

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 591.1+612.337

Механизмы холинергического сокращения гладкой мускулатуры кишечника беломорской трески *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae): вклад различных подтипов М-холинорецепторов и Rho-киназы**А.А. Швецова^{1,*} , Г.В. Моргунова² , Е.А. Новодережкина¹ , В.М. Потехина¹ ,
А.А. Каменский¹ , О.С. Тарасова¹ **¹Кафедра физиологии человека и животных и ²сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com

Изучение особенностей функционирования различных систем организма у разных позвоночных животных является одной из ключевых задач сравнительной физиологии. Костистые рыбы — многочисленная группа позвоночных, однако механизмы функционирования их пищеварительного тракта недостаточно изучены и в основном только для такого модельного объекта как *Danio rerio*. Целью данной работы было охарактеризовать участие различных подтипов М-холинорецепторов и фермента Rho-киназы в холинергическом сокращении гладкой мускулатуры кишечника беломорской трески *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae). Из проксимального отдела кишки вырезали продольную полоску и помещали ее в установку для регистрации сократительных ответов в изометрическом режиме. Сократительные реакции в ответ на ацетилхолин полностью блокировались атропином. Блокада М₃-холинорецепторов с помощью 4-DAMP приводила к ослаблению вызванного ацетилхолином сокращения по сравнению с ответом в контроле. При блокаде М₁-рецепторов с помощью пирензепина сократительные ответы также уменьшались, но менее выражено, чем при блокаде М₃-холинорецепторов. Блокада М₂-холинорецепторов с помощью метоктрамина не влияла на величину сократительного ответа. Инкубация препаратов с ингибитором Rho-киназы сопровождалась существенным уменьшением сократительных реакций по сравнению с контролем, а также более быстрым снижением силы сокращения после достижения «пика» реакции. Таким образом, ацетилхолин вызывает сокращение гладкой мускулатуры кишечника трески путем активации М₃ и М₁, но не М₂-холинорецепторов. Активность фермента Rho-киназы способствует развитию и поддержанию сокращения гладкой мускулатуры кишечника трески под действием ацетилхолина. Полученные результаты представляют интерес для сравнительной физиологии, они могут оказаться важными для понимания механизмов повреждающего влияния факторов окружающей среды на организм костистых рыб, а также при использовании рыб в доклинических исследованиях лекарственных препаратов.

Ключевые слова: *Gadus morhua marisalbi*, гладкая мышца, кишечник, ацетилхолин, мускариновые холинорецепторы, Rho-киназа

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-231-240

Одной из важнейших задач сравнительной и эволюционной физиологии является всестороннее изучение особенностей функционирования различных систем органов у разных позвоночных животных. Костистые рыбы арктических морей составляют большую долю морского биоразнообразия России. Тем не менее, многие аспекты физиологии рыб, которые населяют акваторию Арктики, в частности, атлантической трески (*Gadus morhua*), изучены мало. Изменяющиеся климатические условия и загрязнение окружающей среды могут отрицательно влиять на организм рыб, в том числе и на функционирование их желудочно-кишечного тракта [1, 2]. Эти обстоятельства, а также все большая популярность использования костистых рыб в качестве объектов доклинических ис-

следований лекарственных препаратов [3] определяют необходимость всестороннего изучения их физиологических особенностей.

Перемещение и расщепление компонентов пищи в кишечнике невозможно без координированных эпизодов сокращения и расслабления его гладкомышечной стенки. Как и у других позвоночных животных, гладкая мускулатура кишечника костистых рыб формирует два слоя — наружный продольный и внутренний кольцевой. Моторика кишечника позвоночных животных находится под контролем энтеральной нервной системы, которая представлена двумя нервными сплетениями — подслизистым (Мейсснеровым) и межмышечным (Ауэрбаховым) — и включает чувствительные, вставочные и моторные нейроны

множественной медиаторной специализации [4, 5]. Среди них весьма многочисленны моторные холинергические нейроны, которые образуют синапсы с различными типами клеток стенки кишечника, в том числе с гладкомышечными.

Известно, что ацетилхолин стимулирует моторику кишечника, в том числе у костистых рыб [4–6]. У млекопитающих ключевую роль в холинергическом сокращении гладкомышечных клеток кишечника играют мускариновые рецепторы второго и третьего подтипов [7–12]. В некоторых исследованиях также продемонстрирован функциональный вклад M_1 -холинорецепторов в регуляцию сократительной активности гладкой мышцы кишечника [13–15]. Какие подтипы M -холинорецепторов опосредуют вызванное ацетилхолином сокращение гладкой мускулатуры кишечника рыб, до сих пор остается неизвестным.

Сокращение гладкомышечных клеток запускается повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} [16]. Вместе с тем гладкая мышца способна поддерживать тоническое сокращение даже после того, как уровень Ca^{2+} в клетке значительно снизился, этот феномен получил название «повышение чувствительности сократительного аппарата к кальцию» [17]. Фермент Rho-киназа играет ключевую роль в осуществлении тонического сокращения гладкой мышцы: она фосфорилирует и ингибирует фосфатазу легких цепей миозина (ЛЦМ), что обеспечивает высокий уровень фосфорилирования ЛЦМ даже при низкой активности Ca^{2+} -зависимой киназы ЛЦМ [17]. Участие Rho-киназы в регуляции холинергического сокращения гладких мышц пищеварительного тракта показано для амфибий [18] и многих млекопитающих [19–23], однако ее роль в кишечнике рыб пока не изучена.

Таким образом, целью данной работы было охарактеризовать участие различных подтипов M -холинорецепторов и фермента Rho-киназы в холинергическом сокращении гладкой мускулатуры кишечника одного из подвидов атлантической трески – беломорской трески *G. morhua marisalbi*.

Материалы и методы

Объект исследования. Исследование проводили на Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (ББС МГУ). Объектом исследования служили особи беломорской трески *G. morhua marisalbi* (Gadidae) обоих полов с длиной тела не менее 20 и не более 30 см (приблизительный возраст – от 2 до 3 лет) [24]. Выловленных из моря рыб содержали в аквариумах с постоянно обновляющейся морской водой. Исследования проводили в соответствии с требованиями, сформулированными в Директиве Совета Европейского сообщества 2010/63/EU по охране животных, ис-

пользуемых в научных целях. Всего в работе было использовано 37 животных.

