

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 591.112.1+612.179.1

Посвящается академику Тиграну Мелькумовичу Турпаеву

## Роль NAADP в поддержании спонтанных сокращений сердца: сравнительно-физиологические исследования

Е.С. Кузьмина<sup>1</sup>, М.В. Нечаева<sup>1, 2</sup> , П.В. Авдонин<sup>1, \*</sup> <sup>1</sup>Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26;<sup>2</sup>Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова, Российская академия наук, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр., д. 33

\*e-mail: pavel.avdonin@idbras.ru

Целью работы было изучение роли вторичного мессенджера NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate), вызывающего высвобождение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из лизосом и эндосом, в поддержании спонтанных сокращений сердца. В качестве объектов использовали изолированные сердца виноградной улитки *Helix pomatia* и куриного зародыша на донервной стадии эмбрионального развития. Используя проникающий через мембрану ацетооксиметильный эфир NAADP-AM, мы показали, что NAADP в наномолярных концентрациях увеличивает частоту и амплитуду спонтанных сокращений сердца *H. pomatia*. Антагонист NAADP NED19, не влияя на амплитуду сокращений, дозозависимо снижает их частоту, полностью блокируя спонтанные сокращения сердца моллюска при концентрации 5 мкМ. Ингибитор  $\text{H}^+$ -АТФазы V-типа бафиломицин А1 подавляет накопление ионов кальция в лизосомах и кислых эндосомах. Мы показали, что бафиломицин А1 вызывает затухание спонтанных сокращений и остановку сердца *H. pomatia*. Серотонин увеличивает амплитуду сокращений сердца *H. pomatia*, не влияя на частоту сокращений. NED19 в насыщающих концентрациях (10 мкМ) снижает частоту сокращений при активации сердца улитки серотином, но лишь частично уменьшает их амплитуду. В экспериментах с изолированным сердцем куриного зародыша нами показано, что NED19 снижает частоту спонтанных сокращений, не влияя на амплитуду сокращений. На основании полученных данных высказана гипотеза, согласно которой высвобождение под влиянием эндогенного NAADP ионов кальция из лизосом и эндосом способствует поддержанию спонтанной сократимости сердца.

**Ключевые слова:** кальций, сокращение сердца, NAADP, *H. pomatia*, куриный зародыш

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-6

### Введение

Повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ ) является триггером сокращения сердечной мышцы. Ионы кальция поступают в цитоплазму кардиомиоцитов из саркоплазматического ретикулума (СР) через рианодин-чувствительные каналы типа  $\text{RyR2}$ , открывающиеся после деполяризации плазматической мембраны. Через каналы  $\text{RyR2}$  происходит кальций-индуцированное высвобождение кальция (CICR, Calcium-Induced Calcium Release), которое потенцируется циклической АДФ-рибозой (cADPR, Cyclic Adenosine Diphosphoribose) [1]. Вклад в выброс ионов кальция из СР вносят также чувствительные к инозитол-1,4,5-трисфосфату ( $\text{InsP}_3$ , Inositol Trisphosphate) каналы. В сердце

млекопитающих образование  $\text{InsP}_3$  стимулируют норадреналин, эндотелин-1, ангиотензин II и некоторые другие гормоны и нейротрансмиттеры [2, 3]. Еще одним внутриклеточным агентом, вызывающим высвобождение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо в широком спектре систем от растений до клеток млекопитающих, является адениндинуклеотидфосфат никотиновой кислоты (NAADP — Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate) [4]. NAADP-индуцированная мобилизация  $\text{Ca}^{2+}$  впервые была обнаружена в гомогенатах яиц морских ежей [5]. С того времени было показано, что данный механизм регуляции  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  является универсальным — он есть в клетках разных организмов, принадлежащих к Deuterostomia и Protostomia [6]. NAADP активирует двупоровые

$\text{Ca}^{2+}$ -проницаемые каналы (TPC, Two-Pore Channels), расположенные в мембране кислых эндосом и лизосом [7–9]. Чувствительность каналов TPC к NAADP очень высока, его влияние на мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  проявляется, начиная с субнанолярных концентраций [10].

Опубликовано немало статей, посвященных NAADP-зависимой регуляции  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  в сердце [11]. Объектами исследования были изолированные кардиомиоциты [12–14]. Но в то же время есть совсем немного информации о роли данного механизма в реализации физиологических функций сердца. Установлено, что в сердцах, взятых у мышей  $\text{Trpcn2}^{-/-}$ , не экспрессирующих активируемые NAADP кальциевые каналы TPC2, снижен инотропный эффект изопротеренола [15]. Целью данной работы было определить, каким образом NAADP влияет на частоту и силу сокращений целого сердца.

В первую очередь нас интересовало влияние NAADP на сердце в отсутствие воздействия нейроэндокринных факторов. В качестве объектов были выбраны изолированное сердце виноградной улитки *Helix pomatia* и сердце куриного зародыша, взятое на ранней стадии эмбрионального развития, когда оно не имеет иннервации и кровообращения. Каждый из этих объектов обладает спонтанной сократительной активностью. Эти уникальные модели для проведения физиологических исследований были разработаны под руководством академика Тиграна Мелькумовича Турпаева [16, 17]. Представленные в данной статье результаты были частично доложены нами ранее [18, 19].

