

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Пустовит Ксения Борисовна

**ЭФФЕКТЫ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ
ДИАДЕНОЗИНОВЫХ ПОЛИФОСФАТОВ
И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В СЕРДЦЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Специальность – 03.03.01 – Физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
В.С. Кузьмин

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	10
Актуальность темы	10
Степень разработанности темы	11
Цели и задачи исследования	12
Научная новизна исследования	13
Теоретическая и практическая значимость	14
Методология и методы исследования	15
Положения, выносимые на защиту	16
Степень достоверности данных.....	16
Публикации.	16
Апробация результатов	16
Личный вклад автора.....	17
Структура работы	17
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
2.1. Пуринергическая сигнальная (регуляторная) система.....	18
2.2. Метаболизм пуриновых соединений	19
2.2.1. Структура, внутриклеточный синтез и метаболизм диаденозиновых полифосфатов.....	21
2.2.2. Метаболизм никотинамидадениндинуклеотида (НАД+)	24
2.3. Трансмембранный перенос пуриновых соединений.....	27

2.3.1. Механизмы накопления аденозина и АТФ во внеклеточной среде	27
2.3.2. Пути и механизмы накопления диаденозиновых полифосфатов во внеклеточной среде	29
2.3.3. Пути и механизмы накопления НАД ⁺ во внеклеточной среде	29
2.4. Мембранные рецепторы пуриновых соединений	30
2.4.1. Рецепторы P1-типа (аденозиновые рецепторы)	32
2.4.1.1. P1-рецепторы в сердце	32
2.4.1.2. Внутриклеточные сигнальные каскады, сопряженные с рецепторами P1-типа ..	33
2.4.1.3. Эндогенные и синтетические агонисты и блокаторы рецепторов P1-типа	34
2.4.2. Рецепторы P2-типа (рецепторы АТФ)	35
2.4.2.1 P _{2X} -рецепторы в сердце, механизмы активации, агонисты и блокаторы рецепторов	35
2.4.2.2. P _{2Y} рецепторы в сердце	36
2.4.2.3. Внутриклеточные сигнальные каскады, сопряженные с P _{2Y} рецепторами	37
2.5. Внеклеточные диаденозиновые полифосфаты и НАД ⁺ как агонисты пуриновых рецепторов	39
2.6. Потенциальное физиологическое значение внеклеточных диаденозиновых полифосфатов и НАД ⁺	40
2.6.1. Диаденозиновые полифосфаты и НАД ⁺ в роли нейромедиаторов	40
2.6.2. Диаденозиновые полифосфаты и НАД ⁺ в роли котрансмиттеров	41
2.7. Кардиотропные эффекты пуриновых соединений	41
2.7.1. Хронотропные, дромотропные и инотропные эффекты внеклеточного аденозина	41

2.7.1.1. Антиаритмические и проаритмические эффекты аденозина	45
2.7.2. Эффекты внеклеточного АТФ в миокарде млекопитающих. «Немиокардиальные» механизмы действия АТФ в сердце	46
2.7.3. Эффекты внеклеточных диаденозиновых полифосфатов в миокарде млекопитающих	47
2.7.3.1. Влияние внеклеточных диаденозиновых полифосфатов на тонус коронарных сосудов	49
2.7.3.2. Эффекты внутриклеточных диаденозиновых полифосфатов в сердце.....	50
2.7.4. Эффекты внеклеточного НАД ⁺ в миокарде млекопитающих	51
2.7.5. Эффекты внутриклеточного НАД ⁺ в сердце	52
2.8. Немиокардиальные эффекты диаденозиновых полифосфатов и их производных	52
2.8.1. Роль внеклеточных диаденозиновых полифосфатов в регуляции тонуса гладкомышечных клеток некоронарных сосудов.....	52
2.8.2. Роль внеклеточного НАД ⁺ в регуляции тонуса гладкомышечных клеток некоронарных сосудов	54
2.8.3. Наиболее значимые некардиотропные эффекты диаденозиновых полифосфатов и НАД ⁺	54
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	56
3.1. Объекты исследования	56
3.2. Типы препаратов сердца	57
3.3. Внутриклеточная регистрация потенциалов действия	58
в различных отделах сердца	58
3.3.1. Выделение многоклеточных препаратов сердца лабораторных животных	58

3.3.1.1. Препараты правого предсердия и синусного узла крысы и морской свинки.....	58
3.3.1.2. Препараты левого предсердия с участками легочных вен сердца крысы	59
3.3.1.3. Препараты стенки правого желудочка крысы	60
3.3.1.4. Препараты межпредсердной перегородки сердца крысы.....	61
3.3.1.5. Препараты волокон Пуркинье кролика	61
3.3.2. Перфузия изолированных препаратов отделов сердца крысы, морской свинки и кролика.....	62
3.3.3. Протоколы экспериментов с регистрацией потенциалов действия.....	62
3.3.4. Экспериментальная установка, регистрация потенциалов действия	63
3.3.5. Анализ потенциалов действия	64
3.4. Регистрация сократительной активности сердца	65
3.4.1 Перфузия препаратов, экспериментальная установка	65
3.4.2. Протокол экспериментов с перфузией изолированного сердца крысы	65
3.4.3. Оценка сократительной активности изолированного сердца крысы	66
3.5. Регистрация ионных токов в кардиомиоцитах методом Patch-clamp	66
3.5.1. Изоляция кардиомиоцитов.....	67
3.5.2. Регистрация ионных токов.....	67
3.6. Регистрация колебаний уровня цитоплазматического кальция.....	69
3.6.1. Экспериментальная установка и протоколы.....	69
3.6.2. Оценка колебаний уровня цитоплазматического кальция	71
3.7. Исследование сокращения сосудов в изометрическом режиме.....	71

3.7.1. Активация препарата и проверка функциональной активности эндотелия	72
3.8. Реактивы и материалы.....	74
3.9. Статистическая обработка результатов.....	75
4. РЕЗУЛЬТАТЫ	76
4.1. Исследование прямых эффектов диаденозиновых полифосфатов и НАД ⁺	76
в миокарде	76
4.1.1. Влияние Ар ₄ А, Ар ₅ А на сократительную активность желудочкового миокарда изолированного сердца крысы	76
4.1.2. Эффекты НАД ⁺ на сократительную активность изолированного сердца крысы...	79
4.2. Влияние Ар ₄ А, Ар ₅ А и НАД ⁺ на биоэлектрическую активность сердца	82
4.2.1. Эффекты Ар ₄ А, Ар ₅ А и НАД ⁺ в рабочем миокарде	82
4.2.1.1. Влияние Ар ₄ А, Ар ₅ А и НАД ⁺ на ПД в предсердном миокарде сердца крысы	82
4.2.1.2. Влияние Ар ₄ А, Ар ₅ А и НАД ⁺ на потенциалы действия в желудочковом миокарде сердца крысы.....	86
4.2.1.3. Влияние Ар ₄ А, Ар ₅ А и НАД ⁺ на потенциалы действия в межпредсердной перегородке сердца крысы.....	86
4.2.2. Эффекты Ар ₄ А, Ар ₅ А и НАД ⁺ в пейсмекерном миокарде.....	87
4.2.2.1. Влияние НАД ⁺ на биоэлектрическую активность препаратов, включающих синоатриальный узел крысы.....	87
4.2.2.2. Влияние Ар ₄ А, Ар ₅ А и НАД ⁺ на потенциалы действия волокон Пуркинье	88
4.2.3. Эффекты Ар ₄ А, Ар ₅ А и НАД ⁺ в миокардиальной ткани, обладающей эктопической автоматией.....	89

4.2.3.1. Влияние Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на ПД в миокардиальной ткани легочных вен крысы.....	89
4.2.4. Эффекты Ar_4A и $НАД^+$ в пейсмекерном и рабочем миокарде морской свинки	91
4.3. Эксперименты по исследованию влияния диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$ на коронарные артерии сердца крысы	95
4.3.1. Ответы коронарных артерий, вызываемые диаденозиновыми полифосфатами.....	95
4.3.2. Расслабление кольцевых препаратов коронарных артерий, вызываемое перфузией $НАД^+$	96
4.4. Влияние Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на колебания уровня цитоплазматического кальция в изолированных кардиомиоцитах крысы	97
4.4.1. Влияние Ar_4A на амплитуду «кальциевых волн» в кардиомиоцитах желудочкового миокарда крысы	97
4.4.2. Влияние Ar_5A на амплитуду «кальциевых волн» в кардиомиоцитах желудочкового миокарда	98
4.4.3. Влияние $НАД^+$ на амплитуду «кальциевых волн» в кардиомиоцитах желудочкового миокарда	99
4.5. Сопоставление эффектов Ar_4A , Ar_5A , $НАД^+$ с действием агонистов $P1$ -рецепторов (аденозина) и $P2$ -рецепторов (АТФ) в сердце.....	102
4.5.1 Влияние аденозина и АТФ на параметры сократительной активности желудочкового миокарда крысы.....	102
4.5.1.1. Влияние аденозина на сократительную активность желудочкового миокарда крысы.....	102
4.5.1.2. Влияние АТФ на сократительную активность желудочкового миокарда крысы	103

4.5.2. Влияние аденозина и АТФ на биоэлектрическую активность миокарда крысы (на примере левого предсердия)	105
4.6. Результаты экспериментов по выяснению рецепторных механизмов действия диаденозиновых полифосфатов и НАД ⁺ в сердце.	106
4.6.1. Влияние DPCPX на эффекты Ар ₄ А и Ар ₅ А в сердце крысы	107
4.6.2. Влияние сурамина и PPADS на эффекты Ар ₄ А и Ар ₅ А в сердце крысы	107
4.6.3. Влияние iso-PPADs и Evans Blue на эффекты НАД ⁺ в сердце крысы	108
4.6.4. Исследование рецепторных механизмов действия диаденозиновых полифосфатов и НАД ⁺ в сердце морской свинки. Влияние DPCPX и терциапина	109
4.7. Внутриклеточные сигнальные каскады, обуславливающие влияние диаденозиновых полифосфатов и НАД ⁺ на предсердные потенциалы действия в сердце крысы.....	112
4.7.1. Влияние ингибиторов каскада оксида азота на укорочение потенциалов действия, вызываемое Ар ₄ А в сердце крысы	112
4.7.2. Влияние ингибиторов фосфолипаз на укорочение потенциалов действия, вызываемое Ар ₄ А, Ар ₅ А и НАД ⁺ в сердце крысы	114
4.7.3. Влияние ингибирования протеинкиназы С на укорочение потенциалов действия, вызываемое Ар ₄ А, Ар ₅ А и НАД ⁺ в сердце крысы	116
4.8. Внутриклеточные сигнальные каскады, обуславливающие влияние диаденозиновых полифосфатов на сократимость миокарда крысы.....	117
4.8.1. Влияние ингибирования NO-синтазы, растворимых гуанилатциклаз и протеинкиназы С на снижение сократимости, вызываемое диаденозинтетрафосфатом.....	117
4.8.2. Влияние ингибирования NO-синтазы и протеинкиназы С на кальциевую динамику в кардиомиоцитах крысы при действии диаденозиновых полифосфатов (на примере Ар ₄ А)	120

4.8.3. Влияние ингибирования фосфодиэстераз на эффекты диаденозиновых полифосфатов в сердце крысы (на примере Ar_4A)	121
5. ОБСУЖДЕНИЕ.....	124
5.1. Эффекты диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$ в сердце млекопитающих	125
5.2. Эффекты диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$ в сравнении с эффектами АТФ и аденозина в сердце крысы.....	130
5.3. Рецепторные механизмы действия $НАД^+$ и диаденозиновых полифосфатов в сердце крысы	130
5.4. Внутриклеточные сигнальные каскады, опосредующие эффекты $НАД^+$ и диаденозиновых полифосфатов в миокарде сердца крысы.....	134
5.5. Рецепторные и внутриклеточные механизмы действия $НАД^+$ и диаденозиновых полифосфатов в сердце морской свинки	137
5.6. Эффекты $НАД^+$, Ar_4A и Ar_5A на изолированные коронарные артерии крысы	138
5.7. Возможная физиологическая и патофизиологическая роль диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$ в сердце.....	139
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	141
7. ВЫВОДЫ	143
8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	144
9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	147

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Первые упоминания о пуриновых соединениях как физиологически активных веществах появились в начале XX века, что послужило началом целого ряда разнообразных исследований, посвященных изучению их свойств и механизмов действия в различных тканях и органах животных. Спустя некоторое время было доказано существование пуринергической (наподобие холинергической) регуляторной (или нейромедиаторной, нейротрансмиттерной) системы, в которой пуриновые соединения являются медиаторами, имеются специальные механизмы высвобождения этих медиаторов, их накопления и деградации, а также их мишени [Burnstock et al., 1972]. Мишенями пуриновых медиаторов являются мембранные «пуриновые» рецепторы, для которых в течение последних 20-30 лет были подробно описаны свойства, функции, а также разработана их классификация. Были тщательно изучены функции таких пуриновых соединений, как аденозин и АТФ, которые стали рассматриваться как «классические» пуринергические медиаторы – агонисты пуриновых рецепторов.

В настоящее время показано, что кроме АТФ и аденозина, физиологически активными соединениями, выполняющими роль транзиттеров в пуринергической сигнализации, являются АМФ, АТФ, УТФ и УДФ. Более того, постоянно растет количество пуриновых соединений – т.е. соединений, сходных по структуре с пуриновыми нуклеотидами или имеющих в качестве структурной основы пуриновое или пиримидиновое основание. Такие соединения обладают физиологической активностью и являются агонистами пуриновых рецепторов. Недавно было показано, что некоторые пуриновые соединения, внутриклеточная роль которых известна и детально изучена уже десятилетия назад, могут обладать внеклеточной активностью и являться элементами пуринергической регуляции [Burnstock et al., 1997].

Обнаружено, что такое хорошо известное соединение, как никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺, НАД⁺, NAD, НАД, β-NAD, β-НАД, далее "НАД⁺") обладает внеклеточной нейротрансмиттерной активностью [Berger et al, 2004]. НАД⁺ является соединением пуринового ряда и может рассматриваться как производное диаденозин дифосфата, в котором один аденин замещен на никотинамид.

Физиологическая роль внеклеточного (или экзогенного) НАД⁺ как регуляторного соединения в целом ряде тканей остается малоизученной.

Степень разработанности темы

Диаденозиновые полифосфаты (Ap_nA) – класс пуриновых соединений, представляющих собой две молекулы аденина, соединенных полифосфатным мостиком ($n=2-6$). Диаденозиновые полифосфаты относятся к еще более общему и широкому классу соединений, имеющих название – динуклеотидполифосфаты (Np_nN). Структурно, никотинамидадениндинуклеотид является производным диаденозиндифосфата и также относится к классу динуклеотидполифосфатов. Известно, что и диаденозинполифосфаты, и динуклеотидполифосфаты являются эндогенно синтезируемыми пуриновыми соединениями, которые присутствуют в значимых количествах практически во всех тканях многоклеточных животных, в эукариотических и прокариотических клетках. К данному моменту, проведены сотни исследований, посвященных изучению свойств внутриклеточных динуклеотид- и диаденозинполифосфатов в различных тканях и органах [Burnstock et al., 1997; Flores et al., 1999; Luo et al., 1999; McLennan et al., 2000; Jacobson et al., 2002]. Известно [Flores et al., 1999], что диаденозиновые полифосфаты обладают и внеклеточным действием: они могут регулировать работу различных тканей, являясь, вероятно, агонистами пуриновых рецепторов. Кроме того, было показано, что существует несколько специфических регулируемых механизмов высвобождения диаденозиновых полифосфатов [Pintor et al., 1992; Pintor et al., 1995; Rodriguez del Castillo et al., 1988; Jankowski et al., 2009]. Указанные выше факты свидетельствуют, что диаденозиновые полифосфаты являются новыми медиаторами пуринергической системы. Целый ряд различных диаденозиновых полифосфатов и их производных может обладать нейротрансмиттерными и регуляторными свойствами [Pareira et al., 2000; Mutafova-Yambolieva et al., 201]. Есть данные, указывающие на то, что диаденозиновые полифосфаты и их производные могут обладать физиологической активностью в сердечно-сосудистой системе [Pohl et al., 1991; Vahlensieck et al., 1996; Stavrou et al., 2001; Brandts et al., 2003; Yuan et al., 2007]. Согласно литературным данным, среди целого ряда соединений (ApA – Ap_6A), диаденозинтетра- и диаденозинпентафосфат (Ap_4A , Ap_5A) были отмечены как

соединения, демонстрирующие максимальную физиологическую активность в ряду полифосфатов [Drygalski et al., 2000].

Было также продемонстрировано, что диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ участвуют в регуляции тонуса сосудов, влияют на активность различных внутриклеточных ферментов тканей сердечно-сосудистой системы, а также обладают нейротрансмиттерными свойствами [Rubino et al., 1996; Jovanovic et al., 1998; Burnstock 2004b; Burnstock 2006; Burnstock 2009; Burnstock 2017].

В настоящее время становится очевидным, что диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ могут несколькими способами оказывать влияние на работу сердечно-сосудистой системы. Это регуляция активности симпатических и парасимпатических нервов, регуляция тонуса сосудов, в том числе коронарных сосудов, возможно, регуляция активности вегетативных афферентов сердца [Luo et al., 2004]. Следует отметить, что данная работа сосредоточена на эффектах данных пуриновых соединений именно в миокардиальной и гладкомышечной ткани сердца, иными словами – на их постсинаптических эффектах.

Цели и задачи исследования

В связи с вышесказанным, целью данной работы является *исследование эффектов и механизмов действия внеклеточных диаденозинтетра-, диаденозинпентафосфата и никотинамидадениндинуклеотида в сердце млекопитающих.*

В соответствии с целью, были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать эффекты Ар₄А, Ар₅А и НАД⁺ на сократимость сердца млекопитающих;
2. Изучить влияние Ар₄А, Ар₅А и НАД⁺ на биоэлектрическую активность рабочего миокарда сердца млекопитающих;
3. Изучить эффекты Ар₄А, Ар₅А и НАД⁺ на биоэлектрическую активность пейсмекерного миокарда и проводящей системы сердца млекопитающих;
4. Провести анализ сократимости коронарных артерий под влиянием Ар₄А, Ар₅А и НАД⁺;

5. Выяснить рецепторные механизмы действия внеклеточных Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ в миокардиальной ткани сердца;
6. Оценить эффекты и механизмы действия Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ у различных видов млекопитающих;
7. Определить основные внутриклеточные сигнальные каскады, обуславливающие действие Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на биоэлектрическую активность предсердного миокарда;
8. Определить основные внутриклеточные сигнальные каскады, обуславливающие влияние Ar_4A , Ar_5A на сократимость желудочкового миокарда.

Научная новизна исследования

1. В данной работе впервые показано, что Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ обладают кардиотропной активностью в различных отделах сердца млекопитающих;
2. Впервые исследована роль экзогенных Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ в изменении биоэлектрической активности сердца млекопитающих, а именно: соединения влияют на длительность потенциалов действия в предсердном и желудочковом миокарде;
3. Установлено, что Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ влияют на пейсмекер сердца и электрическую активность проводящей системы желудочков. Основным эффектом исследуемых соединений является снижение частоты спонтанных ПД в пейсмекерном миокарде;
4. Впервые проведен анализ сократимости коронарных артерий под влиянием Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$; установлено, что Ar_5A обладает коронарokonстрикторными свойствами, а $НАД^+$ - коронародилататорными;
5. Исследована роль экзогенных Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ в изменении сократительной активности сердца млекопитающих: показано, что Ar_4A и Ar_5A , но не $НАД^+$ обладают отрицательным инотропным эффектом;
6. Впервые изучено влияние Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на колебания уровня цитоплазматического кальция $[Ca^{2+}]_i$ в изолированных желудочковых кардиомиоцитах крысы; впервые продемонстрировано, что Ar_4A и Ar_5A , но не $НАД^+$ снижали амплитуду колебаний $[Ca^{2+}]_i$;

7. В данной работе впервые показано, что Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ могут быть агонистами как пуриновых $P1$ -рецепторов, так и $P2$ -рецепторов в миокарде млекопитающих;

8. Установлено, что внутриклеточные механизмы, определяющие действие Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ различаются у разных видов млекопитающих: в миокарде морских свинок основным механизмом при действии указанных пуриновых соединений может являться активация тока $I_{K_{Ach/Ado}}$, тогда как в сердце крыс - активация фосфодиэстераз (ФДЭ) под действием протеинкиназы C .

Теоретическая и практическая значимость

Работа направлена на исследование кардиотропной активности и механизмов действия нового класса физиологически активных соединений – диаденозиновых полифосфатов, а также эффектов и механизмов действия в сердце внеклеточного $НАД^+$.

В ряде работ указывается, что в ткани сердца, а также в нервных окончаниях вегетативной нервной системы в значительном количестве содержатся $НАД^+$ и соединения, относящиеся к классу диаденозиновых полифосфатов - это диаденозин тетрафосфат (Ar_4A) и диаденозинпентафосфат (Ar_5A). Показано, что $НАД^+$ содержится в нервных окончаниях [Pareira et al., 2000; Mutafova-Yambolieva et al., 2014], иннервирующих различные отделы сердца, однако, его физиологическая роль не выяснена.

В настоящее время физиологическая активность диаденозиновых полифосфатов интенсивно исследуется, предполагается, что эти соединения являются эндогенными нейрогуморальными факторами. Преобладающее количество работ направлено на изучение роли данных соединений в регуляции тонуса и функционирования гладкой мускулатуры [Pohl et al., 1991; Sumiyoshi et al., 1997; Abbracchio et al., 1998; Stavrou et al., 2001; Kaiser et al., 2002; Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Durnin et al., 2012; Mutafova-Yambolieva et al., 2012; Mutafova-Yambolieva et al., 2014; Burnstock et al., 2017]. Однако, комплексного исследования влияния диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$ на миокард различных отделов сердца ранее не проводилось.

Следует особо отметить, что в ходе выполнения работы изучено влияние вышеуказанных соединений на аритмогенный субстрат, которым является миокард легочных вен. Полученные результаты позволяют оценить потенциальную про- или

антиаритмогенную активность диаденозиновых полифосфатов и их производных. Помимо выяснения возможного действия исследуемых соединений на потенциальные очаги аномальной активности, впервые проведено изучение влияния диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ на биоэлектрическую активность пейсмекерного миокарда и элементов проводящей системы сердца.

Таким образом, данная работа направлена на решение фундаментальной задачи – изучение нового механизма регуляции работы сердца, исследование роли диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ как потенциальных факторов, дополняющих вегетативный нервный контроль деятельности пейсмекера и рабочего миокарда.

Методология и методы исследования

В представленной работе для изучения эффектов исследуемых соединений на биоэлектрическую активность проводили эксперименты с использованием различных изолированных перфузируемых многоклеточных препаратов сердца млекопитающих методом микроэлектродной внутриклеточной регистрации. Для исследования действия пуриновых соединений на сократительную активность осуществляли стандартную нормоксическую ретроградную перфузию изолированного сердца крысы по Лангендорфу. Для исследования рецепторных и электрофизиологических механизмов действия пуриновых соединений помимо микроэлектродной техники использовался метод пэтч-кламп (Patch-clamp) в конфигурации whole-cell. Влияние диаденозиновых полифосфатов и их производных на колебания уровня цитоплазматического кальция в желудочковых кардиомиоцитах осуществляли при использовании двух вариантов метода «кальциевого имиджинга». Наконец, исследовали сократительные ответы изолированных сосудов при действии пуриновых соединений в изометрическом режиме с использованием системы Wire Myograph.

Эксперименты по выявлению эффектов пуриновых соединений на биоэлектрическую и сократительную активность, на динамику сократительного ответа сосудов, исследования методом Patch-clamp были проведены на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Положения, выносимые на защиту

1. Внеклеточные Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ являются физиологически активными соединениями в сердце, так как могут оказывать непосредственное влияние на биоэлектрическую активность всех его отделов в том числе, на сократимость желудочкового миокарда;
2. Внеклеточный диаденозиновый пентафосфат и $НАД^+$ способны регулировать тонус коронарных артерий;
3. Внеклеточные Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ в миокарде млекопитающих являются агонистами пуриновых рецепторов;
4. Внутриклеточным механизмом передачи сигнала при активации пуриновых рецепторов Ar_4A , Ar_5A в кардиомиоцитах может являться активация тока $IK_{Ach/Ado}$ либо, обусловленная протеинкиназой С, активация цитоплазматических фосфодиэстераз;
5. Рецепторные и внутриклеточные механизмы действия Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ в миокарде разных видов животных могут различаться.

Степень достоверности данных

Представленные в работе данные получены с использованием современных общепринятых экспериментальных методик; результаты, представленные в работе, статистически достоверны и воспроизводимы. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальной тематической литературы.

Публикации

По результатам работы опубликовано 27 печатных работ: 12 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus, и 15 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Апробация результатов

Результаты данной диссертационной работы были представлены на XXIII съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова, (Воронеж, Россия 2017); на Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Austrian Physiological Society (FEPS 2017), (Вена, Австрия), (FEPS 2015. Каунас, Литва), FEPS 2014, (Будапешт, Венгрия); на Scandinavian Physiological Society Annual Meeting (SPS 2016, Осло,

Норвегия); на VI Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии кровообращения, МГУ имени М.В. Ломоносова, (Россия 2016); на XIII Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике», (Сыктывкар, 2014) и других конференциях.

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры человека и животных Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 08 октября 2018 года.

Личный вклад автора

Соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: планировании экспериментов, подборе диапазона концентраций исследуемых соединений, проведении экспериментов, статистической обработке и обобщении результатов, написании статей и тезисов, представлении результатов работы на российских и международных конференциях.

Структура работы

Материалы диссертационной работы изложены на 178 страницах. Работа состоит из обзора литературы по выбранной теме, описания материалов и методов, использованных при выполнении данной работы, описания результатов и их обсуждения, а также выводов. Диссертационная работа проиллюстрирована 44 рисунками и 3 таблицами. Список использованной литературы включает 350 источников.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Пуринергическая сигнальная (регуляторная) система

Элементами пуринергической регуляторной системы являются пуриновые и пиримидиновые соединения, оказывающие эффекты посредством активации аденозиновых (P1), а также P₂X и P₂Y (P2) мембранных рецепторов [Alexander et al., 2013].

Впервые эффекты адениновых соединений (аденозина и АТФ) в сердце млекопитающих были описаны в 1929 году Drury и Szent-Gyorgy [Drury et al., 1929]. Впоследствии появился ряд исследований, посвященных изучению влияния пуриновых соединений на сердечно-сосудистую систему [Gaddum et al., 1933; Burnstock, 1972; Burnstock, 1978]. Было показано, что во многих висцеральных тканях наблюдаются нейрогенные ответы, которые не подавляются адрено- или холинергическими блокаторами [Burnstock et al., 2010]. Установлено, что эти ответы опосредуются пуриновыми нуклеотидами и нуклеозидами [Burnstock, 1972; Burnstock et al., 2007; Burnstock et al., 2009b]. В то же время, обнаружено, что АТФ, аденозин и ряд других нуклеотидов могут выделяться нервными [White, 1984] и гладкомышечными клетками [Katzuragi et al., 1991], клетками сердечной мышцы [Forrester et al., 1990; Katzuragi et al., 1993], эндотелиальными клетками [Pearson et al., 1989] и др. Вскоре было показано, что на поверхности клеток практически всех тканей имеются специальные рецепторы для пуринов – пуринорецепторы [Burnstock, 1978; Abbracchio et al., 1994]. Эти рецепторы опосредуют влияние пуриновых нуклеотидов на многие внутриклеточные процессы. В 80-х годах было сформировано представление о «пуринергической» системе (наподобие «холинергической») как о регуляторной системе, трансмиттерами сигнала в которой являются пуриновые нуклеотиды. Первоначально предполагалось, что центральными элементами этой системы являются аденозин и АТФ – исходно идентифицированные агонисты пуриновых мембранных рецепторов различных подтипов. Однако, в настоящее время представления о пуринергической системе существенно расширяются. Показано, что помимо вышеуказанных «классических» агонистов, существенную физиологическую роль играют и другие эндогенные пуриновые или «пуриноподобные» соединения [Ogilvie et al., 1996]. Установлено, что диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺, т.е. соединения, имеющие достаточно сложную структуру, являются активными

агонистами пуринорецепторов. Физиологические эффекты таких соединений изучены только отчасти.

При изучении рецепторных и внутриклеточных механизмов действия сложных пуриновых или «пуриноподобных» соединений наиболее логичным является их функциональное физиологическое сопоставление с «классическими» пуриновыми агонистами. Поэтому, в первой части данного обзора подробно рассмотрены метаболизм и свойства, а также физиологические регуляторные функции аденозина, АТФ как агонистов пуринорецепторов.

2.2. Метаболизм пуриновых соединений

Такие внутриклеточные пурины, как аденозин, АМФ, АТФ, гуанозин, инозин, ГТФ абсолютно необходимы для функционирования живой клетки. Они выступают в качестве макроэргов, входят в состав нуклеиновых кислот, различных ферментов и коферментов. Внеклеточные пурины, в качестве нейротрансмиттеров и паракринных факторов участвуют в регуляции вегетативных реакций, тканевых и клеточных функций. Для понимания функционирования пуринергической системы необходимо рассмотреть основные стадии метаболизма пуринов.

Пути биосинтеза, взаимопревращения, расщепления пуринов достаточно сложны. Основным исходным соединением при внутриклеточном синтезе пуриновых нуклеотидов является инозин-монофосфат – ИМФ. Синтез пуриновых оснований (то есть АМФ и ГМФ) на основе ИМФ требует затраты значительного количества энергии в форме АТФ, АМФ и ГМФ служат источником более сложных пуриновых соединений. Синтез ГТФ осуществляется в две стадии посредством переноса макроэргических фосфатных групп с АТФ. Синтез же АТФ из АДФ в митохондриях осуществляет фермент АТФ-синтаза.

Внутриклеточный метаболизм пуринов является предметом самостоятельных биохимических исследований. Некоторые этапы расщепления АТФ и других пуриновых нуклеотидов могут протекать внеклеточно. Важно, что в процессе преобразований внеклеточных пуринов могут образовываться физиологически активные метаболиты.

У человека конечным продуктом расщепления пуриновых соединений является мочевая кислота (Рисунок 2.1). Основным эндогенным физиологически активным

метаболитом является нуклеозид аденозин (молекула которого состоит из аденина и остатка рибозы). В нормальных условиях аденозин непрерывно образуется как внутри клетки, так и во внеклеточной среде.

В образовании аденозина и мочевой кислоты при расщеплении пуринов принимает участие целая группа ферментов (Рисунок 2.1). Особое значение с точки зрения физиологии имеют специфические фосфатазы, или 5'-нуклеотидазы (NT5), которые обеспечивают гидролитическое отщепление фосфатного остатка от пуриновых нуклеотидов. 5'-нуклеотидазы локализованы в цитоплазме, на поверхности различных клеток, а также циркулируют в крови. Мембранная нуклеотидаза называется экто-5'-нуклеотидазой или CD73. 5'-нуклеотидазы катализируют гидролиз ряда рибозилированных нуклеотидов [Reichard, 1988]. 5'-нуклеотидазы катализируют расщепление АТФ до АДФ и АМФ. АМФ или ИМФ превращаются в аденозин или инозин также под действием 5'-нуклеотидаз.

Активность экто-5'-нуклеотидаз приводит к тому, что физиологическая реакция (например, в ответ на выброс АТФ из нервных терминалей) обуславливается не только самим АТФ, но и непрерывно образующимися АМФ и аденозином.

Помимо экто-5'-нуклеотидаз, расщепление внеклеточного АТФ до АДФ и АМФ происходит при помощи таких ферментов, как трифосфат-дифосфогидролаза (CD39 или ENTPD1), щелочная фосфатаза, пирофосфатаза/фосфодиэстераза [Zimmermann et al., 2000; Alvarado-Cast et al., 2002; Lazarowski et al., 2003; Alvarado-Cast et al., 2005;]. Активность всех этих ферментов влияет на соотношение пуриновых нуклеотидов и нуклеозидов в примембранной области и, соответственно, влияет на характер физиологических реакций, возникающих в ответ на появление пуринов во внеклеточной среде. Завершающие этапы расщепления происходят внутриклеточно.

Далее, от АМФ или аденозина аминогруппа отщепляется гидролитически аденилатдеаминазой с образованием ИМФ или инозина. Пурииннуклеозидфосфорилаза катализирует расщепление N-гликозидной связи в инозине с образованием рибозо-1-фосфата и гипоксантина. Гипоксантин окисляется в ксантин с помощью ксантиноксидазы, которая катализирует и дальнейшее окисление ксантина в мочевую кислоту. Хорошо известно, что такое физиологически активное соединение как кофеин, является производным ксантина. Ксантины способны влиять на физиологические процессы как за счет действия на мембранные рецепторы, так и внутриклеточно.

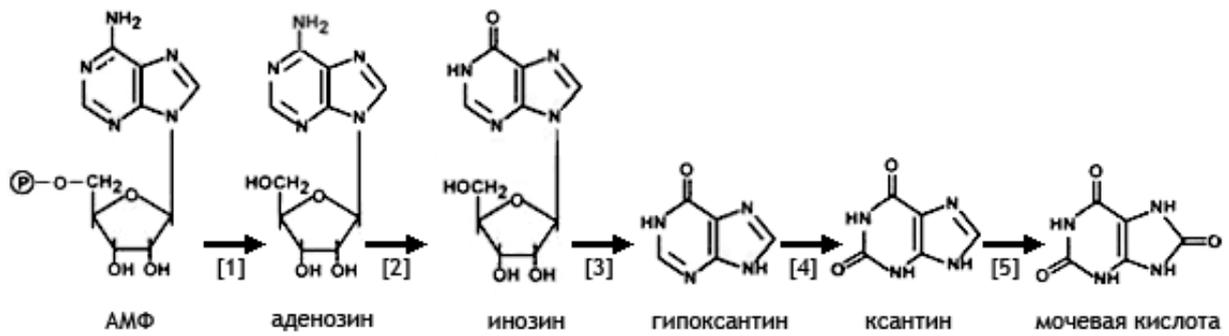


Рисунок 2.1. Внутриклеточные этапы расщепления пуриновых нуклеотидов.

Ферменты, катализирующие реакции: [1]-5'-нуклеотидаза; [2]-деаминаза; [3]-нуклеозид-фосфорилаза; [4], [5] - ксантин-оксидаза.

2.2.1. Структура, внутриклеточный синтез и метаболизм диаденозиновых полифосфатов

Физиологические эффекты, вызванные пуриновыми соединениями, могут быть связаны как с действием непосредственно самих соединений, так и с действием их метаболитов. При этом, при расщеплении пуриновых соединений могут образовываться различные метаболиты в различном соотношении.

Для понимания возможных механизмов реализации данных эффектов необходимо представлять схему синтеза и метаболизма сложных пуринов. Ниже будут рассмотрены синтез и метаболизм диаденозиновых полифосфатов, а также никотинамидадениндинуклеотида.

Диаденозиновые полифосфаты (Ar_nA , $n=2-6$) представляют собой сложные пуриновые соединения, состоящие из двух молекул аденозина, соединенных между собой остатками фосфорной кислоты (Рисунок 2.2).

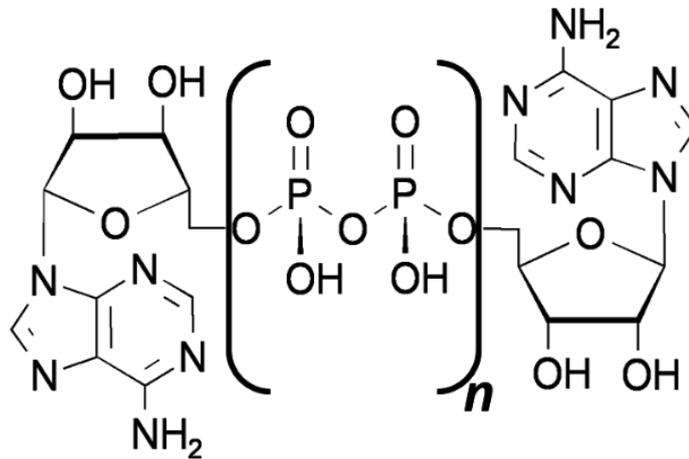


Рисунок 2.2. Структура молекулы диаденозиновых полифосфатов; n -количество остатков фосфорной кислоты, где $n=2-6$.

Синтез диаденозиновых полифосфатов *in vivo* происходит при участии аминоацил-tРНК-синтаз нескольких типов (Рисунок 2.3). Образование диаденозиновых полифосфатов происходит практически во всех типах тканей. Синтез диаденозиновых полифосфатов, и, в частности, диаденозинтетрафосфата, происходит как побочная реакция в ходе синтеза аминоацил-tРНК в результате взаимодействия промежуточного продукта реакции – аминоациладенилата с АТФ (вместо tРНК) [Tshori et al., 2014]. Диаденозинтетрафосфат является основным (относительно остальных Ar_nA) продуктом данной реакции.

Для протекания реакции необходимы двухвалентные ионы (магния или цинка). [Kisselev et al., 1998]. Образование диаденозинпентафосфата и других соединений этого ряда происходит при взаимодействии Ar_4A с аминоациладенилатом. Таким образом, именно Ar_4A является источником других диаденозиновых полифосфатов.

