



Исследование роли паннексина 1 в регуляции сократительной активности продольного гладкомышечного слоя портальной вены мышцы

М.Г. Печкова^{1,2}, О.О. Кирюхина^{1,*} , О.С. Тарасова^{2,3,4} 

¹Институт проблем передачи информации имени А.А. Харкевича, Российская академия наук, Россия, 127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д. 19, стр. 1;

²Институт медико-биологических проблем, Российская академия наук, Россия, 123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А;

³Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

⁴Кафедра физиологии и патологии, факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, г. Москва, Ломоносовский просп., д. 27, корп. 1

*e-mail: kcyu@yandex.ru

Паннексин 1 является белком, способным формировать каналы для выхода АТФ из клеток животных. В мелких артериях за счет функциональной связи с α_{1D} -адренорецепторами он регулирует сокращение гладкомышечных клеток. Вены отличаются от артерий по строению и механизмам регуляции сокращения, но функции паннексина в венозном русле изучены мало. Цель работы заключалась в исследовании роли паннексина 1 в регуляции ритмической сократительной активности продольного гладкомышечного слоя портальной вены мышцы. Сокращения изолированных продольных препаратов портальной вены, полученных от мышей с глобальным нокаутом гена *Panx1* и C57Bl/6J (дикий тип), регистрировали в изометрических условиях. Препараты мышей обеих групп демонстрировали спонтанную ритмическую активность, однако частота сокращений у нокаутной группы была выше, чем у дикого типа. Агонисты α_1 -адренорецепторов фенилэфрин и метоксамин стимулировали сокращения вены, при этом эффект фенилэфрина, который обладает более высоким сродством к α_{1D} -адренорецепторам, в нокаутной группе был ниже, тогда как эффект метоксамина не различался между группами. Экзогенный АТФ также вызывал увеличение частоты сокращений вены, причем у нокаутных по паннексину 1 мышей его эффект был менее выражен, чем у мышей дикого типа. Кроме того, у мышей дикого типа изменение частоты сокращений вены при действии фенилэфрина и АТФ (но не метоксамина) находилось в обратной зависимости от исходной частоты сокращений, у нокаутных мышей такой зависимости не наблюдалось. На фоне апираза, разрушающей внеклеточный АТФ, влияние фенилэфрина на частоту сокращений вены становилось менее выраженным у мышей дикого типа, но не изменялось у нокаутных мышей. Таким образом, в портальной вене мышцы паннексин 1 не принимает непосредственного участия в генерации миогенной ритмической активности, но может ее регулировать. Полученные результаты позволяют предположить, что в продольном гладкомышечном слое портальной вены мышцы каналы паннексина 1 служат основным путем секреции АТФ, причем они функционально связаны с α_{1D} -адренорецепторами.

Ключевые слова: портальная вена, паннексин 1, АТФ, апираза, адренорецепторы, вазомоции

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2-1

Введение

Паннексины – семейство белков, которые присутствуют практически во всех группах животного мира и формируют в мембране клетки каналы, по строению сходные с каналами коннексинов позвоночных и иннексинов беспозвоночных [1]. Три члена этого семейства отличаются по строению и неодинаково представлены в тканях организма: паннексин 2 обнаруживается в основном

в нервной ткани, паннексин 3 – в соединительной, а паннексин 1 встречается повсеместно [2]. Основной функцией паннексинов считается секреция АТФ из цитоплазмы в межклеточное пространство, в связи с чем они принимают участие в пуринергической регуляции клеточных функций [3]. На состояние каналов, формируемых паннексином 1, влияет ряд факторов, среди которых механические воздействия, содержание ионов снаружи

и внутри клетки, агонисты различных рецепторов, в том числе АТФ [4].

Большинство данных об участии паннексина 1 в функционировании гладкомышечных клеток сосудов получены для артерий [5, 6]. Так, в экспериментах на мелкой артерии, приносящей кровь к скелетной мышце мыши, было показано, что сократительные ответы на агонист α_1 -адренорецепторов фенилэфрин сильно уменьшаются после блокады паннексиновых каналов [5, 7]. Аналогичный эффект наблюдали при подавлении экспрессии паннексина 1 в гладкомышечных клетках, тогда как повышение его экспрессии, напротив, потенцировало сокращение. С помощью иммуногистохимического окрашивания было показано, что каналы паннексина 1 локализованы в гладкомышечных клетках с α_{1D} -адренорецепторами [7]. Для объяснения результатов этих исследований авторы предложили следующую схему: активация α_{1D} -адренорецепторов приводит к открытию каналов паннексина 1 и секреции АТФ, который взаимодействует с P2Y-рецепторами той же или соседних гладкомышечных клеток и способствует их сокращению. Несколько позже с использованием сайт-специфичного мутагенеза и пептидов-миметиков был определен участок внутриклеточной петли паннексина 1, ответственный за открытие паннексинового канала при активации α_{1D} -адренорецептора [5]. Участие паннексина 1 в регуляции адренергических сократительных ответов также было показано для мелких артерий брыжейки мыши, однако в этих артериях влияние АТФ, выделяющегося через паннексиновые каналы, может маскироваться за счет действия гладкомышечных эктонуклеотидаз [6].

В последние годы получены данные о том, что высокая активность паннексиновых каналов, локализованных в гладкомышечных клетках, может приводить к нарушениям в сосудистой системе. Например, повышение экспрессии паннексина 1 в гладкомышечных клетках сопровождается увеличением сократительных ответов артерий брыжейки на симпатические влияния и повышением системного артериального давления [8]. В гладкомышечных клетках легочных артерий паннексин 1 через модуляцию концентрации Ca^{2+} также может способствовать их сокращению при гипоксии, хотя в развитии хронической легочной гипертензии его роль не столь очевидна [9]. Также показано, что действие АТФ, секретлируемого через паннексиновые каналы, может усугублять патологические изменения стенки аорты, способствуя формированию аневризм [10].