## Материалы и методы

**Реактивы.** NAADP-AM, проникающий в клетку в форме NAADP [17], был получен от компании Technology Transfer Company (Оксфордский университет, Великобритания), NED19 (транс-изомер) и бафиломицин A1 от Tocris bioscience, 5-HT от SigmaAldrich (США). NAADP-AM был растворен в диметилсульфоксиде (ДМСО) до концентрации 1 мМ, концентрации NED19 и бафиломицин A1 в ДМСО составляли 10 мМ. Непосредственно перед использованием эти соединения растворяли в растворе Рингера (РР). РР имел следующий состав, мМ:  $\text{NaCl}$  – 110;  $\text{KCl}$  – 2,0;  $\text{NaHCO}_3$  – 2,4;  $\text{CaCl}_2$  – 0,9. В контрольных экспериментах вместо NAADP-AM, NED19 и бафиломицина A1 в РР добавляли ДМСО до соответствующих конечных концентраций (от 0,01 до 0,2%). В таких концентрациях ДМСО не оказывал влияния на сократимость сердца *H. pomatia* и куриного эмбриона.

**Регистрация сокращений изолированного сердца *H. pomatia*.** Для экспериментов использовали крупных виноградных улиток *H. pomatia* (размер раковины 35–45 мм). Выделение сердца и реги-

страцию сокращений проводили по методу, описанному ранее [20]. Моллюска обезглавливали, раскалывали раковину, вскрывали полость тела и извлекали сердце. Тонкий конец стеклянной канюли, наполненной РР, вводили в сердце со стороны предсердия. Добавление исследуемых веществ в полость сердца *H. pomatia* проводили путем смены содержимого канюли. Объем добавляемого через канюлю раствора указан в подписях к рисункам. Измерения амплитуды и частоты сердца *H. pomatia* проводили в изотоническом режиме при 20–21°C. Сердце фиксировали на канюле со стороны предсердия и прикрепляли со стороны желудочка тонкой нитью к плечу механического датчика 6MX1B (Россия). Смещения, вызванные сокращениями сердца, преобразовывались в электрические сигналы и регистрировались с помощью одноканального устройства W+W Recorder (Kontron AG, Швейцария). Данные на рисунках репрезентативны для трех или более экспериментов.

**Регистрация сокращений изолированного сердца куриного зародыша.** Эксперименты проводили на оплодотворенных яйцах породы Белый Леггорн (White Leghorn), инкубируемых в лабораторном инкубаторе при оптимальных условиях ( $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  и влажности 60–70%) до 4 сут. Зародыш изолировали из яйца и помещали в чашку Петри с раствором Хэнкса, сердце вырезали, сохраняя желудочек, предсердие и выносящий тракт, затем промывали и помещали в чашку Петри с раствором Хэнкса при температуре  $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Частоту спонтанных сокращений сердца (ЧСС) определяли на основе анализа файлов видеорегистрации. Для этого использовали микроскоп (OPTIKA SZM-2Led, Италия), оснащенный цифровой видеокамерой DMK 23UV024 (The Imaging Source, Германия). Видеорегистрацию осуществляли со скоростью 25 или 30 кадров в секунду. Полученные данные анализировали с использованием программы DanioScore (Noldus, Нидерланды). Детали метода регистрации спонтанных сокращений сердца были описаны ранее [21].

**Статистическая обработка данных.** Достоверность различий между двумя группами наблюдений определяли с помощью критерия Уилкоксона и одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA).

## Результаты

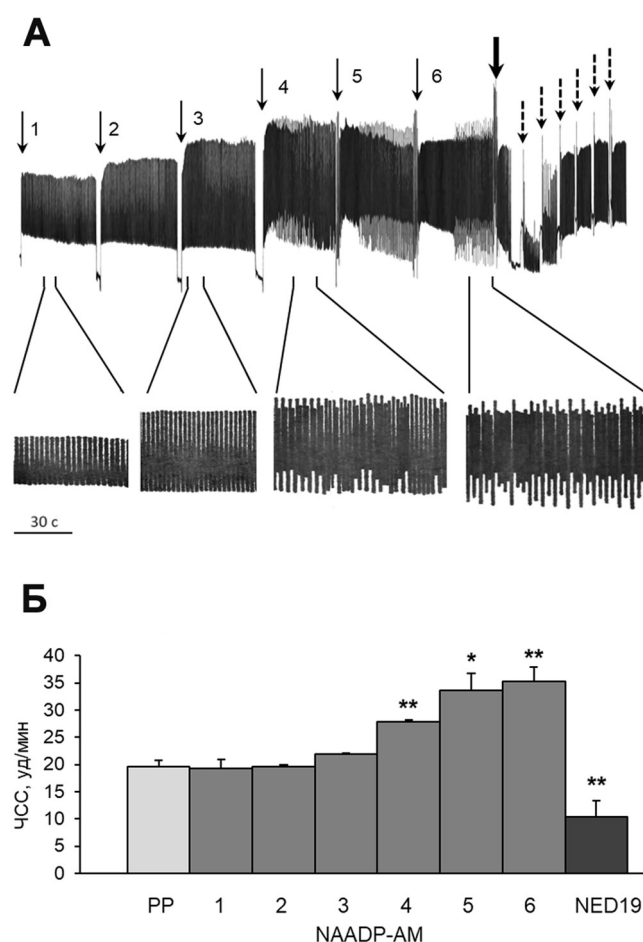
**Исследование влияния NAADP на сократимость изолированного сердца *H. pomatia*.** Для изучения влияния NAADP на сократительные свойства сердца *H. pomatia* нами был использован его ацетоксиметильный эфир NAADP (NAADP-AM), который проникает через клеточные мембраны и гидролизруется цитоплазматической эстеразой до свободного NAADP. Из-за небольшой толщины стенок сердца виноградной улитки NAADP-AM

