

Н.Я. Коваленко, Д.Д. Мацевский, В.К. Решетняк

## Роль М4-подтипа холинорецепторов в ацетилхолиновой вазоконстрикции у крыс

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»  
Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

В опытах на крысах с использованием высокочастотной УЗ измерительной техники и селективного блокатора М4-подтипа холинорецепторов тропикамида показано, что введение животным внутривенно данного мускаринового антагониста в дозах, превышающих порог селективности препарата (1 мг/кг), приводит к выраженному угнетению системного кровообращения. У животных развиваются выраженная транзиторная гипотензия и брадикардия, снижается общее периферическое сосудистое сопротивление и минутный объем сердца. Выключение М4-холинорецепторов тропикамидом в дозах 0,1—0,001 мг/кг оказывает транзиторное, дозозависимое, и разнонаправленное действие на гемодинамические показатели — уменьшаются АД, общее периферическое сосудистое сопротивление, частота сердечных сокращений, минутный объем сердца, в то же время скорость аортального кровотока и величина ударного объема сердца увеличиваются. При дальнейшем снижении дозы тропикамида (0,0001 мг/кг) практически не выявляется его отрицательный хронотропный эффект в то время, как сосудистое действие препарата (снижение АД и общего периферического сосудистого сопротивления) сохраняется. Полученные данные обсуждаются в аспекте возможного участия М4-подтипа холинорецепторов в ацетилхолиновой вазоконстрикции.

**Ключевые слова:** М-4 холинорецепторы, тропикамид, сосуды, ацетилхолиновая вазоконстрикция, ультразвук

N.Ya. Kovalenko, D.D. Matsievsky, V.K. Reshetnyak

## The role of M4-subtype of cholinergic receptors in acetylcholine vasoconstriction

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltyiskaya str., Moscow, 125315, Russia

In experiments on rats using high frequency ultrasonic measurement technique and selective M4-cholinergic receptor antagonist tropicamide it was shown that i/v injection of the cholinergic block agent in large doses exceeding of its selective threshold (1 mg/kg) causes pronounced inhibition of the cardiovascular system in rats. Severe transitory hypotension and bradycardia are developed, general vascular resistance, minute cardiac output, are decreased. The block of M4-cholinergic receptors with smaller doses of tropicamide (0,1—0,001 mg/kg) causes transitory dose-dependent effect on hemodynamic — system blood pressure and vascular resistance, pulse, minute cardiac output, as soon as velocity of aortic blood flow, stroke cardiac output are increased on the contrary. The following decrease the dose of the high selective M4-cholinergic antagonist (0,0001 mg/kg) reveals that its negative chronotropic effect are not detected practically but tropicamide vessel action (decrease of system blood pressure and vascular resistance) are preserved distinctly. The obtained data are discussed in aspect of the possible involvement of M4-muscarinic receptor subtype in acetylcholine-induced vasoconstriction in rats.

**Key words:** M4-cholinergic receptors, tropicamide, vessels, acetylcholine vasoconstriction, ultrasonic

Как известно, периферические сосуды не получают парасимпатическую иннервацию за исключением определенных сосудистых областей. В то же время ацетилхолин и другие мускариновые агонисты вызывают генерализованное расширение сосудов и снижение системного артериального давления (АД) [7, 13]. Вазодилататорное действие ацетилхолина связывают с активации М3 — подтипа мускариновых холинорецепторов (М-ХР), находящихся в эндотелии, что

приводит к образованию оксида азота (NO), накоплению cGMP и релаксации гладких мышц сосудов. В литературе описаны также вазоконстрикторные эффекты ацетилхолина. Следует сказать, что если вопрос об NO-зависимой ацетилхолиновой вазодилатации к настоящему времени достаточно хорошо изучен, то о вазоконстрикторном влиянии ацетилхолина известно немного. Имеющиеся в литературе сведения ограничены и неоднозначны. Весьма противоречивы наблюдения о том, с каким, из известных на сегодня 5 подтипов М-ХР [9, 11, 12], связана не-нейрональная ацетилхолиновая вазоконстрикция. Так, по дан-