Известно, что паннексин 1 присутствует не только в артериальных, но и в венозных сосудах, однако его роль в регуляции сократимости вен пока не изучена [11]. Следует отметить, что вены существенно отличаются от артерий по строению и механизмам регуляции сокращения гладкомы-

шечных клеток [12]. Для некоторых вен – например, портальной – характерно наличие двух слоев гладкомышечных клеток, кольцевого и продольного [13]. Эти слои отличаются по характеру сократительной активности: при действии вазоконстрикторных веществ кольцевые препараты вены развивают тоническое сокращение (контрактуру), тогда как у продольных препаратов контрактура отсутствует, а изменяются частота и амплитуда ритмических сокращений [14, 15].

По данным литературы, паннексин 1 и АТФ могут принимать участие в формировании ритмической активности кардиомиоцитов [16, 17], однако для вен этот вопрос остается открытым. Изучение особенностей сократительной активности продольных препаратов портальной вены у мышей, нокаутных по гену паннексина 1, может способствовать пониманию роли этого белка в механизмах миогенной ритмики сосудов. В связи с этим целью нашей работы было изучение роли паннексина 1 в регуляции ритмической сократительной активности продольного мышечного слоя портальной вены мыши.

Материалы и методы

Животные и объект исследования. В работе использовали самцов мышей двух линий: линии с глобальным нокаутом гена *Panx1* и линии C57Bl/6J (дикий тип, генетическая основа для нокаутной линии) [18]. Возраст животных в двух группах не различался и составлял $11,3 \pm 2,3$ и $11,9 \pm 2,8$ нед. (среднее \pm стандартное отклонение). Масса тела нокаутных мышей ($24,7 \pm 2,4$ г) была немного меньше, чем мышей дикого типа ($28,1 \pm 1,7$ г, среднее \pm стандартное отклонение, $p < 0,05$ по непарному тесту Стьюдента). Животных содержали в стандартных условиях вивария кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова при световом цикле 12/12 ч и температуре от 22°C до 25°C, а также при свободном доступе к питьевой воде и корму для грызунов (ООО «Лаборторм», Россия). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены Этическим комитетом Института проблем передачи информации РАН (протокол заседания № 2 от 14.11.2023).

Исследование сократительной активности портальной вены. После эвтаназии мыши методом цервикальной дислокации органы брюшной полости выделяли и помещали в чашку Петри с охлажденным (4°C) физиологическим раствором. Сегмент портальной вены длиной 7–10 мм освобождали от прилежащих тканей и с помощью миниатюрных зажимов (модель 15913, World Precision Instruments, США) закрепляли в одной из камер двухканальной механографической установки [15]. Верхний зажим был соединен с датчиком силы (минисенсор Q84, ZEMIC, Китай),

а нижний – с микрометром, с помощью которого устанавливали уровень растяжения препарата. Камера (объем 7 мл) была заполнена физиологическим раствором следующего состава (мМ): NaCl – 146; KCl – 4,5; NaH₂PO₄ – 1,2; MgSO₄ – 1,0; EDTA – 0,025; D-глюкоза – 5,5; CaCl₂ – 1,6; HEPES – 5,0; pH – 7,4. Температуру раствора поддерживали на уровне 37°C за счет циркуляции воды из термостата BP-5H (Being Technology, Китай) внутри двойной стенки камеры. Для оксигенации и перемешивания добавляемых веществ раствор в камере аэрировали атмосферным воздухом с помощью компрессора.

Эксперимент проводили при натяжении препарата на 2 мН. Показания датчиков силы поступали на тензоусилитель оригинальной конструкции и далее на аналого-цифровой преобразователь E14-140 (L-CARD, Россия), частота оцифровки составляла 100 Гц. Для регистрации и обработки данных использовали программу PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия).

В начале каждого эксперимента препарат активировали путем замены рабочего раствора на раствор, содержащий 60 мМ KCl (эквимолярная замена NaCl на KCl, длительность воздействия – 3 мин). Затем проводили стандартную отмывку: раствор в камере полностью заменяли сначала 2 раза подряд и еще 1 раз через 2 мин. Такую же отмывку проводили после всех фармакологических воздействий в ходе эксперимента; промежуток времени между отмывкой и следующим воздействием составлял не менее 8 мин.

В большинстве тестов в качестве вазоактивных веществ использовали агонисты α_1 -адренорецепторов фенилэфрин и метоксамин. Следует отметить, что фенилэфрин по сравнению с метоксamiном обладает более высоким сродством к α_{1D} -подтипу адренорецепторов [19], который функционально связан с паннексином 1 [5]. Следовательно, именно при использовании фенилэфрина мы ожидали выявить более выраженные различия адренергических реакций портальной вены между мышами дикого типа и нокаутными по гену паннексина 1. Апликацию фенилэфрина проводили трижды (10^{-6} М в течение 4 мин). Для исследования вклада эндогенного АТФ перед второй апликацией фенилэфрина препарат инкубировали с блокатором аденозиновых рецепторов 8-SPT (8-(p-sulphophenyl)theophylline, 10^{-4} М, 17 мин) и апиразой (10 Е/мл, 7 мин). Третью реакцию на фенилэфрин исследовали после 15-минутной отмывки. Метоксамин использовали в концентрации 10^{-5} М (длительность воздействия – 4 мин). В работе также исследовали изменения сократительной активности портальной вены при действии АТФ (10^{-5} М, 4 мин). Все фармакологические агенты были приобретены в компании Sigma-Aldrich (США).

Полученные записи обрабатывали в программе PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия). Определяли

три показателя: частоту сокращений, амплитуду сокращений и уровень тонического сокращения препарата (далее – «контрактура»). Фоновые значения показателей рассчитывали по 10 последовательным циклам, а для оценки изменений показателей при воздействиях обчитывали 5 циклов, на которые приходился максимальный эффект. Изменения частоты и амплитуды сокращений выражали в процентах от значений в фоне, а величину контрактуры – в процентах от амплитуды сокращений в фоне.