может диффундировать по всей глубине ткани миокарда. В представленном на рис. 1 эксперименте нами сначала проводилась запись спонтанных сокращений с РР в канюле, затем содержимое канюли отсасывали и в нее вносили РР, содержащий 200 нМ NAADP-AM. После 6 мин регистрации сокращений содержимое канюли заменяли на свежий раствор с NAADP-AM. Как показано на рис. 1А последовательное добавление NAADP-AM приводило к постепенному увеличению частоты и амплитуды сокращений сердца.

На рис. 1 Б продемонстрированы изменения частоты сердечных сокращений (ЧСС) после нескольких добавлений NAADP-AM. Среднее значение ЧСС после шестой добавки NAADP-AM возросло на  $79,8 \pm 12,6\%$  ( $N=3$ ;  $\text{Mean} \pm \text{SE}$ ;  $p < 0,01$ ) по сравнению с исходной частотой. Примечательно, что длительное воздействие NAADP на сердце улитки приводило не только к увеличению частоты сокращений, но и к нарушениям ритма сердечных сокращений. Как видно на рис. 1А (вставки), после четвертого добавления NAADP-AM появлялись парные сокращения с разной амплитудой. Амплитуда сокращений к этому моменту возросла более, чем на 75% по сравнению с исходной до добавления NAADP-AM. Позже сердце начало совершать пачечные четверные сокращения с небольшой паузой между ними. Ранее было показано, что на фоне сильной  $\beta$ -адренергической стимуляции инъекция NAADP в кардиомиоциты мыши, которые электростимулировали, вызывает в них кратковременные подъемы  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  во время диастолы [14]. В этой же работе показано, что антагонист NAADP BZ194 устранял аритмию, вызванную введением изопроterenолом бодрствующим мышам. В наших экспериментах, проведенных в изолированном сердце *H. pomatia*, впервые показано, что NAADP ускоряет ритм спонтанных сокращений и при избыточном воздействии непосредственно сам без гормонального воздействия может вызывать аритмию. Конкурентным блокатом участков связывания NAADP является его структурный аналог NED19. Введение его в канюлю вместе с NAADP-AM приводило к затуханию сокращений и остановке сердца (рис. 1А). При последующем отмывании содержимого полости сердца от NED19 и NAADP-AM ритм и амплитуда сокращений восстанавливались до исходного контрольного уровня.

Мы показали, что NAADP не только увеличивает частоту и амплитуду сокращений сердца *H. pomatia*, но также способен предотвращать его остановку. Для демонстрации этого были подобраны такие условия эксперимента, при которых спонтанные сокращения сердца самопроизвольно замедляются и сердце останавливается. Это было достигнуто путем уменьшения объема, добавляемого в канюлю РР. Для того, чтобы сердце *H. pomatia* могло спонтанно сокращаться продол-

жительное время, объем РР в канюле должен быть достаточно большим, что, по-видимому, необходимо для поддержания определенного давления на стенки сердца. В эксперименте, представленном на рис. 1, в канюлю добавляли 200 мкл РР. Уменьшение объема РР в канюле до 100 мкл приводило к тому, что сокращения постепенно затухали и сердце останавливалось (рис. 2). Смена РР в канюле вызывала активацию сердечных сокращений, но после этого вновь происходило замедление ритма сокращений и остановка сердца. Однако если в РР был добавлен NAADP-AM в концентрации 100 нМ, ритм сокращений восстанавливался и сердце не останавливалось.

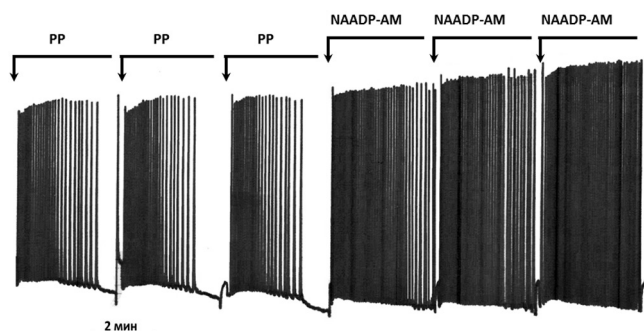


**Рис. 1.** Влияние NAADP-AM и NED19 на сократимость сердца *H. pomatia*.

**А** — Диаграмма сокращений сердца при последовательной смене раствора в канюле. Добавление в канюлю раствора Рингера (РР) с 200 нМ NAADP-AM обозначено тонкими стрелками и цифрами, добавление 200 нМ NAADP-AM и 10 мМ NED19 толстой стрелкой и добавление РР прерывистыми стрелками. Объем добавляемого раствора в канюлю составлял 200 мкл. В контроле РР содержал ДМСО в концентрации, соответствующей концентрации, вносимой вместе с NAADP-AM.