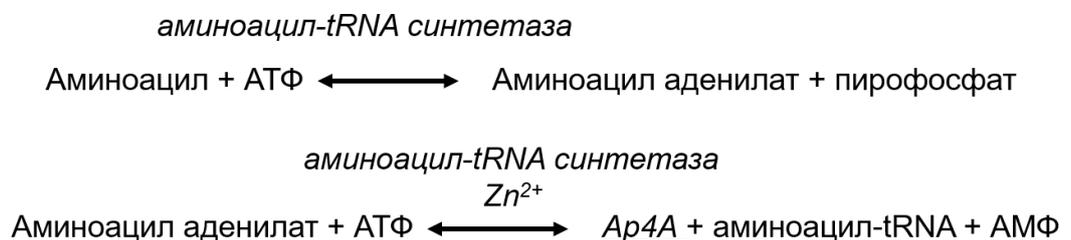


Рисунок 2.3. Синтез диаденозинтетрафосфата.

На рисунке 2.4. приведены основные стадии катаболизма диаденозиновых полифосфатов на примере Ar_5A . Как видно на центральной части рисунка, в основе механизма расщепления сложных пуриновых соединений лежат те же этапы, которые

2.2.2. Метаболизм никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺)

НАД⁺ является соединением пуринового ряда и может рассматриваться как производное диаденозин дифосфата, в котором один аденин замещен на никотинамид. Некоторые этапы расщепления и метаболиты НАД⁺ и АТФ являются общими, что важно для понимания механизмов его действия. Ниже приведены некоторые аспекты метаболизма НАД⁺.

Синтез НАД⁺ происходит внутри клетки. Внутриклеточный синтез таких соединений, как НАД⁺ является сложным, здесь аспекты синтеза НАД⁺ будут приведены очень кратко. Известно два основных механизма синтеза эндогенного внутриклеточного НАД⁺. В первом случае экзогенный никотинамид преобразуется в никотинамидмононуклеотид (НМН) посредством активности никотинамид-фосфорибозил-трансферазы и далее трансформируется в НАД⁺ с участием АТФ-зависимой никотинамид-мононуклеотид-аденилилтрансферазы. Такой путь биосинтеза преобладает у млекопитающих. Второй механизм - синтез НАД⁺ *de novo* из триптофана. В этом случае в биосинтез вовлечено гораздо большее число ферментов и затрачивается значительное количество энергии [Ussher et al., 2012].

НАД⁺, синтезированный внутри клетки, может поступать во внеклеточную среду, где, взаимодействуя с мембранными рецепторами, оказывает регуляторное действие. В результате деградации внеклеточного НАД⁺ образуется ряд физиологически активных соединений [de Figueiredo et al., 2011]. В ранних исследованиях была высказана точка зрения, что регуляторная активность внеклеточного НАД⁺ связана исключительно с такими его метаболитами, как аденозин и АМФ [Mutafova-Yambolieva et al., 2007]. В настоящее время для ряда тканей установлено, что НАД⁺ обладает самостоятельной активностью [Smyth et al., 2004; Breen et al., 2006; Smyth et al., 2006; Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Yamboliev et al., 2009]. Тем не менее, метаболиты и сложные производные внеклеточного НАД⁺ могут дополнять его эффекты.

Известно два основных механизма расщепления внеклеточного НАД⁺:

- (1) - гидролиз до АДФ-рибозы и никотинамида [Broetto-Biazon et al., 2009];
- (2) – гидролиз с образованием АМФ и никотинамидмононуклеотида, (Рисунок 2.4, Рисунок 2.5).

В первом случае, при гидролизе НАД⁺ образуется АДФ-рибоза с помощью β-НАД⁺-глюкогидролаз, которые имеются практически во всех тканях животных. Они локализованы либо в митохондриях, либо в плазматических мембранах [Kim et al., 1993]. Внеклеточная АДФ-рибоза расщепляется до АМФ при помощи эктонуклеазной пирофосфатазы (E-NPPs или CD203).

АДФ-рибоза может быть преобразована в циклическую форму - цАДФ-рибозу при участии АДФ-рибозилциклазы (CD38) (Рисунок 2.5) [Sauve et al., 1998; Kato et al., 1999; Smyth et al., 2006; Mutafova-Yambolieva et al., 2007]. CD38 – трансмембранный димерный гликопротеин, обладающий АДФ-рибозилциклазной, а также цАДФ-рибозилгидролазной активностями [Munshi et al., 2000; Lee et al., 2001; Graeff et al., 2009]. CD38 присутствует в плазматической мембране, на поверхности внутриклеточных везикул. CD38 это полифункциональный фермент, так как участвует в образовании широкого спектра соединений пуринового ряда (цАДФ-рибозы, различных диаденозиновых полифосфатов). Помимо ферментативной функции CD38 обладает функцией трансмембранного переносчика – транспортирует продукт реакции, т.е. цАДФ-рибозу, внутрь клетки. CD38 является основным источником внутриклеточной цАДФ-рибозы. Внутриклеточная цАДФ-рибоза является «вторичным посредником», регулирующим уровень цитоплазматического кальция: цАДФ-рибоза связывается с регуляторным белком FKBP12.6, который, в свою очередь, взаимодействует с рианодиновыми рецепторами и стимулирует выброс ими кальция. Поэтому, CD38 - важный фактор регуляции кальциевого гомеостаза во многих типах клеток.

Как указано выше, другим механизмом гидролиза НАД⁺ является расщепление до АМФ и НМН (Рисунок 2.5). Эту реакцию катализирует пирофосфатаза (CD203), локализованная в клеточной мембране. Образующийся при этом АМФ гидролизуется до аденозина при участии экто-5'-нуклеотидаз. НМН может быть дефосфорилирован 5'-эктонуклеотидазой до никотинамид рибозида (НР). Ранее в нашей лаборатории была протестирована физиологическая активность НМН; нами было установлено, что НМН не обладает физиологической активностью, по крайней мере в сердце: он не оказывает никакого влияния на сократительную и биоэлектрическую активность миокарда [Пустовит и др. 2014]. С другой стороны, хорошо известно, что АМФ является агонистом пуриновых рецепторов, но гораздо более слабым, чем аденозин и/или АТФ.

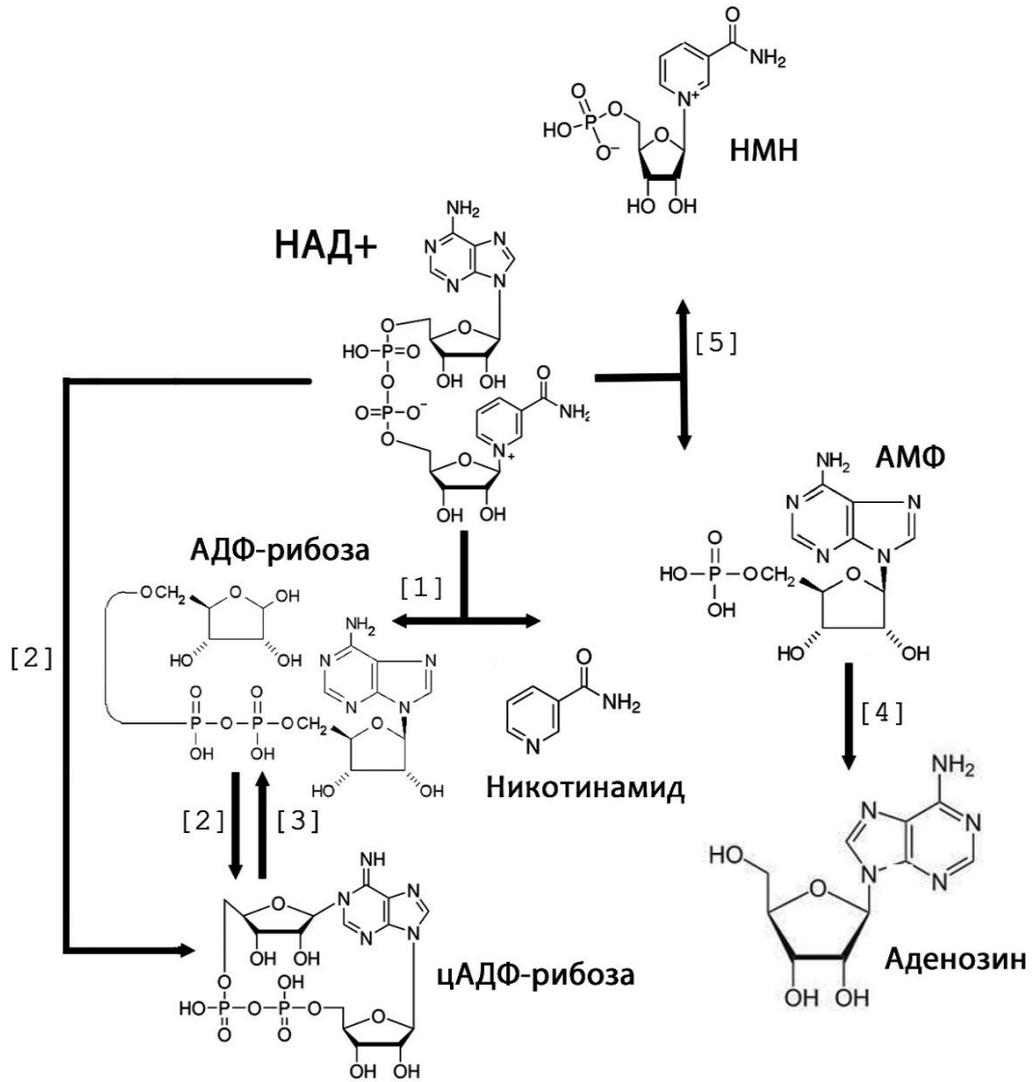


Рисунок 2.5. Некоторые этапы метаболизма внеклеточного НАД⁺.

[1] - β -НАД⁺-глюкогидролазы или АДФ-рибозил-трансфераза; [2] - АДФ-рибозилциклаза; [3] - цикло-АДФР – гидролаза; [4] - экто-5'-нуклеотидаза; [5] - НАД-пиррофосфатаза

2.3. Трансмембранный перенос пуриновых соединений

Поскольку пуриновые соединения синтезируются внутриклеточно, а их мишенями в пуринергической регуляции являются мембранные рецепторы, то для передачи регуляторного сигнала необходимы механизмы трансмембранного переноса и высвобождения пуриновых соединений – атрибуты нейротрансмиттерной системы. В настоящее время известно несколько механизмов, посредством которых пуриновые нуклеотиды, такие как аденозин, АТФ, НАД⁺ и др. могут поступать и накапливаться во внеклеточной среде. В настоящее время больше всего информации имеется о механизмах трансмембранного переноса, высвобождения аденозина и АТФ.

2.3.1. Механизмы накопления аденозина и АТФ во внеклеточной среде

Установлено, что локальная концентрация в межклеточной среде в различных тканях может существенно повышаться в результате поступления аденозина из поврежденных и погибших клеток, достигая концентрации десятков и сотен микромолей [Fredholm et al., 2001; Haskó et al., 2008; Linden, 2001]. Ишемия способствует высвобождению аденозина во внеклеточную среду во множестве тканей [Belardinelli et al., 1921].

В настоящее время известно два основных источника внеклеточного аденозина: трансмембранный перенос (1) и внеклеточное образование аденозина в результате расщепления нуклеотидов-предшественников (2). Как уже было отмечено выше, аденозин образуется из АТФ, АДФ, АМФ, а также НАД⁺ и диаденозиновых полифосфатов в результате их гидролиза.

Трансмембранный перенос аденозина осуществляется с помощью специфических мембранных молекул – «транспортёров нуклеозидов» или «транспортёров аденозина». Существуют как равновесные транспортёры (equilibrative nucleoside transporters, ENT) аденозина, когда перенос возможен в обоих направлениях, и определяется соотношением концентраций аденозина по обе стороны плазматической мембраны [Fredholm et al., 1994], так и транспортёры, работающие против градиента концентрации (concentrative nucleoside transporters, CNT) [Pastor-Anglada et al., 2018]. Концентрирующие переносчики аденозина являются энергозависимыми. Выделено два

подтипа равновесных (ENT1, ENT2) и три подтипа энергозависимых (CNT1-3) транспортеров, однако только CNT2 и CNT3 принимают участие в переносе пуриновых соединений [Baldwin et al., 1999, Eltzschig et al., 2005, Loffler et al., 2007; dos Santos-Rodrigues et al., 2014].

АТФ во внеклеточной среде в нормальных условиях присутствует в наномолярных концентрациях, однако его уровень может сильно изменяться, до сотен миллимолей [Agteresch et al., 1999].

Установлено, что АТФ является котрансмиттером, то есть соединением, которое присутствует в синаптических везикулах совместно с другим (основным) нейромедиатором [Тарасова и др., 2001] в нервных волокнах центральной нервной системы, симпатических и парасимпатических нервных волокнах периферической нервной системы [Mac-Donald et al., 2006; Zhang et al., 2009], а также в моторных волокнах, иннервирующих скелетные мышцы. АТФ, таким образом, поступает во внеклеточную среду совместно с ацетилхолином, норадреналином и другими медиаторами в процессах высвобождения нервными окончаниями [Malomouzh et al., 2011].

Наряду с нервными волокнами, АТФ выделяется во внеклеточную среду при помощи регулируемого экзоцитоза множеством типов клеток – эндотелиальными клетками, различными эпителиальными клетками, клетками иммунной системы. Значительное количество АТФ выделяется во внеклеточную среду при активации тромбоцитов [Weissmuller et al., 2008].

Как и в случае с аденозином, известно несколько механизмов трансмембранного переноса АТФ, которые не связаны с экзоцитозом. Отдельно следует отметить роль мембранных структур, сформированных коннексинами (Cx) или паннексинами (PANX) в высвобождении АТФ [Gaynullina et al., 2015]. Коннексины, а также паннексины известны как структуры, формирующие межклеточные каналы, которые являются элементами щелевых контактов. Полноценный единичный межклеточный канал образован двумя взаимодействующими комплексами молекул - так называемыми «полуканалами» - встроенными в мембраны контактирующих клеток.

Полуканалы, сформированные паннексином-1, называют также – ATP release channel (каналы утечки АТФ; PANX 1) [Huang et al., 2007, Dahl et al., 2013], то есть структурами, специфической функцией которых является высвобождение АТФ.

В настоящее время считается, что именно паннексины совместно с пуриновыми рецепторами играют ключевую роль в реализации локальной межклеточной коммуникации в тканях [Wang et al., 2014].

2.3.2. Пути и механизмы накопления диаденозиновых полифосфатов во внеклеточной среде

Как и в случае с аденозином и АТФ, известно несколько механизмов поступления диаденозиновых полифосфатов во внеклеточную среду. В настоящее время доказано высвобождение Ar_nA из хромафинных клеток [Rodriguez del Castillo et al., 1988], нервных окончаний, синапсом и тромбоцитов [Pintor et al., 1992; Pintor et al., 1995; Jankowski et al., 2009]. Специфических трансмембранных переносчиков молекул диаденозиновых полифосфатов в настоящее время не выявлено.

Концентрация внеклеточных Ar_nA , выделяющихся из хромафинных клеток достигает 30 мкМ [Pintor et al., 1995]. По различным данным, из синаптических терминалей выделяется около 0,1 мкМ внеклеточных полифосфатов [Pintor et al., 1991; Pintor et al., 1993; Pintor et al., 1995]. При дегрануляции тромбоцитов внеклеточная концентрация Ar_nA может достигать 10-50 мкМ [Ogilvie et al., 1992]. Согласно данным [Vartanian et al., 1996; Luo et al., 1999; Westhoff et al., 2003; Luo et al., 2004] концентрация диаденозиновых полифосфатов в миокарде человека достигает миллимолярных значений (0,5 мМ), что значительно превышает концентрации в плазме крови. Предполагается, что адренергическое или холинергическое воздействия могут приводить к локальному повышению внеклеточной концентрации Ar_nA [Luo et al., 1999].

2.3.3. Пути и механизмы накопления НАД⁺ во внеклеточной среде

Существует несколько механизмов, обеспечивающих поступление НАД⁺ во внеклеточную среду:

1. Пассивная диффузия при гибели клеток;
2. Перенос во внеклеточную среду через проницаемые для катионов каналы, либо транспортеры [Billington et al., 2006];

3. Как и АТФ, НАД⁺ может попадать во внеклеточную среду через полуканалы, сформированные коннексинами или паннексинами. В частности, НАД⁺ в нормальных условиях может поступать во внеклеточное пространство посредством коннексина Cx34 [Franco et al., 2001]. «Утечка» НАД⁺ и АТФ через полуканалы является регулируемым процессом: фосфорилирование коннексинов, например, РКС, приводит к изменению их проницаемости для низкомолекулярных соединений, в том, числе и для НАД⁺.

4. НАД⁺ выделяется во внеклеточную среду при помощи регулируемого экзоцитоза рядом эпителиальных клеток;

5. НАД⁺ может выбрасываться из нервных окончаний совместно с норадреналином и АТФ [Rubino et al., 1996; Jovanovic et al., 1998; Burnstock, 2004b; Burnstock, 2006; Burnstock, 2009; Burnstock, 2017].

Таким образом, для переноса НАД⁺ используются практически те же самые механизмы, что и для АТФ. В нормальных условиях в плазме крови человека НАД⁺ содержится в концентрации 50-100 нМ [Moreschi, 2006]. Уровень внеклеточного НАД⁺ существенно увеличивается при повреждении или гибели клеток. Так, в работе Moreschi, показано, что из гранулоцитов человека может выделяться 1-100 мкМ НАД⁺.

Существуют механизмы, ограничивающие накопление НАД⁺ вне клетки. Установлено, что фермент АДФ-рибозилциклаза (CD38) расположен в плазматической мембране в непосредственной близости от полуканалов, образованных коннексинами. Поэтому, «внеклеточный» НАД⁺ будет быстро расщепляться с образованием нескольких метаболитов, включая никотинамид и никотинамидрибозил. Предполагается, что метаболиты транспортируются внутрь клетки, однако, молекулы транспортеры остаются неизвестными.

2.4. Мембранные рецепторы пуриновых соединений

Реализация физиологической активности внеклеточных пуринов, в том числе и диаденозиновых полифосфатов, опосредована специфическими рецепторами, расположенными на мембране клеток и получивших название пуриновых, или Р-рецепторов. Пуриновые рецепторы обнаружены в ЦНС, гладкомышечных клетках,

семенниках, тимоцитах, лимфоцитах, тромбоцитах, пре- и постсинаптических мембранах нейронов, сердце и других клетках, и тканях организма.

Сложность пуринергической сигнальной системы определяется не только значительным разнообразием пуриновых медиаторов, но и количеством пуринорецепторов. В настоящее время выделяют три основных класса пуринорецепторов - аденозиновые рецепторы или **P1**, **P2X**-рецепторы и **P2Y**-рецепторы [Burnstock et al., 1978; Burnstock et al., 1991; Bearder et al., 1994; Darziel et al., 1994; Khaki et al., 2001] (Рис.2.6).

Функциональное разделение пуриновых рецепторов на P1 и P2 типы основано на их различной чувствительности к аденозину и АТФ [Burnstock et al., 1976; Burnstock et al., 1985; Burnstock et al., 1996]. Кроме подтипов пуриновых рецепторов, вошедших в современную классификацию, имеются данные о родственных рецепторах, специфически возбуждающихся аденином [Gorzalka et al., 2005], гуаниловыми нуклеотидами [Schmidt et al., 2007] и динуклеозид-полифосфатами [Hoyle, 1990; Pintor et al., 2000]. Однако, их отношение к семейству пуринорецепторов до конца не установлено.

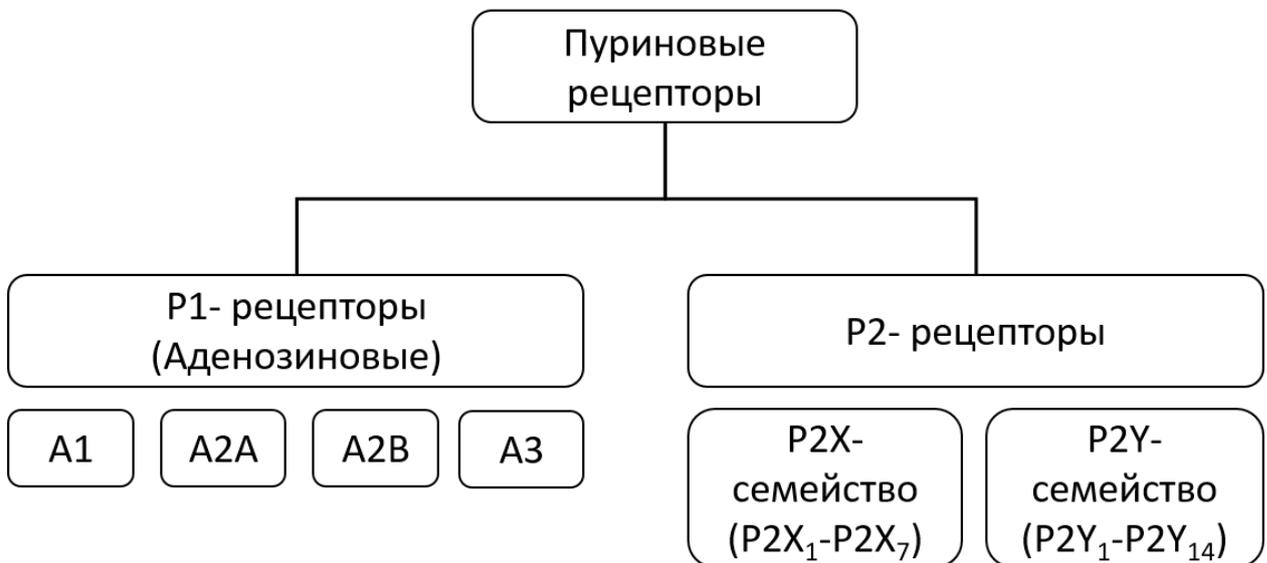


Рисунок 2.6. Классификация пуриновых рецепторов

2.4.1. Рецепторы P1-типа (аденозиновые рецепторы)

Аденозиновые рецепторы являются типичными трансмембранными семидоменными рецепторами (7-ТМ), сопряженными с G-белками. Молекула таких рецепторов, состоит из семи трансмембранных α -спиралей, соединенных тремя внешними и тремя внутриклеточными гидрофильными петлями.

P1-рецепторы разделяют на четыре подтипа: A₁, A_{2A}, A_{2B} и A₃. P1-рецепторы обладают большой афинностью к аденозину и слабой к АТФ. Среди синтетических соединений, производные аденозина являются агонистами, а производные ксантина (метилксантины) антагонистами P1-рецепторов.

2.4.1.1. P1-рецепторы в сердце

В сердце обнаружены все четыре подтипа P1- или аденозиновых рецепторов. Аденозиновые рецепторы имеются как в мембране кардиомиоцитов, так и в мембране гладкомышечных клеток коронарных сосудов. Рецепторы обнаружены в кардиомиоцитах синоатриального (САУ) и атриовентрикулярного (АВ) узла, проводящей системы предсердного и желудочкового миокарда. Существует большое количество литературы, касающейся распределения и уровня экспрессии различных подтипов аденозиновых рецепторов в отделах сердца млекопитающих [Conti et al., 1995; Belardinelli et al., 1989; Lerman et al., 1991; Haleen et al., 1985]. Наиболее распространенным подтипом аденозиновых рецепторов, который экспрессируется в кардиомиоцитах, вероятно является A₁-рецептор [Mustafa et al., 2009], однако в желудочках крысы высока экспрессия рецепторов A_{2A} [Dobson et al., 1977].

Известно, что P1 рецепторы играют существенную роль в контроле тонуса сосудов [Conti et al., 1995]. В гладкой мускулатуре коронарных сосудов человека обнаружены все четыре типа аденозиновых рецепторов, кроме того, A_{2A} и A_{2B} подтипы представлены в эндотелиальных клетках [Olanrewaju et al., 2000; Olanrewaju et al., 2002]. Уровень экспрессии P1-рецепторов в гладкомышечной обкладке коронарных сосудов у разных животных значительно варьирует. Например, у свиней экспрессия A₁ и A_{2A} рецепторов обнаружена в левой передней нисходящей артерии, тогда как A_{2A} рецепторы экспрессируются только в коронарных артериолах [Hein et al., 2001].

2.4.1.2. Внутриклеточные сигнальные каскады, сопряженные с рецепторами P1-типа

A1 аденозиновые рецепторы сопряжены с G_i -, G_o - белками, A3 рецепторы- с $G_{q/11}$ -белком, (Таблица 1). Активация A1 и A3 приводит к ингибированию активности аденилатциклазы (AC), снижению уровня цАМФ, ингибированию протеинкиназы А (PKA), а также активации фосфолипазы C (PLC) (Рисунок 2.7.).

A2A и A2B сопряжены с G_s -белками и их активация, напротив, усиливает работу аденилатциклазы, что ведет к накоплению цАМФ и активации PKA [Fredholm et al., 2000]. Однако в сердце A2A и A2B-рецепторы могут быть сопряжены с $G_{q/11}$ -белками, и взаимодействие этих рецепторов с агонистами может активировать PLC, вызывать накопление инозитолтрифосфата (IP_3), диацилглицерола (DAG) [Woodiwiss et al., 1999].

Существуют и другие внутриклеточные механизмы передачи сигнала при активации аденозиновых рецепторов: например, активация фосфоинозитид-3-киназ (PI-3-K), тирозинкиназ [Tawfik et al., 2005; Peart et al., 2007] (Рисунок 2.7.).

Через некоторое время после связывания лиганда происходит десенситизация аденозиновых рецепторов. Известно два типа десенситизации аденозиновых рецепторов – быстрая и медленная. Первый тип связан с фосфорилированием рецепторов цАМФ-зависимыми киназами и видимо преобладает в регуляции A2A- и A2B-рецепторов. Второй тип - быстрая десенситизация, происходит с участием G-белок-связанных киназ (GRK), которые также фосфорилируют рецептор. Фосфорилированные рецепторы связываются аррестинами [Palmer et al., 1995]. Второй тип преобладает в регуляции A3-рецепторов.

Таблица 1. Подтипы аденозиновых рецепторов, сопряженные с ними G-белки, влияние активации рецепторов на вторичные посредники (↑-накопление или активация; ↓-подавление)

Подтип аденозинового рецептора	Тип G-белка	Вторичные посредники
A1	$G_{i1/2/3}$ G_o	↓ цАМФ ↑ IP_3/DAG (PLC) ↑ PLA2

A2A	G _s	↑цАМФ
	G _{q/11}	↑ IP3/DAG (PLC)
A2B	G _s	↑цАМФ
	G _{q/11}	↑ IP3/DAG (PLC)
A3	G _{i2,3}	↓ цАМФ
	G _{q/11}	↑ IP3/DAG (PLC)

2.4.1.3. Эндogenous и синтетические агонисты и блокаторы рецепторов P1-типа

Как указано выше, основным эндогенным агонистом всех P1 рецепторов является аденозин. A1, A2A и A3 рецепторы имеют очень высокое сродство к аденозину ($K_d=0.01\text{ мкМ}$, они активируются аденозином в концентрации 0,01-1 мкМ); A2B рецепторы активируются при действии аденозина в концентрации более 10 мкМ [Hasko et al., 2008; Eckle et al., 2008].

Целый ряд эндогенных пуриновых соединений может вызвать активацию (в различной степени) P1-рецепторов. АТФ, АМФ в высокой концентрации могут взаимодействовать с аденозиновыми рецепторами и их активировать. Метаболит аденозина - инозин является слабым агонистом A1 и A2 рецепторов, но сильным агонистом A3 [Jin et al., 1997; Fredholm et al., 2001]. В настоящее время показано, что динуклеотид полифосфаты также могут быть агонистами аденозиновых рецепторов. Механизмы активации аденозиновых рецепторов данными соединениями малоизучены [Kunapuli et al., 1998].

В настоящее время известен целый ряд селективных синтетических агонистов и блокаторов всех подтипов аденозиновых рецепторов [Burnstock, 2009]. Структурной основой селективных агонистов, как правило, служит модифицированный аденозин, в состав молекулы которого введено дополнительное бензольное или циклопентановое кольцо. Наиболее известными неселективными антагонистами аденозиновых рецепторов являются кофеин и теofilлин – соединения, являющиеся производными ксантина. Классическими селективными блокаторами отдельных подтипов аденозиновых рецепторов также являются производные ксантина. Ряд синтетических лигандов используется в фармакологии [Muller, 2000; Yan et al., 2003; Jacobson et al.,

2006; Muller et al., 2007; Elzein et al., 2008; Muller, et al. 2011]. Теофиллин используется при лечении обструктивных заболеваний дыхательных путей. Селективные агонисты А1 рецепторов применяют при синусовой тахикардии и тахиаритмиях [Camm et al., 1991].

2.4.2. Рецепторы P2-типа (рецепторы АТФ)

В настоящее время выделяют два семейства P2 рецепторов (или рецепторов АТФ): P₂X- и P₂Y-рецепторы [Burnstock et al., 2004; Burnstock, 2009; Зиганшин и др. 2009]. На данный момент описано 7 подтипов P₂X-рецепторов и 8 подтипов P₂Y-рецепторов [Hoyle et al., 1992; King et al., 2001; Abbracchio et al., 2003; Burnstock et al., 2009; Alexander et al., 2013]. Рассмотрим сначала P₂X-рецепторы.

2.4.2.1 P₂X-рецепторы в сердце, механизмы активации, агонисты и блокаторы рецепторов

P₂X-рецепторы — это трансмембранные белковые комплексы, состоящие из 379-595 аминокислот, имеющие два трансмембранных гидрофобных домена, которые формируют трансмембранную пору, также молекула рецептора имеет большую внеклеточную гидрофильную петлю [Ralevic, 1998; Vassort, 2001; Koles et al., 2007]. Рецепторы P₂X₁₋₇ гомологичны между собой примерно на 30-50% по набору аминокислот. Различия подтипов рецепторов в основном базируются в последовательности С-концевого участка молекулы белка.

P₂X - рецепторы обнаружены как в мембране кардиомиоцитов различных отделов сердца, так и в гладкомышечной обкладке коронарных сосудов. В миокарде обнаружена экспрессия P₂X рецепторов следующих подтипов: P₂X₁, P₂X₂, P₂X₄, P₂X₅ и P₂X₇ [Burnstock, 1999; Vassort, 2001; Burnstock et al., 2006]. Наличие вышеуказанных рецепторов в плазматической мембране кардиомиоцитов было подтверждено с помощью иммуногистохимических методов. P₂X₁ - подтип рецепторов в миокарде наиболее часто обнаруживают в области окончаний нервных волокон [Hansen, 1999]. В предсердии крысы обнаружены P₂X₁, P₂X₂, P₂X₄ и P₂X₇-пуринорецепторы, в желудочковом миокарде - P₂X₄-рецепторы [Vassort, 2001].

По механизму действия P_2X -рецепторы являются лиганд-активируемыми ионными каналами, проницаемыми для ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} [Benham et al., 1987]. Связывание P_2X -рецепторами лиганда обычно приводит к следующим событиям: возникновению входящего неселективного катионного тока и сдвигу мембранного потенциала в положительную сторону (деполяризации). Как правило, деполяризация, вызванная активацией P_2X , приводит к развитию входящего кальциевого тока, который проводится потенциалзависимыми кальциевыми каналами плазматической мембраны $Ca_v1.X$, что способствует дальнейшей деполяризации и дополнительному поступлению Ca^{2+} в цитоплазму клетки. Таким образом, в гладкой мускулатуре активация P_2X приводит к развитию сократительного ответа, возникновению потенциалов действия (ПД), а в кардиомиоцитах - к усилению сократимости [Benham et al., 1987]. Также не следует забывать, что P_2X -рецепторы часто сопряжены с другими рецепторами и каналами («cross-talk»), что также может определять внушительное разнообразие эффектов блокаторов и агонистов этой группы рецепторов [Koles et al., 2008]. В некоторых работах [Barnard et al., 2001] описаны случаи гетеродимеризации P_2Y/P_2X рецепторов.

В ряде работ показано, что пуриновые соединения могут быть модуляторами адренергических, дофаминергических, холинергических и инсулиновых рецепторов [Bobalova et al., 2001; Smyth et al., 2009; Yamboliev et al., 2009]. Одна из функций эндогенных пуринов может заключаться в регуляции физиологической активности клеток различных тканей посредством изменения чувствительности адрено- и холинорецепторов. В то же время, фармакологические эффекты адренергических и холинергических агонистов могут быть частично опосредованы их действием на пуриновые рецепторы [Smyth et al., 2009; Bobalova et al., 2001].

2.4.2.2. P_2Y рецепторы в сердце

Как было указано выше, P_2Y являются 7-ТМ рецепторами, сопряженными с G-белками (Таблица 2, Рисунок 2.7.). Молекула рецептора имеет 7 трансмембранных фрагментов и образует по три внутриклеточных и внеклеточных петли. Различия между подтипами рецепторов касаются в основном трансмембранных сегментов молекулы.

В сердце, как в миокарде, так и в гладкомышечной обкладке коронарных сосудов, обнаружены практически все подтипы P_2Y -рецепторов: P_2Y_{1-14} [Vassort, 2001; Burnstock, 2006]. В работах [Ecke et al., 2008] описываются случаи гетеродимеризации P_2Y_1/P_2Y_{11} рецепторов. Также обнаружены функциональные P_2Y_1 , P_2Y_4 , P_2Y_6 , P_2Y_{12} и P_2Y_{13} гомо-олигокомплексы.

В литературе имеются противоречивые данные относительно распределения подтипов P_2Y -рецепторов в различных отделах сердца. Наиболее вероятно, что большинство подтипов представлено и в предсердном, и в желудочковом миокарде, а также в проводящей системе сердца [Vassort, 2001].

2.4.2.3. Внутриклеточные сигнальные каскады, сопряженные с P_2Y рецепторами

P_2Y -рецепторы сопряжены с $G_{i/o}$ - или $G_{q/11}$ –белками (за отдельными исключениями), поэтому активация данных рецепторов приводит к ингибированию аденилатциклазы и снижению уровня цАМФ, либо к активации фосфолипазы С и протеинкиназы С [Jeffs et al., 1991] (Рисунок 2.7). Как известно, активация PLC приводит к увеличению цитоплазматического уровня IP_3 , уровня цитоплазматического Ca^{2+} , фосфорилированию различных белков кальмодулин-зависимыми киназами [Pearse et al., 1989].

Внутриклеточные сигнальные каскады, связанные с P_2Y и аденозиновыми A_1 , A_3 рецепторами сходятся на уровне аденилатциклазы и фосфолипазы С, поэтому аденозин и АТФ могут вызывать сходные «ингибиторные» физиологические эффекты [Dickenson et al., 1998] (Рисунок 2.7).

P_2Y -рецепторы можно разделить на две группы по механизмам передачи вторичных сигналов: первая включает P_2Y_1 , P_2Y_2 , P_2Y_4 , P_2Y_6 и P_2Y_{11} ; вторая - P_2Y_{12} , P_2Y_{13} , P_2Y_{14} подтипы [Зиганшин и др. 2009] (Рисунок 2.7). P_2Y_{11} обладает особыми свойствами – в отличие от остальных групп P_2Y -рецепторов может быть связан не только с $G_{q/11}$ -белком, но и с G_s -белком (см. Рисунок 2.7).

Пуриновые P_2Y -рецепторы можно классифицировать на основании их фармакологических свойств, в частности, их чувствительности к УТФ, УДФ, АДФ,

УДФ-глюкозе, УДФ-галактозе (Таблица 2), а также синтетическим агонистам [Burnstock 2009; Alexander et al., 2013].

До недавнего времени предполагалось существование специфического рецептора P_2Y -подтипа, эндогенными агонистами которого являются диаденозинтетрафосфат и пентафосфат (Ar_4A , Ar_5A): для данного рецептора была предложена аббревиатура $P_2Y_{Ar_4A}$ -рецептор. Помимо «диаденозинового» рецептора были описаны и другие типы рецепторов, однако позднее они были исключены из классификации вследствие того, что они оказывались либо обычными P_2Y -рецепторами, либо не подтвердили свою функциональную активность [King et al., 2001], поэтому нумерация подтипов рецепторов на сегодняшний день нарушена.

