ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 591.112.1

ДЕЙСТВИЕ ДИАДЕНОЗИНОВЫХ ПОЛИФОСФАТОВ НА КАЛИЕВЫЕ ТОКИ ВХОДЯЩЕГО ВЫПРЯМЛЕНИЯ В КАРДИОМИОЦИТАХ КРЫСЫ

Д.В. Абрамочкин, К.Б. Пустовит, Т.С. Филатова

(*кафедра физиологии человека и животных; e-mail: abram340@mail.ru*)

Диаденозиновые полифосфаты в настоящее время рассматриваются как новый класс эндогенных паракринных регуляторных соединений. Поскольку известно, что уровень диаденозиновых полифосфатов повышается в сердечной ткани при ишемическом повреждении и гибели кардиомиоцитов, предполагается важная роль этих соединений в патогенезе инфаркта миокарда. В связи с этим большой интерес представляет действие диаденозиновых полифосфатов на электрическую активность сердца и ионные механизмы этого действия.

В данной работе изучено влияние диаденозинпентафосфата (Ap5A), диаденозинтетрафосфата (Ap4A) и НАД$^+$ на трансмембранные токи, относящиеся к группе калиевых токов входящего выпрямления — фоновый ток входящего выпрямления (I_{K1}), АТФ-зависимый ток (I_{KATP}) и ацетилхолинзависимый ток (I_{KACh}). Эксперименты выполнены методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell на изолированных предсердных и желудочковых кардиомиоцитах крысы. Показано, что ни одно из исследуемых адениновых соединений не оказывает существенного влияния на I_{K1} и I_{KACh}.Ap5A (10^{-5}M) существенно снижает величину как входящей, так и выходящей компоненты I_{KATP} соответственно на 22,1 и 19% от контрольной величины. Большая концентрация Ap5A (3×10^{-5}M) вызывает более сильное подавление I_{KATP} — на 47,5% и 37,8% соответственно. Однако I_{KATP} оказался нечувствителен к Ap4A и НАД$^+$.

Ключевые слова: *сердце, ионные токи, АТФ, диаденозиновые полифосфаты, НАД$^+$.*

Диаденозиновые полифосфаты (ДАП) представляют собой семейство молекул, в структуру которых входят два аденозиновых основания, соединенных несколькими остатками фосфорной кислоты. В организме ДАП являются эндогенными соединениями: они могут образовываться с помощью специфических ферментных систем в большинстве тканей, присутствуют как в цитоплазме различных клеток, так и во внеклеточной среде и плазме [1]. В настоящее время ДАП и их производные считаются новым классом паракринных регуляторных соединений, обладающих широким спектром физиологической активности. Сходный по структуре с ДАП, никотинамидадениндинуклеотид (НАД$^+$), в составе которого один аденин заменен на никотинамид, рассматривается в настоящее время как новый нейротрансмиттер, так как он может выделяться из пресинаптических нервных окончаний, метаболизироваться вне клетки, связываться с рецепторами на клеточной мембране [2–4].

ДАП способны регулировать кровоток и тонус гладкой мускулатуры сосудов, полых органов, агрегацию тромбоцитов, клеточную пролиферацию [5]. В отношении действия ДАП и родственных соединений на миокард данных значительно меньше, несмотря на известное повышение уровня ДАП в сердечной ткани при ее ишемическом повреждении и гибели кардиомиоцитов, которое указывает на вероятную роль этих соединений в патогенезе инфаркта миокарда. Ранее нашей группой было показано, что внеклеточный НАД$^+$ оказывает существенное влияние на конфигурацию потенциалов действия (ПД), а также сократительную активность рабочего миокарда [6] и пейсмекера сердца [7] крысы. Предварительные данные указывают также на способность диаденозинпентафосфата (Ap5A) и диаденозинтетрафосфата (Ap4A) модифицировать электрическую активность миокарда. Однако ионные механизмы эффектов ДАП и НАД$^+$ в миокарде остаются неизученными.