Приготовление препарата. Из тела рыбы выделяли проксимальные петли кишечника, осторожно удаляя брыжейку с расположенными в ней кровеносными сосудами. Полученный сегмент кишки разрезали вдоль, фиксировали булавками ко дну препаровальной ванночки внутренней стороной вверх и заливали рабочим раствором следующего состава: $NaCl$ – 150,1 мМ, KCl – 5,2 мМ, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,8 мМ, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ – 1,9 мМ, $NaHCO_3$ – 7 мМ, $CaCl_2$ – 1,9 мМ, D-глюкоза – 5,6 мМ (pH от 7,8 до 7,9); этот же раствор использовали в течение последующего эксперимента. Из стенки кишечника вырезали отчетливо видимую продольную полоску (складку) шириной 1–1,5 мм и длиной 10–12 мм. К обоим концам полоски привязывали лигатуры и переносили препарат в экспериментальную установку.

Регистрация сократительных реакций продольной полоски кишечника в изометрическом режиме. Препарат располагали вертикально в камере объемом 10 мл, дистальную лигатуру крепили ко дну экспериментальной камеры, а проксимальную – к рычажку тензометрического датчика. Перед началом работы экспериментальную камеру и подводящие к ней раствор трубки заполняли рабочим раствором (состав см. выше). Во время эксперимента с помощью перистальтического насоса через камеру с препаратом непрерывно создавали проток раствора со скоростью 7 мл/мин. Температуру раствора в камере поддерживали на уровне 10°C. Для оксигенации раствор предварительно аэрировали карбогеном (5% CO_2 + 95% O_2), затем измеряли и при необходимости корректировали pH с использованием $NaOH$. Показания тензометрического датчика оцифровывали с частотой 10 Гц с помощью аналого-цифрового преобразователя E14-140M (L-CARD, Россия) и записывали на жесткий диск персонального компьютера с использованием программы PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия).

Препарат осторожно растягивали до значения силы 5 мН и оставляли на 20–30 мин для расслабления гладкой мышцы, в течение этого времени периодически увеличивали растяжение препарата, возвращая уровень преднагрузки к 5 мН. Затем проводили однократную активацию препарата ацетилхолином (10 мкМ, 5 мин), отмывали раствором без ацетилхолина (10 мин) и еще раз корректировали значение силы к 5 мН. Спустя 5 мин приступали к проведению эксперимента по одному из описанных ниже протоколов.

Первый протокол использовали с целью оценить диапазон эффективных концентраций ацетилхолина и выбрать концентрацию агониста для дальнейшего фармакологического анализа. Для этого регистрировали сократительные ответы препарата на ацетилхолин в концентрациях 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ. Камеру с препаратом

в течение 5 мин перфузировали рабочим раствором, содержащим ацетилхолин в одной из исследуемых концентраций, периоды отмытки между воздействиями длились 10 мин.

Второй протокол использовали с целью оценки вклада разных подтипов М-холинорецепторов и Rho-киназы в холинергическое сокращение гладкой мышцы кишечника трески. Для этого регистрировали две реакции на ацетилхолин: в отсутствие и в присутствии блокаторов/ингибиторов. Камеру с препаратом последовательно перфузировали: (1) раствором ацетилхолина (10 мкМ, 5 мин); (2) раствором без фармакологических веществ (отмытка, 5 мин); (3) раствором с добавлением исследуемого блокатора/ингибитора (5 мин); (4) раствором блокатора/ингибитора с добавлением ацетилхолина (10 мкМ, 5 мин); (5) раствором блокатора/ингибитора без ацетилхолина (5 мин); (6) раствором без фармакологических веществ (5 мин). Все растворы готовили на основе рабочего раствора. Параллельно проводили контрольные эксперименты, в которых регистрировали две реакции на ацетилхолин (10 мкМ, интервал 15 мин) в отсутствие блокаторов/ингибиторов, что позволило оценить воспроизводимость реакции на ацетилхолин при повторном тестировании.

В экспериментах использовали следующие фармакологические препараты: хлорид ацетилхолина (Sigma, США), сульфат атропина (Sigma, США), йодид 4-DAMP (1,1-диметил-4-дифенилацетокси-пиперидиний; Tocris, США), дигидрохлорид пирензепина (Sigma, США), гидрат метоктрамина (Sigma, США), гидрохлорид фасудила (Tocris, США).

Обработка и статистический анализ результатов. Обработку полученных данных проводили с использованием программы PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия). Для вычисления величины реакции из значений силы при действии ацетилхолина (усреднение значений силы за 5 мин, начиная от момента ее быстрого роста) вычитали предшествующее воздействию фоновое значение силы (также усредненное за 5 мин). В первом протоколе величину сократительного ответа при действии ацетилхолина в каждой из концентраций нормировали на максимальное значение (при действии ацетилхолина в концентрации 100 мкМ). В протоколе с использованием блокаторов/ингибиторов величину второй реакции на ацетилхолин выражали в процентах от величины первой реакции, аналогичные вычисления проводили для контрольных экспериментов.

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 7.0 (La Jolla, США). Нормальность распределения значений в выборках была подтверждена с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Различия между группами оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента и считали их статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе работы исследовали сократительные ответы препаратов кишечника трески на ацетилхолин в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мкМ. Как видно на рис. 1А, с повышением концентрации агониста сократительные ответы препаратов кишечника трески становились более