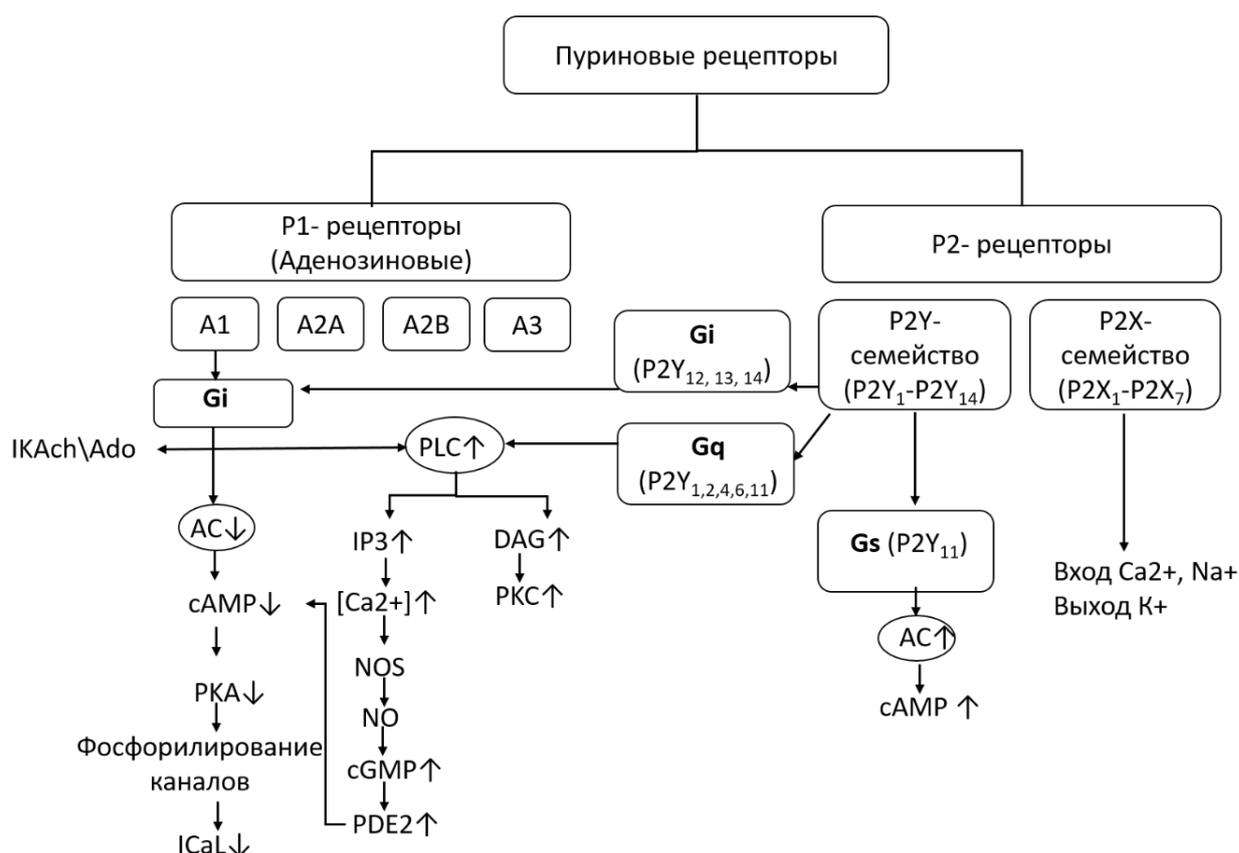


Рисунок 2.7. Пуриновые рецепторы, их возможные эффекторные пути. Для аденозиновых рецепторов рассмотрен каскад реакций только для A1-подтипа рецепторов ввиду его максимальной экспрессии в сердце. Детали передачи сигнала для A2A-, A2B- и A3- подтипов подробно описаны в тексте.

Таблица 2. Подтипы P₂Y рецепторов, сопряженные с ними G-белки, влияние на вторичные посредники.

Подтип P ₂ Y-рецептора	G-белок, регуляция вторичного посредника	Эндогенные агонисты
P ₂ Y ₁	G _{q/11} ; PLC↑	АДФ=АТФ
P ₂ Y ₂	G _{q/11} ; PLC ↑	УТФ=АТФ
P ₂ Y ₄	G _{q/11} ; PLC ↑	УТФ>АТФ
P ₂ Y ₆	G _{q/11} ; PLC ↑	УДФ>УТФ>>АТФ
P ₂ Y ₁₁	G _{q/11} ; PLC ↑ G _s ; AC↑	АТФ
P ₂ Y ₁₂	G _{q/11} ; PLC ↑ G _{i/o} ; ↓ аденилатциклазы	АДФ
P ₂ Y ₁₃	G _{i/o} ; ↓ аденилатциклазы	АТФ=АДФ
P ₂ Y ₁₄	G _{i/o} ; ↓ аденилатциклазы	УДФ-галактоза = УДФ-глюкоза

2.5. Внеклеточные диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ как агонисты пуриновых рецепторов

Предполагается, что диаденозиновые полифосфаты могут быть эндогенными агонистами пуриновых рецепторов различных подтипов [Brandts et al. 2003; Conant et al. 2000; Laubinger et al. 2003; Nahum et al. 2006]. Однако конкретные рецепторные механизмы в сердце остаются неизученными.

Известно, что НАД⁺ является агонистом нескольких типов пуриновых рецепторов [Haag et al., 2007; Hwang et al., 2012; Billington et al., 2006]. В некоторых работах указывается, что тонус сосудов может регулироваться НАД⁺ за счет взаимодействия как с P₁- , так и с P₂X- рецепторами [Alefishat et al., 2015]. Однако в работах [Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Umарathy et al., 2010] исследованы эффекты НАД⁺ в гладкой

мускулатуре и сделано предположение, что НАД⁺ вероятно является агонистом P2-подтипа рецепторов. В целом, на сегодняшний день, количество исследований по уточнению рецепторных механизмов действия пуриновых соединений в миокарде недостаточно.

2.6. Потенциальное физиологическое значение внеклеточных диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺

2.6.1. Диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ в роли нейромедиаторов

Показано, что диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ локализуются не только в нейронах ЦНС, но и в терминалях симпатических и парасимпатических нервных волокон периферической нервной системы [Rubino et al., 1996; Jovanovic et al., 1998; Burnstock 2004b; Burnstock 2006; Burnstock, 2009; Burnstock 2017]. Так, в некоторых работах было показано, что диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ содержатся в синаптических везикулах, и данные соединения выбрасываются при стимуляции из нервных окончаний в синаптическую щель, после чего воздействуют на пресинаптические мембранные рецепторы [Pareira et al., 2000; Mutafova-Yambolieva et al., 2014]. Подобные данные говорят в пользу того, что диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ являются полноценными нейромедиаторами.

В некоторых работах для диаденозиновых полифосфатов предложен термин «алармоны» [франц. *alarme* — тревога], то есть молекулы «сигнала тревоги», выбрасываемые в ответ на стресс (метаболический или оксидативный стресс, «heat shock») во внеклеточную среду. Впервые данный термин применил Дж. Стефенс в 1975 году, в отношении *Salmonella typhimurium* [Stephens et al., 1975]. В настоящее время термин «алармон» применим и к эукариотическим клеткам и тканям [Varshavsky et al., 1983; Lee et al., 1983; Hoyle et al., 1990a; Bo et al., 1994; Baxi et al., 1995; Stavrou et al., 2001; Stavrou 2003].

2.6.2. Диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ в роли котрансмиттеров

Из литературных источников известно, что диаденозиновые полифосфаты, в том числе Ap_4A и Ap_5A , высвобождаются из везикул наряду с катехоламинами [Miras-Portugal et al., 1998]. Также существуют исследования, где показано, что НАД⁺, как и АТФ, является котрансмиттером, и высвобождается вместе с норадреналином (НА) из синаптических везикул [Burnstock 1990; Todorov et al., 1996]. Однако в некоторых работах утверждается, что АТФ совместно с норадреналином содержится в одних везикулах, в то время как НАД⁺ с норадреналином содержится в других пресинаптических везикулах и даже других нервных окончаниях [Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Smyth et al., 2009].

Целый ряд исследований был посвящен изучению НАД⁺ как котрансмиттера в ЦНС и периферической нервной системе. Показано, что НАД⁺ высвобождается синаптическими везикулами из нейронов различных отделов мозга. Также известно, что НАД⁺ выделяется как котрансмиттер при стимуляции постганглионарных нервов в периферической нервной системе. Например, НАД⁺ выделяется вместе с НА из нервных окончаний, иннервирующих гладкую мускулатуру кишечника, мочевого пузыря, различных сосудов [Bobalova et al., 2006; Smyth et al., 2009].

Таким образом, диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ являются котрансмиттерами (комедиаторами), т. е. (1) - соединениями, присутствующими в синаптических везикулах совместно с основными нейромедиаторами, а возможно и полноценными нейротрансмиттерами (2). Помимо этого, для диаденозиновых полифосфатов отводят отдельную тканевую роль локальных ненейрональных регуляторов – «алармонов» (3).

2.7. Кардиотропные эффекты пуриновых соединений

2.7.1. Хронотропные, дромотропные и инотропные эффекты внеклеточного аденозина

Кардиотропные эффекты физиологически активных соединений могут реализовываться посредством их прямого действия на миокард (кардиомиоциты), в результате модулирования симпатических и парасимпатических влияний на сердце (например, регулируя высвобождение норадреналина либо ацетилхолина нервными

окончаниями), а также посредством влияния на коронарные сосуды и кровоток. Пуриновые соединения обладают всеми тремя типами активности. Однако, далее, исходя из поставленных в работе задач, будет рассмотрен преимущественно первый механизм, связанный с прямым (иными словами, «постсинаптическим») влиянием пуриновых соединений на миокард.

Из всех пуриновых соединений лучше всего изучено действие на сердце аденозина. Сравнительно давно обнаружено, что аденозин оказывает отрицательное инотропное, хронотропное и дромотропное влияние в сердце человека и некоторых млекопитающих. В предсердном миокарде, синусном и атриовентрикулярном узлах аденозин оказывает как непосредственное (т.е. действие, наблюдаемое в базальных условиях), так и «косвенное», например, антиадренергическое действие (т.е. действие, наблюдаемое только на фоне адренергической стимуляции). В желудочковом миокарде крупных млекопитающих «отрицательные» эффекты аденозина выявляются только на фоне адренергической стимуляции [Mustafa et al., 2009].

Отрицательный хронотропный эффект аденозина опосредован преимущественно A_1 рецепторами. Как было указано выше, активация A_1 и A_3 рецепторов приводит к снижению уровня цАМФ, усилению калиевых выходящих реполяризирующих токов и подавлению кальциевого тока, протекающего через Ca -каналы L-типа ($I_{Ca,L}$). Аденозин подавляет автоматическую активность синоатриального узла, атриовентрикулярного узла, волокон пучков Гиса и Пуркинье. Аденозин оказывает антиадренергическое действие, т.е. снижает увеличенный норадреналином или бета-агонистами ритм работы сердца [Headrick et al., 2000; Kirchhof et al., 2003; Fabritz et al., 2004].

Важным механизмом действия аденозина в сердце, приводящим к подавлению автоматии, является активация калиевого тока, проводимым каналами аномального выпрямления $Kir3.4$. Эти каналы активируются при связывании свободных $\beta\gamma$ -субъединиц G_i -белка, образующихся, например, при активации A_1 рецепторов аденозина. Те же самые каналы ($Kir3.4$), проводят реполяризирующий ацетилхолинзависимый ток - I_{KAch} , который часто обозначается - $I_{KAch/Ado}$ [Klotz et al., 2000]. Аденозин в синоатриальном узле (САУ) вызывает снижение скорости медленной диастолической деполяризации и фронта потенциала действия, сдвиг максимального диастолического потенциала в область отрицательных значений, ускорение

реполяризации, что и приводит к снижению ритма. Эффекты и механизмы действия аденозина сходны с таковыми для ацетилхолина.

Известно, что аденозин, снижая уровень цАМФ, вызывает подавление активируемого гиперполяризацией «funny» или пейсмекерного I_f тока в САУ [Belardinelli et al., 1988; Zaza et al., 1996]. Известно, что норадреналин активирует I_f ток и $I_{Ca,L}$, вызывая увеличение частоты разрядов пейсмекера. Считается, что антиадренергическое действие аденозина в САУ в большей степени связано с подавлением тока I_f , нежели с активацией $I_{KAch/Ado}$ [Zaza et al., 1996].

Аденозин увеличивает время проведения возбуждения по проводящей системе сердца, может вызывать блокаду проведения в атриовентрикулярном узле (АВ-узле). Плотность рецепторов аденозина максимальна в волокнах Пуркинье, поэтому наибольший эффект аденозина наблюдаются именно в желудочковой проводящей системе [Pelleg et al., 1990].

Электрокардиографическим признаком отрицательного дромотропного действия (т.е. снижения скорости проведения возбуждения) является удлинение PR-интервала поверхностной ЭКГ и АН- и НВ- интервалов внутрисердечной электрограммы. Механизмы отрицательного дромотропного действия аденозина в АВ-узле связаны с активацией A_1 рецепторов, что приводит к снижению уровня цАМФ, подавлению кальциевого $I_{Ca,L}$ и активации калиевого $I_{KAch/Ado}$ токов.

Показано также, что аденозин вызывает увеличение длительности рефрактерности в изолированных клетках АВ-узла [Belardinelli et al., 1981; Clemo et al., 1987; Dennis et al., 1992]. Такой эффект приводит к снижению максимальной частоты импульсов, которую АВ-узел способен пропускать из предсердий в желудочки. Согласно Belardinelli, именно высокий уровень внеклеточного аденозина обуславливает вызванную гипоксией или ишемией блокаду проведения в АВ-узле [Belardinelli et al., 1987].

Активация A_1 аденозиновых рецепторов и, соответственно, тока $I_{KAch/Ado}$, подавление тока $I_{Ca,L}$ в предсердном миокарде вызывает укорочение длительности потенциала действия, уменьшение поступления кальция в клетку, что приводит к снижению сократимости. У мелких млекопитающих аденозин в предсердии способен подавлять базальный ток $I_{Ca,L}$. У крупных млекопитающих и человека аденозин снижает $I_{Ca,L}$ в предсердиях только после предварительной его стимуляции норадреналином

[Belardinelli et al., 1983]. Такие различия, вероятно, обусловлены разницей в базальном уровне цАМФ и базальной активности аденилатциклазы.

В желудочковом миокарде у большинства млекопитающих аденозин, активируя A₁-рецепторы, оказывает выраженные анти-β-адренергические эффекты, укорачивая ПД и снижая сократительную активность [Belardinelli et al., 1983]. Сократительная функция желудочкового миокарда в отсутствие адренергической стимуляции (базальная сократительная активность) при действии аденозина снижается только у хорька и кошки [Belardinelli et al., 1983].

Кирш [Kirsch et al., 1990] в работе с использованием изолированных желудочковых миоцитов крыс высказал предположение, что внеклеточный аденозин способен активировать ток I_{K,ATP}, что должно приводить к усилению отрицательного инотропного эффекта. Впоследствии, данная гипотеза не была подтверждена [Xu et al., 1994].

Наряду с отрицательным инотропным действием, аденозин способен увеличивать сократительную активность миокарда, т.е. вызывать положительный инотропный эффект. Этот эффект опосредуется A_{2A}-рецепторами, активация которых приводит к увеличению уровня цАМФ. Установлено, что у человека A_{2A} экспрессируются преимущественно в правом предсердии. Однако, у крыс экспрессия A_{2A} рецепторов особенно высока в желудочковом миокарде [Dobson et al., 1977], и для них характерен положительный инотропный эффект аденозина. Подобный эффект может быть обусловлен "неклассическими" механизмами. Показано, что селективный агонист A_{2A} рецепторов не влияет на амплитуду I_{Ca,L}, но приводит к уменьшению времени, в течение которого этот ток инактивирован [Hove-Madsen et al., 2006].

2.7.1.1. Антиаритмические и проаритмические эффекты аденозина

Аденозин оказывает одновременно и антиаритмическое и проаритмическое действие. Такая особенность характерна для многих пуриновых нуклеотидов.

Аденозин за счет активации калиевых токов подавляет аномальную автоматию, уменьшает вероятность развития триггерной активности в сердце [Conti et al., 1995]. В то же время действие аденозина приводит к снижению ритма сердца, снижению скорости проведения возбуждения, снижению длительности потенциалов действия и рефрактерности [Pelleg et al., 1996], и, тем самым, способствует возникновению аритмий (облегчает формирование контуров циркуляции возбуждения). Активация A2A рецепторов может способствовать возникновению спонтанной электрической активности в предсердиях [Hove-Madsen et al., 2006]. Проаритмическому действию аденозина способствует то, что A2A рецепторы локализованы с риаудиновыми рецепторами [Venetucci et al., 2007]. Стимуляция A2A рецепторов в предсердиях человека вызывает спонтанные выбросы кальция через риаудиновые рецепторы в цитоплазму, что может приводить к возникновению внеочередных ПД [Hove-Madsen et al., 2006].

С прикладной точки зрения особенности действия аденозина выражаются в том, что в клинике его используют как антиаритмическое средство только в очень ограниченном числе случаев. В некоторых случаях аденозином может быть купирована предсердная или синусная тахикардия [Pelleg et al., 1998]. Однако в основном аденозин применяют при так называемых "АВ-узловых реципрокных тахиаритмиях". Причиной данного нарушения ритма является возвратное поступление возбуждения из желудочков в предсердия по одному из проводящих путей в АВ-узле. Как указано выше, аденозин подавляет проведение в АВ-узле, вызывает АВ-блокаду, что приводит к купированию аритмии. При использовании аденозина в качестве средства для купирования аритмии нормальным эффектом считается желудочковая асистолия в течение нескольких секунд. Аденозин не пригоден для купирования фибрилляции предсердий, однако, благодаря замедлению атриовентрикулярной проводимости, он может вызвать временное снижение частоты сокращений желудочков, что способствует нормализации гемодинамических показателей. Побочным эффектом при введении аденозина часто являются пароксизмы фибрилляции предсердий [Pelleg et al., 2002].

2.7.2. Эффекты внеклеточного АТФ в миокарде млекопитающих.

«Немиокардиальные» механизмы действия АТФ в сердце

АТФ принимает участие в нормальной регуляции работы сердца, так как высвобождается вместе с ацетилхолином и норадреналином из парасимпатических и симпатических нервных окончаний [Fredholm et al., 1982; Mihaylova-Todorova et al., 2001; Boehm et al., 2002]. Существенную роль АТФ играет и в патологических условиях. Внеклеточный уровень АТФ многократно повышается при ишемии миокарда [Iwabuchi et al., 2013]. При ишемии происходит выброс АТФ во внеклеточную среду как самими кардиомиоцитами, так и эндотелиальными клетками коронарных сосудов [Yang et al., 1994; Tarasova et al., 1998].

Кардиотропные эффекты АТФ могут быть связаны как с прямым действием на миокард посредством активации P_2 -рецепторов, так и с действием аденозина, образующегося при его расщеплении. Сохранение эффектов АТФ на фоне действия блокаторов 5'-нуклеотидаз доказывает наличие его самостоятельной регуляторной активности в сердце. Активируя P_2 -рецепторы, АТФ может вызывать как положительные, так и отрицательные хронотропный, инотропный и дромотропный эффекты [Barnard et al., 1994; Bellhansen et al., 1984].

В низких концентрациях АТФ вызывает увеличение ритма и сократимости сердца [Burnstock, 2006]. Положительный хронотропный и инотропный эффекты АТФ связывают с усилением поступления кальция в цитоплазму кардиомиоцитов через P_2X -рецепторы [Ralevic et al., 1991; Scamps et al., 1996]. АТФ, применяемый в низких концентрациях, *in vivo* вызывает кратковременную тахикардию [Barnard et al., 1994; Bellhansen et al., 1984]. Подобный эффект наблюдается и у крыс [Legssyer et al., 1988]. АТФ в высоких концентрациях замедляет работу сердца, как и аденозин, вызывает атриовентрикулярную блокаду [Vassort, 2001].

АТФ играет крайне важную роль в регуляции работы сердца на уровне ЦНС, поэтому здесь кратко будут рассмотрены «немиокардиальные» механизмы действия пуринового соединения. Преганглионарные парасимпатические волокна, берущие начало в двойном ядре продолговатого мозга, играют важную роль в регуляции работы сердца. Их активация вызывает замедление частоты сердечных сокращений. В ядре

одиночного пути АТФ действует на P₂X-рецепторы, расположенные на пресинаптических окончаниях глутаматергических нейронов [Wang et al, 2006]. Активация P₂X-рецепторов/каналов этих нейронов и поступление кальция в их цитоплазму облегчает секрецию глутамата и приводит к активации парасимпатических преганглионаров и дальнейшему замедлению частоты сердечных сокращений [Griffioen et al, 2007; Jameson et al, 2008a].

ГАМК-ергические и глицинергические нейроны гипоталамуса имеют синапсы с парасимпатическими преганглионарными нейронами. Их активация оказывает тормозное действие на парасимпатические преганглионары. АТФ облегчает выброс тормозных медиаторов, (посредством активации P₂X-рецепторов), которые подавляют активность преганглионарных парасимпатических нейронов. Подобное действие АТФ, вероятно, является механизмом увеличения ЧСС [Jameson et al., 2008b].

Как и аденозин, АТФ может вызывать нарушение ритма сердца. Показано, что применение АТФ способствует нормализации целого ряда аспектов сердечной активности после ишемии [Закс и др., 1988]. Антиишемические и кардиопротекторные свойства АТФ связывают не с прямым его действием, а с действием, образующегося при гидролизе аденозина [Burnstock et al., 1983; Елисеев, 1987; Neumann et al., 1999].

2.7.3. Эффекты внеклеточных диаденозиновых полифосфатов в миокарде млекопитающих

На сегодняшний день в литературе представлено множество разрозненных, часто противоречивых данных о влиянии диаденозиновых полифосфатов на сердечно-сосудистую систему. Некоторые исследования [Kikuta et al., 1994; Kengatharan et al., 1994] проводили *in vivo*, что значительно затрудняет определение точных механизмов действия Ар_nА на миокард ввиду целого спектра потенциальных мишеней этих соединений в сердечно-сосудистой системе. Имеющиеся литературные данные не позволяют получить представление об основной регуляторной роли или механизме действия диаденозиновых полифосфатов в сердце. Ниже приведены сведения, касающиеся исследований, проведенных в различных условиях и моделях с использованием широкого диапазона концентраций Ар_nА.

Внутривенное введение Ar_4A наркотизированным собакам и свиньям вызывало снижение артериального давления на 20-80% от контрольного уровня в зависимости от выбранной концентрации – ($72.5 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ – $675.7 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$). Сердечный выброс при этом увеличивался при применении более низких концентраций Ar_4A , и наоборот - повышался при более высоких [Kikuta et al., 1994]. В данной работе акцентировалось внимание на снижении сердечного ритма под воздействием Ar_4A .

В работе Kengatharan и коллег применение Ar_5A в дозах от 1 до 1000 мкг/кг у анестезированных крыс вызывало гипертензию, сменяющуюся длительной гипотензией [Kengatharan et al., 1994].

В электрофизиологических экспериментах показано, что в миокарде сердца морской свинки, работающем в навязанном ритме, наблюдалось увеличение рефрактерного периода и длительности потенциалов действия под воздействием Ar_3A и Ar_4A в концентрациях меньше 1 нМ [Stavrou et al., 2001]. Известен ряд электрофизиологических эффектов диаденозиновых полифосфатов, влияющих на желудочковую рефрактерность, а также на частоту сердечного ритма в субмикромольных концентрациях [Pohl et al., 1991; Stavrou et al., 1998]. Так, Ar_5A в концентрации 5 мкМ достоверно снижал частоту сердечных сокращений у крысы; Ar_6A (3-10 мкМ) обладал негативными хронотропным и инотропным эффектами в сердце человека и морской свинки.

Также ряд экспериментов был проведен на изолированной папиллярной мышце. В электрически стимулируемой папиллярной мышце морской свинки аппликация Ar_6A (0.1-100 мкМ) была не эффективна, однако на фоне изопреналина (агониста адренорецепторов) показано заметное увеличение сократимости. Подобный эффект наблюдался и в экспериментах с человеческой папиллярной мышцей [Vahlensieck et al., 1996]. Эффект Ar_6A полностью нивелировался блокатором A_1 -пуринорецепторов – DPCPX (0,3 мкМ).

В некоторых работах описываются не только феноменологические явления, но и изучены потенциальные механизмы действия диаденозиновых полифосфатов. Yuan с коллегами исследовал кардиотропную активность Ar_3A , Ar_4A , Ar_5A и Ar_6A в изолированных препаратах предсердия крысы [Yuan et al., 2007]. Было показано, что исследуемые соединения в равной степени влияют на выброс предсердного натрийуритического пептида (ANP) в предсердии, а также вызывают отрицательный

инотропный эффект. Авторы утверждают, что такой эффект обусловлен активацией A1, но не A2- или A3 аденозиновых рецепторов. Связывание молекулы диаденозиновых полифосфатов с A1 рецептором, по мнению авторов, приводит к активации PLC, PKC и АТФ-зависимых калиевых каналов. Также в работе было показано, что применение ингибитора PKA увеличивало выброс ANP в предсердии под воздействием только AP₄A, однако на действие других диаденозиновых полифосфатов эффекта ингибитора замечено не было.

AP₆A в концентрации 100 мкМ не оказал действия на трансмембранный кальциевый ток L-типа в изолированных кардиомиоцитах морской свинки. Однако наблюдалось увеличение I_{CaL} после индукции изопреналином до контрольных значений при дальнейшем воздействии AP₆A [Vahlensieck et al., 1996]. В работе [Brandts et al., 2003] исследовался эффект AP₅A на I_{KACH/Ado} и I_{KATP} в изолированных кардиомиоцитах кролика, однако ни один из токов не активировался при перфузии изучаемым соединением.

2.7.3.1. Влияние внеклеточных диаденозиновых полифосфатов на тонус коронарных сосудов

Помимо исследования роли диаденозиновых полифосфатов в регуляции работы миокарда, в ряде работ проводится изучение сократительного ответа коронарных сосудов при действии AP_nA у различных видов животных.

В экспериментах с изолированным сердцем кролика, в коронарных сосудах при перфузии AP₃A и AP₄A (0,1-1 мкМ) в основном наблюдалась вазодилатация, предположительно опосредованная выбросом газообразного медиатора с образованием простациклина (PGI₂). Также в коронарных сосудах диаденозиновые полифосфаты вызывали вазодилатацию у крыс [Pohl et al., 1991], морских свинок [Stavrou et al., 2001; Kaiser et al., 2002], свиней [Sumiyoshi et al., 1997] и собак [Sugimura et al., 2000] в концентрации от нескольких наномолей до нескольких микромолей – т.е. физиологических концентрациях. Так, в работе [Stavrou et al., 2001] указывается, что в изолированном сердце морской свинки AP₅A и AP₆A вызывают вазодилатацию

коронарных артерий: кратковременную при использовании соединений в концентрации 1 нМ и длительную - при концентрации 1 мкМ.

Однако, в экспериментах [Garcia-Villalon et al., 2009], где было исследовано изолированное сердце крысы, перфузируемое по Лангендорфу, было обнаружено, что в контрольных условиях Ar_5A (0,1-10 мкМ) вызывал слабую коронарострикцию с последующей заметной дилатацией коронарных сосудов, а также снижение силы сокращения левого желудочка и частоты сердечных сокращений. После экспериментальной ишемии и реперфузии, вазоконстрикция в ответ на аппликацию Ar_5A усиливалась, последующая вазодилатация снижалась. Блокатор P_2 -пуринорецепторов PPADS (30 мкМ) уменьшил силу сокращения сосудов до и после ишемии-реперфузии, блокатор NO-синтазы L-NAME (100 мкМ) не влиял на эффект; ингибитор циклооксигеназы меклофенамат (2 мкМ) усилил расслабление в ответ на аппликацию Ar_5A после ишемии-реперфузии.

Исследование Humphrey и коллег показало, что в изолированном сердце крысы Ar_5A в концентрации 5 мкМ увеличивает коронарный проток и давление, развиваемое левым желудочком [Humphrey et al., 1987].

В работе Luo [Luo et al., 2004] было исследовано влияние Ar_4A , Ar_5A и Ar_6A на сердечно-сосудистую систему при холинергической стимуляции. Было показано, что существенное количество пуриновых соединений высвобождается из секреторных гранул при стимуляции вегетативных нервов. Внеклеточные диаденозиновые полифосфаты активируют P_2X -рецепторы гладкомышечных клеток. Эффект, оказываемый Ar_4A , Ar_5A и Ar_6A , согласно Luo, был исключительно вазоконстрикторным. Авторами утверждается, что выброс диаденозиновых полифосфатов может участвовать в регуляции коронарного протока в условиях стресса.

2.7.3.2. Эффекты внутриклеточных диаденозиновых полифосфатов в сердце

Из литературных данных известно, что *внутриклеточная* концентрация диаденозиновых полифосфатов в различных тканях достаточна высока [Jankowski et al., 2009]. Ниже приведем некоторые примеры потенциальных ионных механизмов действия диаденозиновых полифосфатов.

Так, в работе [Nakae et al., 1996] имеются сведения о влиянии диаденозиновых полифосфатов на калиевый АТФ-зависимый ток в кардиомиоцитах. Авторы исследования объясняют электрофизиологический и вазодилататорный эффекты Ar_4A в сердце свиньи вовлечением данного тока.

В работе [Holden et al., 1996] утверждается, что внутриклеточные Ar_nA могут связываться с рианодиновыми рецепторами (RyR) в сердечной мышце крысы (а также в скелетной мускулатуре) и усиливать выброс кальция из СПР. Подобное исследование было проведено также группой ученых под руководством Song [Song et al., 2009]. Было показано, что Ar_5A , а также его оксигенированный аналог – $o-Ar_5A$, могут модулировать работу RyR_2 в кардиомиоцитах овец. В результате экспериментов было показано, что оба соединения имеют сайт связывания на рианодиновом рецепторе и действительно способны изменять активность RyR_2 , особенно в патологических условиях, таких как ишемическое повреждение.

2.7.4. Эффекты внеклеточного $НАД^+$ в миокарде млекопитающих

В настоящее время существуют достаточно большое количество литературы (включая обзорные публикации [Abbraccio et al., 1998; Burnstock et al., 2017]) и данных о влиянии $НАД^+$ на тонус сосудов и гладкую мускулатуру [Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Durnin et al., 2012; Mutafova-Yambolieva et al., 2012; Mutafova-Yambolieva et al., 2014] (см. раздел 2.8.2). Однако сведений о влиянии $НАД^+$ на рабочий или пейсмекерный миокард крайне мало, как и сведений, касающихся регуляции тонуса коронарных сосудов.

На кафедре физиологии человека и животных МГУ было исследовано влияние $НАД^+$ на сократительную функцию сердца лягушки, в котором было показано, что $НАД^+$ в концентрациях 0.6 мкМ, 6 мкМ, 60 мкМ оказывал выраженное отрицательное хроно-инотропное действие [Сосулина, 2000].

2.7.5. Эффекты внутриклеточного НАД⁺ в сердце

В настоящее время существует ряд работ, посвященных изучению регуляторной роли (т.е. роли, не связанной с энергетическим метаболизмом клетки) *внутриклеточного* НАД⁺ и определению ионных механизмов его действия.

Влияние ряда пуриновых нуклеотидов на АТФ-зависимые К⁺-каналы, и, соответственно, АТФ-зависимый калиевый ток (I_{КАТР}) впервые были изучены на линии инсулинпродуцирующих клеток [Dunne et al., 1988]. Было показано, что НАД⁺, НАДФ⁺, НАДН, НАДФН в низких концентрациях (до 100 мкМ) способствовали открытию К⁺ каналов, однако при более высоких концентрациях (500 мкМ и выше) эффект был обратным. Для желудочковых кардиомиоцитов свиньи показано, что НАДН вызывает подавление I_{КАТР}, при этом НАД⁺ не приводил к таким результатам [Pelzmann et al., 2003].

В настоящее время предполагается, что калиевые кальций-чувствительные каналы, проводящие ток I_{КСа}, могут, помимо гладкомышечных клеток, присутствовать и в кардиомиоцитах. В работах Lee и коллег показано, что цитоплазматический НАД⁺ (2 мМ) активирует ток I_{КСа}, тогда как НАДН в той же концентрации имеет обратное действие. Данные исследования были проведены на изолированных клетках гладкой мускулатуры мелких легочных артерий крыс [Lee et al., 1994].

2.8. Немиокардиальные эффекты диаденозиновых полифосфатов и их производных

2.8.1. Роль внеклеточных диаденозиновых полифосфатов в регуляции тонуса гладкомышечных клеток некоронарных сосудов

Исходя из обобщения доступной литературы можно заключить, что А_{рп}А оказывают разнонаправленное действие на тонус сосудов, относящихся к различным участкам сердечно-сосудистой системы [Hoopwood et al., 1987; Kitakaze et al., 1995; Gabriels et al., 2002; Steinmetz et al., 2002;]. Следует повторить, что значительное количество диаденозиновых полифосфатов высвобождается из активированных тромбоцитов при повреждениях сосудов, патологиях и в условиях стресса. Это может приводить к формированию градиента концентрации и профиля состава этих

соединений, чем и может быть обусловлен вазодилатационный или вазоконстрикторный ответ разной интенсивности. Развитие определенного эффекта в той или иной ситуации может зависеть от состояния стенок сосудов и тонуса гладких мышц.

В экспериментах с интактными изолированными брызжеечными артериями кролика, то есть с сохраненным эндотелием, совместная перфузия Ar_3A и Ar_4A (1-10 мкМ) вызывала вазодилатацию. Однако в тех экспериментах, где эндотелий был удален или поврежден, Ar_4A вызывал вазоконстрикцию [Busse et al., 1988; Kikuta et al., 1994].

Согласно Ралевик с соавторами, вазодилатация сосудов будет слабее, а вазоконстрикция на уровень выше при аппликации Ar_nA с длинной фосфатной цепью [Ralevic et al., 1995]. В отдельных экспериментах с изолированной почкой крысы было показано вазоактивное действие Ar_3A и Ar_4A . Оба эти вещества в концентрации 10 мкМ обладали вазоконстрикторным действием в почечных венах [Schluter et al., 1994].

В работе Янковски подробно описан механизм высвобождения Ar_5A и Ar_6A при активации тромбоцитов человека [Jankowski et al., 1999]. Авторы утверждают, что данные соединения играют важную роль в контроле тонуса сосудов. Вазоконстрикторный эффект, наблюдавшийся в почечных венах, был полностью нивелирован блокаторами P_2 -пуринорецепторов: сурамином и PPADS (pyridoxal phosphate 6-azophenyl-2,4-disulfonic acid), что, по мнению авторов, подтверждает активацию P_2X -рецепторов пуриновыми соединениями.

В исследовании Штайнметц и соавторов целью было сравнить эффекты диаденозиновых полифосфатов и их потенциальных метаболитов *in vivo* и выяснить, какими рецепторами опосредован данный эффект [Steinmetz et al., 2000]. Было показано, что исследуемые соединения воздействуют на артериальное давление в разной степени: $Ar_4A \geq Ar_6A > Ar_5A = Ar_3A = АТФ = АДФ > АМФ \geq$ аденозин, что демонстрирует первичность эффекта диаденозинов, но не их метаболитов. Автор утверждает, *in vivo* пурины обладают гипотензивным эффектом, что позволяет рассматривать их как потенциальные лекарственные средства. Гипотензивный эффект Ar_5A снимался блокаторами P_2Y_1 - рецепторов и A_2 – рецепторов [Steinmetz et al., 2000].

Таким образом, диаденозиновые полифосфаты регулируют тонус сосудов разных отделов сердечно-сосудистой системы различных млекопитающих. Однако на сегодняшний день однозначно сказать, за счет какого механизма происходит вазодилатация или вазоконстрикция не представляется возможным.

2.8.2. Роль внеклеточного НАД⁺ в регуляции тонуса гладкомышечных клеток некоронарных сосудов

Показано, что НАД⁺ обладает эндотелий-независимым расслабляющим действием на аорту крысы и коронарную артерию свиньи, однако в экспериментах с брызжеечной артерией свиньи был выявлен вазоконстрикторный дозозависимый эффект НАД⁺ [Alefisat et al., 2015].

Как указано выше, помимо прямого действия на рецепторы гладкомышечных клеток, НАД⁺ может обладать «непрямыми» (нейромодуляторными) эффектами - воздействие на симпатическую иннервацию [Smyth et al., 2004; Breen et al., 2006].

В работах Смита и коллег было показано, что при электрической стимуляции брызжеечной артерии собаки, из симпатических окончаний высвобождается НАД⁺. Внеклеточный НАД⁺ подавляет выброс норадреналина из синаптических терминалей в стенке сосуда. Ингибиторный эффект НАД⁺ был наибольшим, по сравнению с другими пуриновыми соединениями [Smyth et al., 2004; Smyth et al., 2006].

2.8.3. Наиболее значимые некардиотропные эффекты диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺

Одним из важнейших некардиотропных физиологических эффектов, который нельзя игнорировать при обсуждении регуляторной роли диаденозиновых полифосфатов, является выделение Ар_nА из активированных тромбоцитов совместно с АТФ, АДФ и серотонином [Flodgaard et al., 1982; Ltithje et al., 1983; Stavrou et al., 1999]. В различных литературных источниках приводятся данные, где отражено резкое увеличение концентрации внеклеточных диаденозиновых полифосфатов в плазме крови при патологических состояниях.

Экспериментально было показано, что Ар₄А в концентрации 5 мкМ является ингибитором агрегации тромбоцитов, активированных АДФ. Подобное ингибирование обусловлено конкурентным связыванием с P₂-рецепторами Ар₄А [Born et al., 1962; Harrison et al., 1975]. Ар₅А в концентрации 100 мкМ обладает ярко выраженным ингибиторным действием в отношении агрегации тромбоцитов. Также было показано,

что Ar_3A в концентрации выше 0,1 мкМ обладает агрегационным действием, что объясняется быстрым расщеплением Ar_3A до АМФ и АДФ, что и вызывает подобный эффект [Lithje et al., 1984; Gaarder et al., 1961].

НАД⁺ является ингибиторным медиатором (комедиатором) в гладкомышечной обкладке полых органов. Показано, что внеклеточный НАД⁺ оказывает влияние на сократительную активность гладкомышечных клеток обкладки различных органов и стенки сосудов. Так, НАД⁺ подавляет спонтанную сократительную активность гладкомышечных клеток стенки мочевого пузыря [Breen et al., 2006], вызывает вазомоторные реакции в брызжеечных сосудах [Smyth et al., 2009], НАД⁺ регулирует тонус и сократимость гладкомышечных клеток кишечника [Durnin et al., 2012]; увеличивает вход кальция в клетки крови человека и повышение $[Ca^{2+}]_i$ предположительно за счет активации P_2Y_1 или P_2Y_{11} -рецепторов [Grahner et al., 2009; Klein et al., 2009]. Предполагается, что влияние внеклеточного НАД⁺ в гладкой мускулатуре может быть обусловлено именно активацией P_2Y_1 - или P_2Y_{11} -рецепторов [Moreschi 2006; Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Mutafova-Yambolieva et al., 2012]. Оба подтипа рецепторов присутствуют практически во всех висцеральных тканях (гладкой мускулатуре сосудов и полых органов).