Для корреспонденции: Коваленко Наталья Яковлевна, канд. мед. наук, старш. науч. сотр. лаб. комбинированных повреждений и шока ФГБУ НИИОПП РАМН. E-mail: niiopp@mail.ru

ным одних авторов, в гладких мышцах сосудов *in vitro* выявляются МЗ-ХР, которые вызывают вазоконстрикцию, усиливающуюся при удалении эндотелия или его повреждении [10]. По результатам других исследователей, в ацетилхолиновом сокращении сосудистой стенки *in vitro* участвуют такие подтипы М-ХР, как М1-ХР и М2-ХР [7, 9], которые характеризуются наличием органной и видовой специфичности [10]. Роль М4-подтипа ХР в развитии ненейрональной вазоконстрикции и регуляции сосудистого тонуса остается неясной и недостаточно изученной.

**Цель исследования** — изучение дозозависимого действия высокоизбирательного блокатора М4-ХР тропикамида на общее периферическое сосудистое сопротивление (ОПСС), АД и насосную функцию сердца интактных крыс.

### Методика

Опыты выполнены на 34 крысах-самцах Вистар массой 250—280 г под уретановым наркозом (1,25 г/кг в/б). В ходе эксперимента у всех животных регистрировали микроманометром АД в бедренной артерии. Скорость кровотока в восходящей части дуги аорты определяли без вскрытия грудной клетки с помощью вводимого через сонную артерию УЗ катетера диамет-

ром 0,6 мм. В качестве чувствительного элемента датчика применяли миниатюрные пьезокристаллы, работающие на частоте 26,8 МГц. Используя специальное электронное устройство, изучали динамику ударного (УО) и минутного (МО) объемов сердца, а также ОПСС. Частоту сердечных сокращений (ЧСС) определяли, применяя кардиотахометр, запускаемый от пульсовой волны аортального кровотока [2—4]. В качестве селективного блокатора М4-ХР использовали тропикамид («Sigma»), который вводили внутривенно в дозе 1—0,0001 мг/кг массы тела животного. Максимальное время наблюдения за действием тропикамида составляло 60 мин после введения препарата. Для обработки полученных данных использовали метод Фишера—Стьюдента. Достоверность различия оценивали с помощью *t* критерия Стьюдента при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Тропикамид, вводимый интактным крысам в/в в больших дозах (1 мг/кг) оказывал выраженный транзиторийный гипотензивный эффект и вызывал сильную брадикардию. Уже через 1—2 с после введения М-холинблокатора наблюдалось быстрое снижение АД до 20—25 мм рт. ст., кратковременное увеличение на 25—30%, а затем снижение ОПСС на 70—80% от