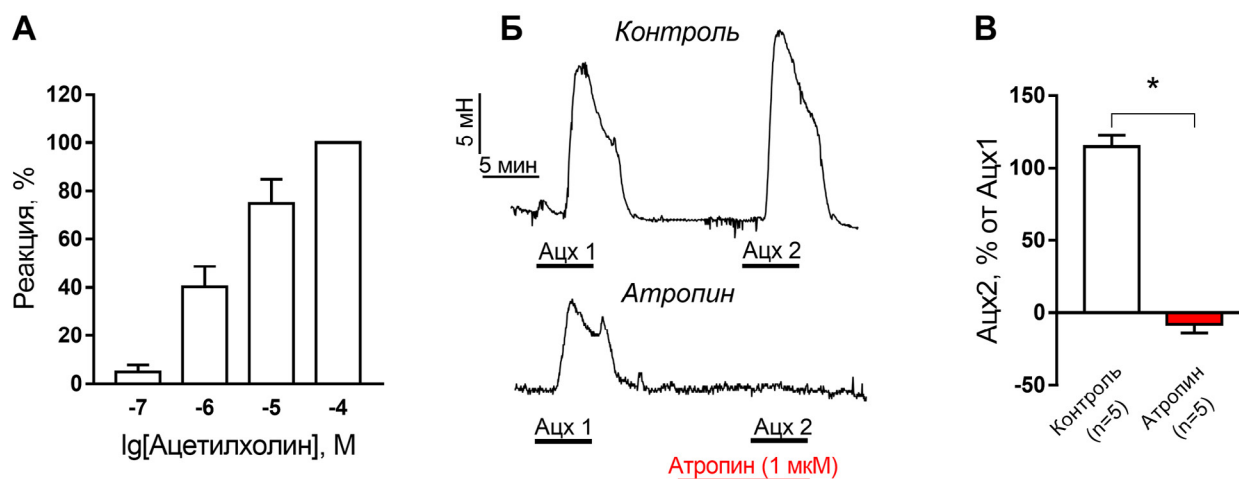


Рис. 1. Блокатор М-холинорецепторов атропин (1 мкМ) подавляет сокращение продольной полоски кишечника трески, вызванное ацетилхолином (10 мкМ). **А.** Зависимость «концентрация-эффект» (ацетилхолин) для продольной полоски кишечника трески ($n = 6$). За 100% принята величина сократительного ответа на ацетилхолин в концентрации 100 мкМ. **Б.** Фрагмент оригинальной записи эксперимента. **Ацх1:** исходно ацетилхолин вызывает сокращение обоих препаратов гладкой мускулатуры кишечника трески («Контроль» и «Атропин»); задержка реакции соответствует времени прохождения раствора ацетилхолина по трубкам перфузионной системы (1–2 мин). **Ацх2:** повторное добавление ацетилхолина вызывает сокращение контрольного препарата («Контроль»), но не препарата, предварительно инкубированного с блокатором М-холинорецепторов атропином («Атропин»). **В.** Относительное изменение сократительных ответов продольной полоски кишечника трески на ацетилхолин при блокаде М-холинорецепторов атропином. Данные представлены в виде среднего $\pm$ ошибка среднего; n – количество животных в группе; * – $p < 0,05$ (непарный критерий Стьюдента).

выраженными. В дальнейшем при изучении механизмов холинергического сокращения препаратов кишечника трески использовали ацетилхолин в концентрации 10 мкМ. В этом случае величина сократительного ответа составляла $75 \pm 11\%$ ($n = 6$) от максимального уровня, что позволяет выявить как ослабление, так и усиление холинергических реакций под действием различных блокаторов или ингибиторов. Контрольные эксперименты показали, что реакции препаратов на ацетилхолин в концентрации 10 мкМ хорошо воспроизводятся в течение эксперимента (рис. 1Б).

Следующей задачей работы было определить тип рецепторов, опосредующих сократительное

влияние ацетилхолина на гладкую мускулатуру кишечника трески. Для этого была проведена серия экспериментов с блокатором М-холинорецепторов атропином (1 мкМ). Как видно на рис. 1 (Б и В), инкубация с атропином предотвращала сокращение препаратов в ответ на ацетилхолин. Таким образом, сокращение гладкой мускулатуры кишечника трески обусловлено действием ацетилхолина преимущественно на мускариновые рецепторы.

Далее проводили эксперименты по определению подтипов М-холинорецепторов, опосредующих вызванное ацетилхолином сокращение гладкой мускулатуры кишечника трески. Блокада