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Объекты исследования

В соответствии с поставленной в работе целью эксперименты проводились с использованием изолированных препаратов, выделенных из сердца крысы, кролика и морской свинки (Таблица 3). Использование нескольких видов лабораторных животных обусловлено следующими причинами: (1) основным объектом исследования выбрана лабораторная крыса (*Rattus norvegicus*), большинство препаратов получено от этого животного, для возможности сопоставления эффектов пуриновых соединений в различных отделах сердца; (2) однако, единственным доступным животным, позволяющим получить приемлемые препараты волокон Пуркинье для электрофизиологических исследований, является кролик. Далее, (3) одним из фундаментальных отличий электрофизиологии кардиомиоцитов крысы от крупных млекопитающих и человека является отсутствие так называемых ионных токов I_{K1} и I_{Ks} . Кардиомиоциты морской свинки (*Cavia porcellus*) обладают токами I_{K1} и I_{Ks} . Определение влияния пуриновых соединений важно не только с фундаментальной, но и прикладной точки зрения (так как может играть роль в формировании патологий у человека).

В работе было использовано 376 самцов белых (аутбредных) крыс (300-350 г, 3-5 мес.) (исследование биоэлектрической и сократительной активности сердца - $n=346$, «кальциевый имиджинг» - $n=15$, исследование сократительного ответа изолированных сосудов - $n=15$); самцов аутбредных морских свинок (250-300 г, 3-4 мес.) в электрофизиологических экспериментах ($n=48$) и экспериментах, направленных на регистрацию ионных токов ($n=6$). В работе также было использовано 13 самцов кроликов породы шиншилла (2000-2500 г, 4-5 мес.). Перед экспериментами животных содержали в виварии в течение 2 недель в стандартных условиях при 12 часовом световом дне с доступом к питью и еде *ad libitum*.

3.2. Типы препаратов сердца

В работе были использованы различные типы препаратов сердца лабораторных животных (Таблица 3). Для регистрации сократительной активности использовали изолированное сердце (1) с дальнейшей перфузией по Лангендорфу; в экспериментах по регистрации биоэлектрической активности (потенциалов действия) выделяли изолированные многоклеточные препараты различных отделов сердца (2): ушко левого предсердия, участок правого предсердия, включающий синоатриальный узел (САУ), участок стенки желудочка, участок межпредсердной перегородки, миокардиальная ткань легочных вен (ЛВ), волокна Пуркинье. Также в работе использовали энзиматически изолированные кардиомициты желудочков сердца (3). Динамика сократительного ответа сосудов исследовалась на препаратах изолированных коронарных артерий (4).

Таблица 3. Основные объекты исследования, типы препаратов.

Вид животного	Тип препарата	Цель
Крыса	Изолированное сердце	Регистрация сократительной активности
	Многоклеточные препараты различных отделов сердца	Регистрация биоэлектрической активности
	Изолированные коронарные артерии	Определение тонуса сосудов
	Кардиомициты желудочка	Кальциевый имиджинг
Морская свинка	Многоклеточные препараты различных отделов сердца	Регистрация биоэлектрической активности
	Кардиомициты предсердия	Пэтч-кламп
Кролик	Изолированные волокна Пуркинье	Регистрация биоэлектрической активности

3.3. Внутриклеточная регистрация потенциалов действия в различных отделах сердца

3.3.1. Выделение многоклеточных препаратов сердца лабораторных животных

Для оценки влияния пуриновых соединений на биоэлектрическую активность сердца регистрировали потенциалы действия в многоклеточных изолированных перфузируемых препаратах сердца. Для получения многоклеточных препаратов животных декапитировали (выбор данного метода эвтаназии обусловлен необходимостью получения жизнеспособных препаратов сердца), вскрывали грудную клетку, извлекали сердце и помещали в емкость с перфузионным раствором комнатной температуры. В аорту вводили канюлю, соединенную со шприцем, содержащим перфузионный раствор. Сердце промывали раствором, вытесняя кровь из предсердий, желудочков и коронарных сосудов. Процедуру повторяли до полного промывания сердца от крови. Далее проводили выделение определенных миокардиальных препаратов различных отделов сердца.

3.3.1.1. Препараты правого предсердия и синусного узла крысы и морской свинки

Для выделения препарата правого предсердия (ПП) крысы и морской свинки сердце фиксировали правым предсердием вверх, вводили браншу ножниц в нижнюю полую вену и делали разрез к ушку правого предсердия, вырезали стенку правого предсердия с ушком, вскрывали верхнюю и нижнюю полые вены, раскрывая препарат таким образом, чтобы эндокардиальная поверхность была доступна для введения микроэлектрода. В экспериментах с препаратом, работающем в навязанном ритме, удаляли всю межвенную область, включающую САУ. В части экспериментов ПД отводили от синоатриального узла крысы и морской свинки. В таких экспериментах изоляцию правого предсердия выполняли так, чтобы препарат включал синусный узел, основания верхних и нижних полых вен, межвенную область, пограничный гребешок, часть ушка правого предсердия (Рисунок 3.1.).

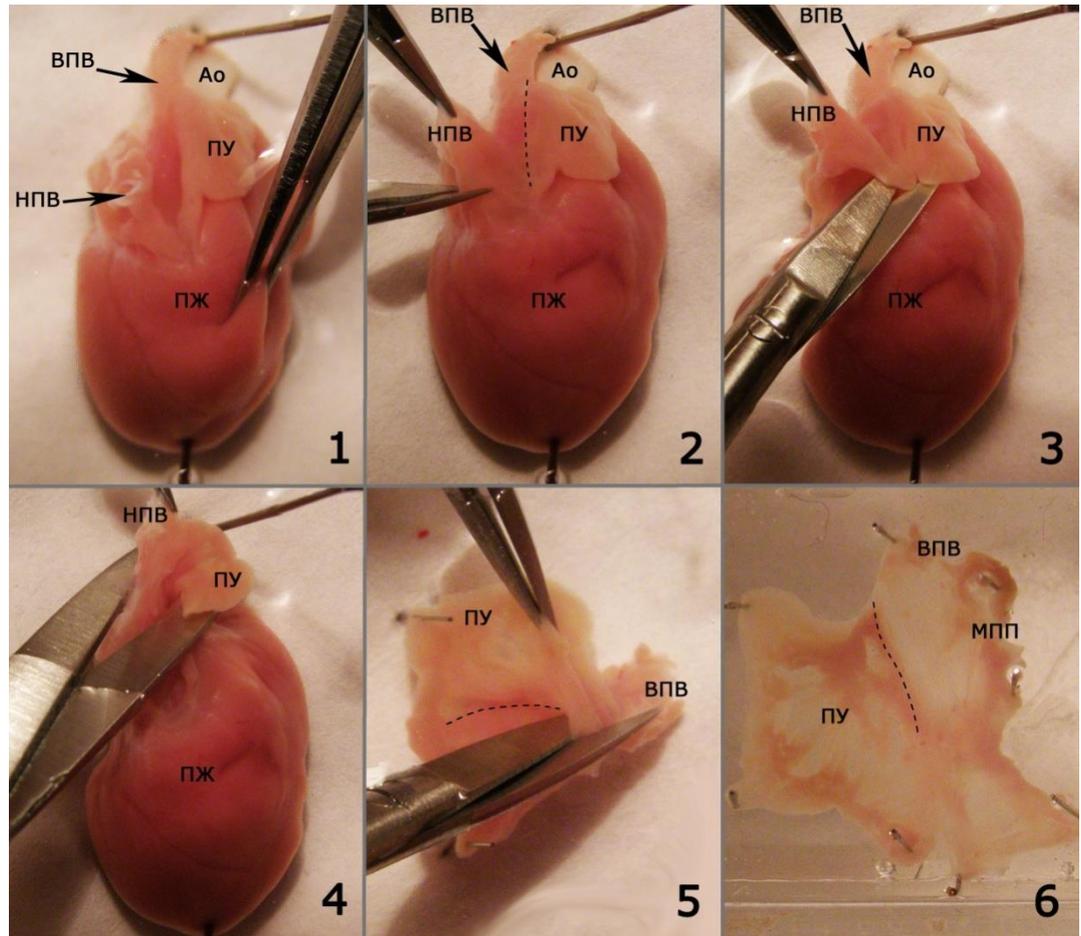


Рисунок 3.1. Выделение правого предсердия крысы. 1 – фиксация стенки правого желудочка; 2 – надрез стенки правого предсердия; 3 – надрез ушка правого предсердия; 4 – отделение правого предсердия, включающее межвенную область; 5 – разрез верхней полой вены; 6 – препарат правого предсердия. ПЖ – правый желудочек, ПУ – ушко правого предсердия, НПВ – нижняя полая вена, ВПВ – верхняя полая вена, Ао – аорта, МПП – межпредсердная перегородка, пунктиром обозначена в (2) – пограничная бороздка, в (5), (6) – пограничный гребешок.

3.3.1.2. Препараты левого предсердия с участками легочных вен сердца крысы

Сердце выделяли и промывали перфузионным раствором так же, как описано в пункте 3.3.1., за исключением того, что сердце извлекали вместе с долями легких. Сердце и легкие затем закрепляли в емкости с перфузионным раствором.

Выделяли препараты, включающие левое предсердие и легочную вену левой доли легкого (Рисунок 3.2.). Для этого делали надрез в области границы левого

желудочка с левым предсердием, далее вели разрез вдоль межпредсердной перегородки, и отделяли левое предсердие вместе с легочными венами и легкими от сердца. Отсекали доли легких дистальнее первой бифуркаций легочных вен.

Препарат переносили в камеру с перфузионным раствором, фиксировали эндокардиальной стороной вверх. Далее, делали разрез в области ушка предсердия, а также вдоль продольной оси легочной вены. Разворачивали и фиксировали препарат в перфузионной камере, делая доступной эндокардиальную сторону препарата. Потенциалы действия отводили в области свободной стенки левого предсердия либо в легочной вене.

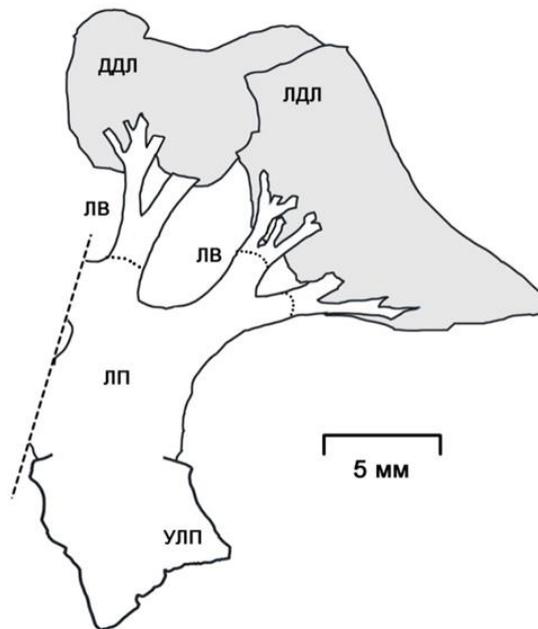


Рисунок 3.2. Схема части суправентрикулярной области, включающей ушко левого предсердия (УЛП), свободную стенку левого предсердия (ЛП), легочные вены (ЛВ) левой (ЛДЛ) и добавочной (ДДЛ) долей легких. Пунктиром отмечены места разрезов при выделении препаратов.

3.3.1.3. Препараты стенки правого желудочка крысы

Сердце крысы выделяли и промывали перфузионным раствором аналогичным образом (раздел 3.3.1.). Сердце закрепляли в препаровальной ванночке с перфузионным раствором комнатной температуры. Делали надрез в области верхушки сердца, который продолжали до атриовентрикулярной границы, вскрывая правый

желудочек. Отводили внешнюю стенку правого желудочка. Затем отрезали полоску желудочкового миокарда шириной 4-5 мм. Препарат стенки правого желудочка фиксировали и растягивали в перфузионной камере эндокардиальной стороной вверх.

3.3.1.4. Препараты межпредсердной перегородки сердца крысы

Сердце промывали перфузионным раствором и закрепляли в препаровальной ванночке с раствором комнатной температуры. Сердце фиксировали и последовательно отсекали ушко правого и левого предсердия, удерживая сердце пинцетом за верхушку желудочков. Перегородку извлекали и фиксировали в перфузионной камере. Потенциалы действия регистрировали со стороны перегородки, обращенной к левому предсердию в сердце.

3.3.1.5. Препараты волокон Пуркинье кролика

Для изучения влияния диаденозиновых полифосфатов и их производных на проводящую систему сердца проводили эксперименты с регистрацией ПД волокон Пуркинье. Регистрация ПД волокон Пуркинье в сердце крысы затруднена, так как они имеют крайне малый диаметр, большая часть волокон Пуркинье располагается интрамурально - внутри стенок желудочков. В виду этого, использовали препараты изолированных свободнолежащих участков волокон Пуркинье кролика.

Кроликам проводили дислокацию шейных позвонков, вскрывали грудную клетку, извлекали сердце и помещали в емкость с перфузионным раствором комнатной температуры, затем промывали перфузионным раствором. Левый желудочек вскрывали вдоль межжелудочковой перегородки, свободнолежащие участки волокон Пуркинье выделяли из полости желудочка совместно с фрагментами стенки желудочка (таким образом избегали повреждения волокон Пуркинье). Препараты размещали в перфузионной камере.

3.3.2. Перфузия изолированных препаратов отделов сердца крысы, морской свинки и кролика

Изолированные препараты сердца крысы и морской свинки непрерывно перфузировали при 37°C раствором следующего состава (ммоль/литр): NaCl-129, KCl-4, NaH₂PO₄-20.9, MgSO₄-0.5, NaHCO₃-20, CaCl₂-1.2, глюкоза-5; pH 7.2-7.4.

Препарат волокон Пуркинье кролика перфузировали раствором при 37°C следующего состава (ммоль/литр): NaCl – 133.47, KCl – 4.69, NaH₂PO₄– 10.35, NaHCO₃ – 16.31, MgSO₄ – 1.18, CaCl₂ – 2.5, глюкоза – 7.77, pH – 7.2-7.4.

Все растворы непрерывно оксигенировали смесью O₂ (95%) и CO₂ (5%). Скорость протока перфузионного раствора (использовали перистальтический насос BT100-2J (Longerpump, Китай) составляла 10 мл/мин (3 объема перфузионной камеры в минуту).

Поскольку препараты предсердий, правого желудочка, волокон Пуркинье и легочных вен не обладали спонтанной активностью, их постоянно стимулировали при помощи серебряных биполярных электродов (диаметр 1 мм, межэлектродное расстояние 2-3 мм), соединенных со стимулятором NB-Lab DL360 (частота для стимуляции препаратов предсердий, желудочков - 4,5 Гц; для стимуляции препаратов волокон Пуркинье - 2 Гц; длительность импульса - 2 мс, амплитуда устанавливалась в 1,5 раза больше пороговой). Стимулирующие электроды размещали непосредственно на поверхности ткани, обычно около границы препаратов. В случае волокон Пуркинье электроды располагали по обе стороны от волокна, но, не касаясь его. Препарат, включающий САУ крысы, возбуждался и генерировал ПД в собственном ритме. Поэтому, в экспериментах с САУ стимулирующие электроды не использовали.

Перед началом эксперимента препараты адаптировали в перфузионной камере в течение 60-90 мин.

3.3.3. Протоколы экспериментов с регистрацией потенциалов действия

«Феноменологические» эксперименты, направленные на выявление и описание эффектов пуринов в отделах сердца, проводили по следующей схеме: контрольная запись (1 мин), подача Ар₄А, Ар₅А и НАД⁺ и запись ПД (10 мин), затем «отмыв» в

течение 15-20 мин. В экспериментах с препаратами левого предсердия и легочных вен НАД⁺ использовали в диапазоне концентраций 1-100 мкМ; с препаратами правого предсердия и желудочка - 10 и 100 мкМ; с препаратами волокон Пуркинье и САУ - 10 и 100 мкМ. Интервалы времени между повторными введениями (по возрастанию концентрации) составляли 20 минут.

Также в работе были выполнены эксперименты, направленные на сопоставление действия А_{р4}А, А_{р5}А, НАД⁺ и АТФ, аденозина. АТФ и аденозин использовали в концентрациях 10 мкМ, схема экспериментов была та же, что и для диаденозиновых полифосфатов.

Схема экспериментов с использованием блокаторов рецепторов была следующей: контроль - 1 мин, подача блокатора - 10 мин. Затем в течение 10 мин подавали одновременно блокатор и пуриновое соединение (10 или 100 мкМ), далее следовал «отмыв» (15-20 мин). В части экспериментов после записи контроля апплицировали исследуемое вещество (10 мин), и далее сразу же подавался блокатор на фоне действующего пуринового соединения, затем проводился отмыв препарата. Подобный протокол позволял нагляднее продемонстрировать эффективность действия блокатора.

3.3.4. Экспериментальная установка, регистрация потенциалов действия

Потенциалы действия в изолированных многоклеточных препаратах регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники. Для отведения ПД использовали стеклянные микроэлектроды (сопротивлением 10-30 МОм), подключенные к усилителю (А-М system 1600, США). Микроэлектроды предварительно вытягивали на пуллере (Sutter Instrument P-30, США) из медицинских стеклянных катетеров (WPI, США) с внешним диаметром 1,2 мм, внутренним – 0,6 мм. Электрод заполняли электролитом (3М КСl). Усиленный сигнал поступал на АЦП (Е-154, L-card, Россия) и далее записывался и обрабатывался на компьютере с помощью программы «Power Graph 3.3.8» (ООО «ДИСофт» Россия) (Рисунок 3.3.).

Потенциалы действия регистрировали в препаратах рабочего миокарда, легочных вен и САУ с эндокардиальной стороны, в препаратах волокон Пуркинье ПД регистрировали в области «узлов», т.е. участков, имеющих наибольшую толщину.

Стабильного отведения (амплитуда не менее 100 мВ в рабочем миокарде и не менее 60 мВ для ткани водителей ритма) добивались путем погружения микроэлектрода в верхние слои фиксированного в перфузионной камере препарата миокарда при помощи микроманипулятора Narishige MM-3 (Япония).

3.3.5. Анализ потенциалов действия

Для анализа ПД использовали программу MiniAnalysis (Synaptosoft, США), с помощью которой измеряли длительность ПД на уровне 25%, 50% и 90% реполяризации (ДПД25, ДПД50 и ДПД90 %).

В экспериментах с регистрацией ПД синусного узла рассчитывали длительность ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50%), а также скорость нарастания медленной диастолической деполяризации ($V_{мдд}$), частоту спонтанной импульсации и максимальную производную фронта потенциала действия (dV/dt_{max}).

Для построения диаграмм и оценки статистической значимости различий использовали значения ДПД90%, взятые в момент времени, который соответствовал максимальному развитию эффекта после начала подачи исследуемых соединений.

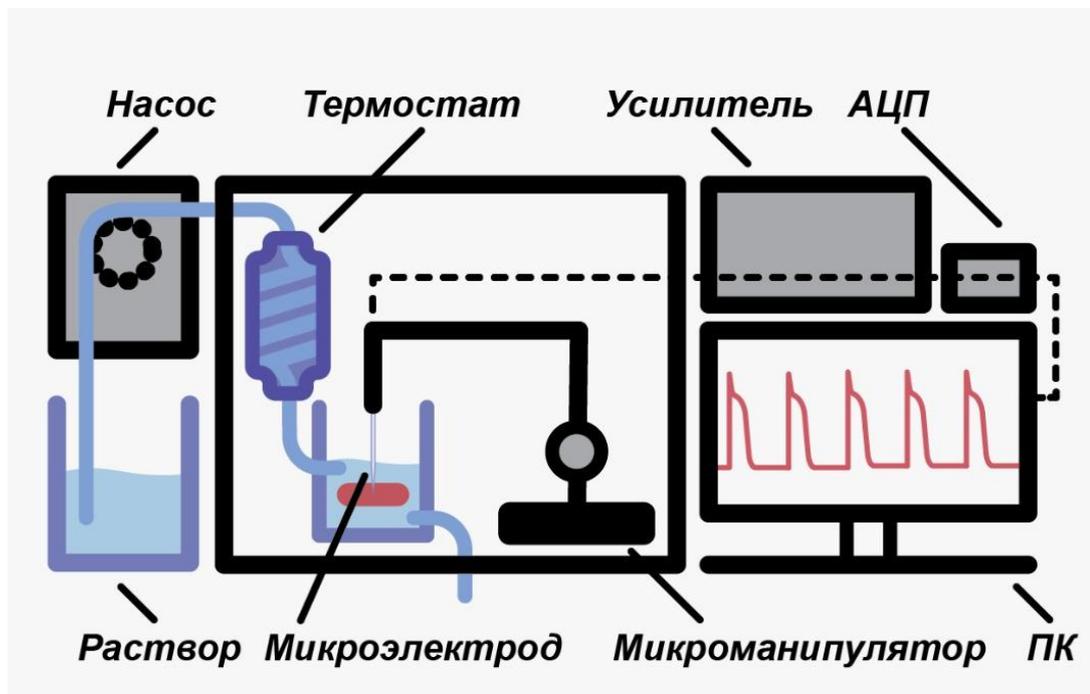


Рисунок 3.3. Блок-схема установки для внутриклеточной регистрации электрической активности (потенциалов действия). Пунктиром обозначен аналоговый сигнал.

3.4. Регистрация сократительной активности сердца

Как указано выше, для оценки влияния диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ на сократительную активность сердца осуществляли стандартную нормоксическую нормотермическую (37°C) ретроградную перфузию изолированного сердца (ИС) крысы по Лангендорфу [Langendorff 1903; Лопухин 1971].

3.4.1 Перфузия препаратов, экспериментальная установка

После декапитации животных, грудную клетку вскрывали, извлекали сердце, помещали канюлю в аорту и перфузировали при 37°C раствором Тироде следующего состава (мМ): NaCl – 118,0, KCl – 4,7, NaHCO₃ – 25,0, MgSO₄ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, KH₂PO₄ – 1,2, глюкоза – 5,5, pH 7,3-7,4. Перфузионное давление было постоянным и составляло 80 мм рт ст.

После присоединения препарата к канюле в полость левого желудочка через надрез в левом предсердии и далее через митральный клапан вводили латексный баллон, соединённый с датчиком давления через катетер. Затем баллон заполняли водой до установления конечно-диастолического давления (LVEDP) в левом желудочке на уровне 5 мм рт ст.

После подключения сердца к установке для перфузии в течение 10 минут производили предварительную адаптацию изолированного сердца. Контрольную регистрацию проводили в течение 5 минут. В ходе эксперимента непрерывно регистрировали и записывали давление в левом желудочке изолированного сердца, используя датчик давления («mpx5050dpt», Motorola Ltd., США), мостовой усилитель сигнала, АЦП (L-card, E-154, Россия, частота оцифровки 1 кГц). Для записи и анализа данных использовали ПО «Power Graph 3.3.8» (ООО «ДИСофт», Россия).

3.4.2. Протокол экспериментов с перфузией изолированного сердца крысы

Регистрацию сократительной активности проводили при навязанном ритме. Для навязывания ритма биполярные стимулирующие серебряные электроды располагали

на поверхности правого предсердия в области синоатриального узла (частота стимуляции составляла 6,25 Гц; интервал между стимулами 160 мс).

Перед началом эксперимента производили предварительную адаптацию сердца, а также запись контрольных значений. Измеряли проток раствора через сердце в течение 1 минуты. Затем, используя медицинский шприцевой инфузор LSP04-1A (Longer Precision Pump Co, Ltd; Китай), устанавливали такую скорость подачи растворов веществ, которая составляла 1% от протока перфузионного раствора через сердце (коронарные сосуды). Вещества поступали в перфузионный раствор через шприц с катетером, установленным в инфузоре. Такой подход позволял задавать необходимую концентрацию соединений в ткани сердца при различном исходно коронарном протоке. Используемые в эксперименте блокаторы или ингибиторы инфузоровали в течение 5 минут, после чего на фоне блокаторов проводили инфузию диаденозиновых полифосфатов или НАД⁺ (10 мкМ) в течение ещё 5 минут. Длительность экспериментов не превышала 40 минут.

3.4.3. Оценка сократительной активности изолированного сердца крысы

Сократительную активность миокарда левого желудочка (иначе «инотропию» или «сократимость», рассматриваемые как эквивалентные термины в контексте данного исследования) и ее изменение оценивали на основе следующих параметров: развиваемое давление (или LVDP), максимальная скорость сокращения (или dP/dt_{max}) и расслабления (или dP/dt_{min}) левого желудочка, а также индекс работы. LVDP рассчитывали, как разницу между конечно-диастолическим и конечно-систолическим давлением каждого сердечного цикла. Для расчета максимальной скорости сокращения и расслабления миокарда использовали максимальное и минимальное значение первой производной функции давления в левом желудочке соответственно. Индекс работы рассчитывали, как произведение ритма и развиваемого давления.

3.5. Регистрация ионных токов в кардиомиоцитах методом Patch-clamp

В ходе выполнения работы было исследовано влияние диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ на калиевые токи аномального (входящего) выпрямления.

3.5.1. Изоляция кардиомиоцитов

Изолированные кардиомиоциты желудочка крысы и предсердия морской свинки получали с помощью энзиматической диссоциации ткани. Животное наркотизировали внутрибрюшинной инъекцией уретана (1 г/кг), после чего вскрывали грудную клетку и быстро вырезали сердце. В аорту вставляли канюлю и в течение 10 минут ретроградно перфузировали сердце по Лангендорфу с постоянным протоком физиологическим раствором следующего состава (моль/л): NaCl - 120, KCl - 5.4, MgSO₄ - 5, Na-пируват - 5, глюкоза - 20, таурин - 20 и Нерес - 10 с pH 7,4 (скорректирован с помощью NaOH), раствор насыщали карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂). Затем 20 минут перфузировали сердце тем же раствором с добавлением коллагеназы типа II (0,3 мг/мл) и 10 мкМ CaCl₂. После этого желудочки отделяли и механически выделяли клетки в растворе «Kraftbruhe» следующего состава (моль/л): KCl - 30, глутамат калия - 50, K₂HPO₄ - 30, MgSO₄ - 3, глюкоза - 20, таурин - 20 и Нерес - 20 с pH 7.4 (скорректирован с помощью KOH) и с добавлением 0,5 mM EGTA (pCa=7.5). Клетки выдерживали в этом растворе при комнатной температуре 2 часа, после чего приступали к регистрации токов. Подобная процедура проводилась для экспериментов по регистрации колебаний уровня цитоплазматического кальция (раздел 3.6.). Кардиомиоциты морской свинки получали сходным образом, однако коллагеназу добавляли в концентрации 0,08 мг/мл, а сердце перфузировали раствором с коллагеназой 15-16 минут. По окончании перфузии предсердия отделяли от желудочков, перед механическим выделением кардиомиоцитов миокард предсердий измельчали ножницами. Кардиомиоциты морской свинки выдерживали в растворе Kraftbruhe 1-1,5 часа.

3.5.2. Регистрация ионных токов

Для регистрации ионных токов методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell использовали усилитель Axopatch 200A (Molecular Devices, США). Клетки располагали в экспериментальной камере объемом 150 мкл, закрепленной на инвертированном микроскопе Nikon Diaphot 200. Регистрацию проводили при комнатной температуре: 24±0,5°C. В камере поддерживали проток внеклеточного физиологического раствора

следующего состава (в ммоль/л): 150 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 глюкозы, 10 HEPES с pH 7,4 (скорректирован с помощью NaOH).

Пэтч-пипетки сопротивлением 2-5 МОм изготавливали с помощью пуллера Narishige PC-10 из боросиликатных стеклянных заготовок диаметром 1,5 мм.

Для регистрации калиевых токов пипетки заполняли раствором следующего состава (в ммоль/л): 140 KCl, 1 MgCl₂, 5 EGTA, 4 MgATP, 10 HEPES, 0.03 Na₂GTP с pH 7.4 (скорректирован с помощью KOH).

Калиевые токи входящего выпрямления вызывали изменением мембранного потенциала по линейному протоколу (Рисунок 4.25. вставка) от +60 до -120 мВ. Токи регистрировали в присутствии во внеклеточном растворе 10 мкМ нифедипина, блокирующего входящие кальциевые токи, а также 5 мкМ E-4031 и 100 мкМ хроманола 293В, подавляющих соответственно быстрый и медленный калиевые токи задержанного выпрямления в кардиомиоцитах морской свинки. Натриевый ток инактивировался благодаря низкому уровню поддерживаемого потенциала, -40 мВ. Таким образом, в этих условиях оставались незаблокированными только токи входящего выпрямления, чувствительные к ионам Ba²⁺ (2 мМ).

Для образования гигаомного контакта пипетку подводили вплотную к мембране кардиомиоцита с помощью гидравлического микроманипулятора Narishige MHW-3, после чего внутри пипетки с помощью шприца создавали отрицательное давление. Для образования отверстия в мембране также прикладывали отрицательное давление, но значительно более резко. Электрическая емкость клетки и сопротивление доступа компенсировались через 20-30 с после образования отверстия. Емкость желудочковых кардиомиоцитов крысы составляла в среднем 105,7±12 пФ, емкость предсердных миоцитов морской свинки - 34,5±6 пФ. При обработке данных, величины токов нормировались на емкость клетки. Для обработки данных использовали программу Clampfit 9.2 (Molecular Devices, CA, США).

3.6. Регистрация колебаний уровня цитоплазматического кальция

Для исследования эффектов пуриновых соединений на динамику цитоплазматического кальция кардиомиоцитах использовали метод «кальциевого имиджинга».

3.6.1. Экспериментальная установка и протоколы

В экспериментах по регистрации колебания уровня цитоплазматического кальция (далее «кальциевых волн») были использованы энзиматически изолированные кардиомиоциты желудочков сердца крысы (14 клеток от 5 животных). Изоляция кардиомиоцитов подробно описана в разделе 3.5.1.

В работе был использован проникающий флуоресцентный зонд Fluo-4AM. Перед регистрацией изолированные клетки помещались в емкость с модифицированным раствором Тироде, содержащим 1 мкл Fluo-4AM (Thermo Fisher Scientific, США) на 100 мкл суспензии клеток, а также 1 мкл 10% р-ра плуроника (f-127), где выдерживались в течение 20-30 мин при 25 С° в темноте. Далее суспензия отмывалась дважды раствором, не содержащим флуоресцентный зонд. После инкубации 250 мкл суспензии помещали в одноразовую перфузионную камеру (bottomglass), фиксированную в препаратодержателе инвертированного микроскопа. Кардиомиоциты в экспериментальной камере перфузировали раствором Тироде, содержащим 1.8 мМ Ca²⁺ (при 22 С°).

Перед началом эксперимента в течение 10-15 минут ждали осаждения клеток на дно камеры. Далее в камеру помещали серебряные электроды, подключенные к электростимулятору WPI Instruments Isostim A320, США. Для возбуждения кардиомиоцитов применяли прямоугольные импульсы длительностью 4 мс и амплитудой 25-30 В, которые следовали с частотой 2 Гц.

Флуоресценцию Fluo-4, пропорциональную цитоплазматической концентрации кальция, регистрировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM700 (Германия) в режиме line-scan (линейное сканирование). Флуоресцентные сигналы регистрировали от отдельных кардиомиоцитов вдоль линии, расположенной перпендикулярно продольной оси клетки, выбранной в той части, где смещение при механическом сокращении было наименьшим (Рисунок 3.4.). Для регистрации

флуоресценции использовали объектив Plan-Apochromat 20x/0,8 M27. Для возбуждения флуоресценции использовали светодиодный лазер с длиной волны эмиссии 488 нм. Мощность возбуждающего излучения подбирали в каждом эксперименте индивидуально. Диапазон детекции флуоресценции составлял 493-800 нм.

В режиме линейного сканирования время одного пробега возбуждающего лазера составляло 30 мкс, при этом линия сканирования включала 96 точек (которые были распределены на отрезке длиной 30-50 мкм в зависимости от поперечного размера кардиомиоцита), а суммарное время воздействия возбуждающего излучения и регистрации флуоресценции от одной точки составляло 0,14 мкс. В ходе одной записи выполнялось 2000 повторных «пробегов» по линии сканирования (с интервалами 1,91 мс) за суммарное время 3,7с.

В ряде экспериментов для оценки кальциевой динамики использовали стандартную флуоресцентную микроскопию. В этих сериях экспериментов кардиомиоциты выделяли, окрашивали и перфузировали по описанной выше методике. Эксперименты выполняли с использованием инвертированного микроскопа ZEISS-Axiovert 200M. Флуоресценцию регистрировали с помощью маслянно-иммерсионного план-ахроматического объектива (ZEISS) x63/1.4 DIC, а также с помощью EMCCD камеры (CarlZeissMicroimaging, GMBH, AxioCamHSm 50–200 fps) при частоте регистрации 30 кадров/с (fps). Флуоресценцию Fluo-4 возбуждали при помощи ртутно-галогеновой лампы HBO 103W/2 (Osram, Germany). Для разделения возбуждающего и эмиссионного света использовали узкополосные фильтры (ZEISS, Filter-Set 38HE, BP 470/40, FT 495, BP 525/50). В ходе экспериментов экспозицию максимально снижали для уменьшения выгорания Fluo-4. Экспериментальные данные анализировали с помощью программного обеспечения AxioVisionRelease 4.8.2 SP1 и ImageG 1.50i. Изменения в амплитуде Ca^{2+} волн рассчитывали, как разницу между пиковой и базовой флуоресценцией при нормировании на площадь изображения клетки. Контрольные записи делали после 30 минутного периода адаптации, после чего кардиомиоциты обрабатывали только Ar_4A , либо Ar_4A в присутствии L-NAME, ODQ либо хелеретрина (эти соединения подавали за 5 минут до начала действия Ar_4A).

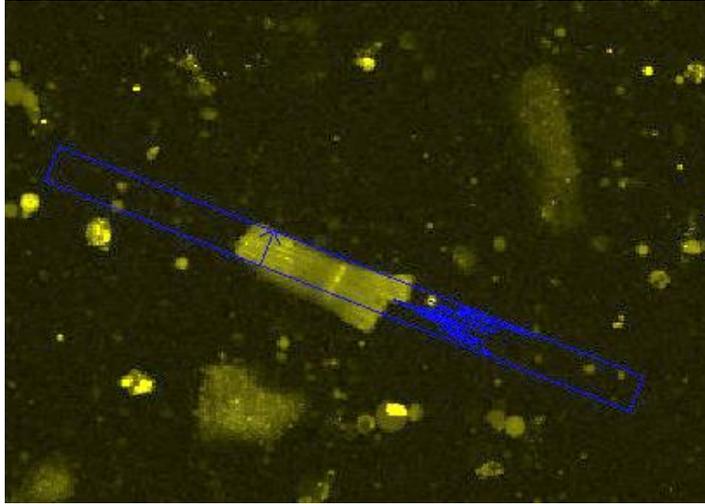


Рисунок 3.4. Регистрация флуоресцентных сигналов кардиомиоцита. Стрелкой обозначена наименее механически деформирующаяся часть кардиомиоцита, вдоль которой и проводили регистрацию.

3.6.2. Оценка колебаний уровня цитоплазматического кальция

Данные анализировали с помощью программного обеспечения ZEN (CarlZeiss), ImageJ 1.51 включая Bio-Formats Explorer, а также Origin 9.0. Амплитуду колебаний уровня цитоплазматического кальция (величину «кальциевых волн») рассчитывали, как разницу между пиковым и наименьшим значением флуоресценции после усреднения значений по линии сканирования.

3.7. Исследование сокращения сосудов в изометрическом режиме

Сокращение сосудов исследовали в изометрическом режиме с использованием системы wire myograph (DMT, Дания, модель 610M) [Gaynullina et al., 2018]. Каждый из кольцевых препаратов сосудов с помощью двух натянутых струн из нержавеющей стали (диаметром 40 мкм) закреплялся между головками миографа. Одна из головок была соединена с тензометрическим датчиком, а другая – с микрометром, с помощью которого устанавливалось расстояние между струнами и, таким образом, растяжение препарата. Миограф имеет четыре канала, что позволяет проводить эксперименты одновременно с использованием нескольких ингибиторов и сравнивать их эффекты с действием растворителя на другой сегмент того же сосуда. Показания

тензометрических датчиков оцифровывали с частотой 1 кГц и непрерывно регистрировали на компьютере с помощью программы LabChart 6.0.

Объем камеры миографа, в которой располагался каждый препарат, был равен 5 мл. Раствор в камере перфузировали с карбогеном (5% CO₂ + 95% O₂) (pH=7,4). Препараты оставляли на 20-30 мин, пока корпус миографа и содержащийся в нем раствор не нагревались до 37°C. Такая температура сохранялась в течение всего эксперимента. Во время нагрева струны, поддерживающие препарат, располагались вблизи друг друга, так что сегмент сосуда не был растянут.

В ходе нормализации строится пассивная эластическая характеристика данного препарата, а затем вычисляется расстояние между струнами, при котором растяжение препарата оптимально для проявления его сократительной активности [Mulvany et al., 1977]. Это необходимо, так как степень растяжения влияет не только на величину максимального сокращения [Mulvany et al., 1977], но и на чувствительность препарата к вазоактивным веществам [Nilsson et al., 1985].