Одной из важнейших групп ионных токов, определяющих электрическую активность миокарда, является семейство калиевых токов входящего выпрямления (I_{Kir}). Оно включает 3 тока: фоновый ток входящего выпрямления (I_{K1}), АТФ-зависимый ток (I_{KATP}) и ацетилхолинзависимый ток (I_{KACh}) [8]. Из этих токов только I_{K1}, основная функция которого поддержание стабильного потенциала покоя, присутствует в кардиомиоцитах постоянно. Ток I_{KACh} активируется исключительно при стимуляции мускариновых или аденозиновых рецепторов за счет взаимодействия βγ-субъединиц G_i-белков, сопряженных с этими рецепторами, с калиевыми ацетилхолинзависимыми каналами. Активация I_{KACh} приводит к гиперполяризации, выраженной главным образом в пейсмекерных клетках [9], и уменьшению длительности ПД. Каналы I_{KACh} экспрессируются главным образом в суправентрикулярном миокарде.

В отличие от I_{K1} и $I_{KACh,}$ ток I_{KATP} индуцируется в кардиомиоцитах исключительно в патологиче-

ских условиях дефицита энергии, например при ишемии. Снижение цитоплазматического уровня АТФ приводит к диссоциации АТФ, связанного в норме с молекулами каналов, что и приводит к открыванию этих каналов. Возникающий при этом I_{KATP} имеет значительную величину и может индуцировать не только укорочение ПД, но и снижение амплитуды ПД вплоть до полного прекращения электрической активности [8]. Предполагается, что умеренная активация I_{KATP} может иметь определенное протекторное значение, позволяя уменьшить расход энергии на сократительную активность.

В данной работе было впервые изучено влияние Ар5А, Ар4А и НАД$^+$ на все три калиевых тока входящего выпрямления — I_{K1}, I_{KATP} и I_{KACh} — в желудочковых и предсердных кардиомиоцитах крысы.

Объекты и методы

При проведении работы были использованы 11 самцов белых беспородных крыс массой 300–350 г. Изолированные желудочковые и предсердные кардиомиоциты выделяли по описанной ранее методике [10]. Животным вводили внутрибрюшинно гепарин (1000 ед/кг), после чего декапитировали и вскрывали грудную клетку. Сердце выделяли и промывали раствором Тироде (состав в ммоль/л: NaCl — 133,47; KCl — 4,69; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ — 1,35; $NaHCO_3$ — 16,31; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,18; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 2,5; глюкоза — 7,77), насыщенным карбогеном (газовая смесь 95% — O_2, 5% — CO_2). Затем в течение 10 мин ретроградно перфузировали сердце по Лангендорфу в системе с постоянным протоком модифицированным бескальциевым раствором Тироде (состав в ммоль/л: NaCl — 120; KCl — 5,4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 5; пируват натрия — 5; глюкоза — 20; таурин — 20 и Hepes — 10, pH 6,9). Далее сердце перфузировали раствором аналогичного состава с добавлением коллагеназы типа II (0,5 мг/мл) и 20 мкМ $CaCl_2$ в течение 15 или 25 мин для выделения желудочковых и предсердных кардиомиоцитов соответственно. Перфузию проводили при температуре 37±1°С и постоянном насыщении раствора карбогеном (95% — O_2, 5% — CO_2). После завершения перфузии желудочки либо предсердия сердца отрезали, измельчали и механически выделяли кардиомиоциты в растворе Крафтбрюэ следующего состава (ммоль/л): KCl — 30; глутамат калия — 50; $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ — 30; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 3; EGTA — 0,5; глюкоза — 10; таурин — 20 и Hepes — 10, pH 7,2 [10]. Данный раствор использовали также для хранения клеток в течение 6–7 ч.