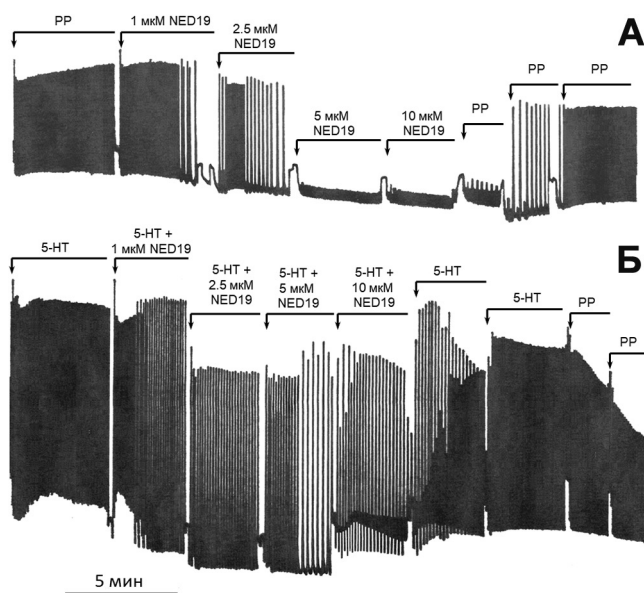
**Б** — Изменение частоты сокращений при действии NAADP-AM и NED19. Представлены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n=3$ ; отличия от контроля значимы: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ). Достоверность изменений ЧСС при последовательных добавлениях NAADP-AM оценивали с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA).

Мы исследовали, каково влияние NED19 на спонтанные сокращения сердца в отсутствие NAADP-AM (рис. 3А). Целью этих экспериментов было выяснить, участвует ли эндогенный NAADP в поддержании сокращений сердца *H. pomatia*. На рис. 3А показано влияние NED19 на спонтанные сокращения сердца в отсутствие NAADP-AM. NED19, начиная с концентрации 1 мкМ, вызывал замедление ритма спонтанных сокращений сердца улитки. При концентрации 2,5 мкМ его ингибирующий эффект был более выражен, а при 5 и 10 мкМ NED19 сокращения полностью блокировались. Эффект NED19 был обратимым. После отмывания сердца значения частоты и амплитуды спонтанных сокращений быстро восстанавливались до исходных уровней. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в миокарде *H. pomatia* образуется эндогенный NAADP, который способствует поддержанию спонтанных сокращений изолированного сердца.



**Рис. 2.** Угасание спонтанных сокращений и остановка сердца *H. pomatia* при уменьшении объема PP в канюле до 100 мкл и восстановление сокращений при внесении в канюлю PP с 100 нМ NAADP-AM.

В контроле PP содержал 0,01% ДМСО, что соответствовало количеству этого растворителя, вносимого вместе с NAADP-AM.



**Рис. 3.** Влияние NED19 на сокращение сердца *H. pomatia*. А – спонтанные сокращения; Б – сокращения в присутствии 0,5 мкМ серотонина (5-HT). PP – раствор Рингера.

Мощным активатором сердца *H. pomatia* является серотонин (5-НТ, 5-гидрокситриптамин). Влияние NED19 на сокращения сердца, активированного серотонином, существенно отличается от его действия на спонтанные сокращения (рис. 3Б). Увеличение концентрации NED19 от 1 до 5 мкМ вызывало постепенное снижение частоты сокращений. При концентрациях NED19 2,5–5 мкМ происходило некоторое снижение тонуса сердца и небольшое уменьшение амплитуды. Однако в отличие от спонтанных сокращений, сокращения сердца, активированного серотонином, не прекращались под влиянием NED19. При концентрации NED19 10 мкМ частота сокращений не падала, а, напротив, постепенно стабилизировалась на среднем уровне, который был реже исходного, но выше, чем при 5 мкМ NED19. После отмывания NED19 сердце начало сокращаться практически в исходном ритме. Отмывание сердца от серотонина приводило к постепенному снижению амплитуды сокращений до контрольного уровня.