Процедура нормализации была разработана и подробно описана для сосудов брыжейки крысы в работе [Mulvany et al., 1977], дальнейшие эксперименты показали, что она применима и к другим сосудам [Nilsson et al., 1985; Tarasova et al., 2003].

Описанную выше процедуру нормализации проводили в растворе для препаровки, т.е. с низким содержанием ионов кальция, и в присутствии донора оксида азота DEA-NO для обеспечения полного расслабления препарата.

3.7.1. Активация препарата и проверка функциональной активности эндотелия

После окончания нормализации раствор в камере сменяли на «рабочий» для миографа следующего состава (в mM): NaCl - 120; NaHCO₃ - 26; KCl - 4,5; CaCl₂ - 1,6; MgSO₄ - 1,0; NaH₂PO₄ 1,2; D-глюкоза - 5,5; EDTA - 0,025; HEPES - 5,0, pH=7,4. В начале эксперимента проводили стандартную процедуру активации, чтобы «предыстория» препарата сосуда не влияла на результаты измерений. Для этого препарат дважды обрабатывали раствором, содержащим 120мM KCl и 10 мкM серотонина. Длительность каждого периода сокращения была равна 5 мин. После каждого введения серотонина препарат отмывали рабочим раствором для миографа 5 раз (суммарное время отмыва - 15 мин).

После добавления серотонина с KCl проводили проверку функционального состояния эндотелия сосуда. Для этого после сокращения сосуда в течение 3 мин, к препарату добавляли ацетилхолин в концентрации 10 мкМ на 2 мин. Следовавшее за сокращением расслабление в ответ на действие ацетилхолина свидетельствовало о сохранности эндотелия, тогда как отсутствие расслабления служило показателем того, что эндотелий удален или нарушена его функция в результате неаккуратной препаровки (в последнем случае препараты не использовались).

После активации и проверки состояния эндотелия сосудов приступали к исследованию влияния пуриновых соединений. Ar_5A и Ar_4A подавались в начальной концентрации 1 мкМ, затем - 3 мкМ, 10 мкМ и 30 мкМ. $НАД^+$ использовался в концентрациях 10 мкМ, 30 мкМ и 100 мкМ. Каждое соединение подавалось отдельно на каждый сосуд. Все концентрации исследовались последовательно, начиная с наименьшей, без отмыва между подачами.

3.8. Реактивы и материалы

В работе использованы следующие реактивы:

- 1) Аденозин «Sigma-Aldrich», США;
- 2) АТФ «Sigma-Aldrich», США;
- 3) НАД+ «ДИА-М», Россия;
- 4) Диаденозин-тетрафосфат «Sigma-Aldrich», США;
- 5) Диаденозин-пентафосфат «Sigma-Aldrich», США;

Для выяснения рецепторных и ионных механизмов действия диаденозиновых полифосфатов и их производных в сердце использовали ряд блокаторов рецепторов и ионных каналов. Были выполнены эксперименты с использованием следующих соединений:

- 6) Coumassie Brilliant Blue G250 (0,1 мкМ), («Sigma-Aldrich», США) – неселективный блокатор пуриновых рецепторов P2X подтипа;
- 7) DPCPX (3 мкМ) («Tocris», Великобритания) – селективный блокатор пуринорецепторов P1 типа, A1 подтипа;
- 8) EHNA (10 мкМ), («Tocris», Великобритания) - блокатор ФДЭ2
- 9) Evans Blue (0.1 мкМ), («Sigma-Aldrich», США) – неселективный блокатор пуриновых рецепторов P2X подтипа;
- 10) FiPi (0.1 мкМ) («Sigma-Aldrich», США) – ингибитор PLD
- 11) Fluor-4AM (1 мкМ), («Sigma-Aldrich», США) - флуоресцентный зонд
- 12) IBMX (10 мкМ), («Tocris», Великобритания) - неселективный блокатор ФДЭ
- 13) Iso-PPADS (1 мкМ), («Tocris», Великобритания) - неселективный блокатор пуриновых рецепторов P2X подтипа;
- 14) L-NAME (100 мкМ) («Sigma-Aldrich», США) - ингибитор NO-синтазы
- 15) ODQ (10 мкМ), («Sigma-Aldrich», США) - ингибитор рГЦ
- 16) PPADS (100 мкМ), («Tocris», Великобритания) - неселективный блокатор пуринорецепторов P2 типа;
- 17) U 73122(10 мкМ), («Sigma-Aldrich», США) - ингибитор PLC
- 18) Ацетилхолин (10 мкМ), («Sigma-Aldrich», США)
- 19) E4031 («Sigma-Aldrich», США) – блокатор тока I_{Kr}

- 20) Нифедипин («Sigma-Aldrich», США) - блокатор входящих кальциевых токов
- 21) Серотонин (10 мкМ), («Sigma-Aldrich», США)
- 22) Сурамин (suramine) (10 мкМ) («Tocris», Великобритания) – неселективный блокатор пуринорецепторов P2 типа;
- 23) Терциапин («Sigma-Aldrich», США)- блокатор каналов, проводящих ток $I_{K_{Ach}}$
- 24) Хелеретрин (10 мкМ) («Sigma-Aldrich», США) – ингибитор РКС
- 25) Хроманол 293В («Sigma-Aldrich», США) - блокатор тока I_{K_s}

3.9. Статистическая обработка результатов

Для статистической обработки использовали программу GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA). Для оценки достоверности различий использовали одно или двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) по Фридману с дальнейшим post-hoc тестом Бонферони. Критический уровень значимости принимали равным 5% ($p < 0,05$). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. Исследование прямых эффектов диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ в миокарде

4.1.1. Влияние Ap_4A , Ap_5A на сократительную активность желудочкового миокарда изолированного сердца крысы

При действии Ap_4A и Ap_5A в концентрации 0,1-1 мкМ заметных изменений работы изолированного сердца крысы не наблюдалось. Однако, при аппликации 10 мкМ исследуемых диаденозиновых полифосфатов были зарегистрированы статистически значимые изменения в частоте сердечных сокращений и параметрах сократительной активности желудочка изолированного сердца (Рисунок 4.1.).

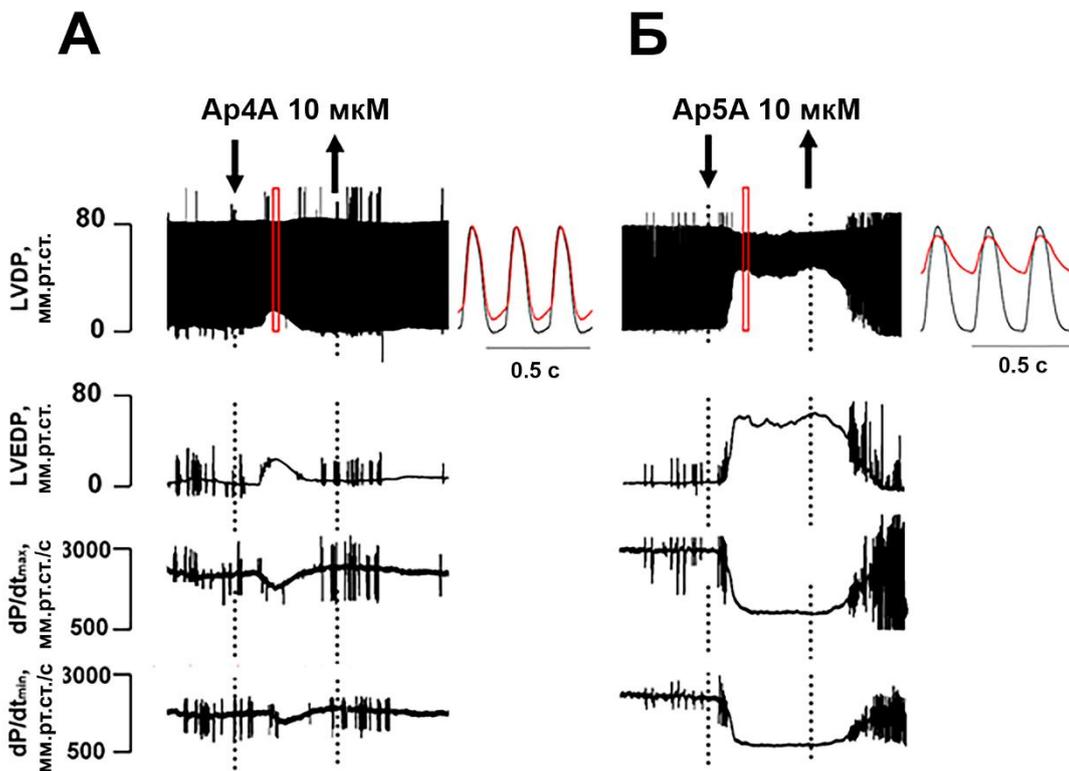


Рисунок 4.1. Репрезентативный пример записи сократительной активности миокарда левого желудочка, изолированного по Лангендорфу сердца крысы при добавлении 10 мкМ Ap_4A (А) и Ap_5A (Б). LVDP- развиваемое давление в левом желудочке; максимальная скорость нарастания давления в левом желудочке (dP/dt_{max}); максимальная скорость снижения давления в левом желудочке (dP/dt_{min}).

Диаденозиновые полифосфаты вызвали снижение частоты сердечных сокращений в изолированном сердце, работающем в собственном ритме. Так Ap_4A и

Ar₅A (10 мкМ) снижал частоту сердечных сокращений от 285±5 уд/мин и 282±7 уд/мин до 260±8 уд/мин (на 9%, n=6, p<0.05) и 256±10 уд/мин, соответственно (на 10%, n=7, p<0.05) (Рисунок 4.2., А).

В сердце, работающем в навязанном ритме, наблюдалось снижение развиваемого давления (LVDP) при действии Ar₄A и Ar₅A на 40,6% и 80,5% от контрольных значений, соответственно (Рисунок 4.2., В). Снижение развиваемого давления, вызванное Ar₅A было достоверно сильнее, чем таковое, при подаче Ar₄A (p<0.05, n=6 и n=6, соответственно). Развиваемое давление снизилось на фоне возросшей преднагрузки (LVEDP), что свидетельствует о снижении сократимости. (Рисунок 4.2., Г). Также оба пуриновых соединения влияли и на индекс работы сердца, вызывая его снижение (Рисунок 4.2., Б).

В нескольких экспериментах (n=3) аппликация Ar₄A и Ar₅A вызвала кратковременное увеличение LVDP (на 5±3%). Однако стабильного положительного инотропного эффекта в данных экспериментах не наблюдалось.

Максимальная скорость сокращения и расслабления в сердцах, работающих в навязанном ритме, также изменялись при подаче исследуемых соединений. Введение 10 мкМ Ar₄A снижало максимальную скорость нарастания давления (dP/dt_{max}) (Рисунок 4.2., Д) и максимальную скорость расслабления в левом желудочке (dP/dt_{min}) (Рисунок 4.2., Е) на 19,5% и 18,5% от контрольных значений. Перфузия Ar₅A также вызвала подавление dP/dt_{max} и dP/dt_{min} - на 75,2 и 70%, соответственно. Таким образом, эффект 10 мкМ Ar₅A оказался статистически более выраженным (p<0.05) в сравнении с эффектом 10 мкМ Ar₄A.

Следует отметить, что диаденозинпентафосфат, в отличие от Ar₄A, вызывал стабильное снижение сократительной активности на всем протяжении подачи соединения (Рисунок 4.1. Б). Прекращение подачи, в случае обоих пуриновых соединений, приводило к восстановлению сердечного ритма и сократительной активности до контрольных значений в течение 10-15 минут. Также, после прекращения действия соединений были зарегистрированы экстрасистолы и спонтанные изменения ритма как в сердцах с навязанным ритмом, так и в работающих в самостоятельном ритме. Абсолютные значения параметров частоты сердечных сокращений, конечно-диастолического давления и параметров сократимости приведены на Рисунок 4.2.

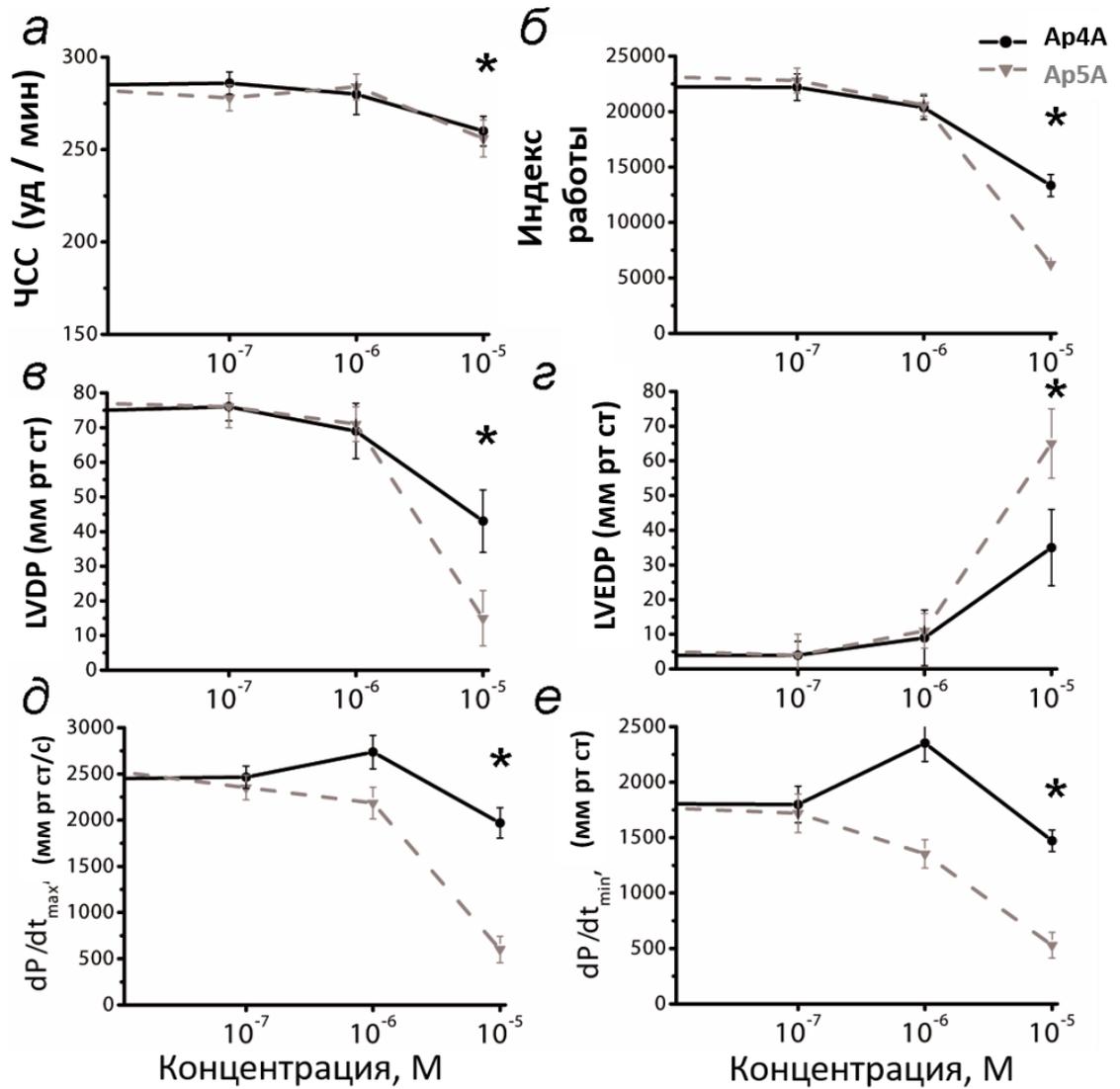


Рисунок 4.2. Изменение параметров сократительной активности изолированного сердца крысы. (А) - изменение частоты сердечных сокращений (удары в минуту); (Б) - изменение индекса работы (произведение ритма и развиваемого давления); (В) - развиваемое давление в левом желудочке (LVDP); (Г) - конечно-диастолическое давление (LVEDP, mmHg); (Д) - максимальная скорость нарастания давления (dP/dt_{max}); (Е) - максимальная скорость снижения давления в левом желудочке (dP/dt_{min}).

4.1.2. Эффекты НАД⁺ на сократительную активность изолированного сердца крысы

В нашей лаборатории в экспериментах *in vivo* (неопубликованные данные) было показано, что НАД⁺ вызывал снижение длительности QT-интервала ЭКГ у крыс. Известно, что длительность QT-интервала пропорциональна длительности потенциалов действия (ПД) в желудочковом миокарде, а снижение этого параметра связывают с укорочением ПД. При изменении длительности ПД может меняться сократимость миокарда. Мы предположили, что НАД⁺ может также, как и диаденозиновые полифосфаты, оказывать влияние на инотропию сердца.

Для исследования влияния НАД⁺ на сократимость изолированного сердца крысы, нами были проведены две серии экспериментов. В первой серии, для регистрации сократительной активности сердца применяли стандартную методику перфузии, при которой регистрировали преимущественно фазы изоволюметрического сокращения и расслабления левого желудочка при постоянном предустановленном диастолическом давлении (как и в экспериментах с диаденозинполифосфатами). Во втором случае, в камеру левого желудочка не помещали латексный баллон, что позволяло сокращаться желудочку в режиме изгнания. Во второй серии экспериментов, использовали модифицированную методику перфузии изолированного сердца крысы, в которой регистрировали не только изоволюметрические фазы, но также фазу изгнания, фазу наполнения. Модифицированная методика позволяет выявлять эффекты, выражающиеся в снижении конечно-диастолического давления либо в слабом увеличении сократимости.

В итоге, нами показано, что внеклеточный НАД⁺ практически не оказывает влияния на сократимость желудочкового миокарда в базальных (т.е. в отсутствии адренергической/симпатической стимуляции) условиях. Ниже приведены результаты исследования действия НАД⁺ на сократимость миокарда с использованием стандартной методики, а также при использовании модифицированной методики.

Оценка действия НАД⁺ на сократимость желудочкового миокарда при использовании стандартной перфузии по Лангендорфу

НАД⁺ в диапазоне концентраций 0,1-10 мкМ, действующий в течение 5 мин, не вызывал значимого изменения сократительной активности желудочкового миокарда

крысы. Величина развиваемого давления при действии 10 мкМ НАД⁺ снижалась не более, чем до $97,3 \pm 8,5\%$ ($n=7$) от контрольного уровня, максимальная скорость сокращения и расслабления левого желудочка составили $100,9 \pm 9,6$ и $100,7 \pm 11\%$ ($n=7$, везде $p > 0,05$) от контрольных значений, соответственно (Рисунок 4.3., А). НАД⁺ в концентрации 100 мкМ ($n=3$) также не вызвал достоверных изменений параметров сократительной активности при использовании данной методики.

Следует указать, что в других сериях экспериментов [Пахомов и др., 2017], НАД⁺ в концентрации 10 мкМ мог вызывать в одной части экспериментов небольшое снижение развиваемого давления в левом желудочке (на $6,4 \pm 1,9\%$, 5 из 9 случаев), в то время как в другой части – незначительное увеличение сократимости ($5,4 \pm 3\%$, 4 из 9). При усреднении результатов экспериментов оказывалось, что НАД⁺ не влиял на параметры, отражающие инотропию миокарда (Рисунок 4.3., Б).

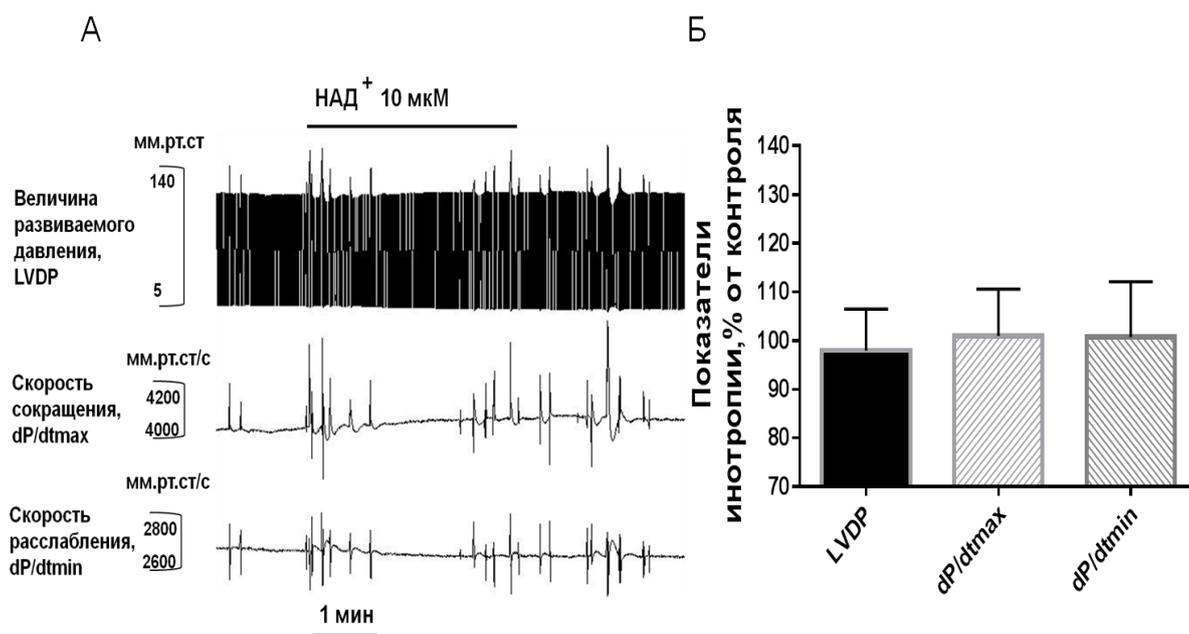


Рисунок 4.3. (А) — репрезентативный пример записи сократительной активности миокарда левого желудочка, изолированного по Лангендорфу сердца крысы при добавлении 10 мкМ НАД⁺. (Б) – давление, развиваемое левым желудочком (LVDP), максимальная скорость нарастания (dP/dt_{max}) и снижения давления в левом желудочке (dP/dt_{min}) при действии 10 мкМ НАД⁺; $n=7$.

Оценка действия НАД⁺ на сократимость желудочкового миокарда при использовании модифицированной перфузии по Лангендорфу

В данной серии экспериментов, как и в предыдущей, 10 мкМ НАД⁺ не оказывали значимого влияния на сократимость желудочкового миокарда сердца крысы (n=3). Только при действии НАД⁺ в концентрации 100 мкМ (n=3, 5 минут) происходило незначительное увеличение развиваемого давления (на 7 ± 3 мм рт ст, n=3), отчасти в результате понижения КДД (на 3-5 мм рт ст или на $40 \pm 10\%$, n=3). Максимальная скорость сокращения левого желудочка при этом несколько снижалась по сравнению с контрольным значением (на $5 \pm 2\%$, n=3), однако максимальная скорость расслабления не изменялась (Рисунок 4.4.).

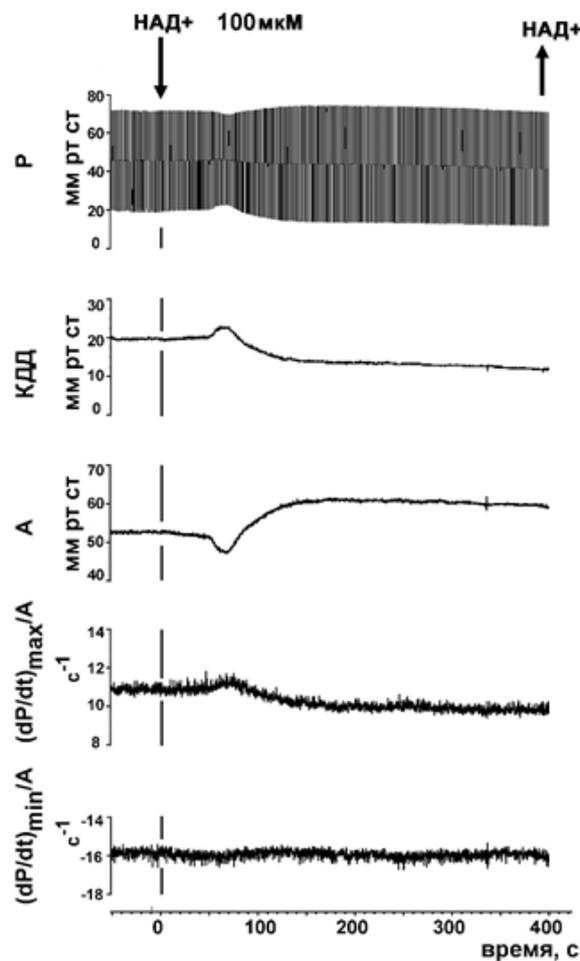


Рисунок 4.4. Репрезентативный пример сократительной активности изолированного сердца крысы при действии 100 мкМ НАД⁺. P – давление в левом желудочке; A - развиваемое давление или амплитуда; КДД (LVEDP) – конечно-диастолическое давление; $(dP/dt)_{max}/A$ – максимальная нормированная скорость

сокращения левого желудочка; $(dP/dt)_{\min}/A$ – максимальная нормированная скорость расслабления левого желудочка.

4.2. Влияние Ar_4A , Ar_5A и НАД⁺ на биоэлектрическую активность сердца

В нескольких сериях экспериментов нами показано, что исследуемые диаденозиновые полифосфаты - диаденозин тетра- и пентафосфат, а также никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺) способны влиять на биоэлектрическую активность сердца. Основным эффектом при действии Ar_4A , Ar_5A и НАД⁺ в рабочем миокарде сердца является снижение длительности потенциалов действия (ДПД). Ниже представлены результаты экспериментов, отражающие изменение длительности ПД при действии исследуемых пуриновых соединений на желудочковый и предсердный рабочий миокард, миокард межпредсердной перегородки и легочных вен; изменение биоэлектрической активности синоатриального узла и элементов проводящей системы сердца крысы, а также некоторых отделов сердца морской свинки.

4.2.1. Эффекты Ar_4A , Ar_5A и НАД⁺ в рабочем миокарде

4.2.1.1. Влияние Ar_4A , Ar_5A и НАД⁺ на ПД в предсердном миокарде сердца крысы

В наномолярных концентрациях, а также в концентрации 1 мкМ исследуемые соединения не оказывали эффектов в наших экспериментах. Однако, при аппликации 10 мкМ Ar_4A и Ar_5A вызывали значимое снижение ДПД₉₀ на $23 \pm 2\%$ ($n=8$, $p<0.05$) и $10 \pm 1\%$ ($n=8$, $p<0.05$) в левом предсердии (ЛП) крысы, соответственно. Эффект в рабочем миокарде правого предсердия (ПП) крысы при постоянном навязываемом ритме был схожим – ДПД₉₀ при действии 10 мкМ Ar_4A и Ar_5A достоверно уменьшались, соответственно, на $22 \pm 2\%$ ($n=7$, $p<0.05$) и $29 \pm 2\%$ от контрольных значений ($n=7$, $p<0.05$) (Рисунок 4.5.).

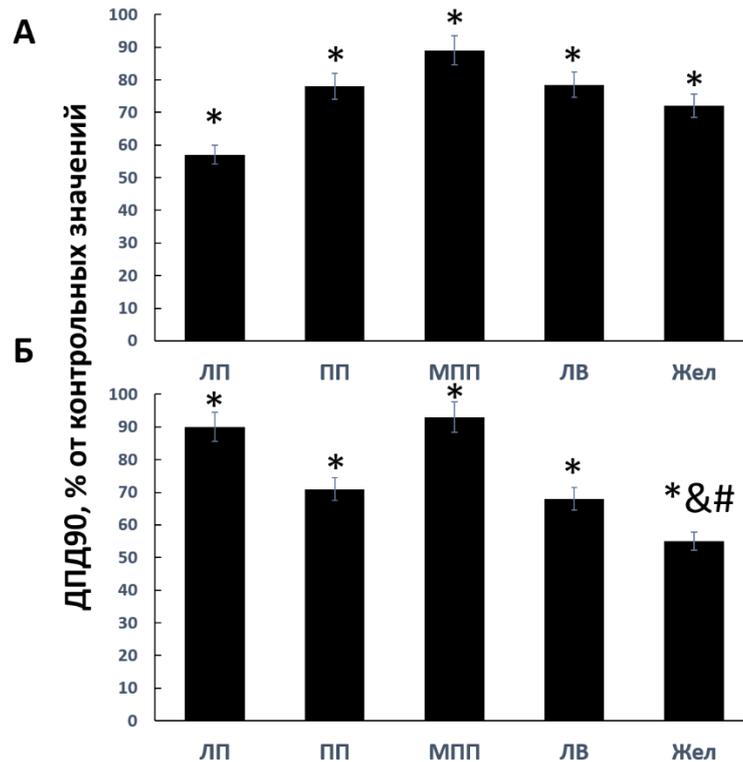


Рисунок 4.5. Длительность ПД на уровне 90% реполяризации по сравнению с контрольными значениями (100%) при аппликации Ar_4A (А) и Ar_5A (Б) (10 мкМ). ЛП-левое предсердие (n=8); ПП-правое предсердие (n=7); МПП-межпредсердная перегородка (n=5); ЛВ-легочные вены (n=7); Жел-правый желудочек (n=6); *- $p < 0.05$ -отличие параметра от значения в контрольных условиях (100%); &- $P < 0.05$ (статистически значимое различие между группами Жел и ЛП); #- $P < 0.05$ (статистически значимое различие между группами Жел и МПП).

Основным эффектом $NAД^+$ в концентрации 10 мкМ является укорочение ПД (ДПД90%) в левом предсердии (до $77 \pm 3\%$, по сравнению с контролем, $p < 0.05$, n=8) и в правом предсердии (до $78 \pm 3\%$, $p < 0.05$, n=6) (Рисунок 4.6.). Однако в некоторых наших экспериментах наблюдался двухфазный эффект при действии $NAД^+$. В начале подачи $NAД^+$ наблюдается кратковременное увеличение ДПД90 (на $19 \pm 5\%$, $p < 0.05$, n=3), (Рисунок 4.7.). Далее следовал обратный эффект $NAД^+$, выражающийся в продолжительном и стабильном снижении длительности ПД. Таким образом, влияние $NAД^+$ на биоэлектрическую активность предсердного миокарда отличается от эффектов Ar_4A и Ar_5A наличием «положительной» фазы (Рисунок 4.7)

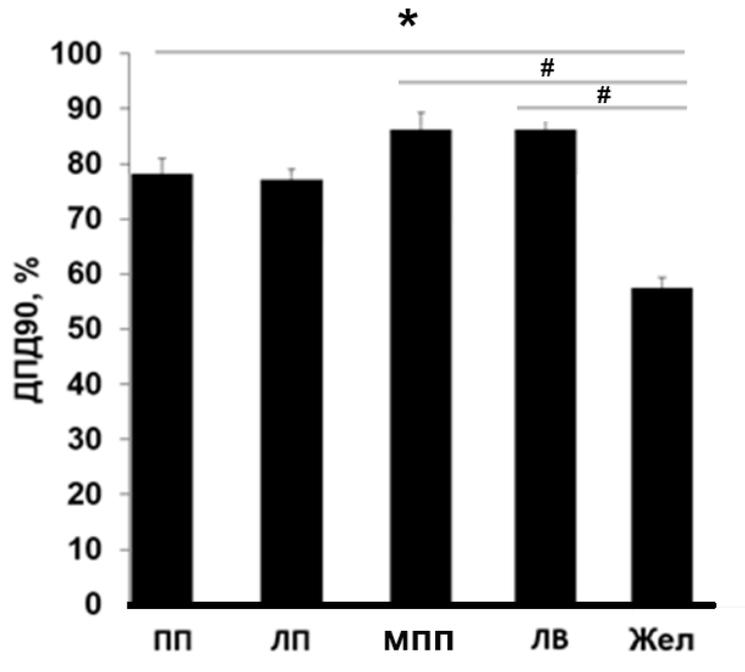


Рисунок 4.6. Снижение длительности ПД (ДПД90) (в процентах от контрольных значений) при действии 10 мкМ НАД⁺ в различных отделах сердца крысы. Контрольные значения приняты за 100%. ЛП-левое предсердие (n=8); ПП-правое предсердие (n=6); МПП-межпредсердная перегородка (n=5); ЛВ-легочные вены (n=6); Жел-правый желудочек (n=6). * - $p < 0.05$; #- $P < 0.05$.

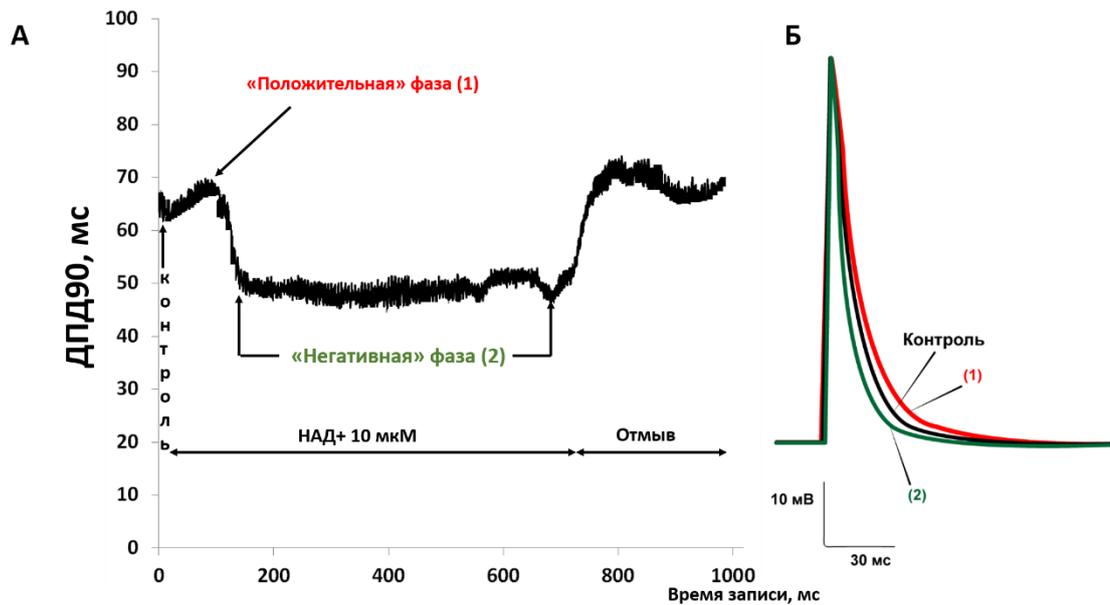


Рисунок 4.7. «Положительный» и «негативный» эффекты НАД⁺ 10 мкМ в миокарде ушка левого предсердия крысы. (А) - Репрезентативная необработанная запись «время-эффект» действия НАД⁺ в ЛП; изменение длительности ПД указаны в миллисекундах. (Б) - Репрезентативные примеры ПД в контроле, в «положительной» фазе (1) и «негативной» (2) фазе развития эффекта НАД⁺.

Следует отметить, что при действии диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ (в концентрации 10 мкМ) в различных отделах сердца снижалась длительность ПД и на уровне 50% реполяризации. Так как ПД в сердце крысы не имеют фазы плато, то длительность на уровне 50% реполяризации в разных отделах варьирует в пределах 9-20 мс. Поэтому, изменения ДПД50 при действии пуриновых соединений были в реальных величинах и составляли несколько миллисекунд, что близко к погрешностям измерения и, поэтому, не всегда было возможно установить достоверность. В данной работе изменения ДПД50 при действии Ар₄А и Ар₅А, а также НАД⁺ не приведены.

Также следует указать, что поскольку значимые изменения конфигурации ПД в миокарде левого предсердия наблюдали только при действии 10 мкМ пуриновых соединений, то на всех остальных тканевых препаратах выполняли эксперименты с применением только данной концентрации.

4.2.1.2. Влияние Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на потенциалы действия в желудочковом миокарде сердца крысы

Конфигурация потенциалов действия в правом желудочке сердца крысы изменялась сходным образом с конфигурацией предсердных ПД под воздействием диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$, однако эффект оказался гораздо более выраженным, чем в предсердном миокарде. Длительность ПД на уровне 90% реполяризации снижалась на $28\pm 3\%$ от контрольных значений при аппликации 10 мкМ Ar_4A ($p < 0.05$, $n=6$). При действии 10 мкМ Ar_5A также наблюдали снижение ДПД90 в желудочковом миокарде: до $55\pm 4\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) от контрольного уровня (Рисунок 4.5.).

В миокарде правого желудочка крысы $НАД^+$, также, как и диаденозиновые полифосфаты, вызывал укорочение ПД: 10 мкМ $НАД^+$ вызывал статистически значимое снижение ДПД90 до $57\pm 6\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) от контрольных значений. Результаты представлены на Рисунок 4.6.

4.2.1.3. Влияние Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на потенциалы действия в межпредсердной перегородке сердца крысы

В нашей работе были проведены серии экспериментов, в которых ПД при действии пуриновых соединений регистрировали при постоянном навязываемом ритме (4 Гц) в изолированных препаратах межпредсердной перегородки (МПП) сердца крысы. Диаденозинтетрафосфат в концентрации 10 мкМ в межпредсердной перегородке вызывал достоверное снижение ДПД90 на $11\pm 3\%$ от контрольных значений ($n=5$, $p < 0.05$); Ar_5A также статистически значимо уменьшал ДПД90 - на $7\pm 2\%$ ($n=5$, $p < 0.05$).