Ионные токи регистрировали методом пэтч-кламп в конфигурации whole cell при помощи усилителя EPC 800 USB (Heka Instruments, Германия). Кардиомиоциты помещали в экспериментальную камеру RC-26 (Warner Instrument Corp, Brunswick, CT, USA) объемом 150 мкл с постоянным протоком физиологического раствора (состав в ммоль/л: NaCl — 150; KCl — 5,4; $CaCl_2$ — 1,8; $MgCl_2$ — 1,2; глюкоза — 10; Hepes — 10, pH 7,6) комнатной температуры (24±1°С). Пэтч-пипетки изготовляли из боросиликатного стекла (Sutter Instruments, США) и заполняли раствором следующего состава (ммоль/л): KCl — 140; $MgCl_2$ — 1; EGTA — 5; Mg-АТФ — 4; Hepes — 10, pH 7,2. Сопротивление пипеток составляло в среднем 3,7±0,5 MΩ. Перед началом регистрации компенсировали емкость пипетки, емкость клетки и сопротивление доступа.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica v.6.0. При оценке достоверности различий использовали критерий Вилкоксона для связанных выборок. Использование непараметрического критерия было обусловлено малыми размерами выборок, не позволяющими гарантировать нормальность распределения.

Результаты и обсуждение

Калиевые токи входящего выпрямления индуцировали изменением мембранного потенциала по линейному протоколу от +60 до –120 мВ. Токи регистрировали в присутствии во внеклеточном растворе 10^{-5}М нифедипина, блокирующего входящие кальциевые токи, и 2 мМ 4-аминопиридина, ингибирующего транзиторный и ультрабыстрый калиевые токи в кардиомиоцитах крысы. Натриевый ток инактивировался благодаря низкому уровню поддерживаемого потенциала (–40 мВ). Таким образом, в этих условиях оставался незаблокированным только один лишний ток — калиевый I_{ss} [11], однако благодаря достаточно медленной активации этот ток имел незначительную величину при используемом нами линейном протоколе изменения мембранного потенциала. Как видно на рис. 1, фоновый ток, регистрируемый в таких условиях, обладал выраженным входящим выпрямлением. Кроме того, ток полностью блокировался Ba^{2+} в концентрации 2 мМ. Это позволяет заключить, что данный ток действительно является I_{K1}. Ни один из протестированных ДАП в концентрации 10^{-5}М, показавшей свою эффективность в экспериментах с внутриклеточной регистрацией электрической активности [6, 7], не вызывал существенных изменений фонового тока I_{K1} как в желудочковых (рис. 1), так и в предсердных (рис. 2) кардиомиоцитах крысы.

Ацетилхолинзависимый калиевый ток I_{KACh} может достигать лишь очень небольших величин в желудочковых миоцитах в связи с малой плотностью мускариновых рецепторов. Поэтому для исследования действия диаденозиновых полифосфатов на I_{KACh} использовали предсердные кардиомиоциты крысы. Ток индуцировали добавлением во внеклеточный раствор карбамилхолина (CCh), негидролизуемого аналога ацетилхолина, в концентрации 10^{-5}М, при этом регистрировали суммарный ток входящего выпрямления (I_{Kir}) — совокупность I_{K1} и I_{KACh}. Затем на фоне CCh добавляли Ар5А, Ар4А и НАД$^+$ в концентрации 10^{-5}М. Ни