Исследование экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Каждый образец содержал ткань портальной вены одной мыши. Вену освобождали от окружающих тканей и помещали в буфер RNA-later (Qiagen, Германия) на час при комнатной температуре, а затем хранили при -20°C . Выделение РНК проводили с помощью набора «Clean RNA Standard» (Евроген, Россия) в соответствии с приложенной методикой. Концентрацию РНК в полученных образцах определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Затем образцы обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США) по методике производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия) и праймеров со случайными последовательностями нуклеотидов длиной 6 п.н. С полученными образцами кДНК проводили ПЦР в реальном времени, используя прибор ДТлайт (ДНК-Технология, Россия) и реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). В работе оценивали содержание мРНК генов трех типов паннексина (*Panx1*: прямой праймер – TAAGCTGCTTCTCCCCGAGT, обратный – TGGCAAACAGCAGTAGGATG; *Panx2*: прямой праймер – TCACCAAGAАСТTCGCAGAGGA, обратный – GGAAGTTGAGCTCCGAGGTGA; *Panx3*: прямой праймер – CAGGAGTTCTCATCAGGGTCT, обратный – AGAGAGTAGGGAAAGAGCSTTGT). В качестве референсного использовали ген белка SM22 (*Tagln*: прямой праймер – CACAAACGACCAAGCSTTCTC, обратный – TCACCAATTTGCTCAGAATCACA). Протокол проведения ПЦР-реакции включал следующие стадии: (1) денатурации ДНК (90°C в течение 10 мин); (2) 40 циклов ПЦР, каждый из которых состоял из этапа денатурации ДНК (30 с при 95°C), отжига праймеров (30 с при температуре, необходимой для каждой пары праймеров) и элонгации (60 с при 72°C); (3) финальной элонгации (10 мин при 72°C); (4) плавления, во время которой температура линейно повышалась от 50 до 95°C .

Для обработки результатов использовали программу «RealTime_PCR» (ДНК-Технология, Россия). Для каждого образца определяли Ct (число циклов ПЦР, при котором флуоресценция превы-

шает пороговое значение), далее с помощью формулы $A = 1/E^{Ct}$, где E – эффективность праймеров, определяли экспрессию (A). Значения экспрессии для каждого образца нормировали на значение экспрессии референсного гена, таким образом вычисляли относительное содержание мРНК исследуемого гена в образце.

Статистический анализ данных. Статистический анализ данных проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Нормальное распределение значений в выборках было подтверждено с помощью теста Шапиро-Уилка. Способ представления данных и использованные статистические критерии указаны в комментарии к таблице и в подрисуночных подписях. Различия считали значимыми при $p < 0,05$; n – количество животных в группе.

Результаты

Характеристика спонтанных сокращений портальной вены. Препараты портальной вены мышей обеих линий демонстрировали выраженную ритмическую активность. У мышей с нокаутом гена паннексина 1 частота спонтанных сокращений была выше, чем у мышей дикого типа, амплитуда сокращений статистически значимо не различалась (таблица). При этом амплитуда сокращений обратно коррелировала с их частотой, причем, по данным регрессионного анализа, зависимости «амплитуда-частота» практически совпадали у двух экспериментальных групп. Значения коэффициента Пирсона и параметров уравнения линейной регрессии приведены в таблице.

Влияние агонистов α_1 -адренорецепторов и АТФ на сократительную активность портальной вены. Фенилэфрин (10^{-6} М) вызывал увеличение частоты и уменьшение амплитуды спонтанных сокращений портальной вены (рис. 1А–В). Кроме того, под действием фенилэфрина препараты развивали небольшую контрактуру, величина которой не превышала 10% амплитуды спонтанных сокращений. У мышей с нокаутом гена паннексина 1 величина контрактуры была значительно меньше, чем у мышей дикого типа (рис. 1В). Изменение частоты

спонтанных сокращений у нокаутной группы в ответ на фенилэфрин было несколько менее выраженным (рис. 1А), однако в этом случае различия не достигли статистической значимости ($p = 0,063$). Амплитуда сокращений портальной вены при действии фенилэфрина уменьшалась у мышей двух групп одинаково (рис. 1Б).

Метоксамин (10^{-5} М) также вызывал увеличение частоты сокращений портальной вены, которое не различалось у двух групп мышей (рис. 1Г). Амплитуда сокращений вены статистически значимо уменьшалась только у мышей с нокаутом гена паннексина 1, однако изменения амплитуды не различались между группами (рис. 1Д). При действии метоксамина контрактуру препараты не развивали (рис. 1Е).

Действие АТФ (10^{-5} М) приводило к увеличению частоты сокращений портальной вены в обеих группах, причем у мышей с нокаутом гена паннексина 1 изменения были менее выраженными, чем у мышей дикого типа (рис. 1Ж). При этом у мышей обеих групп наблюдалось уменьшение амплитуды сокращений (рис. 1З) и развитие контрактуры (рис. 1И), различий между группами по этим показателям не выявлено.

Для дополнительной оценки участия паннексина 1 в регуляции сократительной активности портальной вены были построены зависимости изменения частоты сокращений при действии различных агонистов от исходной частоты сокращений у двух групп мышей. Оказалось, что у мышей дикого типа изменение частоты сократительной активности в ответ на фенилэфрин (рис. 2А), но не на метоксамин (рис. 2Б) находится в обратной зависимости от частоты спонтанных сокращений в фоне. Изменения частоты сокращений, вызванные АТФ, у мышей дикого типа также обратно коррелировали с исходной частотой спонтанных сокращений портальной вены (рис. 2В). Однако у мышей с нокаутом гена паннексина 1 мы не обнаружили статистически значимой корреляции между частотой спонтанных сокращений и эффектами вазоконстрикторов (рис. 2Г–Е).

Влияние апиразы и 8-SPT на изменения сократительной активности вены при действии

Таблица

Показатели спонтанной сократительной активности у мышей дикого типа (WT) и нокаутных по гену паннексина 1 (KO)

Группа	WT (n = 17)	KO (n = 23)	p
Частота, сокр./мин	10,0 ± 2,7	11,5 ± 1,8	0,040
Амплитуда, мН	1,08 ± 0,30	0,98 ± 0,20	0,188
Коэффициент корреляции Пирсона	-0,598 (p = 0,011)	-0,635 (p = 0,001)	–
Параметры уравнения линейной регрессии зависимости амплитуды от частоты:			
Наклон линии регрессии, мН/(сокр./мин)	-0,067	-0,070	0,934
Точка пересечения линии регрессии с осью амплитуды, мН	1,752	1,776	0,966

Примечание: данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, для сравнения значений частоты и амплитуды сокращений использован непарный t-тест.

