

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 591.339-826.17:57.053.2

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ПЕРЕДАЧА ХОЛИНЕРГИЧЕСКОГО СИГНАЛА В АМНИОНЕ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

© 2014 г. О. В. Бойко, Б. Н. Манухин

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,

119334 Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: boikolg@gmail.com

Поступила в редакцию 04.06.2013 г.

Исследована роль системы депонированного кальция в опосредовании сократительных реакций на карбахол в изолированном амнионе 11–13-суточного куриного эмбриона. Обнаружено, что тапсигаргин (2 мкМ, 20 мин), ингибитор эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз, снижает тоническую реакцию на карбахол на $40 \pm 2\%$. Показано, что на фоне U73122 (5–10 мкМ, 10 мин), ингибитора фосфоинозитид-специфической фосфолипазы С, ритмическая сократительная реакция амниона на карбахол блокируется, а тоническая реакция снижается до $47 \pm 9\%$. Рианодин (10 мкМ, 5 мин) блокирует спонтанную сократительную активность амниона и снижает тоническую реакцию на карбахол до $36 \pm 3\%$, а на фоне действия рианоидина нифедипин 0.05 мкМ полностью блокирует тоническую реакцию на карбахол. В реализации сократительных реакций амниона, опосредуемых M_3 -рецепторами, участвует Ca^{2+} , мобилизуемый из внутриклеточных запасов через инозитолтрифосфатные и рианоидиновые рецепторы.

DOI: 10.7868/S0002332914010032

Известно, что вещества, называемые нейротрансмиттерами (медиаторами), синтезируются и выполняют регуляторные функции у простейших организмов, на предзародышевых и донервных стадиях развития Metazoa, в неиннервированных клетках и тканях позвоночных (Vuznikov *et al.*, 2001; Eglén, 2006). Неизменный интерес исследователей вызывают ненейрональные холинергические системы. Мембранные холинорецепторы обнаружены в эндотелиальных клетках сосудов, эпителиальных клетках респираторного тракта, раковых клетках, кератиноцитах, половых клетках, макрофагах, лимфоцитах и др. (Eglén, 2006; Kawashima, Fujii, 2008; Wessler, Kirkpatrick, 2008). При изучении природы ненервных холинергических регуляторных систем и их биологического значения в качестве экспериментальной модели могут быть использованы неиннервированные экстраэмбриональные ткани.

Холинорецепторы в амнионе куриного эмбриона опосредуют стимуляцию его сокращений: в ответ на действие холинергического агониста возрастают тонус, амплитуда и частота сокращений амниотической мембраны (Cuthbert, 1963; Бойко, Манухин, 1989а; Bowers, 1989). Спонтанная сократительная активность амниона коррелирует с уровнем дифференцированности ткани, содержанием ацетилхолина (АХ) и активностью холинэстеразы (Бункина, 1963; Полякова, 1970; Бойко, Манухин, 1989б). Реакция амниона на АХ и карбахол (КБХ) блокируется атропином (Бойко, Манухин, 1989а; Нечаева, Турпаев, 1995). Му-

скаринная природа холинорецепторов подтверждена в опытах на диссоциированных гладкомышечных клетках амниона (Dahm, Bowers, 1996). По аффинности к антагонистам мускариновые рецепторы амниона характеризуются как M_3 -холинорецепторы (Бойко, Манухин, 2007). Таким образом, амнион куриного эмбриона позволяет исследовать механизмы ненейронального действия АХ на M_3 -рецепторы гладкомышечных клеток. Активация M_3 -рецепторов в иннервированных гладких мышцах приводит к повышению цитоплазматической концентрации ионов кальция, которые поступают в клетку через потенциалуправляемые кальциевые каналы и в результате выброса Ca^{2+} в цитоплазму из саркоплазматического ретикулума (Bai *et al.*, 2009; Wray, Burdyga, 2010). В амнионе куриного эмбриона сократительные реакции на холиномиметики в значительной степени опосредуются ионами кальция, входящими через потенциалзависимые каналы L-типа (Бойко, Манухин, 2009), роль системы депонированного кальция ранее не изучалась.