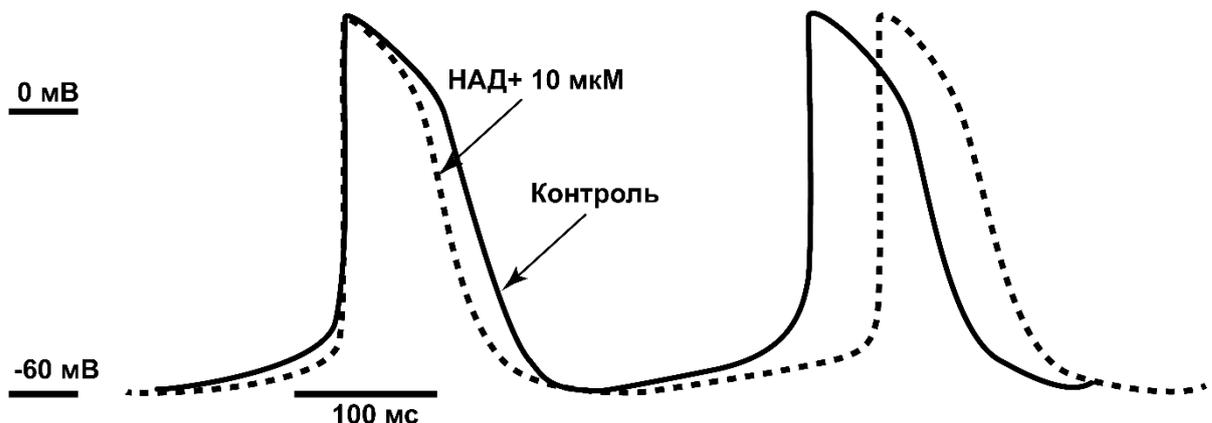
При действии 10 мкМ $НАД^+$ в МПП было зарегистрировано снижение ДПД90 на 10% ($n=5$, $p < 0.05$). В МПП наблюдалось наименьшее влияние пуриновых соединений на потенциалы действия (Рисунок 4.5.; Рисунок 4.6.).

4.2.2. Эффекты Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ в пейсмекерном миокарде

4.2.2.1. Влияние $НАД^+$ на биоэлектрическую активность препаратов, включающих синоатриальный узел крысы

Задачей в данной части работы являлось изучение действия пуриновых соединений на характеристики биоэлектрической активности в ритмоводителе сердца. При использовании препаратов сердца крысы, включающих синоатриальный узел, удалось выполнить серию экспериментов только с оценкой действия 10 мкМ $НАД^+$. При изучении эффектов $НАД^+$ в САУ крысы выбрана концентрация вещества, которая вызывала статистически значимые эффекты в рабочем миокарде - 10 мкМ.

В САУ крысы $НАД^+$ подавляет автоматию: снижает частоту генерации ПД, скорость медленной диастолической деполяризации (СМДД), максимальную скорость деполяризации (иначе, максимальную скорость нарастания фронта ПД - dV/dt , max), длительность ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50). Примеры экспериментальных записей ПД САУ в контроле и при действии $НАД^+$ приведены на Рисунок 4.8. Частота генерации ПД в САУ снижалась до $82 \pm 4\%$; ДПД50 до $66 \pm 3\%$, скорость МДД до $25 \pm 3\%$ от контрольных значений ($n=5$, $p<0.05$). Однако, скорость фронта ПД увеличивалась при действии 10 мкМ $НАД^+$ в среднем на 16% (до $116 \pm 4\%$) по сравнению с контрольным значением (Рисунок 4.8). Все изменения являются статистически значимыми ($p<0.05$, $n=5$).



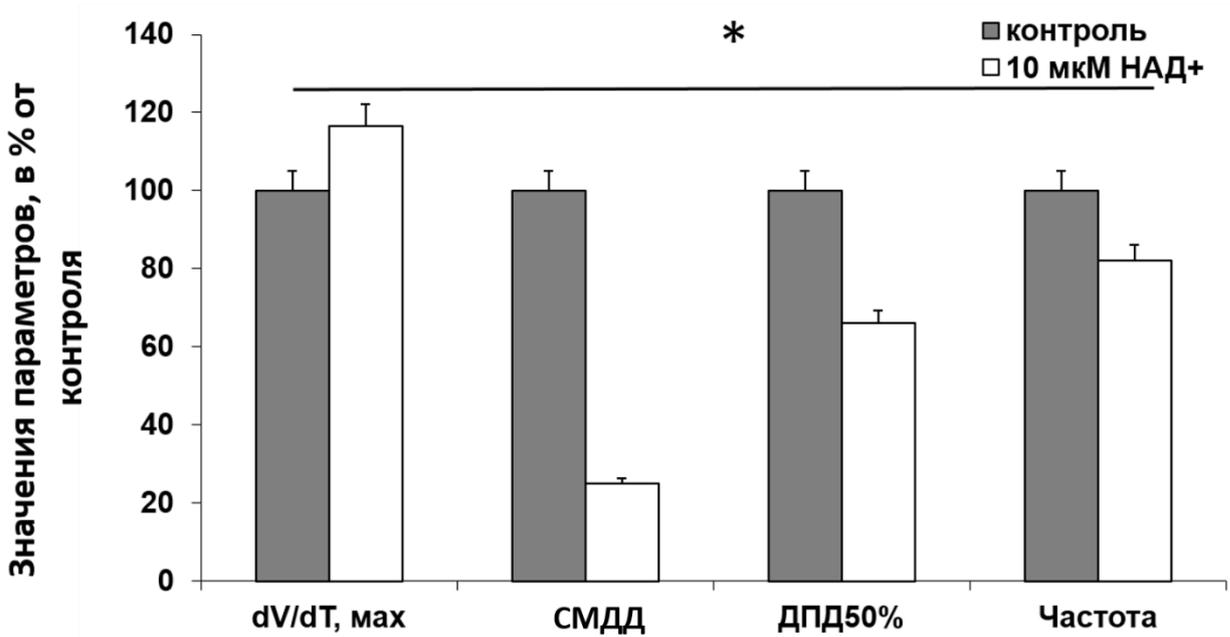


Рисунок 4.8. Сверху: примеры экспериментальных записей ПД САУ в контроле и при действии НАД+. Снизу: влияние НАД+ на параметры биоэлектрической активности синоатриального узла крысы: скорость медленной диастолической деполяризации (СМДД), максимальную скорость деполяризации или скорость фронта ПД (dV/dT , max), длительность ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50). (* - $p < 0.05$, $n=5$).

4.2.2.2. Влияние Ar_4A , Ar_5A и НАД+ на потенциалы действия волокон Пуркинье

Как было сказано выше, (раздел 3.3.1.) регистрация ПД волокон Пуркинье в сердце крысы затруднена. Поэтому, в наших экспериментах использовали препараты изолированных свободнолежащих участков волокон Пуркинье сердца кролика.

В данной серии НАД+ и диаденозиновые полифосфаты были использованы в концентрации 10 мкМ. В этих экспериментах показано, что НАД+ вызывает снижение длительности ПД (ДПД90 и ДПД50) в работающих при постоянном навязываемом ритме в волокнах Пуркинье кролика. ДПД90 снижалась до $82 \pm 4\%$ от контроля, $p < 0.05$, $n=5$). Схожий эффект наблюдался и при действии 10 мкМ Ar_4A и Ar_5A : ДПД90 снижалась до $84 \pm 2\%$ и $87 \pm 3\%$, соответственно ($p < 0.05$, $n=4$). ДПД50 снижалась до

78±5% от контроля при действии НАД+, ($p < 0.05$, $n=5$) и до 72±6% и 92±5%, соответственно ($p < 0.05$, $n=4$) при действии 10 мкМ Ар₄А и Ар₅А (4.9.А).

На Рисунок 4.9, Б. приведены характерные примеры ПД волокон Пуркинье в контроле и при действии исследуемых соединений. В некоторых экспериментах наблюдали спонтанную активность в волокнах Пуркинье. В таких случаях, в ходе подачи 100 мкМ Ар₄А (Рисунок 4.9.В) было зафиксировано снижение частоты спонтанных разрядов (генерации ПД) в волокнах Пуркинье, но статистическую значимость данных изменений подтвердить не удалось, так как случаев возникновения спонтанной активности было недостаточно.

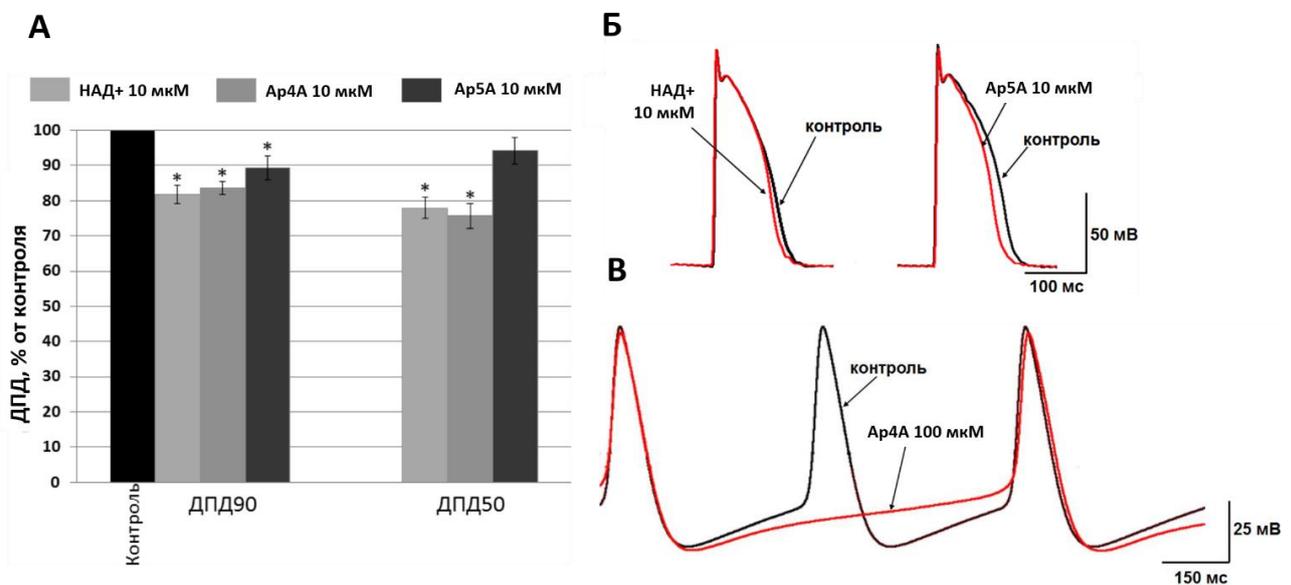


Рисунок 4.9. (А) - изменение ДПД90 и ДПД50 при действии 10 мкМ Ар₄А ($n=4$), Ар₅А ($n=4$) и НАД+ ($n=5$) от контрольных значений (100%) в волокнах Пуркинье кролика, * - $p < 0.05$; (Б) - характерные потенциалы действия в волокнах Пуркинье (контроль) и изменение конфигурации ПД при действии 10 мкМ Ар₅А и НАД+; (В) - пример спонтанной активности в волокнах Пуркинье в контроле и при аппликации 100мкМ Ар₄А.

4.2.3. Эффекты Ар₄А, Ар₅А и НАД+ в миокардиальной ткани, обладающей эктопической автоматией

4.2.3.1. Влияние Ар₄А, Ар₅А и НАД+ на ПД в миокардиальной ткани легочных вен крысы

Стенка легочных вен большинства млекопитающих включает слои миокардиальной ткани, так называемые, «миокардиальные рукава» легочных вен,

которые являются продолжением миокарда предсердий. Кардиомиоциты, располагающиеся в обкладке легочных вен, генерируют ПД, однако по ряду биоэлектрических свойств миокард легочных вен отличен от рабочего миокарда предсердий и пейсмекерного миокарда. Поэтому, помимо предсердного и желудочкового миокарда, легочные вены были объектом исследования действия пуриновых соединений на ПД.

Аппликация 10 мкМ Ap_4A ($n=6$) и Ap_5A ($n=6$) в ритмически стимулируемых препаратах ЛВ приводила к достоверному ($p<0.05$) снижению ДПД90 (на $21,5\pm 3\%$ и $32\pm 3\%$, соответственно, от контрольных значений) (Рисунок 4.5.; Рисунок 4.10).

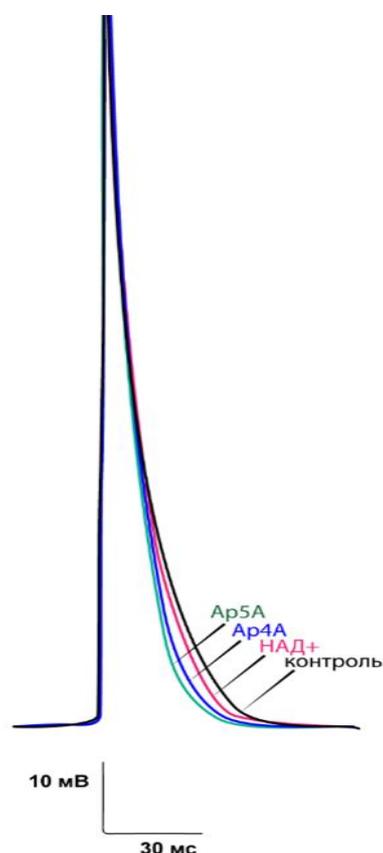


Рисунок 4.10. Репрезентативные примеры потенциалов действия в контроле и при действии 10 мкМ НАД⁺, Ap_4A и Ap_5A .

В концентрации 10 мкМ НАД⁺ в легочных венах крысы, как и диаденозиновые полифосфаты, вызывал статистически значимое снижение ДПД90 - до $86\pm 3\%$ от контрольного значения ($p<0.05$, $n=6$, Рисунок 4.6.; Рисунок 4.10.). Величина эффекта 10 мкМ НАД⁺ в ЛВ была сходна с таковыми в левом и правом предсердиях. Однако,

различия в величине эффекта - снижении ДПД90, в легочных венах и желудочковом миокарде при действии 10 мкМ НАД⁺ являются статистически значимыми ($p < 0.05$).

4.2.4. Эффекты Ar₄A и НАД⁺ в пейсмекерном и рабочем миокарде морской свинки

Миокард синоатриального узла (САУ) отличается от рабочего предсердного миокарда крайне выраженной гетерогенностью. В составе САУ выделяют центральную и периферическую зону. В пределах САУ существует несколько потенциальных центров автоматии. Центр, задающий ритм всего САУ в нормальных условиях, называется истинным пейсмекером, он как правило располагается в центральной части САУ. Активность ведущего центра автоматии отличается относительно плавным переходом от МДД к фазе деполяризации ПД, а также скоростью нарастания переднего фронта ПД, не превышающей 10 В/с [Vinogradova et al., 1998]. Для изучения эффектов НАД⁺ и Ar₄A использовали отведения электрической активности, характерные только для истинного пейсмекера. Доступ к области истинного водителя ритма в препаратах сердца морской свинки гораздо проще, чем в сердце крысы.

Диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ были использованы в концентрациях 10 и 100 мкМ. В обеих протестированных концентрациях соединения существенно замедляли скорость медленной диастолической деполяризации. Так, НАД⁺ (10 мкМ) снижал скорость МДД на $42 \pm 6\%$, а в концентрации 100 мкМ на $73 \pm 4\%$ ($n=6$, $p < 0.05$). Ar₄A (10 мкМ) в свою очередь снижал скорость МДД на $53 \pm 7\%$, и в концентрации 100 мкМ - на $68 \pm 5\%$ ($n=6$, $p < 0.05$).

Тем не менее, только под действием 100 мкМ НАД⁺ и Ar₄A развивалось достоверное замедление синусного ритма, достигавшее $26,7 \pm 5\%$, $23,2 \pm 6\%$ от контрольных значений, соответственно ($n=6$, $p < 0.05$) (наглядно представлено на Рисунок 4.13).

Исследуемые соединения вызывали ярко выраженное увеличение dV/dt_{\max} . НАД⁺ (10 мкМ) увеличивал скорость нарастания переднего фронта ПД на $32 \pm 7\%$, а в концентрации 100 мкМ на $83 \pm 8\%$ ($n=6$, $p < 0.05$). Ar₄A (10 мкМ) увеличивал dV/dt_{\max} на $30 \pm 3\%$, и в концентрации 100 мкМ - на $88 \pm 6\%$ ($n=6$, $p < 0.05$). (Рисунок 4.11.).

Также в наших экспериментах НАД⁺ и Ар₄А дозозависимо влияли на длительность ПД на уровне реполяризации 50% (ДПД50). Подача НАД⁺ в концентрации 10 мкМ приводила к уменьшению ДПД50 на 17±3%, а в концентрации 100 мкМ – на 39±4% (n=6, p<0.05). Ар₄А (10 мкМ) снизил ДПД50 на 19±5%, и Ар₄А (100 мкМ) привел к уменьшению ДПД50 на 42±5%, (n=6, p<0.05). Все значения изменялись статистически значимо относительно контрольного уровня. (Рисунок 4.11.; Рисунок 4.12.; Рисунок 4.13А).

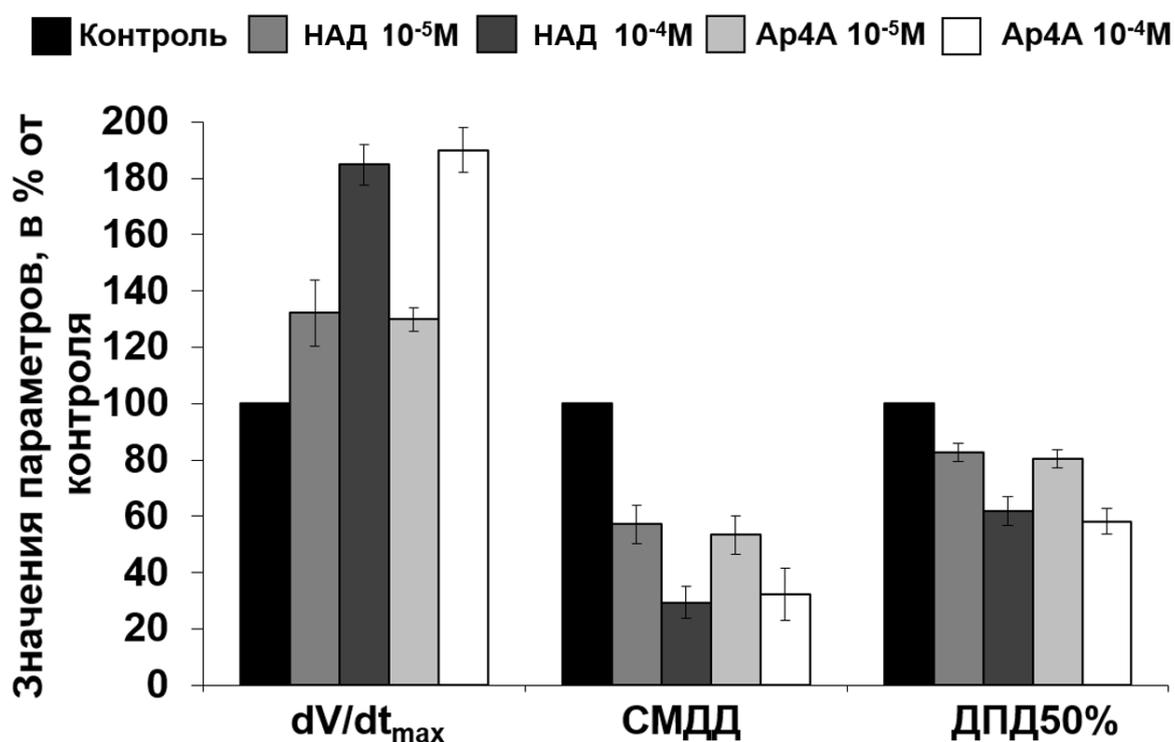


Рисунок 4.11. Действие НАД⁺ и Ар₄А в концентрациях 10 мкМ и 100 мкМ на различные параметры пейсмекерной электрической активности синоатриального узла морской свинки: скорость нарастания переднего фронта ПД (dV/dt_{max}), скорость медленной диастолической деполяризации (СМДД) и длительность ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50).

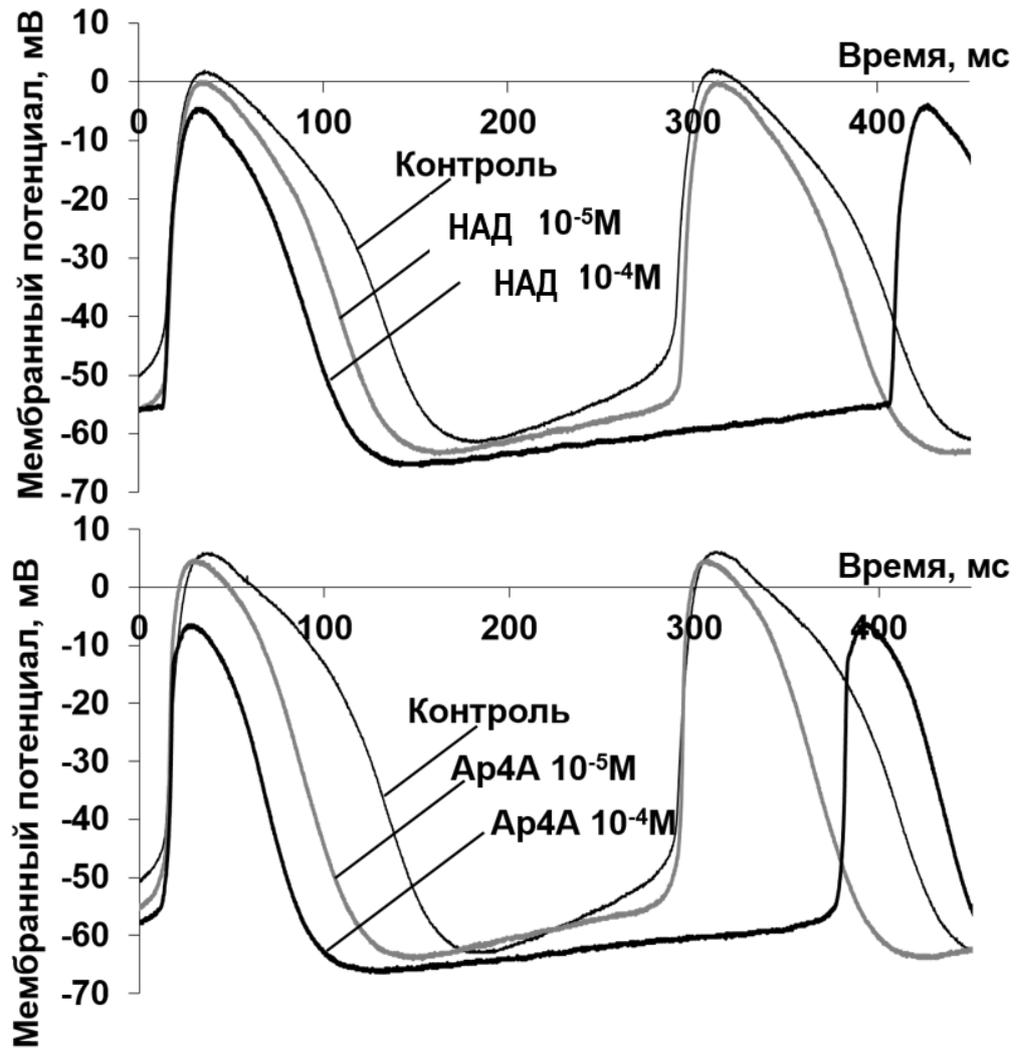


Рисунок 4.12. Оригинальные записи пейсмекерной электрической активности в препаратах синоатриального узла морской свинки. Показано сравнение конфигураций электрической активности в контрольных условиях и на фоне действия 10 мкМ и 100 мкМ НАД⁺ и Ар₄А.

Эксперименты по внутриклеточной регистрации ПД в изолированном препарате ушка правого предсердия показали, что как НАД⁺, так и Ар₄А в применяемых концентрациях вызывают ярко выраженное уменьшение длительности ПД (Рисунок 4.13., А). Наиболее выраженное уменьшение длительности ПД под влиянием НАД⁺ и Ар₄А проявилось на уровне 25% реполяризации (ДПД₂₅) (на 18±4% и 20±4% в концентрации 10 мкМ соответственно, и на 62±5% и 56±7% в концентрации 100 мкМ) (n=6, p<0.05). ДПД₅₀ также снижалась при действии НАД⁺ и Ар₄А на 10±4% и 17±5% в концентрации 10 мкМ, соответственно; на 57±6% и 47±5% в концентрации 100 мкМ (n=6, p<0.05). ДПД₉₀ достоверно уменьшалась при действии НАД⁺ и Ар₄А на 17±3% и

18±8% в концентрации 10 мкМ, соответственно; на 56±4% и 43±8% в концентрации 100 мкМ (n=6, p<0.05). Все измерения приведены (в %) относительно контрольных значений (Рисунок 4.13., Б).

Важно отметить, что в то время как при использовании 10 мкМ НАД⁺ и Ар₄А не удалось вызвать достоверного изменения амплитуды ПД, 100 мкМ НАД⁺ и Ар₄А снижали амплитуду на 8,22±2% и 7,85±1%, соответственно. Таким образом, НАД⁺ и Ар₄А более выраженно влияют на начальную фазу реполяризации ПД морской свинки, аналог фазы плато в кардиомиоцитах более крупных животных.

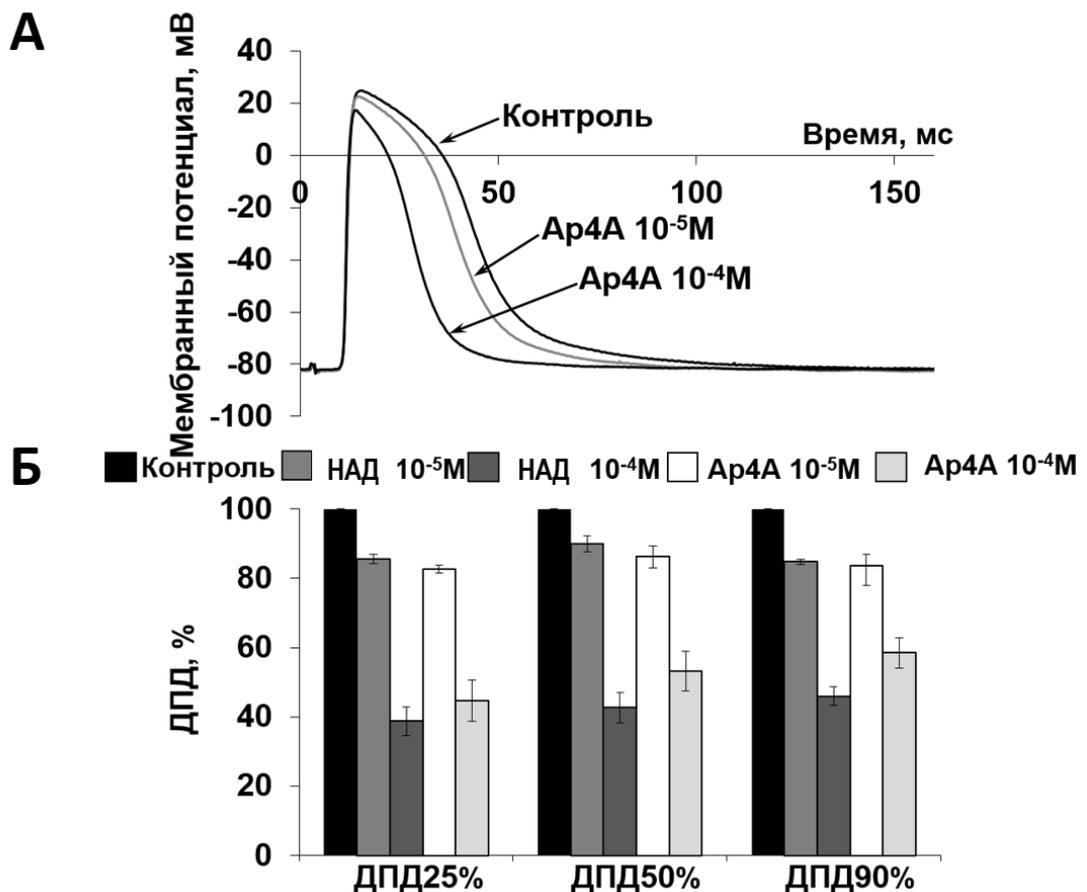


Рисунок 4.13. (А) - Оригинальные записи ПД в рабочем миокарде правого предсердия морской свинки в контрольных условиях и на фоне действия 10 мкМ и 100 мкМ Ар₄А.

(Б) - Действие Ар₄А и НАД⁺ в концентрациях 10 мкМ и 100 мкМ на длительность потенциалов действия на уровне реполяризации 25, 50 и 90%.

4.3. Эксперименты по исследованию влияния диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ на коронарные артерии сердца крысы

4.3.1. Ответы коронарных артерий, вызываемые диаденозиновыми полифосфатами

В литературных источниках имеются противоречивые данные о влиянии диаденозиновых полифосфатов на тонус сосудов. В нашей работе для анализа сократимости сосудов были проведены эксперименты на изолированных коронарных артериях межжелудочковой перегородки (septal coronary artery) с интактным эндотелием, предварительно активированных серотонином (10 мкМ). Все результаты представлены в процентах от максимально возможного сокращения данного сосуда, вызванного подачей серотонина, таким образом, все результаты были нормированы по максимальному сокращению (Рисунок 4.34-4.36).

Как видно из Рисунок 4.34, коронарные артерии не реагировали на добавление Ар₄А в диапазоне концентраций от 1 до 30 мкМ. Это свидетельствует о том, что Ар₄А не влияет на тонус артерий сердца.

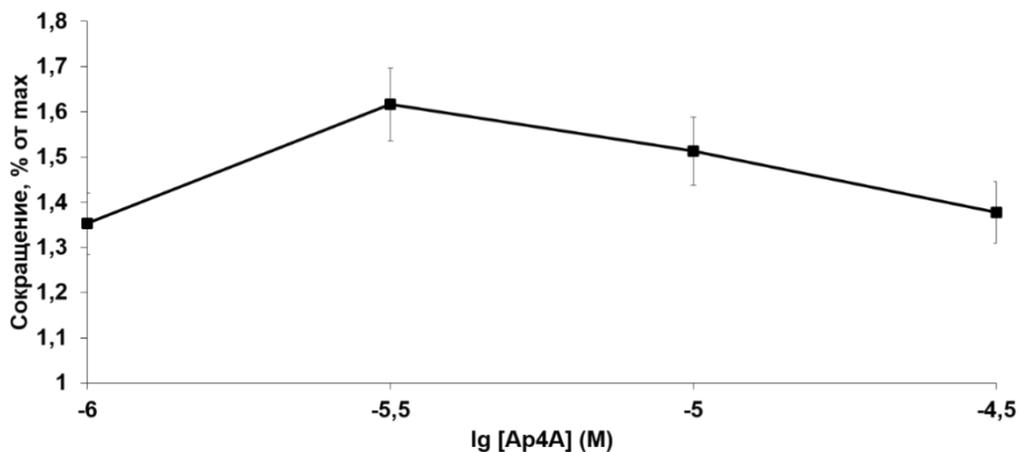


Рисунок 4.34. Сократительный ответ кольцевого препарата коронарной артерии, развиваемый при последовательной подаче Ар₄А (1-30 мкМ, n=5).

При исследовании действия Ар₅А в тех же концентрациях (1-30 мкМ) была обнаружена выраженная дозозависимая вазоконстрикция. Тонус сосуда был наибольшим при подаче Ар₅А в концентрации 30 мкМ; увеличился на 8±2% от максимально возможного уровня (n=5, p<0,05), (Рисунок 4.35.).

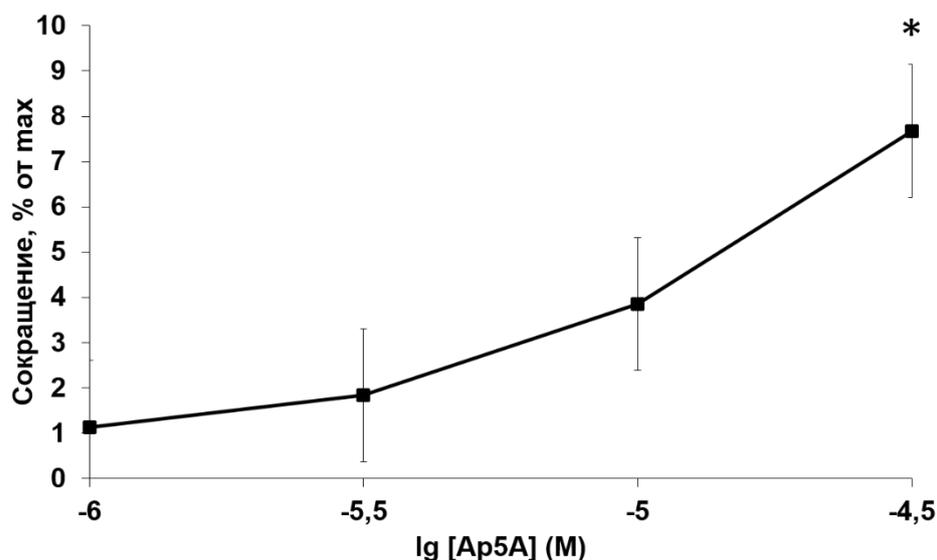


Рисунок 4.35. Сокращение кольцевого препарата коронарной артерии, развиваемое при последовательной подаче Ap_5A (1-30 мкМ, n=5).

4.3.2. Расслабление кольцевых препаратов коронарных артерий, вызываемое перфузией НАД⁺

НАД⁺ вызывал изменение тонуса сегментов коронарных артерий, однако, если диаденозиновые полифосфаты оказывали вазоконстрикторное действие, то НАД⁺ напротив, снижал тонус препаратов. На Рисунок 4.36. представлено дозозависимое снижение сокращения сегментов артерии при последовательной аппликации 3-100 мкМ НАД⁺. Как видно из Рисунок 4.36., НАД⁺ в концентрации 100 мкМ вызвал достоверный вазодилататорный эффект (n=5, p<0,05).

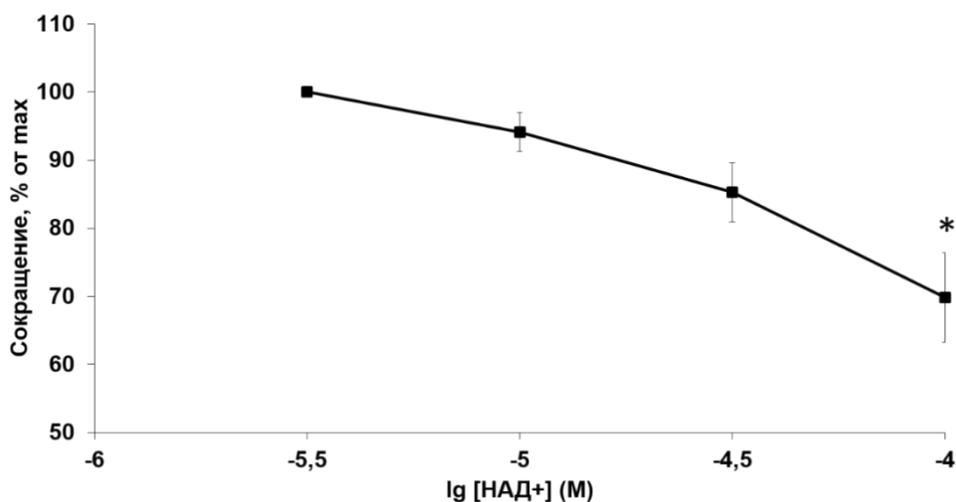


Рисунок 4.36. Дозозависимое снижение тонуса кольцевых препаратов коронарных артерий в ответ на последовательную подачу НАД⁺ (3-100 мкМ, n=5).

4.4. Влияние Ар₄А, Ар₅А и НАД⁺ на колебания уровня цитоплазматического кальция в изолированных кардиомиоцитах крысы

Нами впервые проведено исследование влияния внеклеточного диаденозинтетрафосфата, диаденозинпентафосфата, а также НАД⁺ на динамику цитоплазматического кальция в желудочковых кардиомиоцитах крысы. Были использованы два метода, примененные в двух сериях экспериментов: (1) оценка динамики цитоплазматического кальция в режиме линейного сканирования с помощью лазерной конфокальной микроскопии; (2) оценка динамики цитоплазматического кальция с помощью классической флуоресцентной микроскопии. В результате проведенных экспериментов впервые показано, что Ар₄А и Ар₅А в базальных условиях вызывают снижение амплитуды кальциевых волн в желудочковых кардиомиоцитах крысы (Рисунок 4.14; Рисунок 4.15.). Однако, НАД⁺ не оказывал существенного влияния на динамику цитоплазматического кальция (Рисунок 4.16.).

4.4.1. Влияние Ар₄А на амплитуду «кальциевых волн» в кардиомиоцитах желудочкового миокарда крысы

При аппликации диаденозинтетрафосфата в концентрации 10 мкМ (5 мин) уровень флуоресценции, пропорциональный внутриклеточной концентрации кальция, в желудочковых кардиомиоцитах статистически значимо снижался (n=14 клеток от 5

животных, $p < 0,05$) и составлял $45,5 \pm 11\%$ от значений в контрольных условиях (Рисунок 4. 14., Рисунок 4.17.).

