекса Ca²⁺/кальмодулин приводит к активации кальцинеурин- и протеинкиназа С-зависимых транскрипционных факторов [5]. Таким образом, препятствуя Ca²⁺-перегрузке во время адренергического стресса, α2-AR способны предотвращать транскрипцию внутриклеточных факторов, ведущих к патологическим перестройкам сердца [7,23,24]. С другой стороны, ослабление инотропного эффекта норадреналина через активацию α2-AR уменьшает расход внутриклеточных энергетических ресурсов миокарда, дефицит которых также связан с развитием сердечных дисфункций [2,6].

Одним из проявлений патологии миокарда являются аритмии, связанные с изменениями клеточного Ca²⁺-гомеостаза [19,24,26]. Основной причиной спонтанной активности миокарда считается появление внутриклеточных Ca²⁺-осцилляций [25], которые наблюдаются примерно у 50% не стимулируемых кардиомиоцитов в популяции первичной клеточной культуры (рис. 2). В наших экспериментах активация α2-AR агонистом гуанабеном подавляла спонтанные Ca²⁺-осцилляции (рис. 2), что, как было показано нами ранее, опосредуется PI3K–Akt/PKB–eNOS-сигнальным каскадом [16].

Несмотря на отсутствие точного понимания механизмов, увеличение внешнего Ca²⁺, подавление активности Na⁺/K⁺-насоса, ацидоз, увеличение свободных радикалов, Ca²⁺-парадокс и др. рассматриваются как факторы, способные каждый сам по себе вызывать появление Ca_i-осцилляций, что может провоцировать сократительную миокардиальную аритмию [25]. Среди прочих, катехоламины и другие инотропные агенты также рассматриваются как источники появления Ca_i-осцилляций и последующих спонтанных сокращений сердечных клеток [25,26]. Приложение симпатомиметика изопротеренола с небольшой вероятностью вызывало появление автосократительной активности, которая не синхронизована со стимуляцией ПМ, как показано на рис. 3. При этом гуанабенз, активируя α2-AR, синхронизирует сокращение ПМ со стимуляцией, что приводит к увеличению силы сокращения (рис. 3).

Механистической основой эффекта гуанабена является обнаруженная нами способность активации α2-AR подавлять Ca_{in}-осцилляции, меняя баланс между активностью рианодинового рецептора и SERCA в пользу увеличения скорости закачки Ca²⁺ в саркоплазматический ретикулум [16]. Гетерогенности Ca²⁺-нагрузки саркоплазматического ретикула, вызванные Ca_{in}-осцилляциями в отдельной сердечной клетке, приводят к неравномерности