Цель работы – исследовать вклад и пути мобилизации депонированного Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума в ответ на действие КБХ в амнионе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на изолированной полоске неиннервированного амниона 11–13-суточного куриного эмбриона. Сократительные реакции ре-

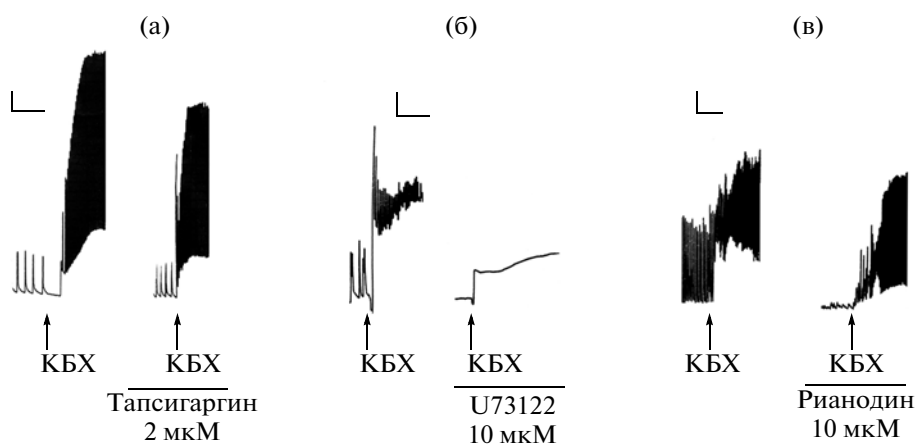


Рис. 1. Ингибирование реакции амниона куриного эмбриона (11–13 сут) на карбахол (50 мкМ) тапсигаргином (а), U73122 (б), рианоудином (в). Калибровка: 1 мин, 25 мВ.

гистрировали в изометрическом режиме с помощью механотронов 6МХ1Б (Россия) на самописцах Н-339 и Н-399. Параллельно исследовали сокращения двух фрагментов амниона, помещенных в термостатируемые (38°C) аэрируемые камеры объемом 10 мл, содержащие раствор Хенкса следующего состава, мМ: NaCl – 137, KCl – 5.4, CaCl₂ – 1.26, MgSO₄ – 0.41, MgCl₂ – 0.49, Na₂HPO₄ – 0.34, KH₂PO₄ – 0.44, NaHCO₃ – 4.2, глюкоза – 5.6. Исходная нагрузка на препарат составляла 100 мг. Тестируемые вещества вносили в камеру в объеме 100 мкл после получасовой преинкубации ткани. Сократительную активность амниона стимулировали с помощью холинергического агониста КБХ (50 мкМ). Используемая концентрация агониста вызывает максимальную реакцию по частоте сокращений и субмаксимальную тоническую реакцию (Бойко, Манухин, 1989а).

Были использованы следующие реактивы: тапсигаргин (Tocris Bioscience, США), рианодин (Ascent Scientific, США), карбахол, U73122 (1-[6-[[[17β)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-триен-17-yl]амино]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione) и нифедипин (Sigma, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

За высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо отвечают два типа рецепторов: рианодиновые и рецепторы инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃). Степень участия депонированного кальция в опосредуемых M₃-рецепторами сократительных реакциях можно оценить, используя ингибитор эндоплазматических Ca²⁺-АТФаз тапсигаргин, который приводит к опустошению IP₃-чувствительных и IP₃-нечувствительных источников, таким образом отменяя возможность дополнительно-

го выброса Ca²⁺ в ответ на действие холиномиметика. Инкубация тестируемой полоски амниона в течение 20 мин с тапсигаргином (2 мкМ) снижает тоническую реакцию на КБХ на 40 ± 2% (рис. 1а, 2а), что означает зависимость КБХ-вызванных сокращений от высвобождения внутриклеточного кальция.