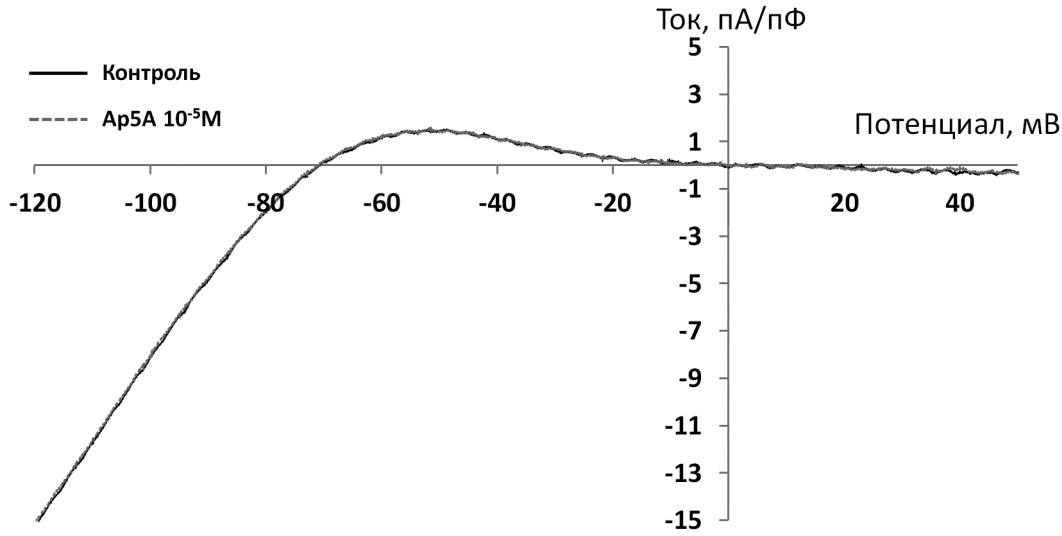

Рис. 1. Базальный калиевый ток входящего выпрямления I_{K1}, зарегистрированный в желудочковых кардиомиоцитах крысы в норме и на фоне действия диаденозиновых полифосфатов. Вольт-амперные кривые I_{K1} в контроле и на фоне 10^{-5}М Ap5A, построенные по оригинальным записям тока в репрезентативном эксперименте после вычитания тока утечки, зарегистрированного в присутствии 2 мМ хлорида бария. Здесь и далее ток входящего выпрямления регистрировали при изменении мембранного потенциала по линейному протоколу от +60 до –120 мВ

одно из трех соединений не вызвало достоверного изменения тока входящего выпрямления, регистрируемого на фоне CCh (рис. 2).

Для регистрации АТФ-зависимого калиевого тока I_{KATP} в желудочковых кардиомиоцитах крысы использовали пипеточный раствор модифицированного состава, в котором магниевая соль АТФ была заменена на эквивалентное количество хлорида магния. Кроме того, для ускорения индукции I_{KATP} во внеклеточный раствор добавляли ингибитор окислительного фосфорилирования — разобщитель электрон-транспортной цепи митохондрий — карбонил цианид 3-хлорофенилгидразон (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP) в концентрации 10^{-7}М. После достижения I_{KATP} стабильного уровня добавляли ДАП или НАД$^+$. НАД$^+$ (10^{-5}М) и Ap4A (10^{-5}М) не вызвали достоверного изменения I_{KATP} (рис. 3, *Б*). В отличие от них, воздействие Ap5A (10^{-5}М) привело к существенному снижению как входящей (при –120 мВ), так и выходящей (при 0 мВ) компоненты I_{KATP} (рис. 3) соответственно на 22,1 и 19% от контрольной величины суммарного тока входящего выпрямления. Ap5A в большей концентрации (3×10^{-5}М) вызвал более сильное подавление I_{KATP} — на 47,5 и 37,8% соответственно.