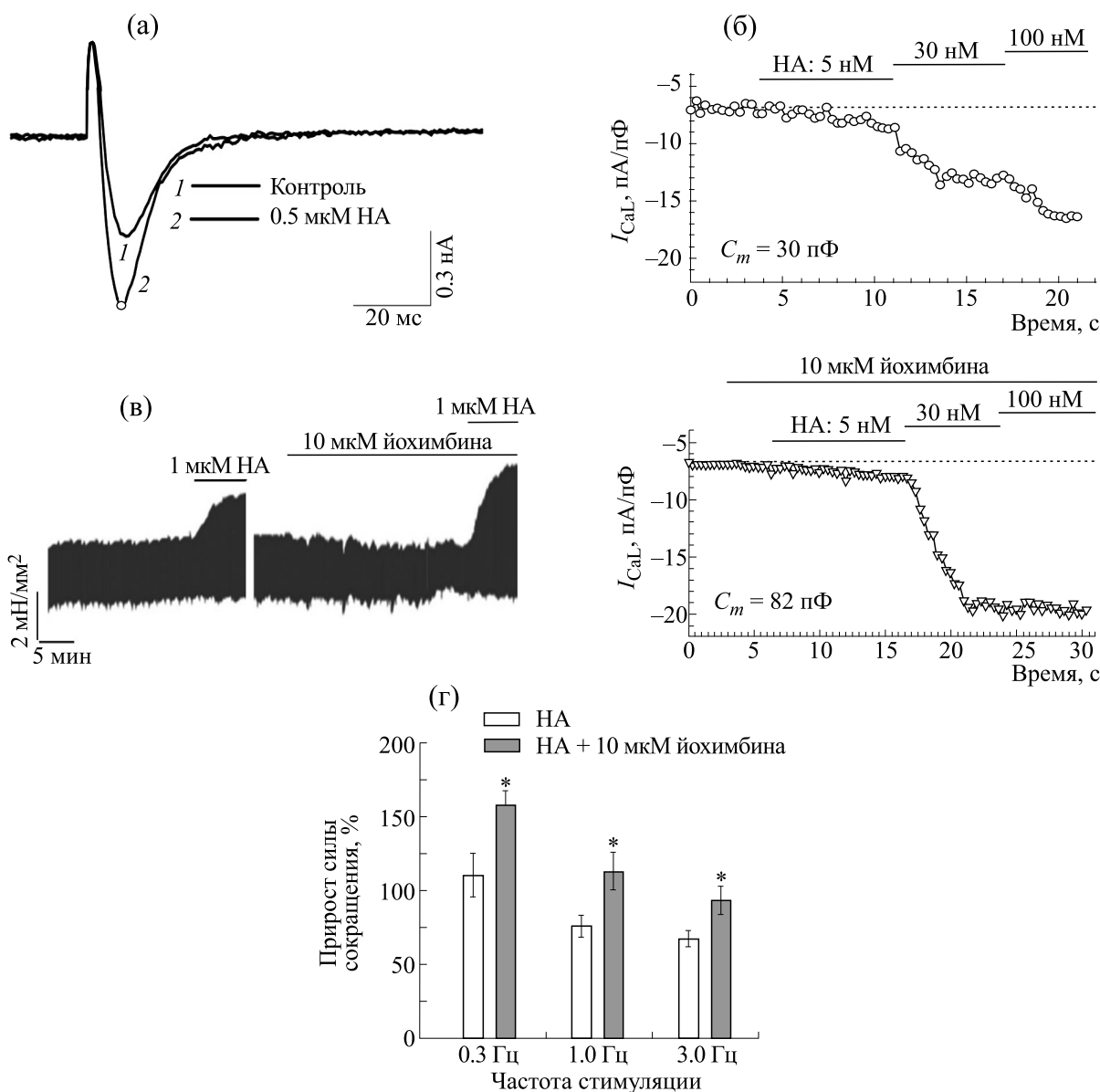


Рис. 1. Вклад α_2 -AR в модуляцию I_{CaL} в изолированных кардиоцитах и сократимости ПМ в условиях адренергической стимуляции. (а) – Норадреналин существенно усиливает входящий в клетку Ca^{2+} -ток. Токвые записи получены в ответ на деполяризацию клетки от -50 до 0 мВ. (б) – Норадреналин имеет более выраженный эффект на I_{CaL} в присутствии блокатора α_2 -AR йохимбина. Примеры развития эффекта норадреналина на пиковые значения I_{CaL} -тока в отсутствие и в присутствии йохимбина. Значения тока нормализованы на измеренную клеточную емкость (C_m). (в) и (г) – Репрезентативные записи сокращения ПМ при частоте стимуляции $0,3$ Гц и статистические данные прироста силы сокращения ПМ, вызванные норадреналином в отсутствие и в присутствии йохимбина (* – $P < 0,05$; t -тест, $n = 3$ в обеих группах).

уровня систолического Ca_{in}^{2+} и состояния саркомеров при стимуляции, что выражается в падении силы сокращения. Таким образом, тканеспецифическая активация α_2 -AR в кардиомиоцитах, подавляющая Ca_{in} -осцилляции, может служить новым инструментом в терапии сердечной недостаточности, позволяющая повышать эффективность систолической функ-

ции сердечной мышцы, а также способствовать уменьшению вероятности возникновения опасной вентрикулярной аритмии [18,25].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-00198) и Российского фонда фундаментальных