Участие в реализации мускариновой реакции в амнионе ионов кальция, мобилизуемых из внутриклеточных запасов через IP₃-рецепторы, установлено при действии U73122. Аминостероид U73122 – ингибитор фосфоинозитид-специфической фосфолипазы С, ключевого фермента метаболизма фосфатидилинозитола. Гидролиз фосфатидилинозитола приводит к образованию диацилглицерола и мобилизующего Ca²⁺ IP₃. На фоне U73122 (5–10 мкМ, 10 мин) ритмическая сократительная реакция амниона на КБХ отме-

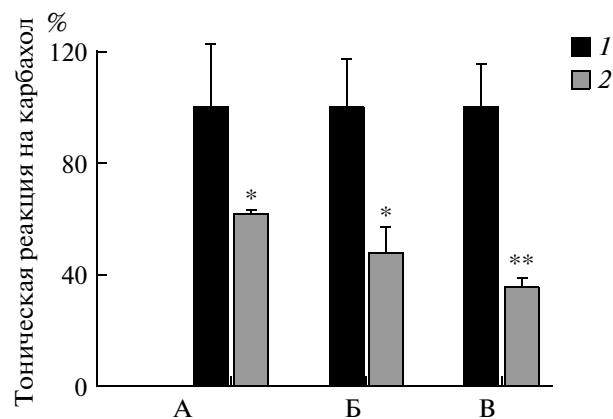


Рис. 2. Реакция амниона куриного эмбриона (11–13 сут) на карбахол. 1 – контроль; 2 – эффект тапсигаргина (А), U73122 (Б), рианодина (В). * – $P < 0.05$, ** – $P < 0.01$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

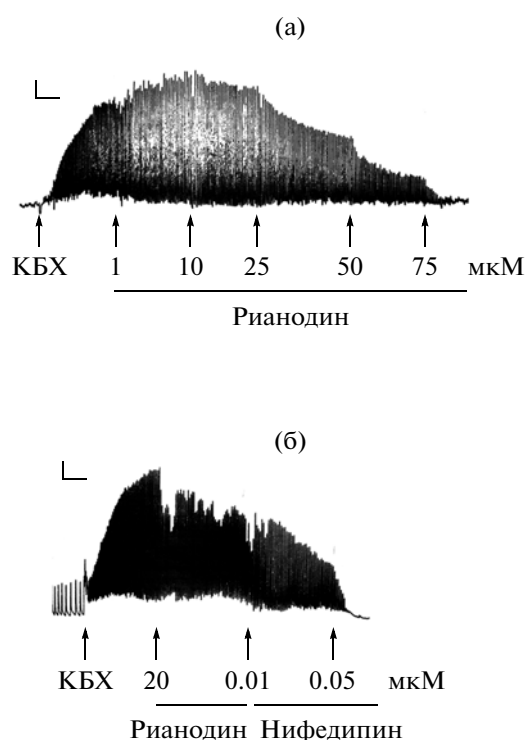


Рис. 3. Влияние рианоидина на сократительную реакцию амниона куриного эмбриона (11 сут), вызванную карбахолом (50 мкМ). а – кумулятивное действие рианоидина, б – ингибиторное действие рианоидина и блокада реакции нифедипином. Калибровка: а – 1 мин, 25 мг; б – 1 мин, 10 мг.

няется, а тоническая реакция снижается до $47 \pm 9\%$ (рис. 16, 26).

Для выявления вклада депонированного кальция, выбрасываемого в цитоплазму через рианоидиновые рецепторы, исследовали активность модулятора этих рецепторов – растительного алкалоида рианоидина. Воздействие рианоидином (10 мкМ, 5 мин) приводит к блокаде спонтанной сократительной активности амниона и снижает тоническую реакцию на КБХ до $36 \pm 3\%$ (рис. 1в, 2в). В реакциях без выраженного тонического компонента рианоидин в низкой концентрации (1 мкМ) вызывает повышение амплитуды сократительной реакции на КБХ (рис. 3а). В более высоких концентрациях (10–75 мкМ) он дозозависимо ингибирует амплитуду вызванных КБХ сокращений до полного их прекращения (рис. 3а). На фоне действия рианоидина 20 мкМ холинергическая реакция становится высокочувствительной к нифедипину, блокатору потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа. Нифедипин в концентрации 0.05 мкМ полностью блокирует реакцию на КБХ (рис. 3б), включая тоническую компоненту.