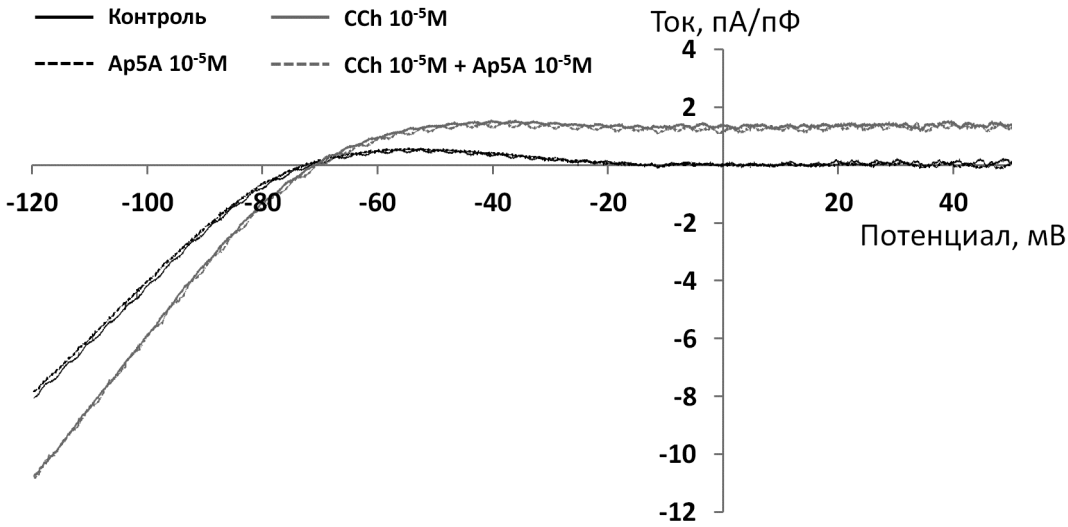

Рис. 2. Базальный калиевый ток входящего выпрямления I_{K1} и ацетилхолинзависимый калиевый ток входящего выпрямления I_{KACh}, зарегистрированные в предсердных кардиомиоцитах крысы в норме и на фоне действия диаденозиновых полифосфатов. Вольт-амперные кривые тока входящего выпрямления в нормальных условиях (базальный I_{K1}), в присутствие негидролизуемого аналога ацетилхолина CCh (сумма I_{K1} и I_{KACh}), а также при воздействии 10^{-5}М Ap5A самого по себе и на фоне 10^{-5}М CCh. Кривые построены по оригинальным записям тока в репрезентативном эксперименте после вычитания тока утечки, зарегистрированного в присутствии 2 мМ хлорида бария