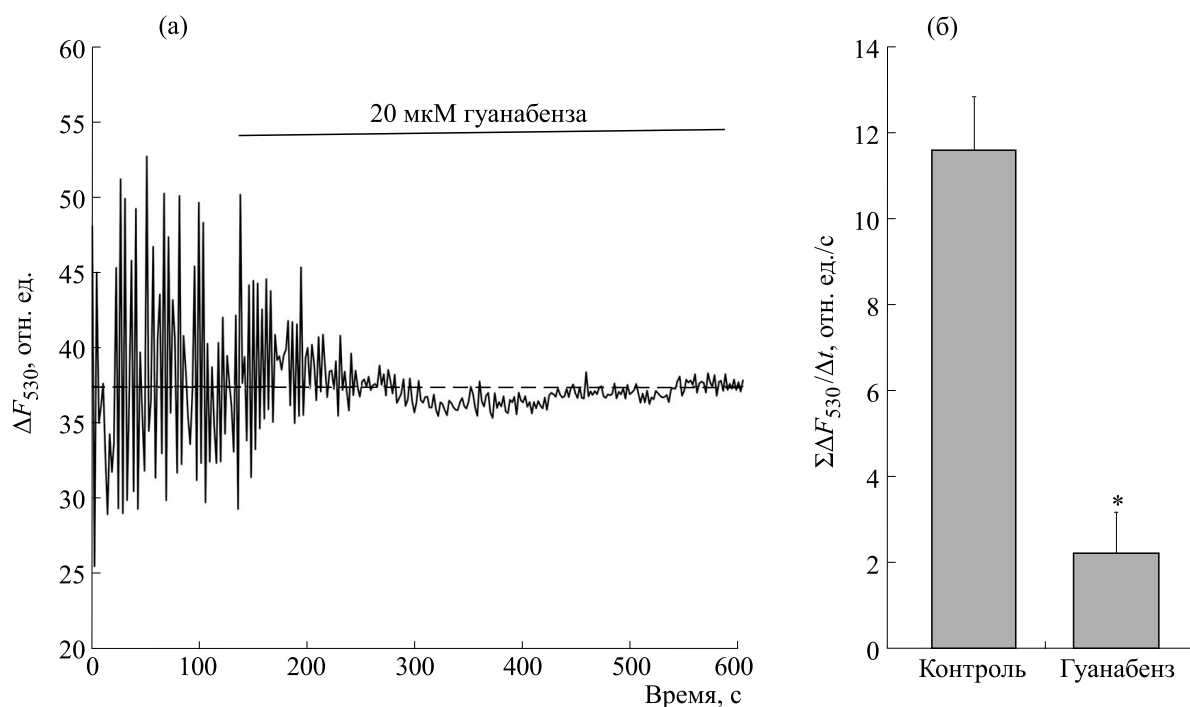


Рис. 2. (а) – Fluor4-AM-флуоресценция одиночного не стимулированного кардиомиоцита. Спонтанные Ca^{2+} -осцилляции подавляются гуанабеном, агонистом $\alpha 2$ -AR. (б) – Для построения гистограммы проводили интегрирование значений флуоресценции, превышающих ее среднее значение (пунктирная линия на панели (а)), до и после приложения гуанабенса с последующей нормировкой на соответствующий период суммирования (* – $P < 0,05$, t -тест, $n = 3$).