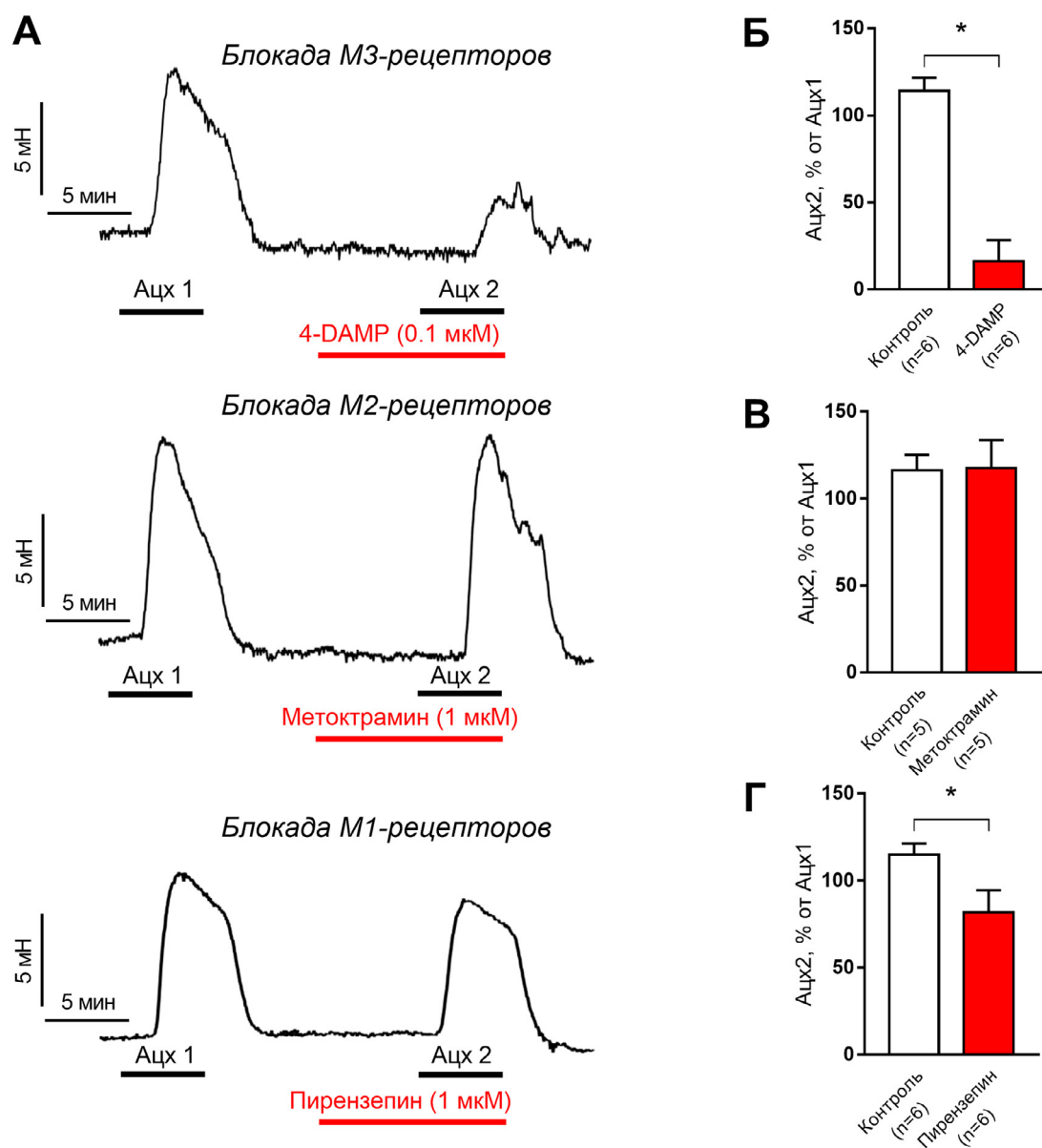


Рис. 2. Влияние блокады различных подтипов М-холинорецепторов на сокращение продольной полоски кишечника трески, вызванное ацетилхолином (10 мкМ). А. Фрагменты оригинальных записей экспериментов. Инкубация препарата кишечника трески с блокатором М₃-холинорецепторов 4-DAMP (0,1 мкМ) и блокатором М₁-холинорецепторов пирензепином (1 мкМ) сопровождается снижением амплитуды холинергического сокращения, тогда как блокада М₂-холинорецепторов с помощью метоктрамина (1 мкМ) не оказывает такого влияния. Б–Г. Относительное изменение сократительных ответов продольной полоски кишечника трески при блокаде М₃-, М₂- и М₁-холинорецепторов соответственно. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего; n – количество животных в группе; * – $p < 0,05$ (непарный критерий Стьюдента).

M_3 -холинорецепторов с помощью 4-DAMP (0,1 мкМ) привела к выраженному ослаблению вызванного ацетилхолином сокращения препаратов кишечника трески: величина сократительного ответа в присутствии 4-DAMP составила всего $16 \pm 12\%$ относительно первой реакции на ацетилхолин (в отсутствие блокатора, рис. 2, А и Б). Блокада M_2 -холинорецепторов с помощью метоктрамина (1 мкМ) не оказала такого влияния (рис. 2, А и В). Мы также показали, что блокада M_1 -рецепторов с помощью пирензепина (1 мкМ) приводит к ослаблению сокращения препаратов полоски кишечника, хоть и менее выраженному, чем при блокаде M_3 -холинорецепторов (рис. 2, А и Г). Таким образом, ацетилхолин вызывает сокращение гладкой мускулатуры кишечника трески путем активации M_3 - и M_1 -холинорецепторов, при этом вклад M_3 -рецепторов более выражен. M_2 -холинорецепторы, судя по всему, не являются посредниками влияния ацетилхолина на гладкую мускулатуру кишечника трески.

В последней серии экспериментов мы оценивали роль фермента Rho-киназы в регуляции холинергического сокращения продольной мускулатуры кишечника трески. Как видно из рис. 3, инкубация препаратов с ингибитором Rho-киназы фасудилом (10 мкМ) сопровождалась уменьшением сократительных реакций примерно вдвое по сравнению с реакциями препаратов в контрольных экспериментах. Помимо этого, можно наблюдать изменение формы ответа: после

достижения «пика» сокращения в присутствии фасудила происходит более резкое снижение силы, чем в контроле (рис. 3А). Полученные данные позволяют заключить, что активность фермента Rho-киназы способствует развитию и поддержанию сокращения гладкой мускулатуры кишечника трески под действием ацетилхолина.

Обсуждение результатов

Ацетилхолин вызывает сокращение гладкой мускулатуры кишечника беломорской трески путем активации M -холинорецепторов. Холинергические парасимпатические нейроны энтеральной нервной системы, выявляемые по специфическим маркерам — холинацетилтрансферазе и везикулярному транспортеру ацетилхолина — обильно представлены в энтеральной нервной системе рыб [4, 5]. У костистых рыб подслизистое нервное сплетение развито слабо либо же вовсе отсутствует, а большая часть ацетилхолинергических нейронов сосредоточена в межмышечном нервном сплетении [5], что указывает на их роль в регуляции моторики желудочно-кишечного тракта рыб. Сократительное влияние ацетилхолина на кишечник атлантической трески было продемонстрировано еще в конце предыдущего века: в этих работах ацетилхолин вызывал увеличение перфузионного давления в кишечной трубке [6] и силы сокращения кольцевых препаратов [4]. По данным настоящего исследования, действие ацетилхолина приводит к сокращению продольного слоя гладкой мускулатуры кишечника.