Провизорные экстраэмбриональные ткани привлекают возрастающее внимание исследователей по ряду причин. Установлено, что эпителиальные клетки амниона человека обладают характеристиками плюрипотентных стволовых клеток и в определенных условиях способны дифференцироваться в клетки различной тканевой принадлежности (Miki, Strom, 2006). Уникальные характеристики клеток амниона позволяют рассматривать их как потенциальный источник материала для регенеративной медицины (Toda *et al.*, 2007; Miki *et al.*, 2009). Показано, что клетки амниона зародышей высших позвоночных способны синтезировать и высвобождать катехоламины и ацетилхолин (Sakuragawa *et al.*, 2001), а также обладают рецепторами медиаторов и гормонов (Di Renzo *et al.*, 1984; Collins, 1993). Механизмы реализации рецепторных сигналов в амниотической ткани остаются малоисследованными.

Мускариновые рецепторы амниона куриного эмбриона, опосредующие активацию его сокращений, были идентифицированы тестированием активности селективных антагонистов. В качестве M_1 -антагониста использовали пирензепин, M_2 – метоктрамин, M_3 – 4-DAMP, M_4 – тропикамид. По холинолитической активности ($-\lg IC_{50}$) в отношении реакции на КБХ они составили последовательность: 4-DAMP (8.29) > тропикамид (6.97) > пирензепин (5.85) > метоктрамин (5.63). Согласно полученным данным мускариновые рецепторы гладкомышечных клеток амниона куриного эмбриона относятся к M_3 -подтипу (Манухин, Бойко, 2008).

Установлено, что в ответ на действие 100 мкМ КБХ концентрация кальция в клетках амниона возрастает более чем в 10 раз по сравнению с исходной (Cross *et al.*, 2000). Латентный период между введением агониста и последующим повышением концентрации Ca^{2+} в клетке составлял 0.7 с. В случае прямой деполяризации плазматической мембраны путем повышения концентрации наружного K^+ латентный период оказался наполовину меньше, однако нарастание концентрации Ca^{2+} происходило медленнее и достигнутый максимум пика был существенно ниже. Так как реакция на гиперкалиевый раствор в амнионе обеспечивается входом экстраклеточного Ca^{2+} (Бойко, Манухин, 2009), это косвенно свидетельствует о мобилизации при действии КБХ дополнительных источников Ca^{2+} и предполагает, что в реализации холинергического воздействия в амнионе могут быть задействованы как экстраклеточные, так и внутриклеточные источники Ca^{2+} .

Показано, что нифедипин (0.1–1 мкМ), блокатор потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа, полностью прекращает спонтанные и вы-

званные КБХ (50 мкМ) ритмические сокращения, а также тоническую реакцию на гиперкалиевый раствор. Однако КБХ-вызванная тоническая реакция в норме и на фоне калиевой контрактуры полностью нифедипином не устраняется (Бойко, Манухин, 2009). Следовательно, активация мускариновых рецепторов амниона приводит к экзогенному входу Ca^{2+} в цитоплазму клетки через каналы плазматической мембраны L-типа, открывающиеся в ответ на деполяризацию, и, по-видимому, к высвобождению его из внутриклеточных источников. Последнее подтверждается опытами с тапсигаргином, специфическим ингибитором эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз. Как и в других гладких мышцах (An *et al.*, 2002; Quinna *et al.*, 2004), опустошение внутриклеточных кальциевых депо путем воздействия тапсигаргином в течение 20 мин приводит к значительному снижению реакции амниона на КБХ (рис. 2а).

Известно, что в гладких мышцах холинергические агонисты через M_3 -холинорецепторы активируют метаболизм мембранных фосфоинозитидов. Связывание АХ с рецепторами инициирует сигнальный каскад, приводящий к гидролизу фосфатидилинозитола фосфоинозитид-специфической фосфолипазой С с образованием диацилглицерола и IP_3 , мобилизующего Ca^{2+} (Eglen, 2005). Согласно нашим данным, КБХ-вызванное сокращение амниона куриного эмбриона опосредуется активацией фосфолипазы С. На фоне действия U73122, подавляющего активность фосфолипазы С, ритмическая составляющая ответа амниона на КБХ отменялась, а тоническая реакция снижалась более чем в 2 раза (рис. 2б). Следовательно, можно предположить, что КБХ-вызванные сокращения амниона куриного эмбриона опосредуются высвобождением кальция через IP_3 -чувствительные рецепторы саркоплазматического ретикулума вследствие зависимость от фосфолипазы С увеличения уровня внутриклеточного IP_3 . Эти данные согласуются с результатами, полученными при активации M_3 -рецепторов других гладкомышечных клеток, и свидетельствуют об участии IP_3 -зависимой мобилизации внутриклеточного пула кальция в гладких мышцах (Mimata *et al.*, 1997; Vai *et al.*, 2009).