фенилэфрина. На фоне апиразы и 8-SPT изменение частоты сокращений, вызванное фенилэфрином, было меньше, чем при первом добавлении фенилэфрина (рис. 3А). Важно, что такое уменьшение реакции на фенилэфрин под действием апиразы и 8-SPT наблюдалось только у мышей дикого типа, но не у нокаутных по гену паннексина 1 (рис. 3А). Отмывка препарата от апиразы и 8-SPT сопровождалась восстановлением частоты сокращений вены мышей дикого типа до исходного уровня. Другие показатели сократительной активности (амплитуда и контрактура) в обеих группах мышей были более вариабельны, чем частота, для них статистически значимых изменений при действии апиразы и 8-SPT не наблюдалось.

Анализ экспрессии паннексина в портальной вене. Методом ПЦР в реальном времени мы проанализировали содержание мРНК паннексина 1, 2 и 3 в образцах портальной вены мышей дикого типа ($n = 10$) и нокаутных по гену паннексина 1 ($n = 9$). Отношение содержания мРНК *Panx1* в портальной вене мышей дикого типа к содержанию мРНК *Tagln* составило $(4,2 \pm 1,5) \times 10^{-3}$. У нокаутных мышей при использовании этой же пары праймеров продукт ПЦР не обнаруживался до 40-го цикла. Экспрессии генов *Panx2* и *Panx3* в портальной вене у обеих групп мышей выявлено не было (работоспособность праймеров для *Panx2* и *Panx3* была проверена с использованием тканей мыши – головного мозга и ушного хряща соответственно).

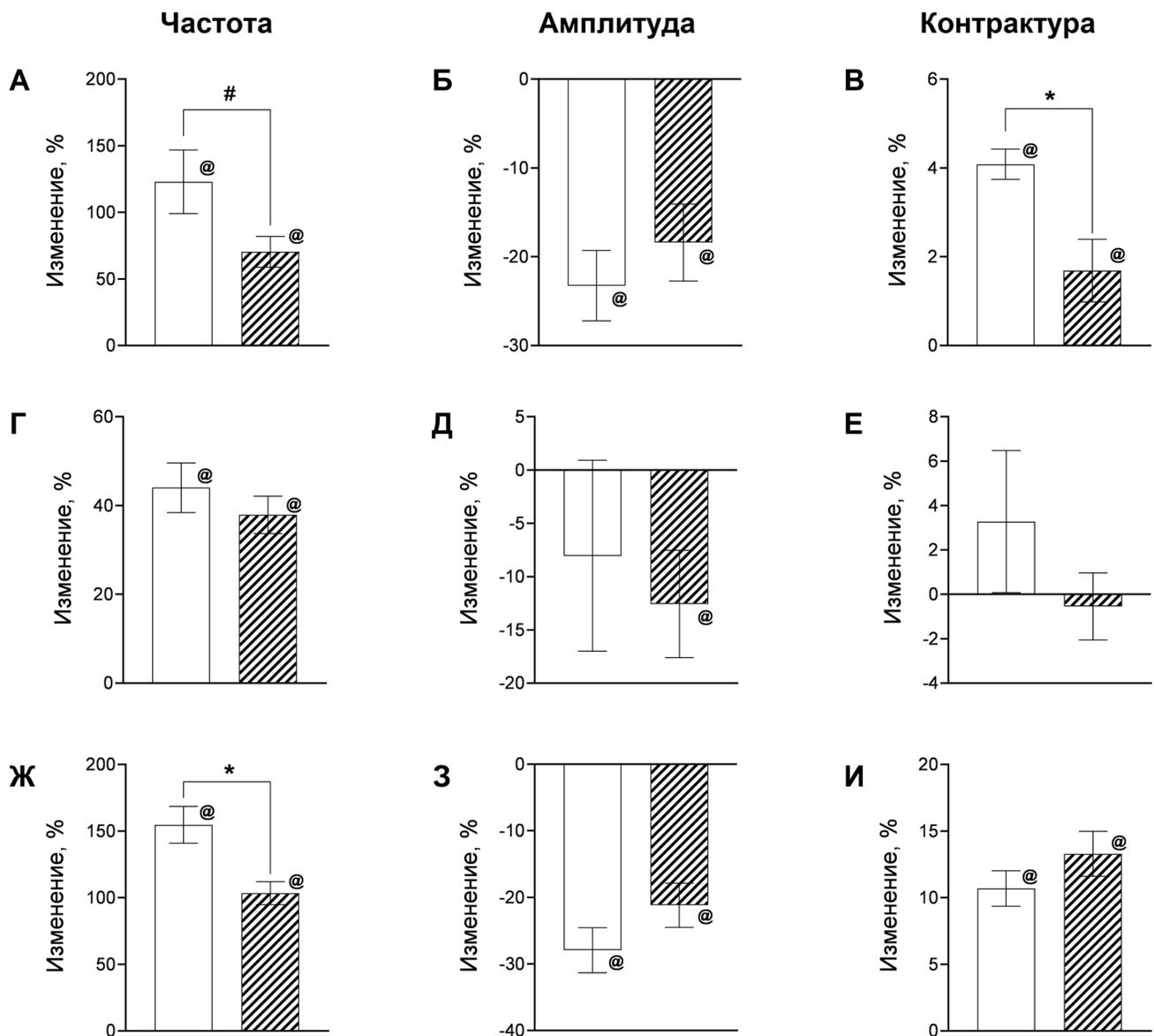


Рис. 1. Изменение показателей сократительной активности портальной вены в ответ на вазоконстрикторы у мышей дикого типа (WT, белые столбики) и нокаутных по паннексину 1 (КО, заштрихованные столбики). А–В: реакция на фенилэфрин (10^{-6} М, WT $n = 10$, КО $n = 10$); Г–Е: реакции на метоксамин (10^{-5} М, WT $n = 6$, КО $n = 11$); Ж–И: реакции на АТФ (10^{-5} М, WT $n = 17$, КО $n = 23$). Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения; * – $p < 0,05$, # – $p < 0,1$ (непарный t-тест); @ – $p < 0,05$ (односторонний t-тест).