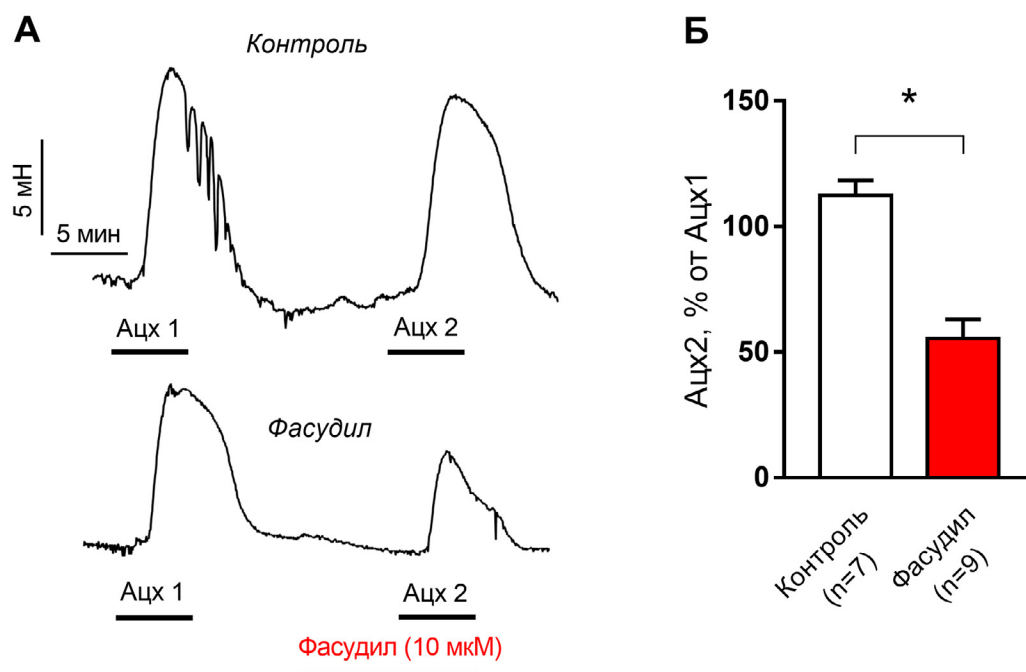


Рис. 3. Влияние ингибитора Rho-киназы фасудила (10 мкМ) на вызванное ацетилхолином сокращение продольной полоски кишечника трески. **А.** Фрагмент оригинальной записи эксперимента: фасудил вызывает снижение амплитуды и длительности реакции препарата кишечника трески на ацетилхолин (Ацх2, «Фасудил») относительно контрольного препарата (Ацх1, «Контроль»). **Б.** Относительное изменение сократительных ответов полоски кишечника трески в присутствии ингибитора Rho-киназы фасудила (10 мкМ). Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего; n — количество животных в группе; * — $p < 0,05$ (непарный критерий Стьюдента).

Участие рецепторов мускаринового типа в холинергическом сокращении гладкой мускулатуры кишечника костистых рыб не вызывает сомнений. По данным литературы, блокада М-холинорецепторов с помощью атропина значительно уменьшала сократительные реакции гладкой мышцы кишечника радужной форели и золотой рыбки в ответ на активацию энтеральных нейронов электрическим полем [25], а также реакции гладкой мышцы кишечника сазана на экзогенный ацетилхолин [26]. Что касается атлантической трески, то Карила с коллегами продемонстрировали сравнительно небольшое снижение силы сокращения препаратов кишечника в ответ на стимуляцию электрическим полем на фоне атропина [27], тогда как по нашим же данным блокада М-холинорецепторов атропином полностью устраняет сократительную реакцию кишки на ацетилхолин. Различие результатов нашей работы и работы Карила с коллегами может быть обусловлено разными способами воздействия на клетки кишечника. Очевидно, что при электрической стимуляции возбуждаются не только холинергические нейроны, но и нейроны другой медиаторной специализации, например, секретирующие серотонин, который также вызывает сокращение гладкой мышцы кишечника трески [27]. В настоящей же работе сокращение кишечника трески было связано только с влиянием ацетилхолина. Таким образом, холинергическое сокращение гладкой мускулатуры кишечника атлантической трески опосредуют преимущественно мускариновые рецепторы.

М₃- и, возможно, М₁-холинорецепторы опосредуют сокращение гладкой мышцы кишечника беломорской трески в ответ на ацетилхолин. Среди всех подтипов М-холинорецепторов роль первых трех (М₁, М₂ и М₃) в регуляции сократительной активности кишечника изучена наиболее подробно. В ряде исследований показаны как функциональный вклад, так и экспрессия этих подтипов мускариновых рецепторов в кишечнике [8, 9, 14, 28, 29]. Стоит отметить, что М₂- и М₃-рецепторы локализируются преимущественно в мембране гладкомышечных клеток [28, 30]. М₁- и М₃-рецепторы сопряжены с G_q-белком, активация которого ведет к запуску фосфоинозитидного сигнального каскада и к увеличению внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺. М₂-рецепторы сопряжены с белком G_{i/o}, α-субъединица которого ингибирует аденилатциклазу. Важно отметить, что участие этих подтипов М-холинорецепторов в регуляции сократительной активности кишечника рыб ранее не исследовалось, большинство данных по этой проблематике было получено на млекопитающих.

В наших экспериментах блокада М₃-рецепторов сопровождалась выраженным ослаблением вызванного ацетилхолином сокращения гладкой

мускулатуры кишечника беломорской трески. Схожим образом, блокаторы М₃-рецепторов (4-DAMP или p-FHNSiD) вызвали значительное ослабление сократительных реакций гладкой мускулатуры кишечника морской свинки [29] и человека [9] на карбахол (аналог ацетилхолина, не гидролизующийся холинэстеразами), а также угнетали вызванное ацетилхолином сокращение кишечника кролика [31] и лошади [15]. Более того, у мышей, нокаутных по гену, кодирующему М₃-рецепторы, максимальная сила сокращения продольных полосок кишечника на карбахол была существенно ниже, чем у мышей дикого типа [8]. Таким образом, М₃-рецепторы играют ключевую роль в реализации холинергического сокращения кишечника у атлантической трески, как и у млекопитающих.

М₂-рецепторы, по нашим данным, не участвуют в вызванном ацетилхолином сокращении кишечника трески. Следует отметить, что в кишечнике млекопитающих функциональная роль М₂-рецепторов является предметом дискуссий и, вероятно, определяется видом животного [12, 32, 33]. С одной стороны, чувствительность к карбахолу, а также сократительные реакции препаратов кишечника на стимуляцию электрическим полем были существенно снижены у мышей, нокаутных по гену М₂-рецептора, по сравнению с этими показателями у животных дикого типа [8, 34]. Вместе с тем, не было выявлено прямого влияния М₂-рецепторов в опосредование реакций сокращения кишечника морской свинки [29, 35] и лошади [15], что согласуется с результатами нашего исследования. Показано, что влияние ацетилхолина на М₂-рецепторы может усиливать его эффекты через М₃-рецепторы. Последнее связано с активацией неселективных катионных каналов семейства TRPC (Transient Receptor Potential (C – canonical), семейство каналов транзитного рецепторного потенциала) и деполяризацией гладкомышечных клеток [8, 12]. Кроме того, есть мнение, что функциональная роль М₂-рецепторов в гладкой мышце кишечника заключается в ограничении реакций расслабления, например, при стимуляции аденилатциклазы (АЦ) агонистами β-адренорецепторов [36, 37], то есть вклад М₂-рецепторов в холинергическое сокращение зависит от активности АЦ в гладкомышечных клетках. Возможно, базальная активность АЦ в гладкой мышце кишечника трески невелика, по крайней мере, в условиях наших экспериментов. Таким образом, в кишечнике беломорской трески активация М₂-рецепторов не оказывает прямого сократительного влияния, однако нельзя исключать модуляторной роли этих рецепторов, что является предметом будущих исследований.