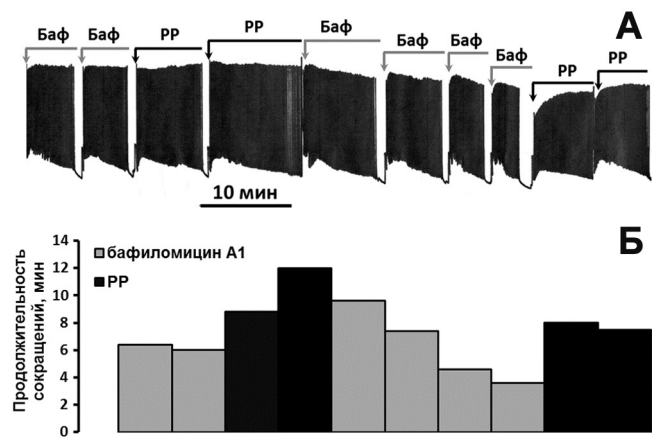
NAADP вызывает высвобождение ионов кальция из лизосом и эндосом, внутренняя среда которых имеет слабокислое значение pH [7]. Повышенная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в кислых эндосомах и лизосомах поддерживается благодаря антипорту протонов и  $\text{Ca}^{2+}$ . Закачивание ионов водорода в эти органеллы осуществляет протонная АТФаза V-типа. Чтобы определить, участвуют ли внутриклеточные хранилища  $\text{Ca}^{2+}$  в поддержании спонтанных сокращений сердца *H. pomatia*, мы использовали ингибитор  $\text{H}^{+}$ -АТФазы V-типа бафиломицин А1. Ингибирование  $\text{H}^{+}$ -АТФазы бафиломицином А1 приводит к повышению значений pH в интралюминальном пространстве лизосом и эндосом с последующим постепенным оттоком оттуда  $\text{Ca}^{2+}$ . Мы показали, что введение бафиломицина А1 в полость сердца в концентрации 10 мкМ не уменьшало амплитуду сокращений, но уменьшало время, в течение которого сердце было способно спонтанно сокращаться (рис. 4А). В представленном эксперименте сердечные сокращения прекратились через 6 мин после первого применения бафиломицина А1 (рис. 4Б). Смена раствора в канюле приводила к восстановлению сердечных сокращений, но через 6 мин сердце вновь останавливалось. При отмывании бафиломицина А1 путем двух последовательных смен содержимого канюли на PP сердце спонтанно сокращалось 12 мин без признаков угасания сокращений (рис. 4 Б). Однако если в канюле вновь проводилась смена контрольного PP на раствор с бафиломицином А1 длительность спонтанных сокращений вновь стала постепенно уменьшаться. После его четвертого добавления сокращения продолжались около 3,5 мин. Данный эффект можно объяснить увеличением утечки ионов кальция из лизосомоподобных депо после каждого применения бафиломи-

цина A1. Действие бафиломицина A1 было обратимым. При вымывании бафиломицина A1 раствором Рингера сердце вновь восстанавливало первоначальную способность к спонтанным сокращениям (рис. 4А).

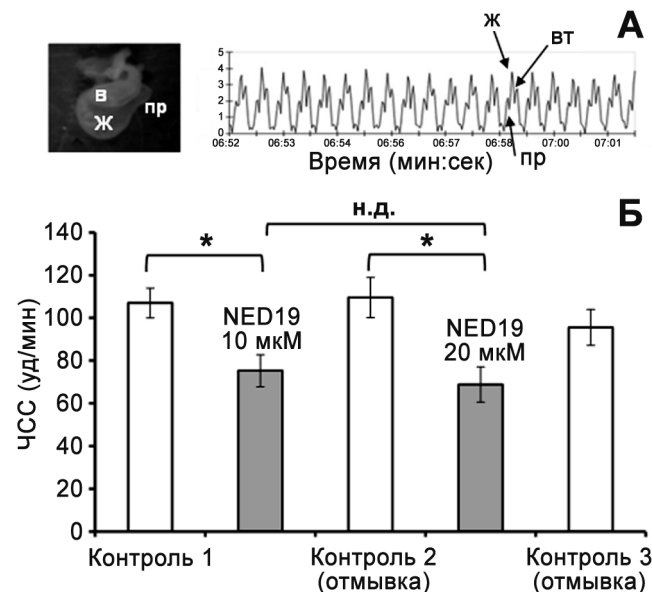
**Влияние NED19 на частоту спонтанных сокращений изолированного сердца куриного зародыша.** Целью второго этапа исследований было оценить участие NAADP в поддержании ритма сокращений сердца позвоночных животных. В качестве экспериментальной модели было выбрано сердце куриного эмбриона на 4 сут инкубации, поскольку на этих стадиях развития оно еще не имеет иннервации и кровообращения и изолированное сердце спонтанно сокращается. Для оценки участия эндогенного NAADP в поддержании спонтанной сократительной активности сердца куриного эмбриона мы использовали его специфический антагонист NED19. На рис. 5 показано, что после добавления 10 мкМ NED19 ЧСС снижалась на  $29,6 \pm 8,7\%$ . Этот эффект был обратим – после отмывания сердца раствором Хэнкса ЧСС восстанавливалась до прежнего значения. При последующем увеличении концентрации NED19 в два раза (20 мкМ) ЧСС снизилась на  $36,3 \pm 7,9\%$  от значения в контроле, однако эта величина не отличалась достоверно от таковой при 10 мкМ NED19 ( $p > 0,05$ ). Сердечный ритм вновь полностью восстанавливается после промывки в растворе Хэнкса. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии эндогенного NAADP в поддержании ритма спонтанных сердечных сокращений сердца куриного эмбриона.