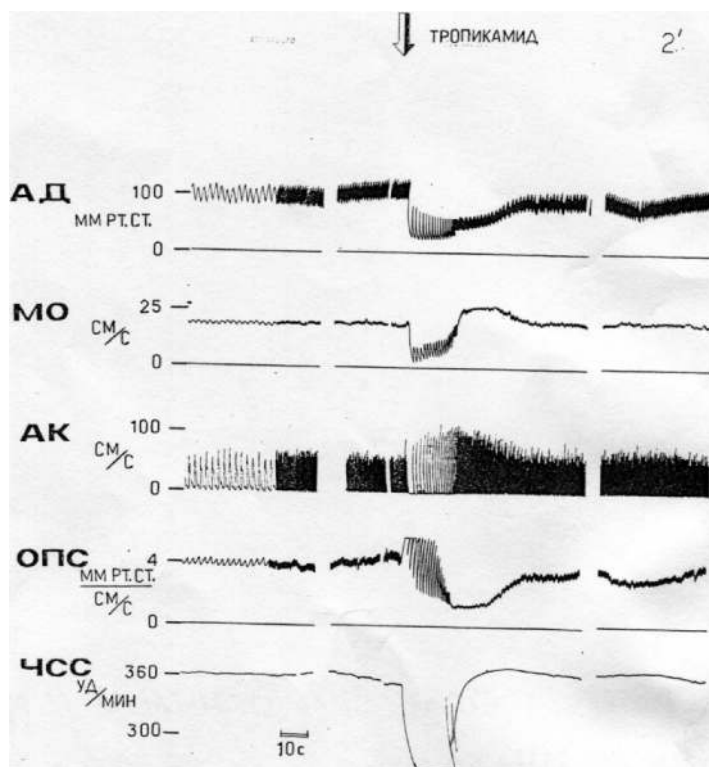


Рис. 1. Влияние тропикамида в дозе 1 мг/кг в/в на показатели дыхания и системного кровообращения интактной крысы (оригинальные кривые). Здесь и на рис. 3 сверху вниз: АД — системное артериальное давление; МО — минутный объем крови; АК — линейная скорость кровотока в восходящей дуге аорты; ОПС — общее периферическое сосудистое сопротивление; ЧСС — частота сердечных сокращений; слева направо сверху: стрелка — введение препарата; время после введения препарата (мин)

исходного уровня (рис. 1). Скорость аортального кровотока и величина УО сердца транзитивно возрастали более, чем вдвое. Изменения МО сердца и ЧСС носили двуфазный характер. После первоначального быстрого снижения этих показателей на 80—90% наблюдалось их восстановление с последующим небольшим увеличением на 15—20%. Через 3—4 мин после введения холиноблокатора наступала нормализация всех изученных гемодинамических показателей.

Действие тропикамида в дозах 0,1—0,001 мг/кг на центральное кровообращение было дозозависимым и разнонаправленным — угнетающим на АД, ЧСС и стимулирующим на насосную функцию сердца (рис. 2). Введение селективного холинолитика в дозе 0,1 мг/кг приводило к снижению на 60—70% от исходного уровня АД, ОПСС, а также ЧСС. МО сердца уменьшался на 15—20%, скорость аортального кровотока и величина УО сердца при этом увеличивались на 25—30%. Через 30—40 с наступала нормализация указанных гемодинамических параметров. Дальнейшее снижение дозы М4-холиноблокатора приводило к уменьшению величины описанных выше изменений изученных показателей. Так при введении тропикамида в дозе 0,01 мг/кг АД и ОПСС снижались примерно на половину (рис. 2, 3). Отрицательный хронотропный эффект был выражен незначительно, изменения со стороны СВ носили непостоянный характер. У части животных (35% случаев) наблюдалось небольшое (на 10—15%), но стойкое увеличение скорости аортального кровотока, а также УО и

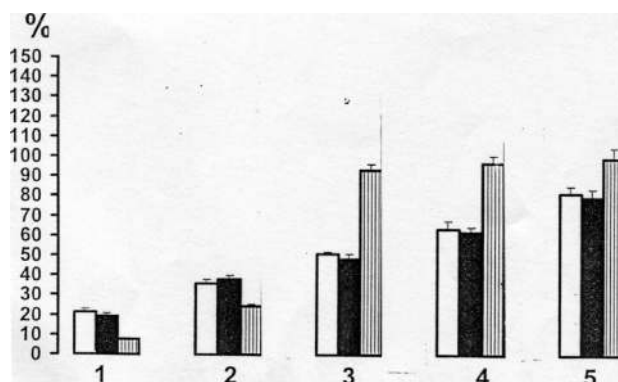


Рис. 2. Дозозависимое действие тропикамида на артериальное давление, общее периферическое сосудистое сопротивление и ЧСС у крыс.