Рианодинные рецепторы, которые принимают участие в реализации сократительных реакций в скелетных и сердечной мышцах, также выявляются в различных типах гладкомышечных клеток и опосредуют мускариновые реакции (White, McGeown 2002; Du *et al.*, 2005). Для изучения роли рианодинных рецепторов в КБХ-индуцированных ответах амниона куриного эмбриона аппликацию КБХ проводили на фоне рианодина. В наших опытах рианодин в концентрации 1 мкМ вызывал усиление сократительной реакции амниона на КБХ (рис. 3а), т.е. его воздействие в низкой concentra-

ции, по-видимому, активирует и удерживает рианодинные рецепторы в открытом состоянии. Это приводит к дополнительному выбросу депонированного Ca^{2+} . Рианодин в концентрации 5 мкМ и более вызывал блокаду рианодинных рецепторов амниона и эффективно и достоверно снижал реакцию на КБХ (рис. 2в). Одновременное действие нифедипина (0.05 мкМ) и рианодина (10 мкМ) полностью блокировало холинергическую реакцию и увеличивало ее чувствительность к нифедипину.

Таким образом, сократительные реакции амниона куриного эмбриона, обусловленные активацией M_3 -холинорецепторов, зависят от экстраклеточного Ca^{2+} , входящего через потенциалуправляемые каналы L-типа, и мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных запасов через рецепторы инозитолтрифосфата и рианодинные рецепторы. Вовлечение разных источников Ca^{2+} обеспечивает значительный Ca^{2+} -сигнал и долговременную и высокоамплитудную реакцию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бойко О.В., Манухин Б.Н. Холинергическая реакция амниона куриного эмбриона // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1989а. Т. 25. № 6. С. 742–748.
- Бойко О.В., Манухин Б.Н. Холинэстераза амниона развивающегося куриного эмбриона // Онтогенез. 1989б. Т. 20. № 3. С. 258–262.
- Бойко О.В., Манухин Б.Н. Фармакологическая характеристика мускариновых холинорецепторов в иннервированном амнионе куриного эмбриона // Докл. РАН. 2007. Т. 413. № 1. С. 120–123.
- Бойко О.В., Манухин Б.Н. Значение экстраклеточного Ca^{2+} в сократительных реакциях амниона куриного эмбриона // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 4. С. 254–260.
- Бункина Л.С. О роли системы ацетилхолин–холинэстераза в спонтанной ритмической двигательной активности амниона куриного зародыша // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1963. Т. 55. № 1. С. 17–21.
- Манухин Б.Н., Бойко О.В. Мускариновые холинорецепторы амниона куриного эмбриона // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 2. С. 215–222.
- Нечаева М.В., Турпаев Т.М. Особенности сократительной реакции амниона куриного зародыша при действии ацетилхолина на его внутреннюю и внешнюю поверхности // Докл. РАН. 1995. Т. 341. № 3. С. 419–421.
- Полякова Л.А. О двух типах колебательных движений куриного эмбриона в амниотической жидкости // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1970. Т. 69. № 5. С. 27–31.
- An J.Y., Yun H.S., Lee Y.P. *et al.* The intracellular pathway of the acetylcholine-induced contraction in cat detrusor muscle cells // Br. J. Pharmacol. 2002. V. 137. № 7. P. 1001–1010.