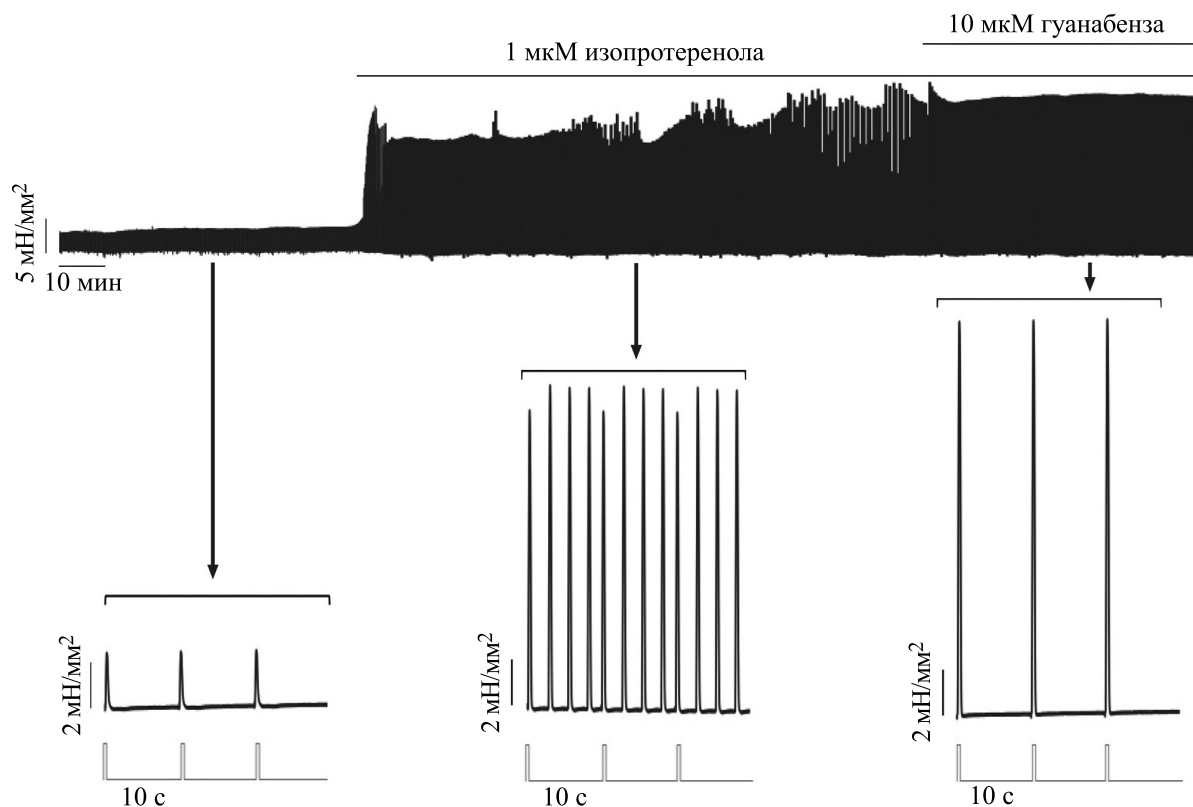


Рис. 3. Запись сократительной активности ПМ при частоте стимуляции 0,1 Гц. Появление автосокращений ПМ, вызванных изопротеренолом, сопровождается флуктуацией амплитуды силы сокращения. Гуанабенз на фоне изопротеренола синхронизует возбуждение и сокращение ПМ, что приводит к увеличению силы сокращения. Протоколы стимуляции и фрагменты сократительной активности ПМ показаны соответствующими вставками под основным временным ходом эксперимента.