Обсуждение

Как видно из представленных данных, у мышей, нокаутных по гену паннексина 1, сохраняются спонтанные ритмические сокращения портальной вены и частота таких сокращений выше, чем в вене мышей дикого типа. Кроме того, нокаут гена паннексина 1 приводит к уменьшению действия фенилэфрина и АТФ на спонтанные сокращения портальной вены, а также к нивелированию влияния нуклеозидтрифосфатазы апиразы на сократительную активность вены.

Строение портальной вены мышцы подробно описано в работе Такахашаи [13]. Особенностью этого сосуда является наличие спиральной складки, которая образована эндотелием и гладкомышечными клетками. В портальной вене мышцы складка начинается в месте соединения верхней брыжеечной и селезеночной вен, делает три оборота по часовой стрелке и заканчивается у входа портальной вены в печень. Гладкомышечные клетки в спиральной складке сравнительно немногочисленны, имеют неправильную форму и расположены неупорядоченно. В промежутках

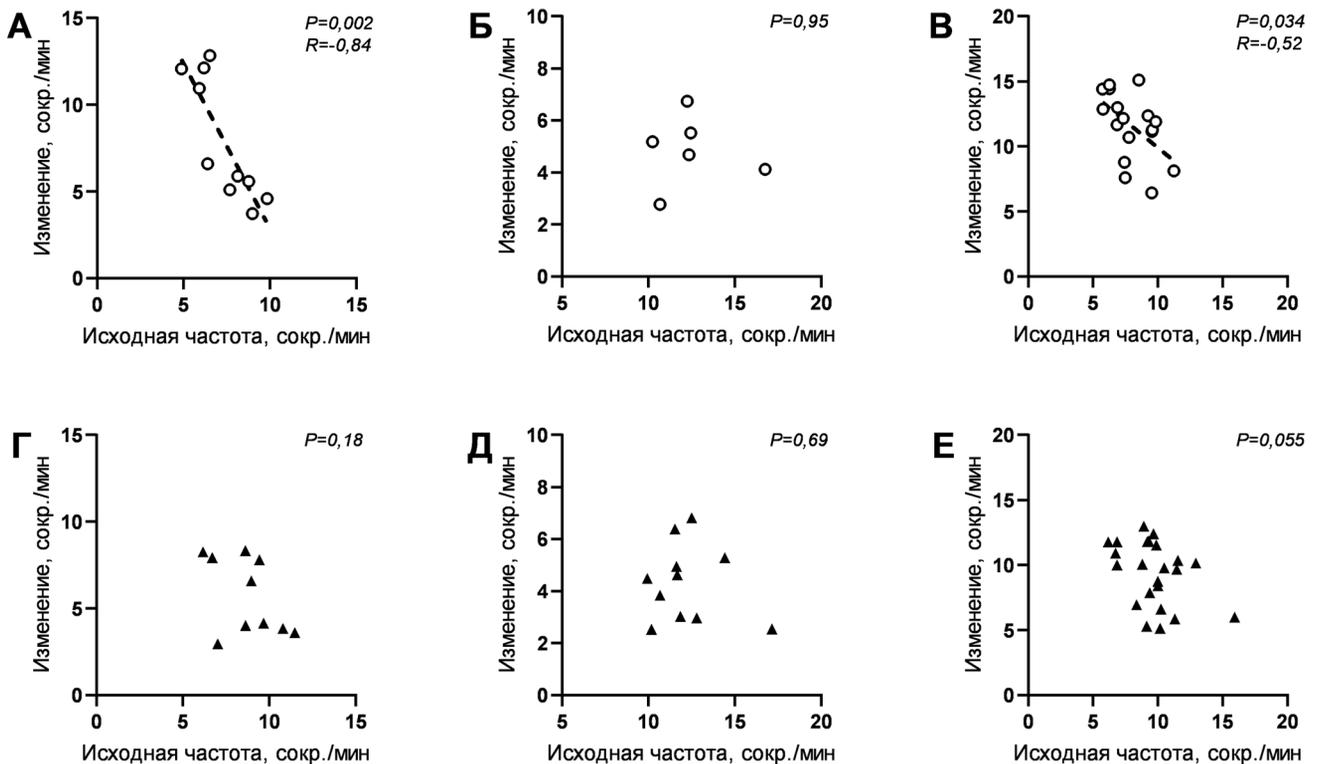


Рис. 2. Корреляционные зависимости влияния вазоконстрикторов на частоту сокращений от исходной частоты сокращений портальной вены у мышей дикого типа (А–В) и нокаутных по гену паннексина 1 (Г–Е). А: фенилэфрин, 10^{-6} М (n = 10); Б: метоксамин, 10^{-5} М (n = 6); В: АТФ, 10^{-5} М (n = 17); Г: фенилэфрин, 10^{-6} М (n = 10); Д: метоксамин, 10^{-5} М (n = 11); Е: АТФ, 10^{-5} М (n = 23). В верхней части графиков приведены значения уровня статистической значимости (p) и коэффициента корреляции Пирсона (R).