- Bai Y., Edelmann M., Sanderson M.J. The contribution of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors to agonist-induced Ca^{2+} signaling of airway smooth muscle cells // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2009. V. 297. P. L347–L361.
- Bowers C.W. Expression of functional neurotransmitter receptors in an innervated tissue: avian amnion // *Cell Tissue Res.* 1989. V. 258. P. 409–415.
- Buznikov G.A., Lambert W.H., Lauder J.M. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis // *Cell Tissue Res.* 2001. V. 305. № 2. P. 177–186.
- Collins P.L., Zink E., Moore R.M. et al. Ritodrine: a beta-adrenergic receptor antagonist in human amnion // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1993. V. 168. № 1. Pt 1. P. 143–151.
- Cross K.M.L., Dahm L.M., Bowers C.W. et al. Simultaneous measures of contraction and intracellular calcium in single, cultured smooth muscle cells // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2000. V. 36. P. 50–57.
- Cuthbert A.W. An acetylcholine-like substance and cholinesterase in the smooth muscle of the chick amnion // *J. Physiol.* 1963. V. 166. P. 284–295.
- Dahm L.M., Bowers C.W. Substance P responsiveness of smooth muscle cells is regulated by the integrin ligand, thrombospondin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 1276–1281.
- Di Renzo G.C., Venincasa M.D., Bleasdale J.E. The identification and characterization of beta-adrenergic receptors in human amnion tissue // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1984. V. 148. № 4. P. 398–405.
- Du W., Stiber J.A., Rosenberg P.B. et al. Ryanodine receptors in muscarinic receptor-mediated bronchoconstriction // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 26287–26294.
- Eglen R.M. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology // *Progress Med. Chem.* 2005. V. 43. P. 105–136.
- Eglen R.M. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function // *Auton. Autacoid Pharmacol.* 2006. V. 26. № 3. P. 219–233.
- Kawashima K., Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance // *J. Pharmacol. Sci.* 2008. V. 106. № 2. P. 163–173.
- Miki T., Strom S.C. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells // *Stem. Cell Rev.* 2006. V. 2(2). P. 133–142.
- Miki T., Marongiu F., Ellis E.C. et al. Production of hepatocyte-like cells from human amnion // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 481. P. 155–168.
- Mimata H., Nomura Y., Emoto A. et al. Muscarinic receptor subtypes and receptor-coupled phosphatidylinositol hydrolysis in rat bladder smooth muscle // *Int. J. Urol.* 1997. V. 4. P. 591–596.
- Quinna T., Molloy M., Smytha A. et al. Capacitative calcium entry in guinea pig gallbladder smooth muscle in vitro // *Life Sci.* 2004. V. 74. P. 1659–1669.
- Sakuragawa N., Elwan M.A., Uchida S. et al. Non-neuronal neurotransmitters and neurotrophic factors in amniotic epithelial cells: expression and function in humans and monkey // *Jap. J. Pharmacol.* 2001. V. 85. № 1. P. 20–23.
- Toda A., Okabe M., Yoshida T. et al. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. // *J. Pharmacol. Sci.* 2007. V. 105. № 3. P. 215–228.
- Wessler I., Kirkpatrick C.J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans // *Br. J. Pharmacol.* 2008. V. 154. № 8. P. 1558–1571.
- White C., McGeown J.G. Carbachol triggers RyR-dependent Ca^{2+} release via activation of Ip_3 receptors in isolated rat gastric myocytes // *J. Physiol.* 2002. V. 542. № 3. P. 725–733.
- Wray S., Burdyga T. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. P. 113–178.

Intracellular Transmission of the Cholinergic Signal in the Chick Amnion

O. V. Boiko and B. N. Manukhin

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

e-mail: boikolg@gmail.com

The role of the system of deposited calcium in the mediation of contractile reactions to carbachol in an isolated amnion of 11–13 day old chicken embryo was studied. It was found that thapsigargin (2 μ M, 20 min), an inhibitor of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases, decreases the tonic reaction to carbachol by $40 \pm 2\%$. In the presence of U73122 (5–10 μ M, 10 min), a phosphoinositide-specific phospholipase C inhibitor, the rhythmic contractile reaction of the amnion to carbachol is blocked, whereas the tonic reaction decreases to $47 \pm 9\%$ of the initial one. Ryanodine (10 μ M, 5 min) inhibits the spontaneous contractile activity of the amnion and decreases the tonic reaction to carbachol to $36 \pm 3\%$ relative to control. In the presence of ryanodine, nifedipine (0.05 μ M) completely blocks the tonic reaction to carbachol. Thus, calcium mobilized from intracellular stores via inositol trisphosphate and ryanodine receptors is involved in realization of contractile reactions, mediated by M3 receptors, in the chick amnion.