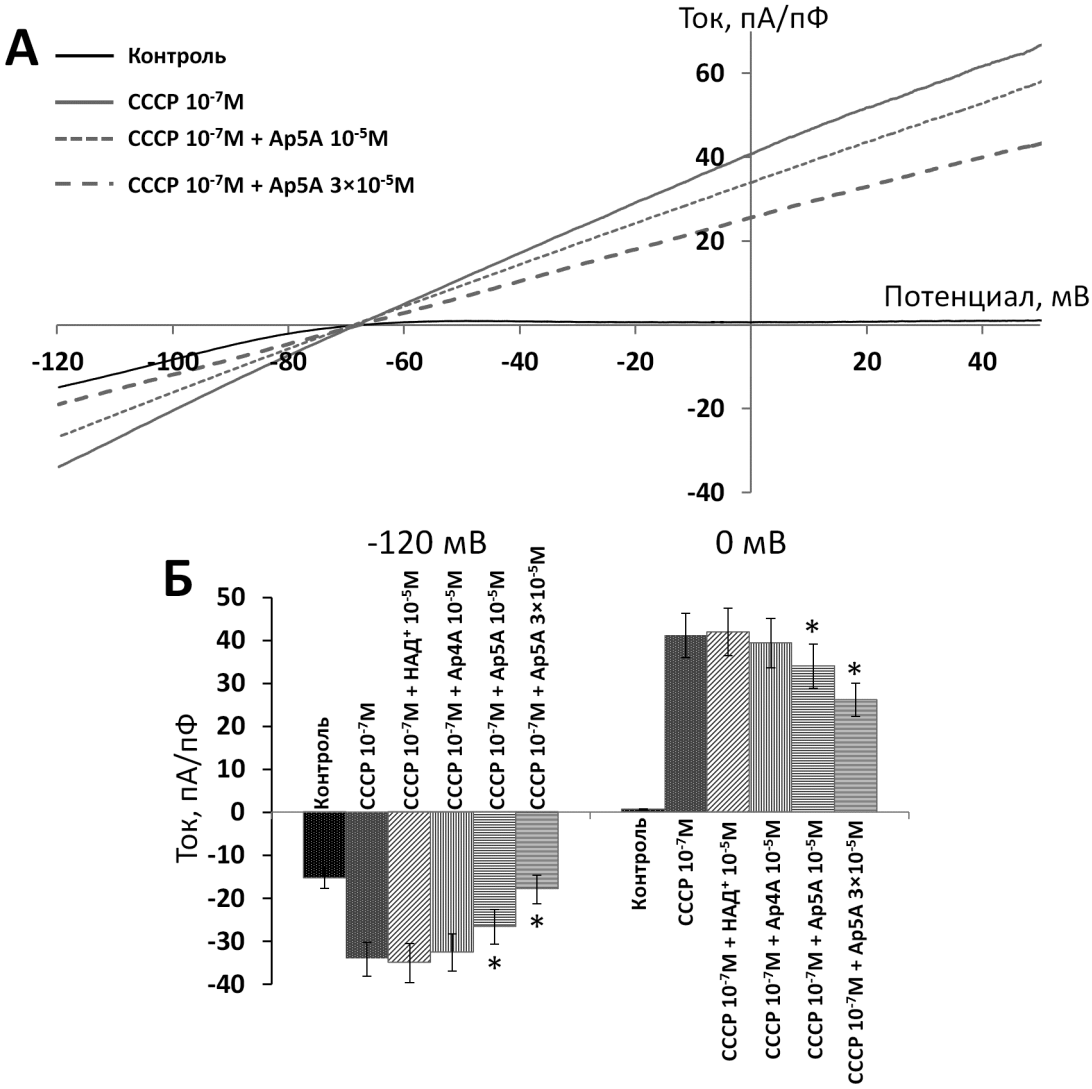

Рис. 3. АТФ-зависимый калиевый ток I_{KATP}, зарегистрированный в желудочковых кардиомиоцитах крысы в норме и на фоне действия диаденозиновых полифосфатов и НАД$^+$. **А** — вольт-амперные кривые базального тока входящего выпрямления I_{K1}, а также суммарного тока входящего выпрямления (I_{K1}+I_{KATP}), зарегистрированного после индукции АТФ-зависимого тока ингибитором окислительного фосфорилирования СССР (10^{-7}М), а также вольт-амперные кривые суммарного тока при добавлении 10^{-5}М и 3×10^{-5}М Ар5А на фоне 10^{-7}М СССР. Кривые построены по оригинальным записям тока в репрезентативном эксперименте. **Б** — средние (n = 8, для второго столбца — n = 32) величины суммарного тока входящего выпрямления (I_{K1} + I_{KATP}), измеренного при −120 мВ (максимум входящей компоненты обеих токов) и 0 мВ (при этом потенциале I_{K1} отсутствует, весь ток представлен I_{KATP}), в контроле, после индукции I_{KATP} 10^{-7}М СССР и при последующем добавлении на фоне СССР диаденозиновых полифосфатов: 10^{-5}М НАД$^+$, 10^{-5}М Ар4А, 10^{-5}М Ар5А, 3×10^{-5}М Ар5А. * — достоверность эффекта Ар5А на фоне СССР (критерий Вилкоксона, n = 8)

Таким образом, среди всех токов входящего выпрямления лишь I_{KATP} показал некоторую чувствительность к воздействию ДАП. С одной стороны, данные результаты согласуются с отсутствием изменений потенциала покоя кардиомиоцитов под действием этих соединений [6, 7]. С другой стороны, добавление ДАП не вызывало какой-либо прибавки к регистрируемому фоновому току I_{K1}. Это означает, что наблюдаемое выраженное уменьшение длительности ПД под действием ДАП нельзя объяснить ранее описанным механизмом активации тока I_{KACh} через пуриновые рецепторы, поскольку в противном случае было бы зафиксировано появление дополнительного тока входящего выпрямления на фоне I_{K1} под действием ДАП.

Обнаруженная способность Ар5А снижать амплитуду I_{KATP} может играть существенную роль в условиях ишемии, подавляя протекторное воздействие данного тока. Однако для определения ионных механизмов электрофизиологических эффектов ДАП в непатологических условиях, когда ток I_{KATP} в кардиомиоцитах отсутствует, требуются дополнительные исследования.

Таким образом, токи I_{K1} и I_{KACh} нечувствительны ни к одному из протестированных соединений (НАД$^+$, Ар4А, Ар5А). Ток I_{KATP} снижается под действием Ар5А, но нечувствителен к НАД$^+$ и Ар4А.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00268).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Baxi M.D., Vishwanatha J.K.* Diadenosine polyphosphates: their biological and pharmacological significance // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 1995. Vol. 33. N 3. P. 121–128.