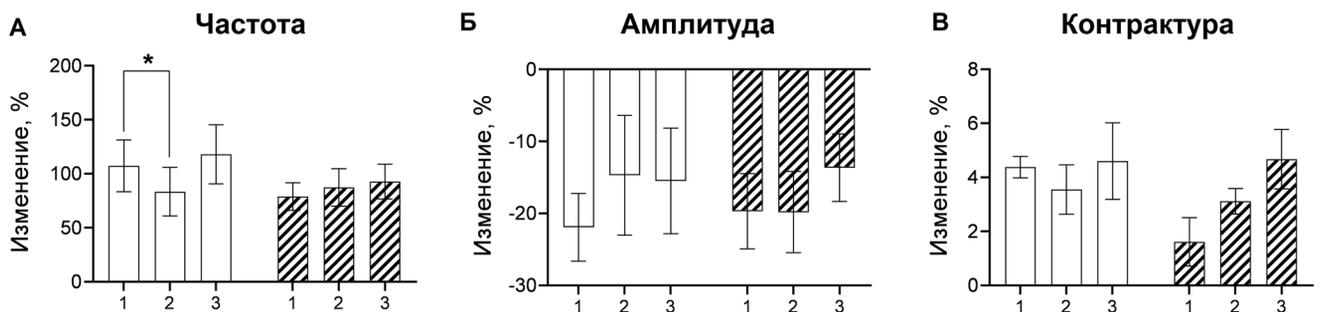


Рис. 3. Влияние апиразы (10 Ед/мл) и 8-SPT (10^{-4} М) на изменения частоты (А), амплитуды (Б) и контрактуры (В) сокращений портальной вены под действием фенилэфрина (10^{-6} М) у мышей дикого типа (светлые столбики, n = 7) и нокаутных по гену паннексина 1 (заштрихованные столбики, n = 8). 1 – первая реакция на фенилэфрин, 2 – вторая реакция на фенилэфрин (на фоне апиразы и 8-SPT), 3 – третья реакция на фенилэфрин (после отмывки). Данные представлены как среднее и стандартное отклонение; * – $p < 0,05$ (использован двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с апостериорным тестом Сидака).

между витками складки можно четко идентифицировать два слоя гладкомышечных клеток: кольцевой, который выражен слабее, и продольный, который образован плотно расположенными гладкомышечными клетками, формирующими два-три слоя. Ритмические сокращения венных сосудов связаны с генерацией спонтанных потенциалов действия гладкомышечными клетками [21]. Сокращение портальной вены начинается на стыке селезеночной и верхней брыжеечной вен и распространяется по спирали в сторону печени [13]. Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии было показано, что спонтанному перистальтическому сокращению вены предшествует транзитное повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме продольных гладкомышечных клеток, затем кальциевая волна распространяется между этими клетками от кишечника к печени [13]. Таким образом, за спонтанные перистальтические движения воротной вены отвечает именно продольный слой гладкомышечных клеток, при этом спиральная складка является местом их крепления, в связи с чем при перистальтических сокращениях портальная вена не укорачивается одновременно по всей длине.

Сохранение спонтанной ритмики портальной вены у нокаутных мышей, а также практически полное совпадение у двух групп мышей зависимостей амплитуды сокращений от их частоты говорит о том, что отсутствие паннексина 1 не нарушает работу базовых механизмов генерации ритмических сокращений. Однако нокаут паннексина 1 переводит ритмические сокращения вены в другой диапазон частоты. Вероятно, частота является показателем сократительной активности вены, который в большей степени подвержен регуляторным влияниям. К сходному заключению мы пришли и в нашей предыдущей работе, показав, что частота сокращений сильнее изменяется при действии многих вазоактивных веществ, чем амплитуда сокращений и контрактура [15].

Следует отметить, что при нокауте гена паннексина 1 в клетках могут развиваться компенсаторные изменения – например, может происходить увеличение содержания паннексина 3 [22]. Поэтому мы сочли необходимым провести проверку подобных изменений в нашей работе. Исследование показало, что гены паннексинов 2 и 3 типа не экспрессируются в клетках портальной вены мыши, в том числе отсутствует повышение их экспрессии в вене мышей с нокаут гена паннексина 1. Важно отметить, что в портальной вене мышей дикого типа наблюдалась экспрессия гена паннексина 1, ранее такие данные отсутствовали.

Активация α_1 -адренорецепторов двумя разными агонистами приводила к увеличению частоты сократительных ответов в обеих группах мышей, однако только эффект фенилэфрина, но не метоксамина, уменьшался при нокауте гена пан-

нексина 1. Ранее было показано, что фенилэфрин обладает более высоким сродством к α_{1D} -адренорецепторам: величина EC_{50} в отношении α_{1D} -адренорецепторов у фенилэфрина на порядок ниже, чем у метоксамина [19]. Следует отметить, что активацию именно α_{1D} -адренорецепторов связывают с открытием каналов паннексина 1, секрецией АТФ и последующим повышением адренореактивности артерий [5]. Такой механизм позволяет предположить, что менее выраженное влияние фенилэфрина на сократительную активность портальной вены у нокаутных мышей по сравнению с диким типом может быть связано с отсутствием паннексина 1 и его взаимодействия с α_{1D} -адренорецепторами.

С таким предположением согласуются результаты исследования влияния апиразы на фенилэфрин-зависимые изменения сократительной активности портальной вены. Их можно трактовать следующим образом: апираза уменьшает реакции на фенилэфрин, поскольку разрушает АТФ, выделяющийся из гладкомышечных клеток вены через каналы паннексина 1 при активации α_{1D} -адренорецепторов. Таким образом, у мышей дикого типа эндогенный АТФ может модулировать адренергическую регуляцию ритмических сокращений портальной вены. Отсутствие эффекта апиразы у мышей нокаутной группы свидетельствует в пользу того, что в портальной вене паннексин 1 является важным путем выхода АТФ из клеток, как и в артериальных сосудах [6, 8].

По данным литературы, в клетках других органов паннексин 1 и АТФ могут участвовать в ритмогенных процессах. Так, в сердце паннексин 1 может способствовать формированию сердечных аритмий, то есть генерации ритмической активности ранее «молчащими» клетками [16, 23], сходным влиянием обладает внеклеточный АТФ [24]. Проведенный нами анализ влияния экзогенного АТФ на ритмическую активность портальной вены выявил менее выраженное увеличение частоты сокращений у мышей с нокаут гена паннексина 1 по сравнению с диким типом. Можно предположить, что такие различия в реактивности портальной вены в ответ на АТФ связаны с изменением компонентов пуринергической системы у мышей с нокаут гена паннексина 1. Так как паннексин 1 является важным путем секреции АТФ, его отсутствие у нокаутных мышей должно приводить к снижению содержания АТФ в межклеточном пространстве, что в свою очередь может влиять на состав пуринергических рецепторов в гладкомышечных клетках вены. Кроме того, при нокауте паннексина 1 может изменяться скорость метаболизма АТФ: снижение количества АТФ должно сопровождаться снижением количества аденозина, который, как показано, повышает экспрессию эктонуклеотидазы NTPDase 1 [25], дефосфорилирующей АТФ и АДФ. Таким образом, в отсутствие