Светлые столбики — АД; темные — ОПСС; с вертикальной штриховкой — ЧСС; по оси абсцисс — доза препарата: 1 — 1 мг/кг; 2 — 0,1 мг/кг; 3 — 0,01 мг/кг; 4 — 0,001 мг/кг; 5 — 0,0001 мг/кг; по оси ординат — максимальные изменения показателей после введения тропикамида (% от исходного уровня, принимаемого за 100%)

МО сердца, у других животных показатели СВ не изменялись. При снижении вводимой дозы тропикамида еще на порядок (0,001 мг/кг) его отрицательный хронотропный эффект практически не выявлялся в то время, как действие на АД и ОПСС сохранялось (рис. 2). При еще больших разведениях препарата (0,0001 мг/кг) регистрировалось его действие только на сосуды — АД и ОПСС снижались 20—25%. Влияния на ЧСС, а также показатели СВ тропикамид в таких дозировках не оказывал.

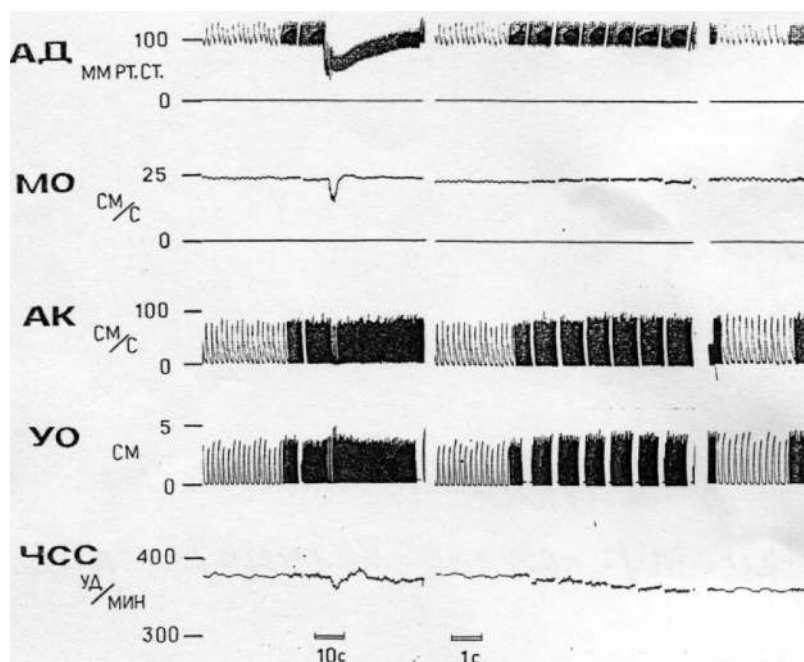


Рис. 3. Изменения показателей системной гемодинамики у интактной крысы после в/в введения тропикамида в дозе 0,01 мг/кг. УО — ударный объем сердца. Время наблюдения за действием холиноблокатора 60 мин (оригинальные кривые)

Таким образом, блокада *in vivo* М4-ХР высокоизбирательным антагонистом тропикамидом приводит к транзиторному дозозависимому снижению АД, ОПСС, ЧСС и уменьшению МО сердца из-за развивающейся брадикардии. Насосная функция сердца при этом увеличивается. Обращает на себя внимание неодинаковая чувствительность сердца и сосудов к дозозависимому действию изученного селективного холинолитика. Так, по мере снижения дозы тропикамида уменьшается его отрицательный хронотропный эффект. При введении холиноблокатора в дозе 0,001 мг/кг снижение ЧСС практически не отмечается. В то же время, гипотензивное действие данного холинолитика, связанное с расширением сосудов и снижением ОПСС, сохраняется при его введении в таких концентрациях, как 0,0001 мг/кг, что дает основание говорить о высокой селективности М4-ХР сосудистой стенки.

Полученные нами данные о действии тропикамида на АД и ОПСС, являющегося интегративным показателем состояния сосудистой резистивности, дают основания полагать, что у крыс вазоконстрикторные эффекты ацетилхолина *in vivo* могут быть связаны с активацией М4-подтипа ХР, локализующихся периферически, непосредственно в сосудистой стенке. Однако нельзя исключить и то, что тропикамид при его введении в системную циркуляцию мог проникать через гематоэнцефалический барьер [6] и оказывать действие на соответствующие холинергические структуры головного мозга, принимающие участие в центральной регуляции сосудистого тонуса [5]. В этом плане весьма интересным было бы проведение экспериментов по сравнительному изучению *in vivo* влияния высокоселективных агонистов и антагонистов М4-ХР на сердечно-сосудистую систему в норме при введении селективных холиномиметиков и холинолитиков внутривенно и интратистернально.