Блокада М₁-рецепторов с помощью пирензепина приводила к уменьшению вызванных ацетилхолином сократительных реакций препаратов

кишечника трески, хотя влияние пирензепина было менее выраженным, чем блокатора M_3 -рецепторов 4-DAMP. В ряде исследований экспрессия M_1 -рецепторов была продемонстрирована в энтеральных холинергических нейронах, а не в гладкомышечных клетках [28, 38, 39]. В соответствии с этим, не было обнаружено функционального вклада M_1 -рецепторов на уровне гладкой мышцы в кишечнике мыши: карбахол не вызывал сокращения кишечника мышей, нокаутных сразу по двум подтипам мускариновых рецепторов – M_2 и M_3 [8]. В то же время, в работах других авторов сократительные ответы препаратов гладкой мускулатуры кишечника лошади и крысы на ацетилхолин были снижены на фоне пирензепина [14, 15], что соотносится с результатами нашего исследования и предполагает наличие вклада M_1 -рецепторов в регуляцию холинергического сокращения кишечника беломорской трески. Возможно, вклад M_1 -рецепторов в регуляцию холинергического сокращения кишечника зависит от вида животного.

В данной работе мы не исследовали эффекты блокады двух остальных подтипов М-холинорецепторов (M_4 и M_5), которые также могут экспрессироваться в кишечнике млекопитающих, хотя и в небольшом количестве [40, 41]. Однако значительный вклад этих подтипов в вызванное ацетилхолином сокращение препаратов кишечника трески маловероятен, судя по ярко выраженному эффекту блокады M_3 -холинорецепторов.

Сократительное влияние ацетилхолина в кишечнике беломорской трески реализуется с участием фермента Rho-киназы. Rho-киназа – фермент, активность которого играет ключевую роль в регуляции тонического сокращения гладких мышц: активность Rho-киназы способствует поддержанию сокращения даже в условиях низкой концентрации Ca^{2+} в цитоплазме [17]. Неудивительно, что содержание, активность и функциональный вклад Rho-киназы высоки в гладких мышцах, относящихся к тоническому типу, т.е. способных поддерживать длительное сокращение [42]. Тем не менее, в ряде исследований на млекопитающих показан функциональный вклад Rho-киназы в регуляцию холинергического сокращения гладких мышц фазического типа [21, 22], к которому относится гладкая мускулатура кишечника (за исключением сфинктеров).

Мы впервые исследовали функциональный вклад Rho-киназы в гладкой мускулатуре кишечника рыб. Действие ингибитора Rho-киназы фасудила приводило к уменьшению амплитуды и длительности сократительных ответов кишечника трески на ацетилхолин. Влияние фасудила на длительность реакции согласуется с ключевой ролью Rho-киназы в поддержании тонического сокращения гладких мышц по механизму каль-

циевой сенситизации и, по всей видимости, связано со снижением активности фосфатазы легких цепей миозина [17, 42]. Сходным образом, ингибиторы Rho-киназы подавляли тоническую фазу сократительных реакций гладких мышц пищевода кошки [22], желудка лягушки [18], кишечника морской свинки [20], крысы [19] и мыши [21] на агонисты М-холинорецепторов или стимуляцию электрическим полем. Снижение амплитуды быстрой фазы сокращения под действием ингибиторов Rho-киназы также было продемонстрировано в ряде работ на гладкомышечных препаратах желудочно-кишечного тракта млекопитающих [19, 21, 22], что согласуется с нашими данными для кишечника трески. Такое быстрое действие фасудила (падение амплитуды реакции) может быть связано с тем, что исходно активная или активирующаяся под действием ацетилхолина Rho-киназа способствует открытию потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа [43] или неселективных катионных каналов [21, 44], что в итоге приводит к дополнительному входу ионов кальция в клетку. Быстрое влияние Rho-киназы на концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме может быть важным механизмом регуляции сокращения гладкой мускулатуры фазического типа.

Таким образом, мы охарактеризовали механизмы регуляции сократительной активности кишечника под действием ацетилхолина, которые ранее были известны для млекопитающих, но не описаны для костистых рыб. Мы показали, что M_1 - и, особенно, M_3 -, но не M_2 -рецепторы, являются посредниками сократительного влияния ацетилхолина на гладкую мускулатуру кишечника беломорской трески. Кроме того, мы впервые продемонстрировали роль Rho-киназы в регуляции холинергического сокращения гладкой мускулатуры кишечника трески. Полученные данные дополняют и развивают современные представления о сравнительной физиологии пищеварения, необходимы для понимания механизмов влияния повреждающих факторов на организм костистых рыб в условиях ухудшающейся экологии и глобального потепления, а также могут быть использованы при исследовании механизмов влияния лекарственных препаратов в рамках доклинических исследований.