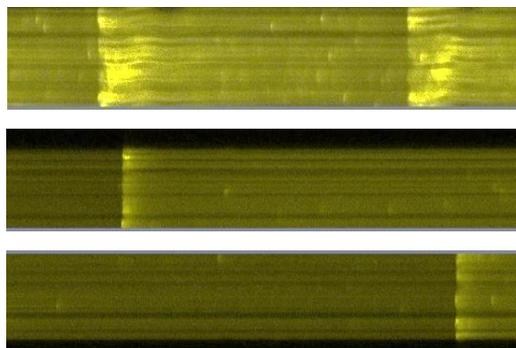


Рисунок 4.14. Примеры флуоресцентных сигналов (Fluo-4), полученные от энзиматически изолированных ритмически стимулируемых кардиомиоцитов крысы в контроле (сверху), после 3 мин. действия 10 мкМ Ar_4A (в середине) и после 5 мин. действия Ar_4A .

4.4.2. Влияние Ar_5A на амплитуду «кальциевых волн» в кардиомиоцитах желудочкового миокарда

Как и Ar_4A , внеклеточный экзогенный диаденозинпентафосфат (10 мкМ) в наших экспериментах оказывал заметное влияние на динамику цитоплазматического кальция в желудочковых кардиомиоцитах. Диаденозинпентафосфат в концентрации 10 мкМ (5 мин) статистически значимо снижал уровень флуоресценции, пропорциональный внутриклеточной концентрации кальция, в желудочковых кардиомиоцитах ($n=13$ клеток от 5 животных, $p < 0,05$). Уровень флуоресценции составил $49 \pm 13\%$ от контрольного уровня (Рисунок 4.15.).

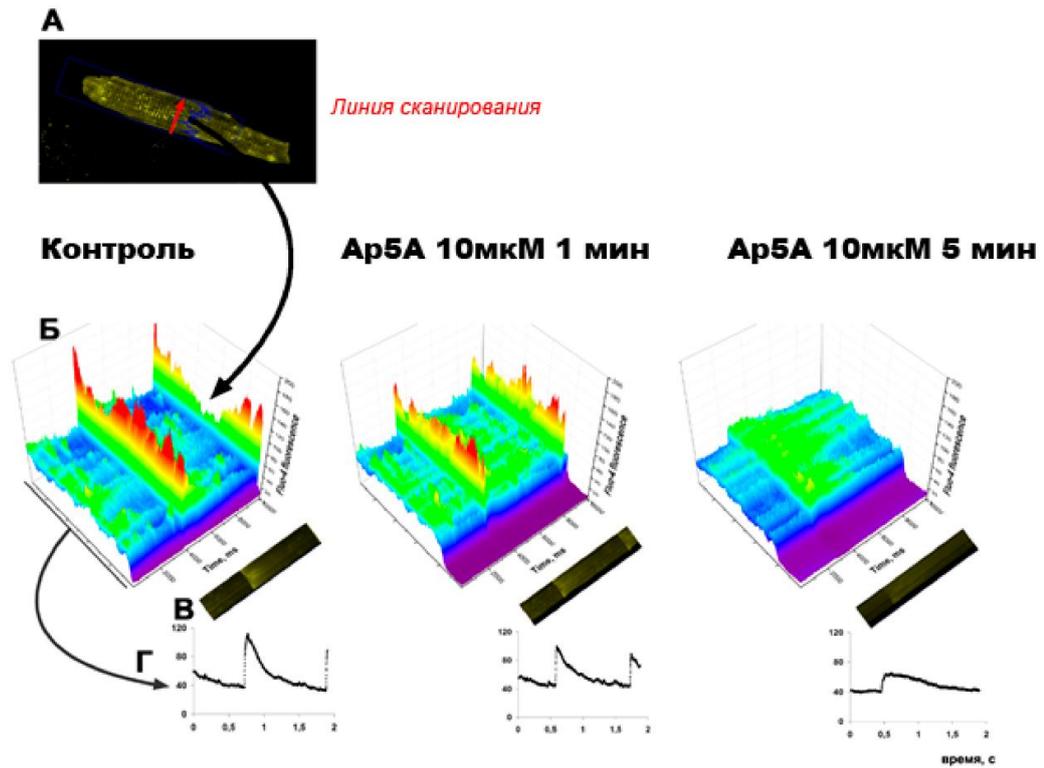


Рисунок 4.15. Репрезентативные примеры визуализации «кальциевой динамики» (кальциевых транзитов) в желудочковых кардиомиоцитах крысы в контрольных условиях и при действии диаденозинпентафосфата (Ar_5A) в концентрации 10 мкМ, полученные с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. (А). Энзиматически изолированный кардиомиоцит, окрашенный флуоресцентным кальциевым сенсором Fluo-4; показана линия сканирования (линия регистрации флуоресценции в режиме «line-scan»). (Б) и (В). Визуализация кальциевых волн, а также исходные записи результатов сканирования. (Г). Пики нормализованной флуоресценции, полученные в результате усреднения в каждый момент времени по линии сканирования. Аппликация Ar_5A в течение 5 минут вызывает значимое снижение амплитуды кальциевых волн.

4.4.3. Влияние $NAД^+$ на амплитуду «кальциевых волн» в кардиомиоцитах желудочкового миокарда

В наших экспериментах внеклеточный $NAД^+$ не оказывал существенного влияния на динамику цитоплазматического кальция. При аппликации $NAД^+$ в концентрации 10 мкМ уровень флуоресценции, пропорциональный внутриклеточной концентрации

кальция, в кардиомиоцитах, не изменялся при действии 10 НАД⁺ в течение 5 минут. Амплитуда «кальциевых волн» под действием НАД⁺ (n=13 клеток от 5 животных, p>0,05) составляла 100±3% от контрольных значений (Рисунок 4.16.). Действие 10 мкМ НАД⁺ в течение 5 минут не приводило к снижению амплитуды кальциевых волн в изолированных кардиомиоцитах крысы.

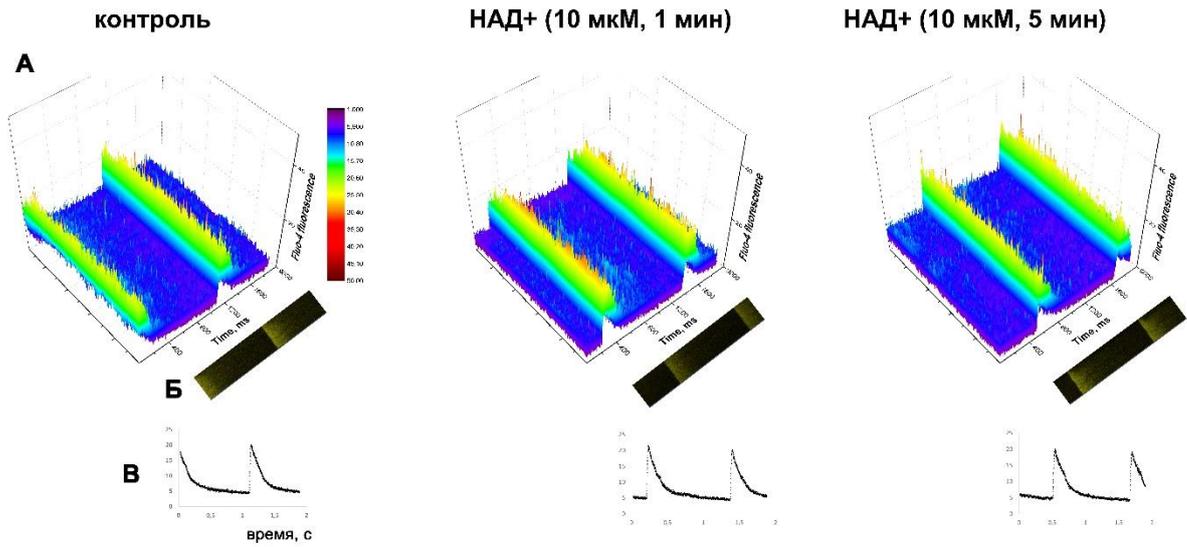


Рисунок 4.16. Репрезентативные примеры визуализации «кальциевой динамики» (кальциевых транзитов) в желудочковых кардиомиоцитах крысы в контрольных условиях и при действии НАД⁺, полученные с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Визуализация кальциевых волн (А), исходные записи результатов сканирования (Б), нормализованная флуоресценция после усреднения по линии сканирования (В).

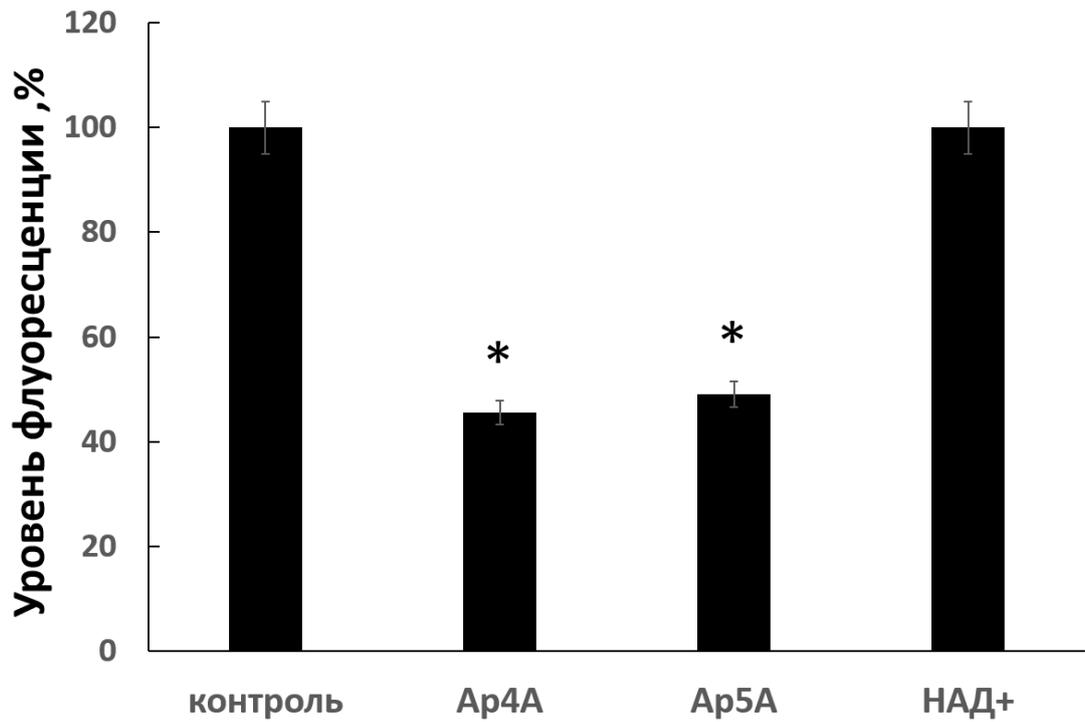


Рисунок 4.17. Уровень флуоресценции (пропорциональный внутриклеточной концентрации кальция) при аппликации Ar₄A, Ar₅A и НАД⁺ (10 мкМ) в контроле и через 5 минут. *- p<0,05

4.5. Сопоставление эффектов Ar_4A , Ar_5A , НАД+ с действием агонистов P1-рецепторов (аденозина) и P2- рецепторов (АТФ) в сердце

4.5.1 Влияние аденозина и АТФ на параметры сократительной активности желудочкового миокарда крысы

Несмотря на то, что влияние таких пуриновых соединений, как аденозин и АТФ на инотропию сердца хорошо и давно изучено, в данном разделе будут представлены результаты нескольких серий собственных экспериментов с АТФ и аденозином. Результаты приведенных ниже экспериментов способствуют прояснению роли метаболитов диаденозиновых полифосфатов (и НАД+) в реализации их эффектов в сердце. Можно предположить, что желудочковый миокард крысы и оценка его инотропии оказались подходящим объектом и методикой, для того, чтобы исключить связь эффектов диаденозиновых полифосфатов с образуемым при их расщеплении аденозином

4.5.1.1. Влияние аденозина на сократительную активность желудочкового миокарда крысы

В наших экспериментах аденозин всегда вызывал увеличение сократимости желудочкового миокарда сердца крысы ($n=10$). Аденозин в концентрации 10 мкМ в сердце крысы приводил к статистически значимому увеличению развиваемого давления (на $12\pm 8\%$, $p<0.05$), максимальной скорости сокращения левого желудочка (на $11\pm 7\%$, $p<0.05$) (Рисунок 4.18., Рисунок 4.20.). Результаты экспериментов, выполненные в нашей лаборатории, согласуются с результатами, полученным другими исследователями [Woodiwiss et al., 1999]. Подобные эффекты аденозина описаны в литературе; положительные инотропные эффекты аденозина в желудочковом (но не в предсердном) миокарде крысы связывают с преобладанием в этой ткани аденозиновых рецепторов A2A-типа, которые сопряжены с G_s -белком (в отличие от A1-рецепторов, сопряженных с ингибиторным G_i -белком) [Dobson et al., 1997].

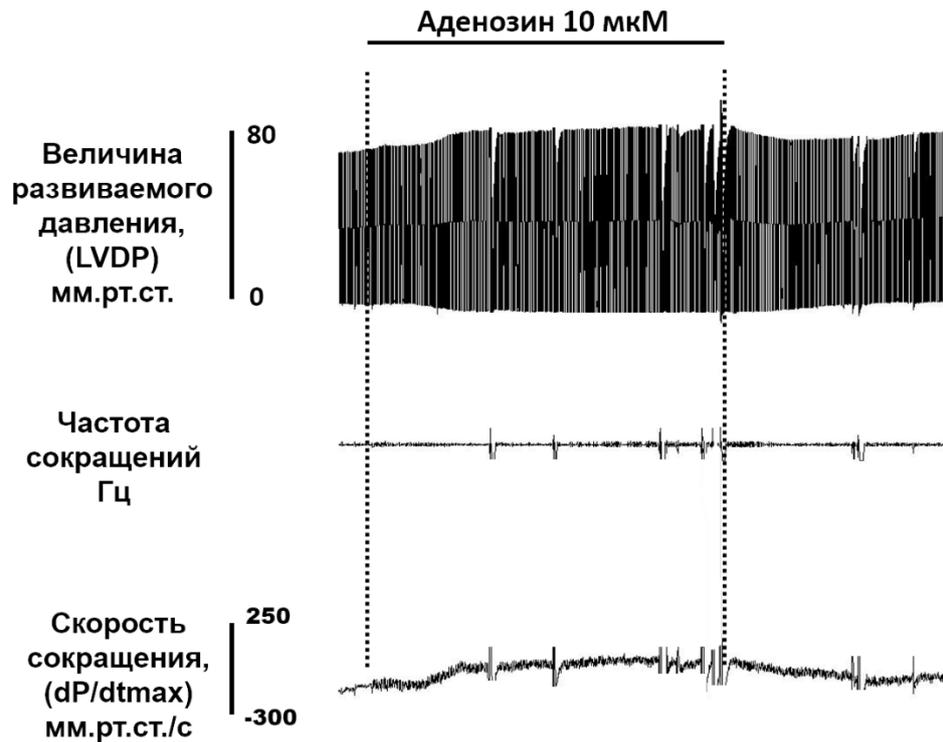


Рисунок 4.18. Репрезентативная оригинальная запись, отражающая изменение сократимости левого желудочка изолированного сердца крысы при действии 10 мкМ аденозина (n=10). Сверху – развиваемое давление (LVDP), в середине – частота сокращения препарата сердца (частота является постоянной, так как препарат работает в навязанном ритме), снизу – максимальная скорость сокращения левого желудочка.

4.5.1.2. Влияние АТФ на сократительную активность желудочкового миокарда крысы

Как и аденозин, АТФ в наших экспериментах вызывал (n=6) увеличение сократимости желудочкового миокарда. АТФ в концентрации 10 мкМ приводил к статистически значимому увеличению развиваемого давления (на $14 \pm 8\%$, $p < 0.05$), максимальной скорости сокращения левого желудочка (на $15 \pm 8\%$, $p < 0.05$) сердца крысы (Рисунок 4.19., Рисунок 4.20.). Результаты экспериментов, выполненных в нашей лаборатории, соответствуют результатам, полученным другими авторами: увеличение инотропии при действии АТФ в диапазоне концентраций 10-100 мкМ описано в литературе для желудочкового миокарда крысы и других млекопитающих [Mei et al., 2001; Shen et al, 2014]. Механизм реализации положительного инотропного действия, сложен и включает активацию P2 рецепторов самим АТФ, накопление IP₃, а также активацию A2A-рецепторов его метаболитом аденозином.

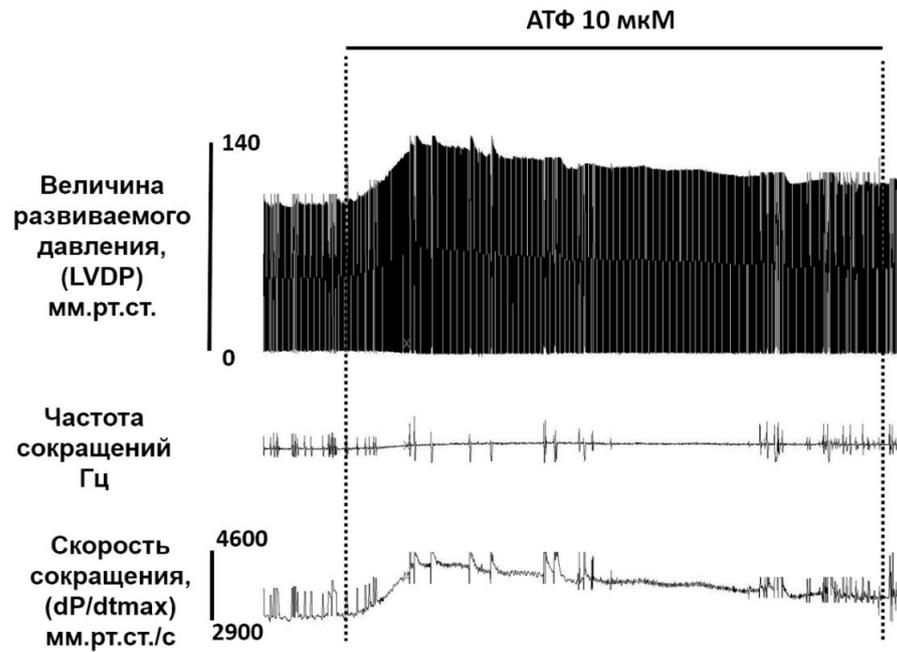


Рисунок 4.19. Репрезентативная оригинальная запись, отражающая изменение сократимости левого желудочка изолированного сердца крысы при действии 10 мкМ АТФ, (n=6). Сверху – развиваемое давление (LVDP), в середине – частота сокращения препарата сердца (частота является постоянной, так как препарат работает в навязанном ритме), снизу – максимальная скорость сокращения левого желудочка.

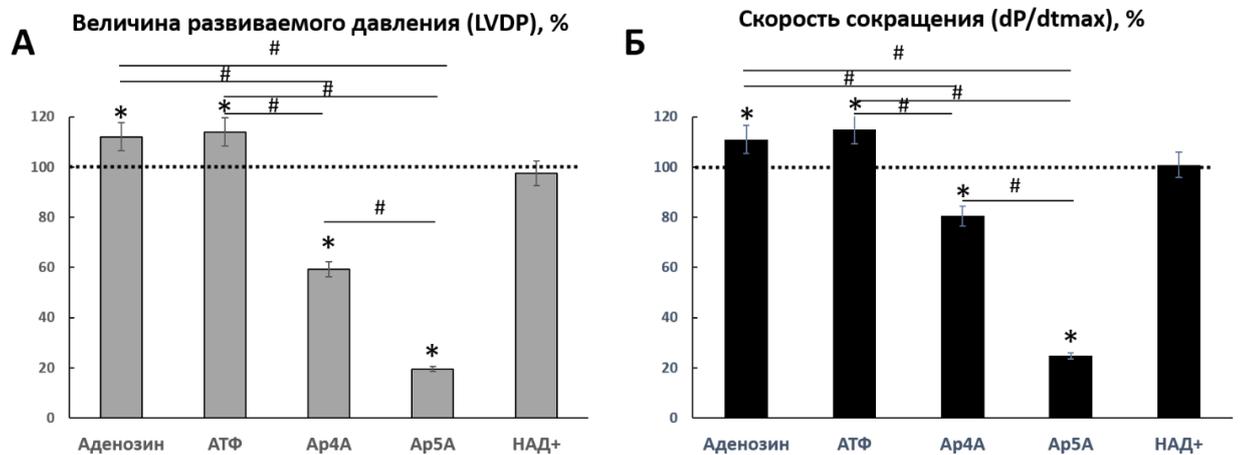


Рисунок 4.20. Сопоставление влияния аденозина, АТФ, а также диаденозинтетрафосфата, диаденозинпентафосфата и НАД⁺ на сократимость желудочкового миокарда крысы (в процентах от контрольных значений). Концентрация соединений 10 мкМ. Пунктирной линией обозначен контроль (100%). (А) -изменение развиваемого давления; (Б) – изменение максимальной скорости сокращения. * -p<0.05; # -p<0.05.

Результаты, касающиеся действия Ap_4A , Ap_5A и $НАД^+$ в желудочковом миокарде крысы приведены в разделе 4.1., а также на рисунках 4.1. - 4.4. Кратко повторим, что диаденозиновые полифосфаты не вызывали положительных инотропных эффектов в наших экспериментах. $НАД^+$ не оказывал существенного влияния на инотропию. Таким образом, Ap_4A , Ap_5A и аденозин оказывают разнонаправленное действие на сократимость желудочкового миокарда крысы, что позволяет предположить, что эффекты Ap_4A , Ap_5A , не обусловлены их немедленным расщеплением с образованием аденозина.

4.5.2. Влияние аденозина и АТФ на биоэлектрическую активность миокарда крысы (на примере левого предсердия)

Влияние АТФ и аденозина на биоэлектрическую активность сердца хорошо изучено, однако также, как и в разделе 4.4.1., в данном разделе предоставлены результаты, полученные в нашей лаборатории. Действие Ap_4A , Ap_5A и $НАД^+$ было сопоставлено с эффектами АТФ и аденозина на примере предсердного миокарда крысы [Pustovit et al., 2015].

Снижение ДПД90 при действии 1 мкМ АТФ и аденозина не было статистически значимым ($n=8$, ($p>0,05$)). В концентрации 10 и 100 мкМ АТФ и аденозин оказывали выраженное влияние на ПД в предсердии крысы. При действии 10 и 100 мкМ АТФ ДПД90 снижалась до $76\pm 5\%$ и до $62\pm 5\%$ от контрольных значений ($n=8$, $p<0,05$), соответственно. Аденозин в концентрации 10 и 100 мкМ вызывал статистически значимое снижение ДПД90 до $85\pm 1\%$ ($n=8$, ($p<0,05$)) и до $54\pm 3\%$ ($n=8$, ($p<0,05$)), соответственно (Рисунок 4.21.). Полученные нами данные согласуются с результатами, полученными в других исследовательских группах [Pelleg et al., 1990; Pelleg et al., 1998]. Значения длительности ПД при действии диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$ приведены выше и на Рисунок 4.21. Таким образом отличительной особенностью исследуемых соединений, а также аденозина и АТФ является сходное снижение длительности ПД в предсердном миокарде.

Как было сказано выше (раздел 4.2.1.), в начале действия $НАД^+$ в некоторых экспериментах наблюдается кратковременное небольшое увеличение ДПД90 (Рисунок 4.7.; Рисунок 4.23.). Таким образом, действие $НАД^+$ является двухфазным, но

основным, эффектом является снижение длительности ПД. В отличие от НАД⁺ эффекты АТФ и аденозина были однофазными, т.е. в ходе их действия не наблюдалось иных изменений ПД, кроме снижения длительности. Эффекты Ар₄А и Ар₅А также не обладали многофазностью.

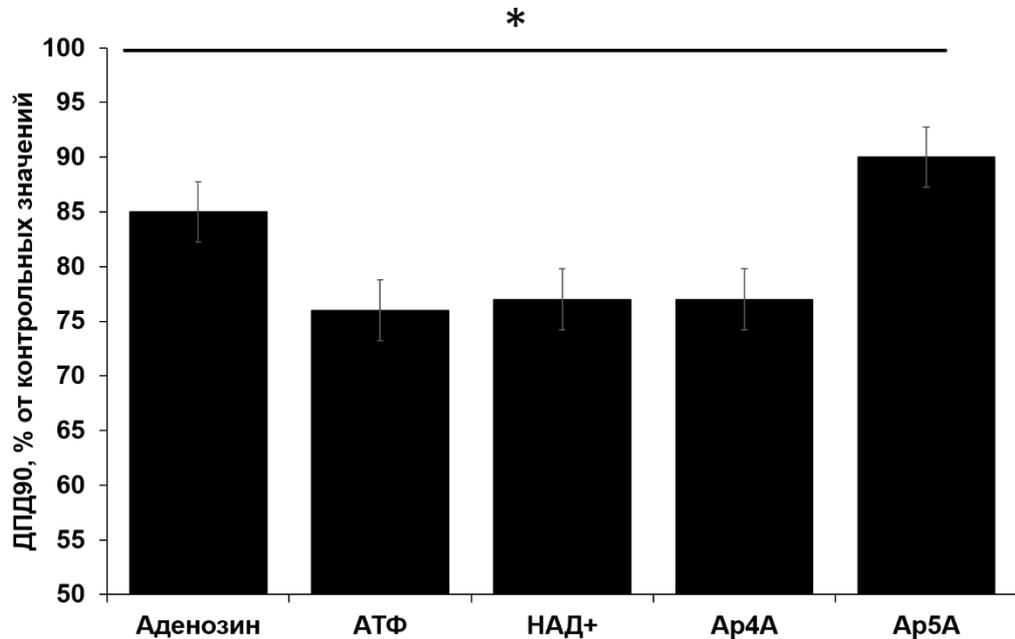


Рисунок 4.21. Влияние аденозина и АТФ, а также НАД⁺, Ар₄А и Ар₅А на ДПД90 в левом предсердии крысы (все вещества использованы в концентрации 10 мкМ), * - P<0,05.

4.6. Результаты экспериментов по выяснению рецепторных механизмов действия диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ в сердце.

Исследование рецепторных механизмов проводили с использованием блокаторов пуринорецепторов на препаратах левого предсердия сердца крысы, работающих в навязанном ритме. Были использованы: неселективный блокатор Р₁- пуринорецепторов- DPCPX (0.1 мкМ), а также блокаторы Р₂-пуринорецепторов PPADS (100 мкМ) и сурамин (10 мкМ). Для неселективной блокады Р₂Х подтипа рецепторов в работе использовался iso-PPADs (1 мкМ) и Evans Blue (0.1 мкМ).

4.6.1. Влияние ДРСРХ на эффекты Ar_4A и Ar_5A в сердце крысы

В наших экспериментах ДРСРХ не вызывал статистически значимого подавления эффектов диаденозиновых полифосфатов (Рисунок 4.22.). При действии Ar_4A на фоне ДРСРХ ДПД90 снижалась на $18\pm 4\%$, ($p < 0,05$, $n = 10$); при действии Ar_5A в присутствии указанного блокатора длительность ПД уменьшалась на $9\pm 5\%$ ($p < 0,05$, $n = 10$). Такое же снижение ДПД90 наблюдали при самостоятельном действии диаденозиновых полифосфатов.

4.6.2. Влияние сурамина и РРАДС на эффекты Ar_4A и Ar_5A в сердце крысы

Для определения роли пуриновых рецепторов Р2-типа в реализации эффектов диаденозиновых полифосфатов нами был использован сурамин. Сурамин (10 мкМ) вызывал практически полную блокаду эффектов как Ar_4A , так и Ar_5A : при действии Ar_4A на фоне сурамина снижение ДПД90 составляло $2\pm 4\%$ ($p > 0,05$, $n = 6$), а при аппликации Ar_5A на фоне сурамина длительность ПД не изменялась ($p > 0,05$, $n = 6$).

В отдельной серии экспериментов также был использован неселективный блокатор Р2-рецепторов – РРАДС (100 мкМ). Однако, был зарегистрирован его самостоятельный эффект. При аппликации РРАДС длительность ПД на уровне реполяризации 90% снижалась на 8-9%. При дальнейшей подаче 10 мкМ Ar_4A на фоне РРАДС, снижение ДПД90 составило $11\pm 3\%$, ($p > 0,05$, $n = 5$, Рисунок 4.22., А, В). Это снижение было меньше, чем при самостоятельном действии диаденозинтетрафосфата. Эффект 10 мкМ Ar_5A также был частично заблокирован. Аппликация Ar_5A на фоне блокатора вызвала снижение ДПД90 только на $5\pm 1\%$, ($p > 0,05$, $n = 6$, (Рисунок 4.22. Б, Г).

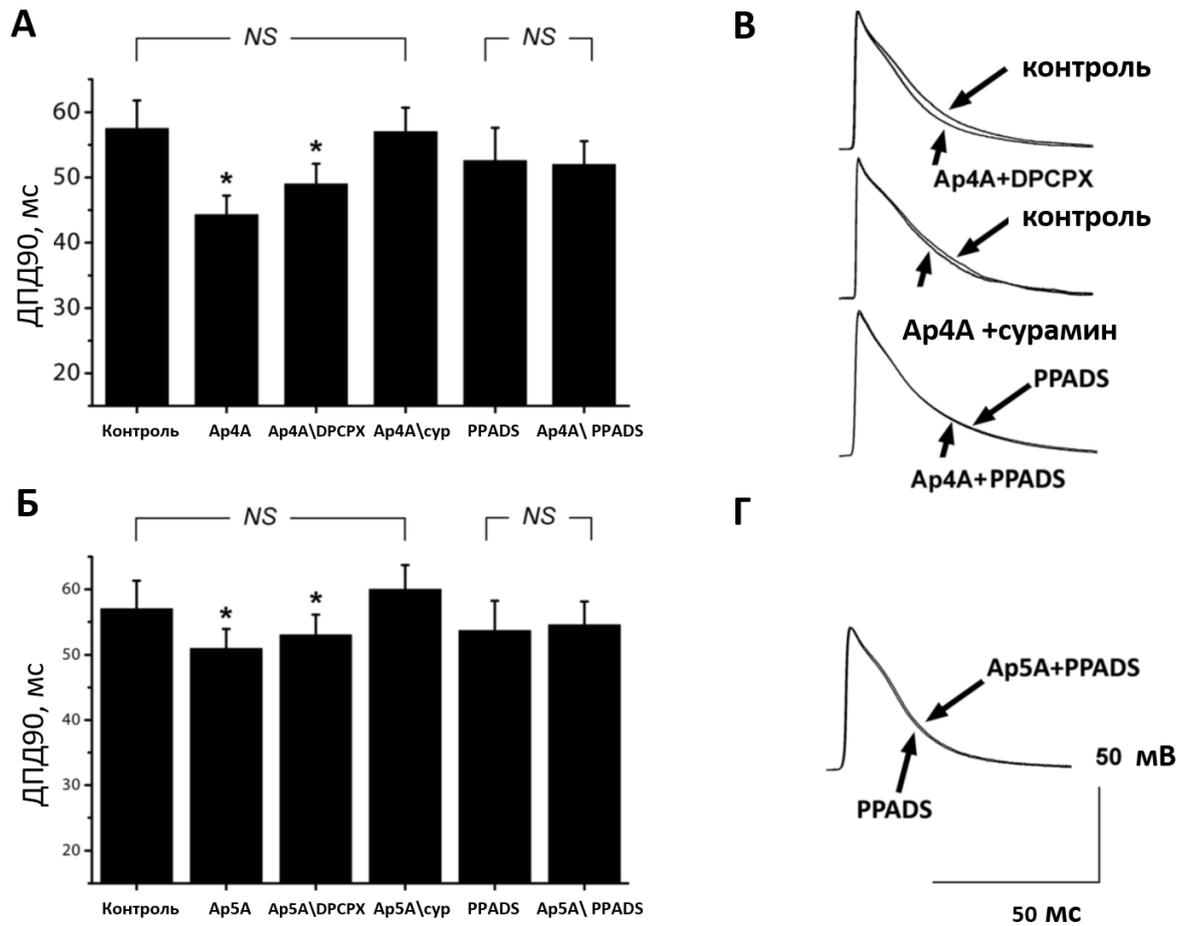


Рисунок 4.22. Влияние блокаторов P1-пуринорецепторов DPCPX (0.1 мкМ) и P2-пуринорецепторов: сурамина (сур (10 мкМ) и PPADS (100 мкМ) на ингибиторные эффекты Ar₄A (10 мкМ) (A) и Ar₅A (10 мкМ) (Б) в левом предсердии. ДПД90% указано в миллисекундах. (В) - репрезентативные примеры потенциалов действия в ЛП в контроле, при действии Ar₄A (10 мкМ) и на фоне блокаторов; (Г) - репрезентативные примеры потенциалов действия в ЛП в контроле, при действии PPADS (100 мкМ) и при совместной подаче с Ar₅A (10 мкМ); NS – не достоверно. *- p<0.05 в сравнении с контролем.

4.6.3. Влияние iso-PPADs и Evans Blue на эффекты НАД⁺ в сердце крысы

Как уже отмечалось, в некоторых наших экспериментах наблюдался двухфазный профиль эффекта НАД⁺ (10 мкМ) (раздел 4.2.1.). В течение первых 45 секунд подачи НАД⁺, ДПД90 увеличивалась на 19±5% (на 19±5%, p<0.05, n=3) от контрольного уровня. Подобного временного увеличения длительности не наблюдалось при действии

1-10 мкМ $A_{\mu 4}A$ и $A_{\mu 5}A$. Аппликация iso-PPADs (1 мкМ) и Evans Blue (0.1 мкМ) приводила к подавлению «положительного» эффекта НАД⁺ (Рисунок 4.23.). Следует указать, что при подаче iso-PPADDs ДПД90 составила $78 \pm 8\%$ ($p < 0.05$, $n=6$), по сравнению с контролем, и $82 \pm 11\%$ - при аппликации Evans Blue ($p < 0.05$, $n=6$).

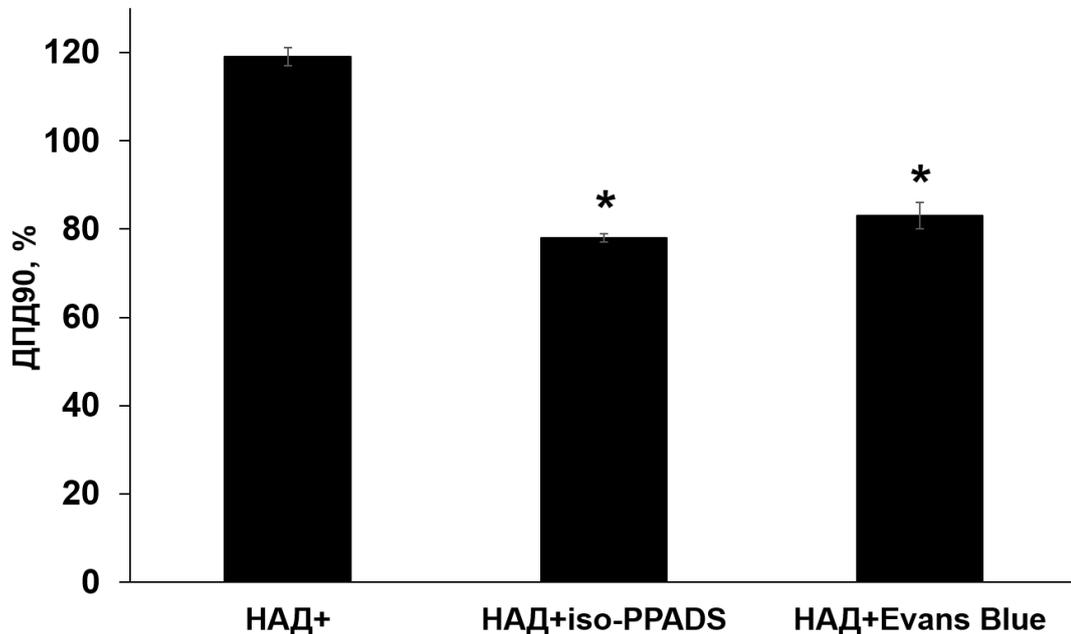


Рисунок 4.23. Изменение ДПД90 при аппликации НАД⁺(10 мкМ) (Показан его положительный эффект) на фоне блокаторов P2X-рецепторов iso-PPADs (1 мкМ) и Evans Blue (0.1 мкМ). За контроль принято 100%. *- $p < 0.05$

4.6.4. Исследование рецепторных механизмов действия диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ в сердце морской свинки. Влияние DPСРХ и терциапина

В предсердном миокарде морской свинки практически полное подавление эффектов $A_{\mu 5}A$ вызывал селективный блокатор P_1 рецепторов DPСРХ (1 мкМ) - ДПД90 снижалась лишь до $99 \pm 3\%$ от контрольных значений, $n=6$; $p > 0.05$ (Рисунок 4.24).

Для проверки предположения об участии тока I_{KAcH} в реализации описанных эффектов в суправентрикулярном миокарде морской свинки были проведены опыты с аппликацией высокоселективного пептидного блокатора каналов этого тока - терциапина. Оказалось, что терциапин в концентрации 1 мкМ практически полностью

снимал действие 100 мкМ Ap_5A , даже если он был апплицирован на фоне уже развившегося эффекта этого соединения (Рисунок 4.24.).