Все вышесказанное, а также данные, полученные нами ранее, свидетельствуют об участии М4-ХР в регуляции сердечно-сосудистой системы в норме и о наличии функциональной гетерогенности различных подтипов М-ХР при осуществлении ими холинергической регуляции в условиях целостного организма [1].

## Список литературы

1. Коваленко Н.Я., Мацневский Д.Д. Селективная блокада М1-холинорецепторов головного мозга пирензепином ухудшает состояние систем кровообращения и дыхания у крыс с острой кровопотерей // Бюл. exper. биол. — 2006. — Т. 142, №9. — С. 255-259.
2. Мацневский Д.Д. Внутрисосудистые измерения кровотока на крысах // Бюл. exper. биол. 1993. Т.116, №8. — С. 144-147.
3. Мацневский Д.Д. Ультразвук в экспериментальных исследованиях макро- и микроциркуляции // Бюл. exper. биол. — 2003. — Т. 136, №7. — С. 115-118.
4. Мацневский Д.Д. Измерения кровотока в исследованиях макро- и микроциркуляции // Бюл. exper. биол. — 2004. — Т. 137, №10. — С. 612-616.
5. Подосиновичева Н.П., Горобец Л.Ф., Долго-Сабуров В.Б. Типовая принадлежность пресинаптических М-холинорецепторов различных отделов мозга крыс // Бюл. exper. биол. — 1996. — Т. 122, №7. — С. 75-77.
6. Betz A.I., McLaughlin P.I., Burgos M. et al. The muscarinic receptors antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movement in a rodent model of parkinsonian tremor: possible role of M4- receptors // Psychopharm. — 2007. — Vol. 194, №3. — P. 347-359.
7. Broadly R.J., Kelly D.P. Muscarinic receptors agonist and antagonist // Molecules. — 2001. — №6. — P. 142-193.
8. Caulfield M.P., Birdsall N.J.M. International Union of Pharmacology. XVII Classification of Muscarinic acetylcholine receptors // Pharm. Rev. — 1998. — Vol. 50, №2. — P. 279-290.
9. Jaiswal N., Lambrecht F.J., Mutschler E. et al. Pharmacological characterization of vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1991. — Vol. 258, №3. — P. 848-850.
10. Leris V.A., Hita F.J., Gobbi M.D. Relaxation and contraction in rabbit aorta Pharmacological characterization of the muscarinic receptors subtypes mediating vasoconstriction of human umbilical vein // Br. J. Pharmacol. — 2006. — Vol. 147, №5. — P. 516-523.
11. Steinle J.J., Smith P.G. Presynaptic muscarinic facilitation of parasympathetic neurotransmission after sympathectomy in rats // J. Pharm. Exp. Ther. — 2000. — Vol. 294, №2. — P. 627-632.
12. Zhang H.M., Chen S.P., Matsui M. et al. Opposite function of spinal M2, M3, M4 receptors subtypes in regulation of GABAergic inputs to dorsal neuron revealed by muscarinic receptors knockout mice // Mol. Pharmacol. — 2006. — Vol. 69, №3. — P. 1048-1055.
13. Wess J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors // Crit. Rev. Neurobiol. — 1966. — Vol. 10, №2. — P. 69-99.

Поступила 21.05.13

## Сведения об авторах:

Коваленко Наталья Яковлевна, канд. мед. наук, старш. науч. сотр. лаб. комбинированных повреждений и шока ФГБУ НИИОПП РАМН

Мацневский Дмитрий Дмитриевич, канд. тех. наук, зав. биоинженерной лаб. ФГБУ НИИОПП РАМН

Решетняк Виталий Кузьмич, чл.-корр. РАМН, д-р мед. наук, проф., зав. отд. ФГБУ НИИОПП РАМН