2. *Burnstock G.* Purine and pyrimidine receptors // Physiol. Rev. 2007. Vol. 87. N 2. P. 659–797.

3. *Smyth L.M., Yamboliev I.A., Mutafova-Yambolieva V.N.* N-type and P/Q-type calcium channels regulate differentially the release of noradrenaline, ATP and beta-NAD in blood vessels // Neuropharmacology. 2009. Vol. 56. N 2. P. 368–378.

4. *Yamboliev I.A., Smyth L.M., Durnin L., Dai Y., Mutafova-Yambolieva V.N.* Storage and secretion of beta-NAD, ATP and dopamine in NGF-differentiated rat pheochromocytoma PC12 cells // Eur. J. Neurosci. 2009. Vol. 30. N 5. P. 756–768.

5. *Flores N.A., Stavrou B.M., Sheridan D.J.* The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system // Cardiovasc. Res. 1999. Vol. 42. N 1. P. 15–26.

6. *Пустовит К.Б., Кузьмин В.С., Сухова Г.С.* Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (NAD+) на сократительную и биоэлектрическую активность сердца крысы // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2014. Т. 100. № 4. С. 445–457.

7. *Пустовит К.Б., Кузьмин В.С., Сухова Г.С.* Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (NAD+) на биоэлектрическую активность пейсмекера и проводящей системы сердца // Бюл. эксп. биол. мед. 2015. Т. 159. № 2. С. 4–6.

8. *Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y.* Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles // Physiol. Rev. 2010. Vol. 90. N 1. P. 291–366.

9. *Boyett M.R., Kodama I., Honjo H., Arai A., Suzuki R., Toyama J.* Ionic basis of the chronotropic effect of acetylcholine on the rabbit sinoatrial node // Cardiovasc. Res. 1995. Vol. 29. N 6. P. 867–878.

10. *Isenberg G., Klockner U.* Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a “KB-medium” // Pflugers Arch. 1982. Vol. 395. N 1. P. 6–18.

11. *Brouillette J., Clark R.B., Giles W.R., Fiset C.* Functional properties of K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes // J. Physiol. 2004. Vol. 559. Pt. 3. P. 777–798.

Поступила в реакцию
11.05.15

EFFECTS OF DIADENOSINE POLYPHOSPHATES ON INWARD RECTIFIER POTASSIUM CURRENTS IN RAT CARDIOMYOCYTES

D.V. Abramochkin, K.B. Pustovit, T.S. Filatova

Diadenosine polyphosphates are now considered as a novel class of endogenous paracrine signal compounds. The putative role of these compounds in pathogenesis of myocardial infarction was proposed, since the concentration of diadenosine polyphosphates increases in the cardiac tissue following the ischemic lesion and myocardial necrosis. Therefore, possible effects of diadenosine polyphosphates on cardiac electrical activity and their ionic mechanisms are of considerable interest.

In the present study we have investigated the effects of diadenosine pentaphosphate (Ap5A), diadenosine tetraphosphate (Ap4A) and NAD^+ on transmembrane currents, belonging to the family of potassium inward rectifiers: background inward rectifier (I_{K1}), ATP-dependent potassium current (I_{KATP}) and acetylcholine-dependent current (I_{KACh}). Experiments were performed using the whole-cell patch-clamp technique on isolated atrial and ventricular rat cardiomyocytes. We have demonstrated that none of tested adenine compounds affects I_{K1} and I_{KACh}. Ap5A (10^{-5}M) induces considerable decrease of both inward and outward component of I_{KATP} by 22,1 and 19% of control value, respectively. Higher concentration of Ap5A (3×10^{-5}M) produces stronger suppression of I_{KATP} — by 47,5 and 37,8%, respectively. However, I_{KATP} turned out to be insensitive to Ap4A and NAD^+.

Key words: *heart, ionic currents, ATP, diadenosine polyphosphates, NAD^+.*

Сведения об авторах

Абрамочкин Денис Валерьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: abram340@mail.ru

Пустовит Ксения Борисовна — аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: k_pustovit@mail.ru

Филатова Татьяна Сергеевна — студент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: filka1994@gmail.com