Исследование выполнено в рамках научного проекта Государственного задания Правительства Российской Федерации Московскому государственному университету имени М.В. Ломоносова № 121032300071-8. Проведение экспериментов осуществлялось с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shahjahan M., Taslima K., Rahman M.S., Al-Emran M., Alam S.I., Faggio C.* Effects of heavy metals on fish physiology – A review // *Chemosphere*. 2022. Vol. 300: 134519.
2. *Pasparakis C., Esbaugh A.J., Burggren W., Grosella M.* Impacts of deepwater horizon oil on fish // *Comp. Biochem. Physiol. Part – C: Toxicol. Pharmacol.* 2019. Vol. 224: 108558.
3. *Cueto-Escobedo J., German-Ponciano L.J., Guillén-Ruiz G., Soria-Fregozo C., Herrera-Huerta E.V.* Zebrafish as a useful tool in the research of natural products with potential anxiolytic effects // *Front. Behav. Neurosci.* 2022. Vol. 15: 795285.
4. *Karila P., Shahbazi F., Jensen J., Holmgren S.* Projections and actions of tachykinergic, cholinergic, and serotonergic neurones in the intestine of the Atlantic cod // *Cell Tissue Res.* 1998. Vol. 291. N 3. P. 403–413.
5. *Olsson C., Holmgren S.* Autonomic control of gut motility: A comparative view // *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 2011. Vol. 165. N 1. P. 80–101.
6. *Jensen J., Holmgren S.* Neurotransmitters in the intestine of the atlantic cod, *Gadus morhua* // *Comp. Biochem. Physiol. Part – C: Toxicol. Pharmacol.* 1985. Vol. 82. N 1. P. 81–89.
7. *Gómez A., Martos F., Bellido I., Marquez E., García A. J., Pavia J., de la Cuesta F.S.* Muscarinic receptor subtypes in human and rat colon smooth muscle // *Biochem. Pharmacol.* 1992. Vol. 43. N 11. P. 2413–2419.
8. *Unno T., Matsuyama H., Sakamoto T., Uchiyama M., Izumi Y., Okamoto H., Yamada M., Wess J., Komori S.* M₂ and M₃ muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice // *Br. J. Pharmacol.* 2005. Vol. 146. N 1. P. 98–108.
9. *Kerr P.M., Hillier K., Wallis R.M., Garland C.J.* Characterization of muscarinic receptors mediating contractions of circular and longitudinal muscle of human isolated colon // *Br. J. Pharmacol.* 1995. Vol. 115. N 8. P. 1518–1524.
10. *Ehlert F.J.* Contractile role of M₂ and M₃ muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle // *Life Sci.* 2003. Vol. 74. N 2–3. P. 355–366.
11. *Hu X.Q., Zhang L.* Function and regulation of large conductance Ca²⁺ activated K⁺ channel in vascular smooth muscle cells // *Drug Discov. Today*. 2012. Vol. 17. N 17–18. P. 974–987.
12. *Tanahashi Y., Komori S., Matsuyama H., Kitazawa T., Unno T.* Functions of muscarinic receptor subtypes in gastrointestinal smooth muscle: A review of studies with receptor-knockout mice // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. N 2. P. 1–24.
13. *Tran J.A., Matsui M., Ehlert F.J.* Differential coupling of muscarinic M₁, M₂, and M₃ receptors to phosphoinositide hydrolysis in urinary bladder and longitudinal muscle of the ileum of the mouse // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006. Vol. 318. N 2. P. 649–656.
14. *Glaza I., Szadujkis-Szadurski L., Szadujkis-Szadurski R., Gajdus M., Olkowska J.* Modulating activity of M₁ receptor to the reaction of ileal smooth muscle // *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2011. Vol. 65. P. 478–481.
15. *Menzies A., Pozzoli C., Poli E., Bontempi G., Serventi P., Meucci V., Intorre L., Bertini S.* Role of muscarinic receptors in the contraction of jejunal smooth muscle in the horse: An *in vitro* study // *Res. Vet. Sci.* 2017. Vol. 115. P. 387–392.
16. *Karaki H., Weiss G.B.* Calcium release in smooth muscle // *Life Sci.* 1988. Vol. 42. N 2. P. 111–122.
17. *Somlyo A.P., Somlyo A.V.* Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83. N 4. P. 1325–1358.
18. *Sahin L., Cevik O.S., Koyuncu D.D., Buyukafsar K.* Role of rho-kinase (ROCK) in tonic but not phasic contraction in the frog stomach smooth muscle // *Life Sci.* 2018. Vol. 198. P. 46–55.
19. *Loirand G., Cario-Toumaniantz C., Chardin P., Pacaud P.* The Rho-related protein Rnd1 inhibits Ca²⁺ sensitization of rat smooth muscle // *J. Physiol.* 1999. Vol. 516. N 3. P. 825–834.
20. *Swärd K., Dreja K., Susnjär M., Hellstrand P., Hartshorne D.J., Walsh M.P.* Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca²⁺ sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum // *J. Physiol.* 2000. Vol. 522. N 1. P. 33–49.
21. *Bayguinov O., Dwyer L., Kim H., Marklew A., Sanders K. M., Koh S.D.* Contribution of Rho-kinase to membrane excitability of murine colonic smooth muscle // *Br. J. Pharmacol.* 2011. Vol. 163. N 3. P. 638–648.
22. *Park S.Y., Song H.J., Sohn U.D.* Participation of Rho-associated kinase in electrical stimulated and acetylcholine-induced contraction of feline esophageal smooth muscle // *Eur. J. Pharmacol.* 2009. Vol. 607. N 1–3. P. 220–225.
23. *Rattan S., Phillips B.R., Maxwell P.J.* RhoA/Rho-Kinase: pathophysiologic and therapeutic implications in gastrointestinal smooth muscle tone and relaxation // *Gastroenterology*. 2010. Vol. 138. N 1. P. 13–18.
24. *Андрюшин А.П.* Рыбы северных морей СССР. М.: Л.: Изд-во Акад. наук СССР, 1954. 567 с.
25. *Kitazawa T., Itoh K., Yaosaka N., Maruyama K., Matsuda K., Teraoka H., Kaiya H.* Ghrelin does not affect gastrointestinal contractility in rainbow trout and goldfish *in vitro* // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012. Vol. 178. N 3. P. 539–545.
26. *Kitazawa T., Hoshi T., Chugun A.* Effects of some autonomic drugs and neuropeptides on the mechanical activity of longitudinal and circular muscle strips isolated from the carp intestinal bulb (*Cyprinus carpio*) // *Comp. Biochem. Physiol. Part – C: Toxicol. Pharmacol.* 1990. Vol. 97. N 1. P. 13–24.
27. *Karila P., Holmgren S.* Enteric reflexes and nitric oxide in the fish intestine // *J. Exp. Biol.* 1995. Vol. 198. N 11. P. 2405–2411.
28. *Harrington A.M., Peck C.J., Liu L., Burcher E., Hutson J. M., Southwell B.R.* Localization of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R in the human colon // *Neurogastroenterol. Motil.* 2010. Vol. 22. N 9: 999–e263.
29. *Honda K., Takano Y., Kamiya H.* Pharmacological profiles of muscarinic receptors in the longitudinal smooth muscle of guinea pig ileum // *Jpn. J. Pharmacol.* 1993. Vol. 62. N 1. P. 43–47.
30. *Tobin G., Giglio D., Lundgren O.* Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract // *J. Physiol. Pharmacol.* 2009. Vol. 60. N 1. P. 3–21.