Обсуждение

Для изучения непосредственного действия NAADP на сердце нами был использован проникающий через мембрану клеток его ацетооксиметильный эфир, гидролизующийся в цитоплазме до свободного NAADP. Возможность проведения этих экспериментов была обусловлена выбором удачной модели – изолированного сердца виноградной улитки *H. pomatia*. Благодаря его небольшим размерам и тонким стенкам диффузия NAADP-АМ может проходить в глубину ткани миокарда. Мы установили, что доставленный таким образом в сердце NAADP увеличивает частоту и амплитуду спонтанных сокращений. Нами также было показано, что NAADP может предотвращать остановку сердца *H. pomatia*, восстанавливая спонтанные сокращения. При длительном воздействии NAADP-АМ одновременно с увеличением ЧСС наблюдалось нарушение ритма сокращений сердца *H. pomatia*, что, по-видимому, обусловлено избыточным накоплением NAADP в мышечных клетках и усиленной активацией в них обмена ионов кальция. Наши результаты согласуются с ранее полученными данными о том, что NAADP индуцирует спонтанные подъемы  $[Ca^{2+}]_{цит}$  во время диастолы



**Рис. 4.** Угасание спонтанных сокращений сердца *H. pomatia* при добавлениях к сердцу PP с 10 мкМ бафиломицина A1 (Баф) и восстановление сокращений при отмывании сердца от бафиломицина A1. А – диаграмма сокращений сердца *H. pomatia* при последовательных сменах PP с 10 мкМ бафиломицина A1 на PP с 0.1% ДМСО. PP с бафиломицином A1 заменяли на контрольный PP через 30–60 с после самопроизвольной остановки сердца. Б – продолжительность спонтанных сокращений сердца при воздействии бафиломицина A1 (серые столбики) и после его отмывки PP (черные столбики). Объем раствора в канюле составлял 200 мкл.



**Рис. 5.** Влияние NED19 на ритм спонтанных сокращений изолированного сердца куриного эмбриона. А – изолированное сердце куриного зародыша на 4 сут инкубации и пример типичной записи спонтанных сокращений, полученной в контрольных условиях с использованием программного обеспечения Danio Scope (Noldus). Структуры сердца и соответствующие им пики сокращений на записи обозначены буквами («пр» – предсердие, «ж» – желудочек и «вт» – выносящий тракт). Б – гистограмма, демонстрирующая эффект NED19 на частоту спонтанных сокращений сердца. Сначала приведено значение ЧСС перед добавлением NED19 (контроль 1), далее – при действии 10 мкМ NED19; затем после отмывки сердца в растворе Хэнкса (контроль 2), и после этого – при действии 20 мкМ NED19 и при последующей отмывке в растворе Хэнкса (контроль 3). На гистограмме представлены средние значения ЧСС  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $N = 14$ ); \* –  $p < 0,05$ ; критерий Уилкоксона. н.д. – отсутствие достоверных различий.

в электростимулированных кардиомиоцитах на фоне бета-адренергической стимуляции и вовлечен в возникновение аритмии, спровоцированной у мышей *in vivo* инъекцией изопротеренола [14]. Новым является то, что мы показали способность NAADP вызывать аритмию при отсутствии стимуляции сердца нейроэндокринными факторами. Антагонист NAADP NED19 дозозависимо замедлял ритм спонтанных сокращения сердца *H. pomatia*, а при концентрации 10 мкМ полностью их блокировал. Мы предполагаем, что это происходит в результате подавления активирующего действия эндогенного NAADP в сердце *H. pomatia*.

Исходя из ранее полученных другими авторами данных о действии NAADP на обмен кальция в кардиомиоцитах [12–14], мы предполагаем, что его влияние на сократимость сердца *H. pomatia* можно объяснить следующим образом: при повышении концентрации NAADP увеличивается высвобождение ионов кальция из эндосом и лизосом и тем самым быстрее достигается пороговый уровень  $[Ca^{2+}]_{цит}$ , при котором запускается CICR. Благодаря этому при росте концентрации NAADP увеличивается частота сокращений, однако при его избыточном накоплении происходит наложение одиночных подъемов  $[Ca^{2+}]_{цит}$ , вызванных CICR, что приводит к аритмии в виде сдваивания и учетверения сокращений. Параллельно идет накопление ионов кальция в ретикулуме, рост пикового подъема  $[Ca^{2+}]_{цит}$  и увеличение амплитуды сокращений. В сердце млекопитающих уровень NAADP возрастает при активации  $\beta$ -адренорецепторов [13, 22] и этот мессенджер участвует в передаче от них кальциевых сигналов [15, 23]. У моллюсков мощным активатором сокращений сердца является серотонин. Влияние серотонина на уровень NAADP не изучалось. Антагонист NAADP NED19 уменьшал частоту сокращений при активации сердца *H. pomatia* серотонином, но

не вызывал остановки сердца. Мы предполагаем, что при действии серотонина зависимость от эндогенного NAADP активация CICR способствует увеличению частоты, но этот механизм не является критическим для поддержания сокращений. По-видимому, в этих условиях в высвобождение ионов кальция из ретикулума включаются и другие механизмы повышения  $[Ca^{2+}]_{цит}$ . Мы показали, что ингибитор фосфолипазы C U73122 уменьшает активацию сокращения сердца *H. pomatia* серотонином (данные не приводятся). Это говорит об участии в данном процессе кальциевых каналов ретикулума, активируемых инозитол-1,4,5-трисфосфатом.