паннексина 1 в пуринергической системе сосудов могут происходить многочисленные компенсаторные изменения — особенно в использованной нами модели глобального нокаута этого гена. Показано, что в модели кондиционного нокаута гена паннексина 1 только в гладкомышечных клетках наблюдаются намного более выраженные изменения регуляции тонуса сосудов, чем при глобальном нокауте [8]. Важно отметить, что в силу особенностей препарата мы исследовали роль паннексина 1 в регуляции сократительной активности только продольного гладкомышечного слоя портальной вены. В таком случае исследование генной экспрессии в препарате целой вены было бы неинформативным, а разделение продольного и кольцевого гладкомышечных слоев является технически сложной задачей. Этот вопрос требует дальнейшего исследования с использованием других методических подходов.

Интересно, что у мышей дикого типа корреляционный анализ выявил связь между эффектами экзогенного АТФ и исходной частотой спонтанных сокращений. Согласно этой связи, меньшая исходная частота сокращений соответствует более выраженному ответу на экзогенный АТФ. Эффект фенилэфрина также коррелировал с уровнем исходной сократительной активности портальной вены, в этом случае связь также была обратной: больший эффект вазоконстриктора соответствовал меньшему значению исходной частоты сокращений. Нокаут гена паннексина 1

приводил к потере связи между этими показателями, что может отражать еще один аспект участия паннексина 1 в регуляции реакций портальной вены на вазоактивные вещества.

Заключение

В этой работе впервые описана экспрессия паннексина 1 в портальной вене мыши и проведен анализ его участия в формировании ритмической активности вены. Показано, что продольный гладкомышечный слой генерирует ритмическую активность и у мышей с нокаутом этого гена. АТФ, выделяющийся из клеток через каналы паннексина 1, регулирует сокращения вены, причем такие каналы, вероятно, функционально связаны с α_{1D} -адренорецепторами. У мышей дикого типа повышение частоты спонтанных сокращений под действием веществ, способных модулировать состояние каналов паннексина 1, обратно связано с исходной частотой сокращений вены, тогда как нокаут гена паннексина 1 приводит к уменьшению или потере этой связи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №23-75-01111). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены Этическим комитетом Института проблем передачи информации имени А.А. Харкевича РАН (протокол заседания №2 от 14.11.2023). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shestopalov V.I., Panchin Y. Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008;65(3):376–394.
2. Penuela S., Gehi R., Laird D.W. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1828(1):15–22.
3. Dahl G. ATP release through pannexon channels. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2015;370(1672):20140191.
4. Taylor K.A., Wright J.R., Mahaut-Smith M.P. Regulation of Pannexin-1 channel activity. *Biochem. Soc. Trans.* 2015;43(3):502–507.
5. Billaud M., Chiu Y.H., Lohman A.W., Parpaite T., Butcher J.T., Mutchler S.M., DeLalio L.J., Artamonov M.V., Sandilos J.K., Best A.K., Somlyo A.V., Thompson R.J., Le T.H., Ravichandran K.S., Bayliss D.A., Isakson B.E. A molecular signature in the pannexin1 intracellular loop confers channel activation by the α_1 adrenoreceptor in smooth muscle cells. *Sci. Signal.* 2015;8(364):ra17.
6. Кирюхина О.О., Гайнулина Д.К., Панчин Ю.В., Шестопалов В.И., Тарасова О.С. Изменения пуринергической регуляции артерий брыжейки у мышей с нокаутом гена паннексина 1. *Биологические мембраны.* 2017;34(6):137–146.
7. Billaud M., Lohman A.W., Straub A.C., Looft-Wilson R., Johnstone S.R., Araj C.A., Best A.K., Chekeni F.B., Ravichandran K.S., Penuela S., Laird D.W., Isakson B.E. Pannexin1 regulates α_1 -adrenergic receptor-mediated vasoconstriction. *Circ. Res.* 2011;109(1):80–85.
8. Dunaway L.S., Billaud M., Macal E., Good M.E., Medina C.B., Lorenz U., Ravichandran K., Koval M., Isakson B.E. Amount of Pannexin 1 in smooth muscle cells regulates sympathetic nerve-induced vasoconstriction. *Hypertension.* 2023;80(2):416–425.
9. Grimmer B., Krauszman A., Hu X., Kabir G., Connelly K.A., Li M., Grune J., Madry C., Isakson B.E., Kuebler W.M. Pannexin 1: a novel regulator of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc. Res.* 2022;118(11):2535–2547.
10. Ladd Z., Su G., Hartman J., Lu G., Hensley S., Upchurch G.R., Sharma A.K. Pharmacologic inhibition by spironolactone attenuates experimental abdominal aortic aneurysms. *Front. Cardiovasc. Med.* 2023;10(2):555–567.
11. Vanlandewijck M., He L., Mäe M.A., Andrae J., Ando K., Del Giudice F., Nahar K., Lebouvier T., Laviña B., Gouveia L., Sun Y., Raschperger E., Räsänen M., Zarb Y., Mochizuki N., Keller A., Lendahl U., Betsholtz C. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature.* 2018;554(7693):475–480.
12. Reho J.J., Zheng X., Fisher S.A. Smooth muscle contractile diversity in the control of regional

circulations. *Am. J. of Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2014;306(2):H163–H172.

13. Takahashi S., Hitomi J., Satoh Y.I., Takahashi T., Asakura H., Ushiki T. Fine structure of the mouse portal vein in relation to its peristaltic movement. *Arch. Histol. Cytol.* 2002;65(1):71–82.

14. Guimarães C.L., Calixto J.B., Rae G.A. Potent constrictor actions of endothelin-1, endothelin-2, and endothelin-3 in rat isolated portal vein. *Hypertension.* 1992;19(2):II79–II86.

15. Печкова М.Г., Кирюхина О.О., Виноградова О.Л., Тарасова О.С. Исследование сократительной активности портальной вены мыши в полетном эксперименте «Бион-М2»: обоснование актуальности и разработка экспериментальной модели. *Авиакосмическая и экологическая медицина.* 2023;57(5):141–148.