31. Hu J., Gao W.Y., Ma L., Man S.L., Huang L.Q., Liu C.X. Activation of M₃ muscarinic receptor and Ca²⁺ influx by crude fraction from *Crotonis Fructus* in isolated rabbit jejunum // J. Ethnopharmacol. 2012. Vol. 139. N 1. P. 136–141.
32. Harrington A.M., Hutson J.M., Southwell B.R. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system // Prog. Histochem. Cytochem. 2010. Vol. 44. N 4. P. 173–202.
33. Uchiyama T., Chess-Williams R. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract // J. Smooth Muscle Res. 2004. Vol. 40. N 6. P. 237–247.
34. Unno T., Matsuyama H., Izumi Y., Yamada M., Wess J., Komori S. Roles of M₂ and M₃ muscarinic receptors in cholinergic nerve-induced contractions in mouse ileum studied with receptor knockout mice // Br. J. Pharmacol. 2006. Vol. 149. N 8. P. 1022–1030.
35. Griffin M.T., Matsui M., Ostrom R.S., Ehlert F.J. The guinea pig ileum lacks the direct, high-potency, M₂-muscarinic, contractile mechanism characteristic of the mouse ileum // Naunyn. Schmiedeberg. Arch. Pharmacol. 2009. Vol. 380. N 4. P. 327–335.
36. Griffin M.T., Ehlert F.J. Specific inhibition of isoproterenol-stimulated cyclic AMP accumulation by M₂ muscarinic receptors in rat intestinal smooth muscle // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1992. Vol. 263. N 1. P. 221–225.
37. Reddy H., Watson N., Ford A.P.D.W., Eglan R.M. Characterization of the interaction between muscarinic M₂ receptors and β -adrenoceptor subtypes in guinea-pig isolated ileum // Br. J. Pharmacol. 1995. Vol. 114. N 1. P. 49–56.
38. North R.A., Slack B.E., Surprenant A. Muscarinic M₁ and M₂ receptors mediate depolarization and presynaptic inhibition in guinea-pig enteric nervous system // J. Physiol. 1985. Vol. 368. N 1. P. 435–452.
39. Harrington A.M., Hutson J.M., Southwell B.R. Immunohistochemical localisation of cholinergic muscarinic receptor subtype 1 (M1r) in the guinea pig and human enteric nervous system // J. Chem. Neuroanat. 2007. Vol. 33. N 4. P. 193–201.
40. Delvalle N.M., Fried D.E., Rivera-Lopez G., Gaudette L., Gulbransen B.D. Cholinergic activation of enteric glia is a physiological mechanism that contributes to the regulation of gastrointestinal motility // Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol. 2018. Vol. 315. N 4. P. G473–G483.
41. Takeuchi T., Fujinami K., Goto H., Fujita A., Taketo M.M., Manabe T., Matsui M., Hataet F. Roles of M₂ and M₄ muscarinic receptors in regulating acetylcholine release from myenteric neurons of mouse ileum // J. Neurophysiol. 2005. Vol. 93. N 5. P. 2841–2848.
42. Patel C.A., Rattan S. Spontaneously tonic smooth muscle has characteristically higher levels of RhoA/ROK compared with the phasic smooth muscle // Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol. 2006. Vol. 291. N 5. P. 830–837.
43. Shabir S., Borisova L., Wray S., Burdyga T. Rho-kinase inhibition and electromechanical coupling in rat and guinea-pig ureter smooth muscle: Ca²⁺-dependent and -independent mechanisms // J. Physiol. 2004. Vol. 560. N 3. P. 839–855.
44. Kim B.J., Jeon J.H., Kim S.J., So I. Role of calmodulin and myosin light chain kinase in the activation of carbachol-activated cationic current in murine ileal myocytes // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2007. Vol. 85. N 12. P. 1254–1262.

Поступила в редакцию 02.08.2022

После доработки 11.10.2022

Принята в печать 24.10.2022

RESEARCH ARTICLE

Mechanisms of the White Sea cod *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae) intestinal smooth muscle cholinergic contraction: the contribution of various subtypes of M-cholinergic receptors and Rho-kinase

A.A. Shvetsova^{1,*} , G.V. Morgunova² , E.A. Novoderezhkina¹ , V.M. Potekhina¹ ,
A.A. Kamensky¹ , O.S. Tarasova¹ 

¹Department of Human and Animal Physiology and ²Evolutionary Cytogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com

The study of the functioning of various body systems in different vertebrates is one of the key tasks of comparative physiology. Teleost fish are a large group of vertebrates, however, the mechanisms of functioning of their digestive tract have been studied little and mainly only for such a model object as *Danio rerio*. The aim of this work was to characterize the participation of various subtypes of M-cholinergic receptors and the enzyme Rho-kinase in the cholinergic contraction of the intestinal smooth muscles of the White Sea cod *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae). A longitudinal strip was excised from the proximal cod intestine and placed in an apparatus for recording contractile responses in the isometric mode. Contractile responses to acetylcholine were completely blocked by atropine. Blockade of M₃ cholinergic receptors with 4-DAMP resulted in a decrease in acetylcholine-induced contraction compared with the control

response. Blockade of M_1 receptors with pirenzepine led to a weakening of contraction, less pronounced than with blockade of M_3 cholinergic receptors. Blockade of M_2 -cholinergic receptors with methoctramine did not affect the magnitude of the contractile response. Incubation of preparations with the Rho-kinase inhibitor fasudil was accompanied by a significant decrease in contractile responses compared with the control, as well as a faster decrease in the contraction force after reaching the “peak” of the reaction. Thus, acetylcholine causes contraction of cod intestinal smooth muscle by activating M_3 - and M_1 - but not M_2 -cholinergic receptors. The activity of the Rho-kinase enzyme contributes to the development and maintenance of cod intestinal smooth muscle contraction under the action of acetylcholine. The results obtained are of interest for comparative physiology, may be important for understanding the mechanisms of the damaging effect of environmental factors on the bony fish’ body, as well as for the use of fish as objects of preclinical studies of drugs.

Keywords: *Gadus morhua marisalbi*, smooth muscle, intestine, acetylcholine, muscarinic receptors, Rho-kinase

Funding: The research was carried out as part of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University, project number 121032300071-8.

Сведения об авторах

Швецова Анастасия Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8859-7689>

Моргунова Галина Васильевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5259-0861>

Новодережкина Евгения Алексеевна — соискатель, кафедра общей и клинической фармакологии Российского университета дружбы народов. Тел.: 8-499-936-87-87; e-mail: evgeniyanovoderezhkina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7657-5973>

Потехина Виктория Маратовна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: vm-potekhina@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2319-9396>

Каменский Андрей Александрович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: kamensky_msu@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6496-0527>

Тарасова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, доц., проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ost.msu@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4230-384>