исследований (в рамках научного проекта № 18-04-00764).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных (86/609/ЕЕС, 1986).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Selye, *The Physiology and Pathology of Exposure to Stress: A treatise based on the Concepts of the General-Adaptation-Syndrome and the Diseases of Adaptation* (Acta, Inc., Montreal, Canada, 1950).
2. L. V. Zingman, D. M. Hodgson, and A. E. Alekseev, *J. Mol. Psychiatry* **8**, 253 (2003).
3. D. S. Goldstein, In: *Comprehensive Physiology*, Ed. by R. Terjung (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2011), pp. 1569–2013.
4. V. Maletic, A. Eramo, K. Gwin, et al., *J. Front. Psychiatry* **8**, 42 (2017).
5. J. J. McMurray and M. A. Pfeffer, *Lancet* **365**, 1877 (2005).
6. S. Neubauer, *N. Engl. J. Med.* **356**, 1140 (2007).
7. A. Lymperopoulos, G. Rengo, and W. J. Koch, *Circ. Res.* **113**, 739 (2013).
8. R. P. Ahlquist, *J. Auton Pharmacol.* **1**, 101 (1980).
9. D. B. Bylund, *Am. J. Physiol.* **293**, E1479 (2007).
10. N. Dzimir, *Pharmacol Rev.* **51**, 465 (1999).
11. N. Macrez-Leprêtre, F. Kalkbrenner, G. Schultz, and J. Mironneau, *J. Biol. Chem.* **272**, 5261 (1997).
12. M. Brede, F. Wiesmann, R. Jahns, et al., *Circulation* **106**, 2491 (2002).
13. M. Brede, G. Nagy, M. Philipp, et al., *Mol. Endocrinol.* **17**, 1640 (2003).
14. L. Hein, J. D. Altman, and B. K. Kobilka, *Nature* **402**, 181 (1999).
15. K. M. Small, L. E. Wagoner, A. M. Levin, et al., *N. Engl. J. Med.* **347**, 1135 (2002).
16. A. V. Maltsev, Y. M. Kokoz, E. V. Evdokimovskii, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **68**, 66 (2014).
17. Y. M. Kokoz, E. V. Evdokimovskii, A. V. Maltsev, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **100**, 9 (2016).
18. A. V. Berezhnov, E. I. Fedotova, M. N. Nenov, et al., *Biofizika.* **53** (6), 1025 (2008)
19. A. E. Alekseev, S. Park, O. Y. Pimenov, et al., *Pharmacol. Ther.* **197**, 179 (2019). DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.01.007
20. O. V. Nakipova, A. S. Averin, E. V. Evdokimovskii, et al., *PLoS One* **12**, e0177469 (2017).
21. D. M. Bers, D. A. Eisner, and H. H. Valdivia, *Circ. Res.* **93**, 487 (2003).
22. M. Vassalle and C. I. Lin, *J. Biomed. Sci.* **11**, 542 (2004).
23. Y. K. Tham, B. C. Bernardo, J. Y. Y. Ooi, et al., *Arch. Toxicol.* **89**, 1401 (2015).
24. J. O. Mudd and D. A. Kass, *Nature* **451**, 919 (2008).
25. E. G. Lakatta, *Cardiovasc. Res.* **26**, 193 (1992).
26. S. Pogwizd, *Trends. Cardiovasc. Med.* **14**, 61 (2004).

Activation of Sarcolemmal α_2 Adrenoceptors Supports Ca^{2+} Homeostasis and Prevents Ventricular Arrhythmia under Sympathetic Stress

A.S. Averin*, O.V. Nakipova*, L.S. Kosarsky*, O.Yu. Pimenov**, M.H. Galimova**, M.N. Nenov** ***, A.V. Bereznov*, and A. E. Alekseev** ****

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Alzheimer's Center at Temple, Lewis Katz School of Medicine, Temple University, Philadelphia, PA, 19140, USA

****Department of Cardiovascular Medicine, Center for Regenerative Medicine, Stabile 5, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

Reaction of organisms to stress is mediated by interaction of the catecholamines with adrenergic α - and β - receptors. It has been established that in contrast to α_1 - and β -adrenoceptors, α_2 -adrenoceptors in the sympathoadrenal system compose a short feedback loop aimed at controlling catecholamine (norepinephrine, epinephrine) release from the synapses of sympathetic neurons and the adrenal medulla. Thus, activation of α_2 -adrenoceptors serves to conserve cellular energy resources and maintain function of peripheral organs under catecholamine overload. Aberrant feedback control of the stress response results in a spectrum of pathologies including maladaptive cardiac remodeling and development of heart failure. With our previous finding that α_2 -adrenoceptors in sarcolemma of cardiac myocytes can govern intracellular Ca^{2+} handling, we have suggested that in addition to the conventional mechanism, these receptors are capable of controlling cardiac muscle-delimited stress response. We demonstrated that by controlling free Ca^{2+} levels in cytosol, sarcolemmal α_2 -adrenoceptors attenuate the positive inotropic effect via adrenoceptor stimulation in papillary muscles. Activation of α_2 -adrenoceptors also improved the papillary muscles systolic function and prevented detrimental ventricular arrhythmia via maintenance of the cellular Ca^{2+} homeostasis and suppression of spontaneous Ca^{2+} oscillations. Hence, α_2 -adrenoceptors in sarcolemma of ventricular myocytes possess unique cardioprotective potential that may be implemented to mitigate adverse consequences of sustained adrenergic stress.

Keywords: norepinephrine, isoproterenol, guanabenz, contractility, L-type Ca^{2+} channel, oscillations of intracellular Ca^{2+}