С помощью специфического антагониста NED19 мы продемонстрировали, что NAADP-зависимый механизм регуляции спонтанных сокращений реализуется у куриного зародыша на стадии эмбрионального развития до иннервации сердца. Ранее было установлено, что у позвоночных животных уровень NAADP участвует в активации сокращений под действием изопротеренола через бета-адренергические рецепторы [15, 23]. В данном случае участие бета-адренорецепторов можно исключить. Сокращение сердца куриного эмбриона происходит самопроизвольно. Таким образом, этот результат является новым, и он подтверждает идею о том, что одной из функций внутриклеточного NAADP является поддержание спонтанной сократительной активности сердца.

Работа выполнена в рамках Государственной программы фундаментальных исследований № 0088-2024-0009. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены этическим комитетом Института биологии развития имени Н.К. Кольцова (протокол №70 от 25.05.2023 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rakovic S., Galione A., Ashamu G.A., Potter B.V., Terrar D.A. A specific cyclic ADP-ribose antagonist inhibits cardiac excitation-contraction coupling. *Curr. Biol.* 1996;6(8):989–996.
2. Kawaguchi H., Sano H., Okada H., Iizuka K., Okamoto H., Kudo T., Murakami T., Kitabatake A. Increased calcium release from sarcoplasmic reticulum stimulated by inositol trisphosphate in spontaneously hypertensive rat heart cells. *Mol. Cell. Biochem.* 1993;119(1–2):51–57.
3. Lamers J.M., De Jonge H.W., Panagia V., Van Heugten H.A. Receptor-mediated signalling pathways acting through hydrolysis of membrane phospholipids in cardiomyocytes. *Cardioscience.* 1993;4(3):121–131.
4. Lee H.C. Cyclic ADP-ribose and NAADP: fraternal twin messengers for calcium signaling. *Sci. China. Life. Sci.* 2011;54(8):699–711.
5. Lee H.C., Aarhus R. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* 1995;270(5):2152–2157.
6. Patel S., Marchant J.S., Brailoiu E. Two-pore channels: Regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals. *Cell Calcium.* 2010;47(6):480–490.
7. Calcraft P.J., Ruas M., Pan Z., Cheng X., Arredouani A., Hao X., Tang J., Rietdorf K., Teboul L., Chuang K.T., Lin P., Xiao R., Wang C., Zhu Y., Lin Y., Wyatt C.N., Parrington J., Ma J., Evans A.M., Galione A., Zhu M.X. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature.* 2009;459(7246):596–600.
8. Zong X., Schieder M., Cuny H., Fenske S., Gruner C., Rotzer K., Griesbeck O., Harz H., Biel M., Wahl-Schott C. The two-pore channel TPCN2 mediates

NAADP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -release from lysosomal stores. *Pflugers. Arch.* 2009;458(5):891–899.

9. Brailoiu E., Churamani D., Cai X., Schrlau M.G., Brailoiu G.C., Gao X., Hooper R., Boulware M.J., Dun N.J., Marchant J.S., Patel S. Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *J. Cell. Biol.* 2009;186(2):201–209.

10. Churchill G.C., Okada Y., Thomas J.M., Genazzani A.A., Patel S., Galione A. NAADP mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell.* 2002;111(5):703–708.

11. Negri S., Faris P., Moccia F. Endolysosomal  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in cardiovascular health and disease. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 2021;363:203–269.

12. Collins T.P., Bayliss R., Churchill G.C., Galione A., Terrar D.A. NAADP influences excitation-contraction coupling by releasing calcium from lysosomes in atrial myocytes. *Cell Calcium.* 2011;50(5):449–458.

13. MacGregor A., Yamasaki M., Rakovic S., Sanders L., Parkesh R., Churchill G.C., Galione A., Terrar D.A. NAADP controls cross-talk between distinct  $\text{Ca}^{2+}$  stores in the heart. *J. Biol. Chem.* 2007;282(20):15302–15311.

14. Nebel M., Schwoerer A.P., Warszt D., Siebrands C.C., Limbrock A.C., Swarbrick J.M., Fliegert R., Weber K., Bruhn S., Hohenegger M., Geisler A., Herich L., Schlegel S., Carrier L., Eschenhagen T., Potter B.V., Ehmke H., Guse A.H. NAADP mediated calcium signalling and arrhythmias in the heart evoked by beta-adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* 2013;288(22):16017–16030.

15. Capel R.A., Bolton E.L., Lin W.K., Aston D., Wang Y., Liu W., Wang X., Burton R.A., Bloor-Young D., Shade K.T., Ruas M., Parrington J., Churchill G.C., Lei M., Galione A., Terrar D.A. Two-pore channels (TPC2s) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) at lysosomal-sarcoplasmic reticular junctions contribute to acute and chronic beta-adrenoceptor signaling in the heart. *J. Biol. Chem.* 2015;290(50):30087–30098.