16. Andelova K., Benova T.E., Vacova B.S., Sykora M., Prado N.J., Diez E.R., Hlivak P., Tribulova N. Cardiac connexin-43 hemichannels and pannexin1 channels: Provocative antiarrhythmic targets. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(1):260.

17. Kienitz M.-C., Bender K., Dermietzel R., Pott L., Zoidl G. Pannexin 1 constitutes the large conductance cation channel of cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 2011;286(1):290–298.

18. Battulin N., Kovalzon V.M., Korablev A., Serova I., Kiryukhina O.O., Pechkova M.G., Bogotskoy K.A., Tarasova O.S., Panchin Y. Pannexin 1 transgenic mice: human diseases and sleep-wake function revision. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(10):5269

19. Kountz T.S., Lee K.S., Aggarwal-Howarth S., Curran E., Park J.M., Harris D.A., Stewart A., Hendrickson J., Camp N.D., Wolf-Yadlin A., Wang E.H., Scott J.D.,

Hague C. Endogenous N-terminal domain cleavage modulates α_{1D} -Adrenergic receptor pharmacodynamics. *J. Biol. Chem.* 2016;291(35):18210–18221.

20. Koval M., Cwiek A., Carr T., Good M.E., Lohman A.W., Isakson B.E. Pannexin 1 as a driver of inflammation and ischemia-reperfusion injury. *Purinergic Signal.* 2021;17(4):521–531.

21. Van Helden D.F., Imtiaz M.S. Venous vasomotion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1124:313–328.

22. Whyte-Fagundes P., Kurtenbach S., Zoidl C., Shestopalov V.I., Carlen P.L., Zoidl G. A potential compensatory role of panx3 in the VNO of a Panx1 knock out mouse model. *Front. Mol. Neurosci.* 2018;11:135.

23. Petric S., Klein S., Dannenberg L., Lahres T., Clasen L., Schmidt K.G., Ding Z., Donner B.C. Pannexin-1 Deficient mice have an increased susceptibility for atrial fibrillation and show a QT-prolongation phenotype. *Cell. Physiol. Biochem.* 2016;38(2):487–501.

24. Gurung I. S., Kalin A., Grace A.A., Huang C. L-H. Activation of purinergic receptors by ATP induces ventricular tachycardia by membrane depolarization and modifications of Ca^{2+} homeostasis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009;47(5):622–633.

25. Bao R., Shui X., Hou J., Li J., Deng X., Zhu X., Yang T. Adenosine and the adenosine A2A receptor agonist, CGS21680, upregulate CD39 and CD73 expression through E2F-1 and CREB in regulatory T cells isolated from septic mice. *Int. J. Mol. Med.* 2016;38(3):969–75.

Поступила в редакцию 20.03.2024

После доработки 25.04.2024

Принята в печать 26.04.2024

RESEARCH ARTICLE

The study of the pannexin 1 role in the regulation of contractile activity of longitudinal smooth muscle layer in the mouse portal vein

M.G. Pechkova^{1,2}, O.O. Kiryukhina^{1, *} , O.S. Tarasova^{2,3,4} 

¹Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Bolshoy Karetny per. 19–1, Moscow, 127051 Russia;

²Institute for Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76A, Moscow, 123007 Russia;

³Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology,

Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

⁴School of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, Lomonosovskiy pr. 27–1, Moscow, 119991, Russia

*e-mail: kcyu@yandex.ru

Pannexin 1 is a protein capable of forming channels for the release of ATP from animal cells. In small arteries, it regulates the contraction of smooth muscle cells, due to a functional connection with α_{1D} -adrenoceptors. Veins differ from arteries in structure and mechanisms of regulation of contraction, but the functions of pannexin in the venous bed have been poorly studied. The purpose of this study was to investigate the involvement of pannexin 1 in regulating the rhythmic contractile activity of the longitudinal smooth muscle layer in the mouse portal vein. The contractions of longitudinal vein preparations obtained from mice with global knockout of pannexin 1 gene and from C57Bl/6J mice (wild type) were studied in isometric mode. Venous preparations from both groups of mice demonstrated spontaneous rhythmic activity but the frequency of contractions in pannexin 1 knockout mice was higher than in wild-type mice. The α_1 -adrenoceptor agonists phenylephrine and methoxamine stimulated venous contractions.

In the knockout group, the effect of phenylephrine, which has a higher affinity for α_{1D} -adrenoceptors, was lower, while the effect of methoxamine did not differ between groups. Evoking an increase in the frequency of vein contractions, exogenous ATP also demonstrated a less pronounced effect in pannexin 1 knockout mice compared to wild-type mice. While in wild-type mice, the change in the frequency of vein contractions induced by phenylephrine and ATP (but not methoxamine) inversely correlated with the baseline frequency of contractions, such dependence was not observed in knockout mice. In the presence of apyrase, which degrades extracellular ATP, the effect of phenylephrine on venous contraction frequency became less pronounced in wild-type mice but remained unchanged in knockout mice. Thus, in the mouse portal vein, pannexin does not directly participate in the generation of myogenic rhythmic activity but may regulate it. The obtained results suggest that in the longitudinal smooth muscle layer of the mouse portal vein, pannexin 1 channels serve as the main pathway for ATP secretion, and they are functionally associated with α_1 -adrenoceptors.

Keywords: *portal vein, pannexin 1, ATP, apyrase, adrenergic receptors, vasomotion*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-75-01111.

Сведения об авторах

Печкова Марта Германовна – мл. науч. сотр. лаб. №12 ИППИ РАН и мл. науч. сотр. лаб. физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-67-15; e-mail: marta.peckovva@gmail.com

Кирюхина Оксана Олеговна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. №12 ИППИ РАН. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: kcyu@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6853-6029>

Тарасова Ольга Сергеевна – докт. биол. наук, доц., вед. науч. сотр. лаб. физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ ИМБП РАН, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; зав. кафедрой физиологии и патологии факультета фундаментальной медицины МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ost.msu@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4230-3849>