16. Nechaeva M.V., Turpaev T.M. Rhythmic contractions in chick amnio-yolk sac and snake amnion during embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2002;131(4):861–870.

17. Suslova I.V., Solomonova V.G., Yurchenko O.P., Turpaev T.M. Quantitative characteristics of negative inotropic effect of acetylcholine on the heart of the snail *Helix pomatia*. *Dokl. Biol. Sci.* 2005;404:325–328.

18. Нечаева М.В., Алексеева Т.А., Авдонин П.В. Влияние транс-NED19 на сердечный ритм куриного зародыша на ранних стадиях развития. *Материалы конференции с международным участием «Физиология и биохимия сигнальных систем»*, Москва, 23–25 октября 2018 г. М.: Изд-во «Перо»; 2018:65–66.

19. Федорова (Кузьмина) Е.С., Суханова И.Ф., Соломонова В.Г., Авдонин П.В. Роль двупоровых кальциевых каналов эндолизосомальных везикул в поддержании спонтанного ритма сокращения сердца. *Материалы конференции с международным участием «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация»*, Пушкино, 2013. Пушкино: ИД В. Ема; 2013:237–240.

20. Соломонова В.Г., Авдонин П.П., Виниченко Е.С., Суханова И.Ф., Авдонин П.В. Активация сократимости сердца виноградной улитки *H. pomatia* под действием тромбина. Исследование роли cAMP. *Журн. эвол. биохим. физиол.* 2007;43(1):32–38.

21. Nechaeva M., Alekseeva T., Dobretsov M., Kubasov I. Chicken embryos can maintain heart rate during hypoxia on day 4 of incubation. *J. Comp. Physiol. B.* 2020;190(3):361–370.

22. Lewis A.M., Aley P.K., Roomi A., Thomas J.M., Masgrau R., Garnham C., Shipman K., Paramore C., Bloor-Young D., Sanders L.E., Terrar D.A., Galione A., Churchill G.C. beta-Adrenergic receptor signaling increases NAADP and cADPR levels in the heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;427(2):326–329.

23. Gul R., Park D.R., Shawl A.I., Im S.Y., Nam T.S., Lee S.H., Ko J.K., Jang K.Y., Kim D., Kim U.H. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) and cyclic ADP-ribose (cADPR) mediate  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in cardiac hypertrophy induced by beta-adrenergic stimulation. *PLoS One.* 2016;11(3):e0149125.

Поступила в редакцию 01.04.2024

После доработки 14.05.2024

Принята в печать 20.05.2024

## RESEARCH ARTICLE

# The role of NAADP in maintaining spontaneous heart contractions: comparative physiological studies

E.S. Kuzmina<sup>1</sup>, M.V. Nechaeva<sup>1, 2</sup> , P.V. Avdonin<sup>1, \*</sup> 

<sup>1</sup>Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova st., 26, Moscow, 119334, Russia;

<sup>2</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky pr., 33, Moscow, 119071, Russia

\*e-mail: pavel.avdonin@idbras.ru

The goal of the work was to study the role of the second messenger NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate), which causes the release of  $\text{Ca}^{2+}$  ions from lysosomes and endosomes, in the regulation of heart contractions. Isolated hearts of the grape snail *Helix pomatia* and a chicken embryo were used as models. Using the membrane-permeable acetoxymethyl ester NAADP-AM, we showed that NAADP at nanomolar concentrations increases the frequency and amplitude of spontaneous cardiac contractions in *H. pomatia*. The

NAADP antagonist NED19, without affecting the amplitude of contractions, dose-dependently reduces their frequency, completely blocking spontaneous contractions of the mollusk heart at a concentration of 5  $\mu\text{M}$ . The V-type  $\text{H}^+$ -ATPase inhibitor bafilomycin A1 suppresses the accumulation of calcium ions in lysosomes and acidic endosomes. We have shown that bafilomycin A1 causes attenuation of spontaneous contractions and cardiac arrest in *H. pomatia*. Serotonin increases the amplitude of contractions of the *H. pomatia* heart without affecting heart rate. NED19 at saturating concentrations (10  $\mu\text{M}$ ) reduces the frequency of contractions when the snail heart is activated by serotonin, but only partially reduces their amplitude. In experiments with the isolated chick embryo heart, we showed that NED19 reduces the frequency of spontaneous contractions without affecting the amplitude of contractions. Based on the data obtained, a hypothesis was put forward that the release of calcium ions from lysosomes and endosomes under the influence of endogenous NAADP ensures the maintenance of spontaneous contractions of the heart.

**Keywords:** *calcium, heart contraction, NAADP, H. pomatia, chicken embryo*

**Funding:** The research was carried under the assignment of the State Basic Research Program of the Institute of Developmental Biology, project No. 0088-2024-0009.

### Сведения об авторах

*Кузьмина Елена Сергеевна* — аспирант Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-70-09; e-mail: eskuzmina@list.ru

*Нечаева Марина Владимировна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-70-09; e-mail: mane\_c@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5101-3245>

*Авдонин Павел Владимирович* — докт. биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лабораторией физиологии рецепторов и сигнальных систем Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-70-09; e-mail: pavel.avdonin@idbras.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4138-1589>