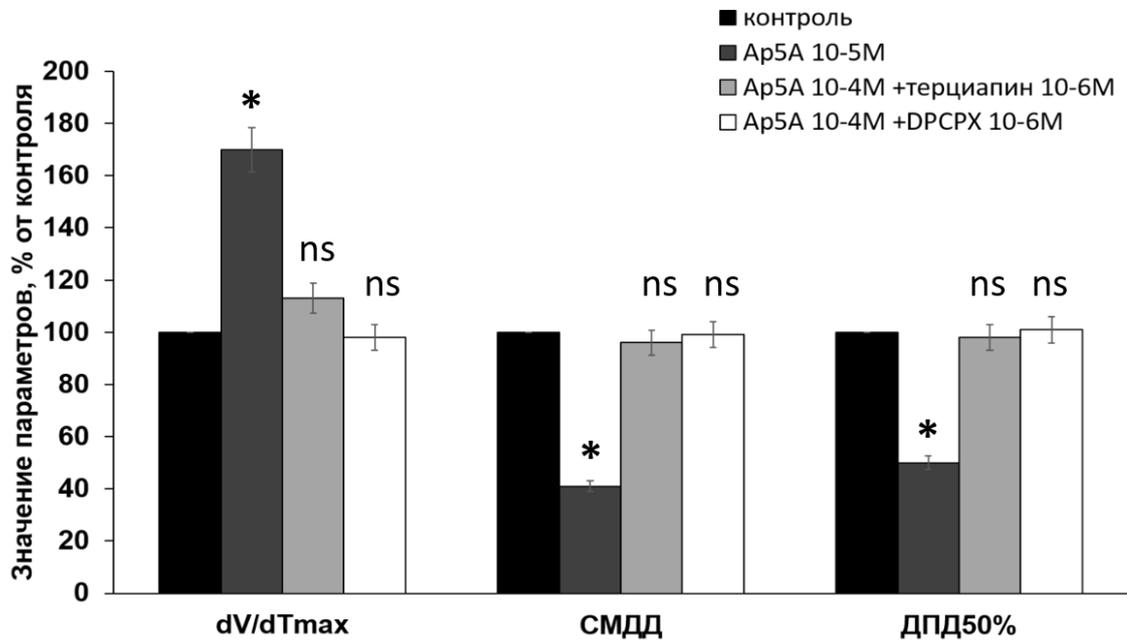


Рисунок 4.24. Изменение параметров пейсмекерной электрической активности (скорость нарастания переднего фронта ПД (dV/dt_{max}), скорость медленной диастолической деполяризации (СМДД) и длительность ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50%) под действием 100 мкМ Ap_5A в норме, а также на фоне 1 мкМ терциапина или 1 мкМ селективного блокатора P_1 пуринорецепторов DPCPX. *- $p < 0.05$; ns-недостовверное значение.

Для того, чтобы напрямую показать способность исследуемых соединений индуцировать калиевый ацетилхолинзависимый ток, были проведены эксперименты с регистрацией потенциала (пэтч-кламп) на изолированных предсердных кардиомиоцитах морской свинки. Как известно, ток I_{KACH} относится к семейству токов входящего (или аномального) выпрямления I_{Kir} . В нормальных условиях I_{KACH} , отсутствует в клетках и активируются только при стимуляции мускариновых рецепторов или других, сопряженных с G_i -белками. С другой стороны, базальный (фоновый) ток аномального выпрямления I_{K1} присутствует в клетках постоянно.

Исследуемые соединения в концентрации 100 мкМ вызывали существенное увеличение как входящей компоненты (при потенциалах негативнее калиевого

равновесного), так и выходящей компоненты регистрируемого совокупного тока аномального выпрямления (Рисунок 4.25.). В концентрации 10 мкМ Ар₄А и НАД⁺ не вызвали достоверного увеличения тока, а Ар₅А значительно увеличил только входящую компоненту. Данный «прибавочный» ток по своей вольт-амперной зависимости соответствует известной вольт-амперной характеристике I_{КАCh}. Кроме того, в трех экспериментах со 100 мкМ Ар₅А -- терциапин (1 мкМ) (p<0.05, n=6), апплицированный на фоне Ар₅А, практически полностью устранил «прибавочный» ток, не повлияв на базальный ток I_{К1} (Рисунок 4.25.).

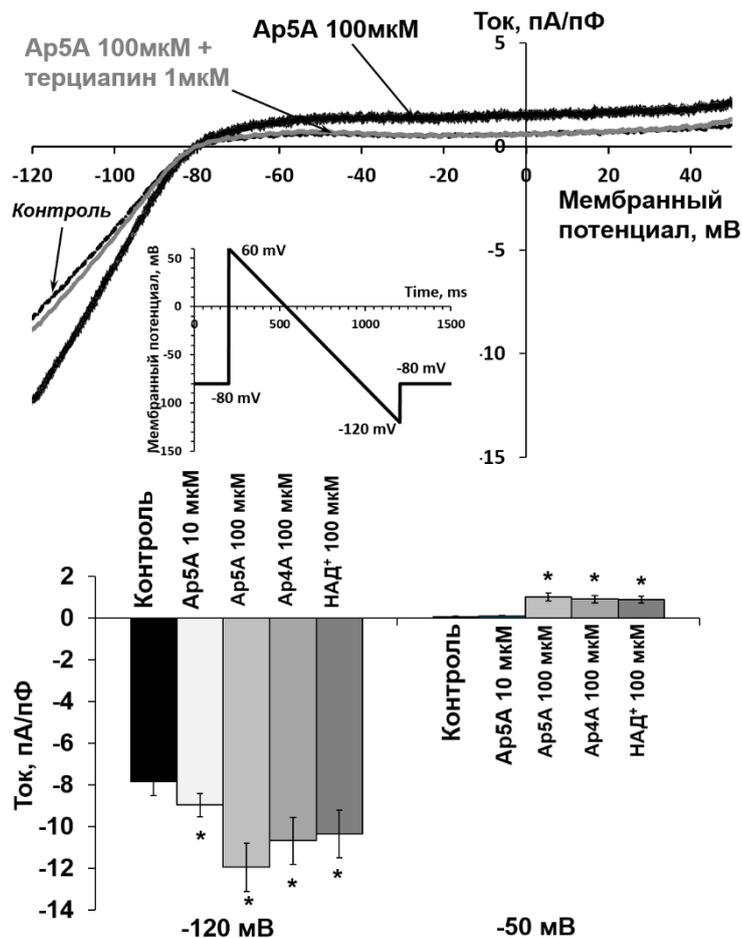


Рисунок 4.25. Калиевые токи аномального (входящего) выпрямления, зарегистрированные в предсердных кардиомиоцитах морской свинки в норме и на фоне действия НАД⁺ и диаденозиновых полифосфатов. Сверху: вольт-амперные кривые суммарного тока в контроле (в таких условиях ток аномального выпрямления включает лишь базальный ток I_{К1}) и на фоне 10 мкМ Ар₅А (сумма I_{К1} и I_{КАCh}), а также после добавления к Ар₅А блокатора I_{КАCh} терциапина (1 мкМ). Кривые построены по оригинальным записям тока в репрезентативном эксперименте без вычитания тока утечки. Ток аномального выпрямления регистрировали при изменении мембранного

потенциала по линейному протоколу, представленному на вставке. Снизу: средние ($n=5$ для каждого из веществ) величины суммарного тока аномального выпрямления, измеренного при -120 мВ (максимум входящей компоненты токов I_{K1} и I_{KACH}) и $+20$ мВ (максимум выходящей компоненты тока I_{KACH}), в контроле и на фоне 10^{-5} М НАД⁺, Ар₄А и Ар₅А. Значения получены после вычитания тока утечки, зарегистрированного на фоне 2 мМ Ва²⁺; *- $p<0.05$.

4.7. Внутриклеточные сигнальные каскады, обуславливающие влияние диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ на предсердные потенциалы действия в сердце крысы

4.7.1. Влияние ингибиторов каскада оксида азота на укорочение потенциалов действия, вызываемое Ар₄А в сердце крысы

Для выяснения роли сигнального пути NO/cGMP были проведены эксперименты по исследованию влияния ингибитора растворимой гуанилатциклазы - ODQ (5 мкМ), и ингибитора NO-синтазы - L-NAME (100 мкМ) на эффекты пуриновых соединений. Было показано, что ни один из ингибиторов не повлиял на развитие эффекта как Ар₄А, так и НАД⁺ (Рисунок 4.26; Рисунок 4.27.).

При одновременном действии L-NAME (100 мкМ) и Ар₄А (10 мкМ) ДПД90 снизилась до $72\pm 5\%$ от контрольных значений ($n=6$; $p<0.05$, Рисунок 4.26. А; В); при подаче ODQ (5 мкМ) и Ар₄А (10 мкМ) ДПД90 также уменьшилась - до $76\pm 5\%$ от контрольных значений ($n=6$; $p<0.05$ Рисунок 4.26. Б; Г), что соответствует самостоятельному действию 10 мкМ Ар₄А ($n=6$; $p>0.05$).

При действии НАД⁺ (10 мкМ) на фоне L-NAME (100 мкМ) происходило снижение ДПД90 до $78\pm 4\%$ от контрольных значений ($n=6$; $p<0.05$, Рисунок 4.27., Б; Г); при одновременном действии ODQ (5 мкМ) и НАД⁺ (10 мкМ) ДПД90 также уменьшилась до $77\pm 7\%$ от контрольных значений ($n=6$; $p<0.05$ Рисунок 4.27., А; В), что также, как и в случае с Ар₄А, соответствует самостоятельному действию 10 мкМ НАД⁺ ($n=6$; $p>0.05$).

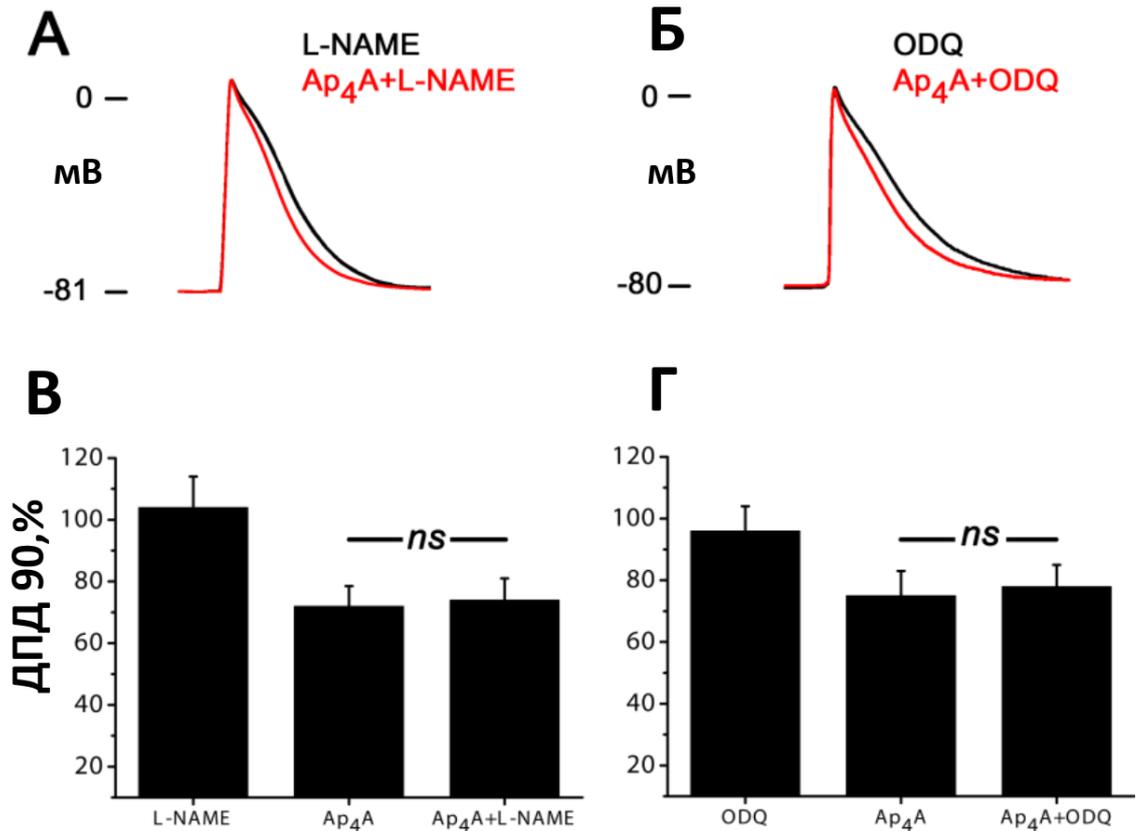


Рисунок 4.26. Влияние L-NAME (100 мкМ) и ODQ (5 мкМ) на ингибиторные эффекты 10 мкМ Ap₄A. В верхней части рисунка: репрезентативные примеры ПД при самостоятельном действии L-NAME и совместной подаче с Ap₄A (А); репрезентативные примеры ПД при самостоятельном действии ODQ и совместной подаче с Ap₄A (Б). В нижней части рисунка: изменение длительности ПД на уровне реполяризации 90% от контрольных значений при действии L-NAME (В) и ODQ (Г). ns – $p > 0.05$ (ANOVA). Контрольные значения приняты за 100%.

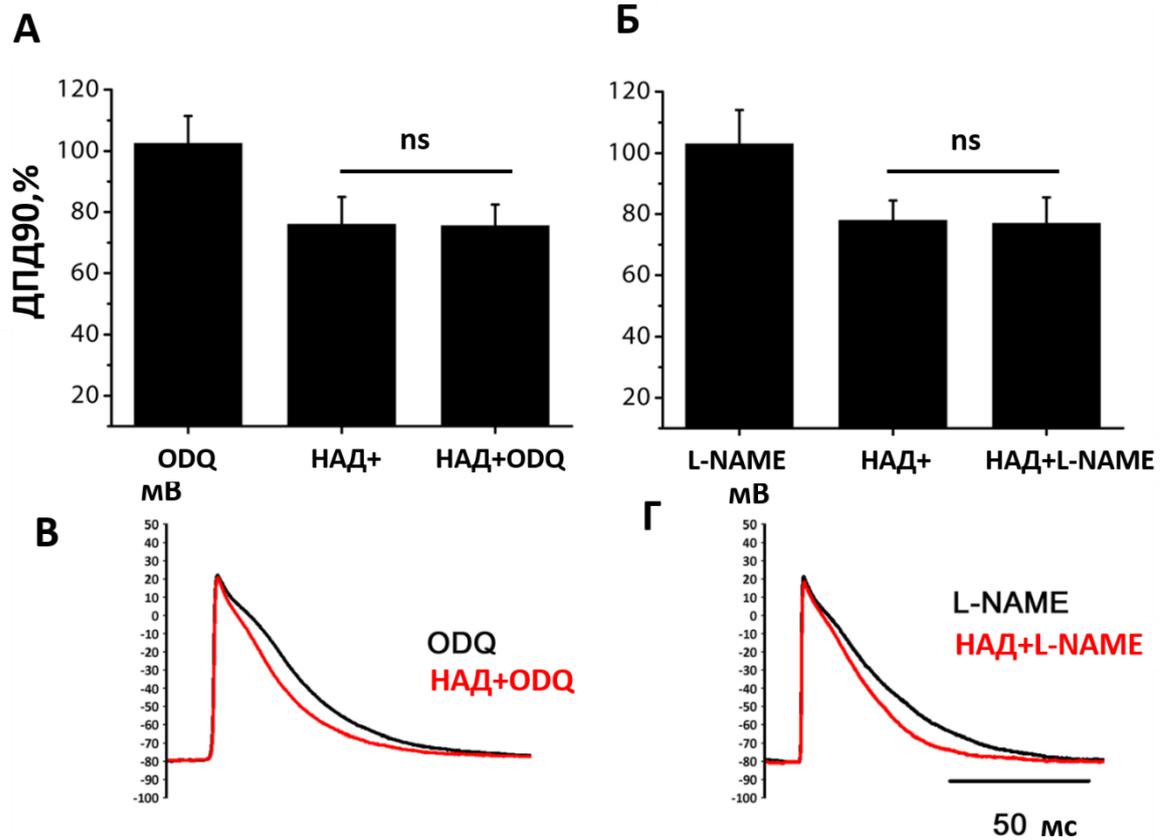


Рисунок 4.27. Влияние L-NAME (100 мкМ) и ODQ (5 мкМ) на ингибиторные эффекты 10 мкМ НАД+. В верхней части рисунка: изменение длительности ПД на уровне реполяризации 90% от контрольных значений при действии ODQ (А) и L-NAME (Б). ns – $p > 0.05$ (ANOVA). Контрольные значения приняты за 100%. В нижней части рисунка: репрезентативные примеры ПД при самостоятельном действии ODQ и совместной подаче с НАД+ (В); репрезентативные примеры ПД при самостоятельном действии L-NAME и совместной подаче с НАД+ (Г).

4.7.2. Влияние ингибиторов фосфолипаз на укорочение потенциалов действия, вызываемое Ар₄А, Ар₅А и НАД+ в сердце крысы

Для изучения внутриклеточных механизмов передачи сигнала при действии Ар₄А, Ар₅А и НАД+ была предпринята попытка исследовать роль фосфолипаз С (PLC) и D (PLD).

Совместная подача 0.1 мкМ U73122 и 10 мкМ НАД+ привела к незначимому снижению ДПД90 до $83 \pm 3\%$ от контрольных значений ($p > 0.05$, $n = 5$) (Рисунок 4.28 А, Б). При аппликации U73122 совместно с Ар₄А и Ар₅А ДПД90 уменьшилась до $75 \pm 6\%$ и

77±8% ($p < 0,05$, $n=6$) от контрольных значений. Однако статистически значимых отличий между самостоятельным эффектом пуриновых соединений и их действием на фоне блокатора выявлено не было ($p > 0,05$, $n=6$),

В свою очередь FIP1 в концентрации 0.1 мкМ совместно с НАД+ 10 мкМ снизил ДПД90 до 78±5% от контрольных значений ($p < 0,05$, $n=6$) (Рисунок 4.28 А, В). При аппликации FIP1 совместно с Ар4А и Ар5А ДПД90 уменьшилась до 73±6% и 80±7%, соответственно ($p < 0,05$, $n=6$) от контрольных значений. Статистически значимых отличий между эффектом пуриновых соединений и их действием на фоне FIP1 выявлено не было ($p > 0,05$, $n=6$).

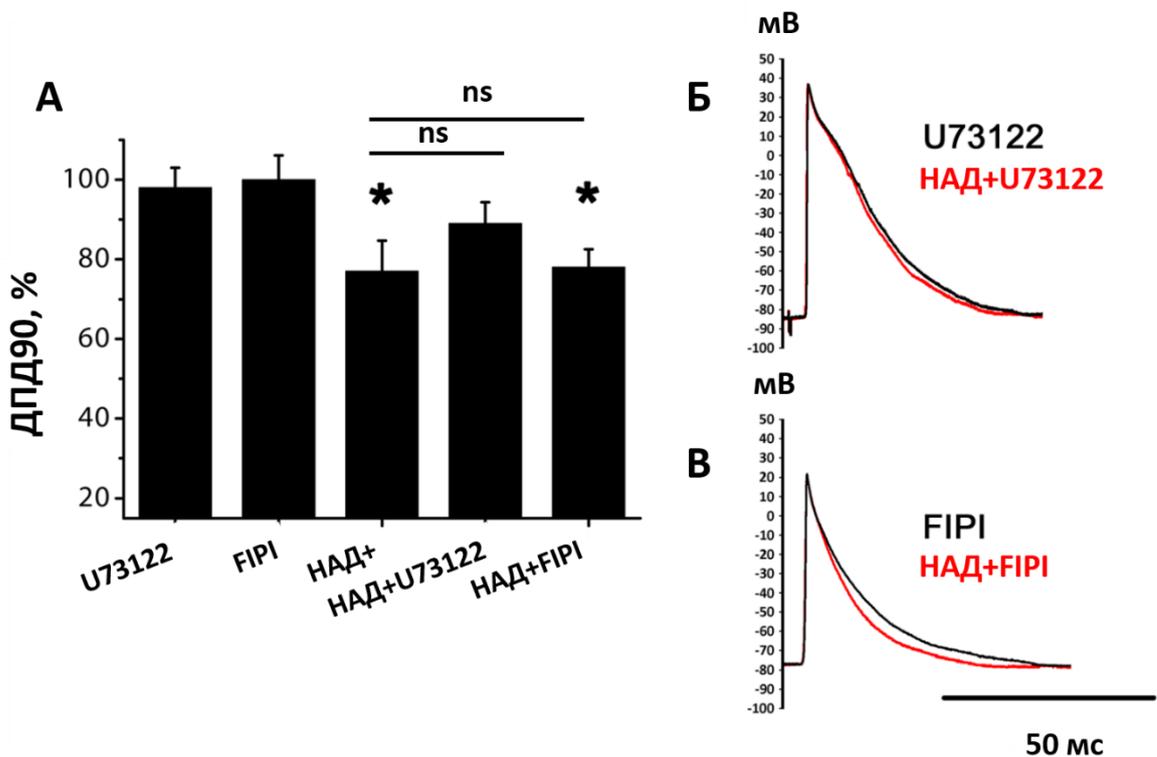


Рисунок 4.28. Влияние 0.1 мкМ U73122 и 0.1 мкМ FIP1 на ингибиторные эффекты 10 мкМ НАД+. (А)-изменение ДПД90 в процентах от контрольных значений при действии U73122 и FIP1, (*- $p < 0,05$, $n=6$; ns – $p > 0,05$ (ANOVA), Контрольные значения приняты за 100%. (Б)- репрезентативные примеры ПД при действии U73122 и совместной подаче с НАД+; (В)- репрезентативные примеры ПД при самостоятельном действии FIP1 и совместной подаче с НАД+.

4.7.3. Влияние ингибирования протеинкиназы С на укорочение потенциалов действия, вызываемое Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ в сердце крысы

Нами проведены эксперименты с блокатором РКС - хелеретрином (10 мкМ) для выявления возможного участия протеинкиназы С в развитии эффектов диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$. Из рисунка 4.29. видно, что эффект диаденозинтетрафосфата (10 мкМ) практически полностью подавлялся хелеретрином. ДПД90 при действии Ar_4A на фоне хелеретрина составила $91 \pm 4\%$ ($p > 0,05$) от контрольных значений ($n=6$). Подобные результаты были получены в экспериментах с Ar_5A и $НАД^+$ (10 мкМ), ДПД90 составила $86 \pm 5\%$ ($p > 0,05$, $n=6$) и $89 \pm 3\%$ ($p > 0,05$, $n=5$) соответственно.

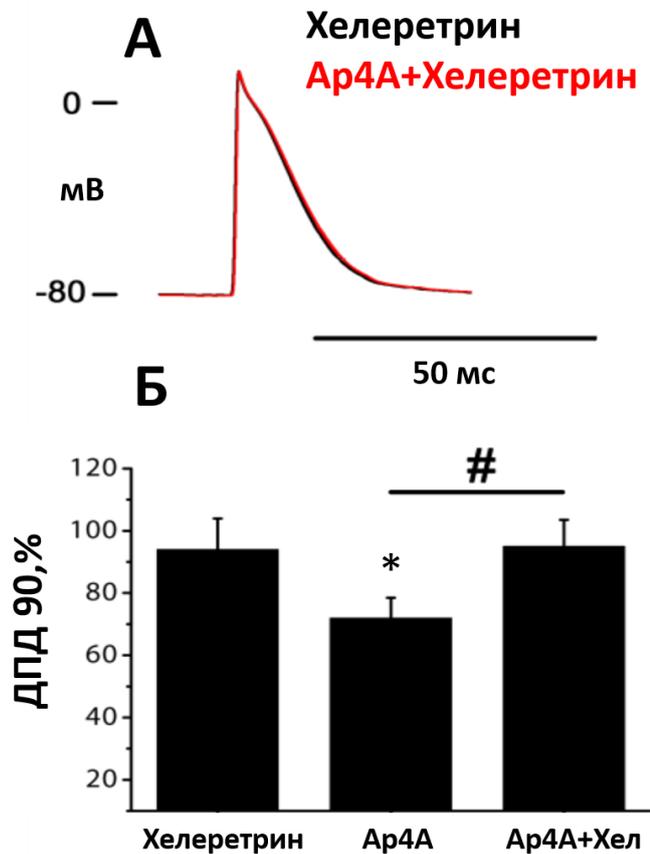


Рисунок 4.29. Эффекты блокатора протеинкиназы С хелеретрина (Хел) (10 мкМ) на ингибиторное действие Ar_4A (10 мкМ). (А) - репрезентативные примеры ПД при самостоятельном действии хелеретрина и совместной подаче с Ar_4A ; (Б) - изменение длительности ПД на уровне реполяризации 90% от контрольных значений при действии хелеретрина. * – $p < 0.05$, # – $p < 0.05$ (ANOVA). Контрольные значения приняты за 100%.

4.8. Внутриклеточные сигнальные каскады, обуславливающие влияние диаденозиновых полифосфатов на сократимость миокарда крысы

4.8.1. Влияние ингибирования NO-синтазы, растворимых гуанилатциклаз и протеинкиназы С на снижение сократимости, вызываемое диаденозинтетрафосфатом

Так как в предыдущих экспериментах нам не удалось выявить значительного влияния НАД⁺ на сократимость желудочкового миокарда и кальциевую динамику в базальных условиях, то дальнейшие эксперименты с НАД⁺ не проводились. Кроме того, поскольку Ар₄А, Ар₅А вызывали сходные изменения длительности потенциалов действия, сократимости и колебаний цитоплазматического кальция, то в дальнейшем исследовании внутриклеточных сигнальных каскадов, затрагиваемых диаденозиновыми полифосфатами использовали только Ар₄А.

В данной серии экспериментов в контрольных условиях развиваемое давление, максимальная скорость сокращения и расслабления были следующими: 100±11 мм рт ст, 2510±213 и 1700±190 мм рт ст/с, соответственно. Диаденозинтетрафосфат (10 мкМ) статистически значимо ($p < 0.01$) снижал развиваемое давление, dP/dt_{max} и dP/dt_{min} на 34,6±15,6%, 34,7±16,2%, 41,4±15,3% (n=7), соответственно.

В присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME (100 мкМ) инотропный и лузитропный эффекты Ар₄А не изменялись (Рисунок 4.30 А), снижение параметров, отражающих сократимость желудочкового миокарда в присутствии L-NAME и диаденозинтетрафосфата было следующим: развиваемое давление - 38,4±17,5%, dP/dt_{max} -38,3±16,6, dP/dt_{min} - 45,4±13,6 (n=7) (Рисунок 4.31). Как и L-NAME, ингибитор растворимых гуанилатциклаз ODQ не оказывал влияния на эффекты Ар₄А (См. Рисунок 4.30. Б). Снижение развиваемого давления, dP/dt_{max} и dP/dt_{min} при действии диаденозинтетрафосфата на фоне 10 мкМ ODQ составляло 36±18%, 41±15% 40±17% (от контрольных значений), соответственно (Рисунок 4.31.).

В противоположность блокаторам сигнального каскада оксида азота - L-NAME и ODQ, ингибитор протеинкиназы С хелеретрин статистически значимо (n=5, P<0.05) снижал инотропный и лузитропный эффекты Ар₄А в желудочковом миокарде крысы. Развиваемое давление, максимальная скорость сокращения желудочкового миокарда при действии Ар₄А на фоне 10 мкМ хелеретрина были близки к таковым, наблюдаемым

в контрольных условиях: $93,4 \pm 9,7\%$, $94,8 \pm 11\%$, соответственно. Снижение максимальной скорости расслабления, вызванное Ap_4A (т.е. влияние на луситропию), также статистически значимо подавлялось хелеретрином, но не так полно, как в случае с максимальной скоростью сокращения: при одновременном действии диаденозинтетрафосфата и хелеретрина dP/dt_{min} составляла $84,6 \pm 9,4\%$ от значения в контрольных условиях (Рисунок 4.30.В, Рисунок 4.31).

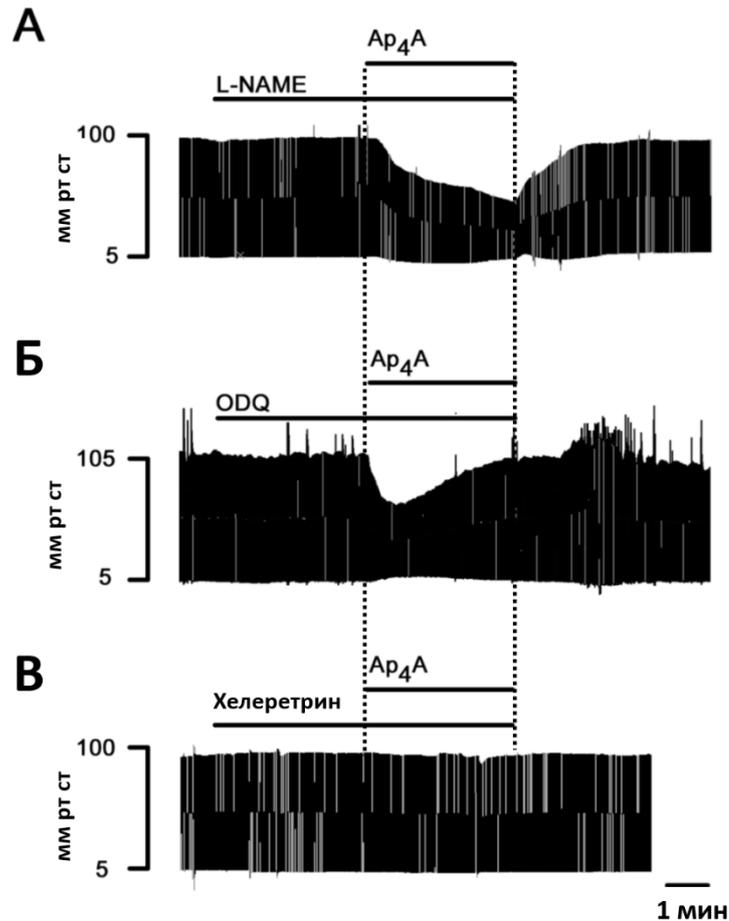


Рисунок 4.30. Репрезентативные фрагменты экспериментальной записи, отражающие изменение развиваемого давления при действии диаденозинтетрафосфата на фоне (А) ингибитора NO-синтаз (L-NAME, 100 мкМ), (Б) ингибитора растворимых гуанилатциклаз (ODQ, 10 мкМ) и (В) ингибитора протеинкиназы С (хелеретрин, 10 мкМ).

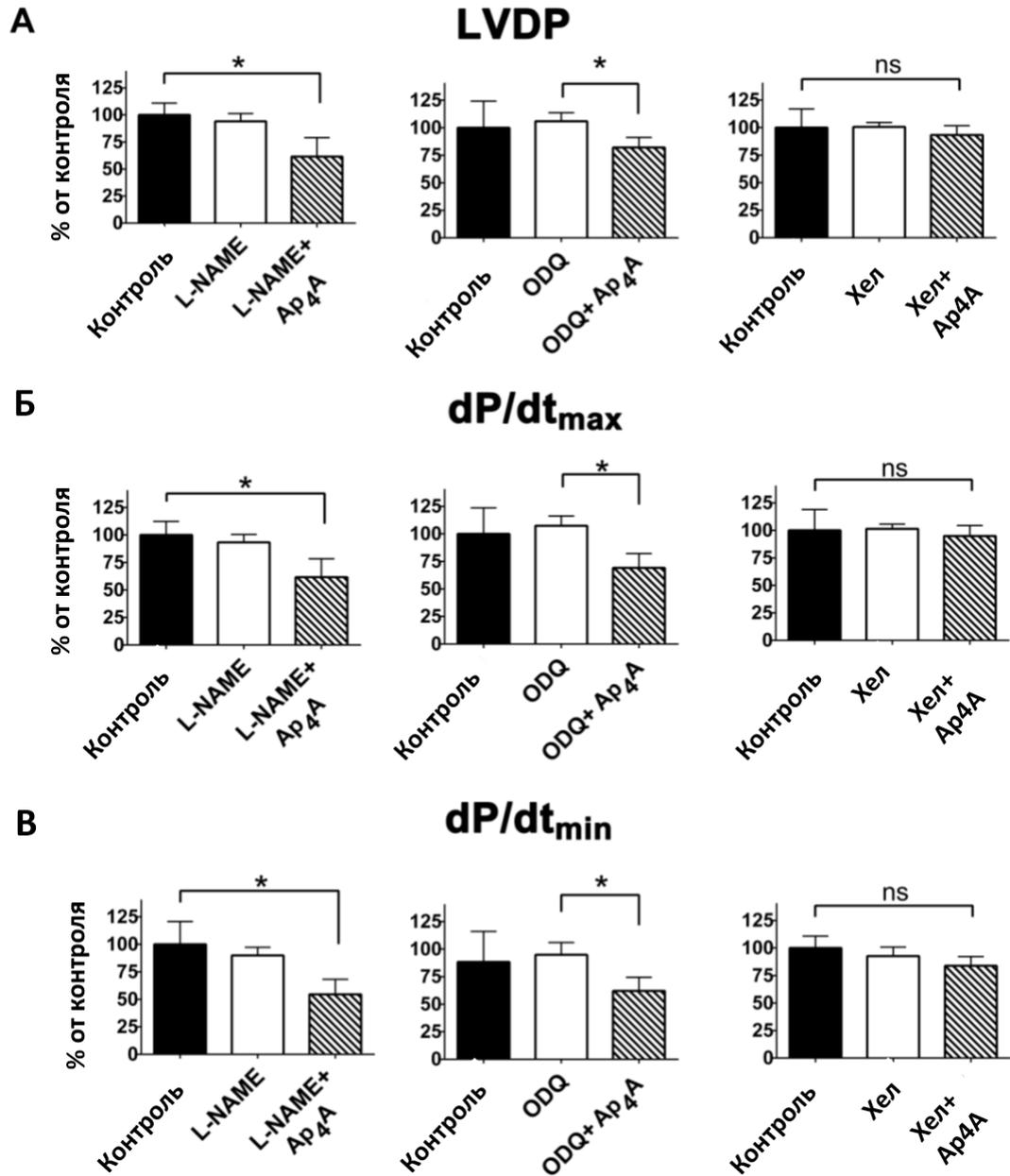


Рисунок 4.31. Влияние ингибитора NO-синтаз (L-NAME 100 мкМ, слева), ингибитора гуанилатциклаз (ODQ 10 мкМ, в центре), и ингибитора протеинкиназы С (хелеретрин 10 мкМ, справа) на эффекты диаденозинтетрафосфата в желудочковом миокарде перфузируемого по Лангендорфу сердца крысы. Только хелеретрин подавляет действие Ap₄A на инотропию желудочкового миокарда. А- LVDP изменение давления при действии Ap₄A; Б- dP/dt_{max}, максимальная скорость сокращения и расслабления (dP/dt_{min}, В) желудочкового миокарда при действии Ap₄A. *– p<0.05, ns– p>0.05 (ANOVA). Контрольные значения приняты за 100%.

4.8.2. Влияние ингибирования NO-синтазы и протеинкиназы С на кальциевую динамику в кардиомиоцитах крысы при действии диаденозиновых полифосфатов (на примере Ар₄А)

Данную серию экспериментов выполняли с помощью классической флуоресцентной микроскопии. Нами установлено, что ни ингибирование NO-синтазы с помощью L-NAME (100 мкМ, n=5, p>0.1, в течение 5 мин), ни ингибирование растворимых гуанилатциклаз (sGC) с помощью ODQ (10 мкМ, n=5, p>0.1, в течение 5 мин) не приводят к подавлению влияния Ар₄А, на кальциевую динамику в желудочковых кардиомиоцитах крысы (Рисунок 4.32. А и Б). L-NAME на фоне Ар₄А вызвал снижение амплитуды кальциевых волн на 35±11%, (n=5, p>0.1). Эффект ODQ на фоне Ар₄А также недостоверно отличался от эффекта Ар₄А: амплитуда кальциевых волн снижалась на 42±11%, (n=5, p>0.1).

С другой стороны, ингибитор протеинкиназы С хелеретрин приводил к значимому снижению эффекта Ар₄А в изолированных кардиомиоцитах: снижения амплитуды кальциевых волн при действии Ар₄А в присутствии хелеретрина не наблюдалось. Более того, нами был зарегистрирован значимый рост амплитуды до 105±6%, (p<0.05, n=6) от исходного уровня (Рисунок 4.32. В).

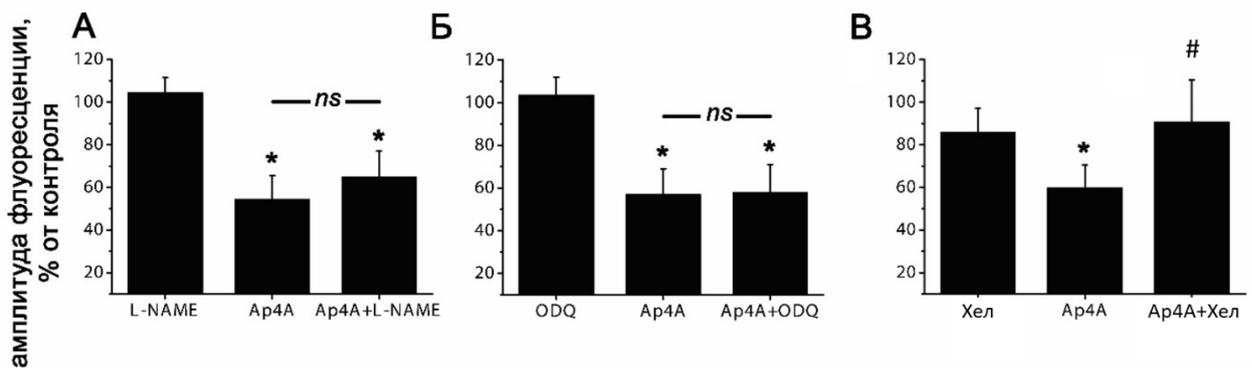


Рисунок 4.32. Влияние Ар₄А в концентрации 10 мкМ на динамику кальция (флуоресценцию Fuo-4) в изолированных желудочковых кардиомиоцитах крысы в базальных условиях, при действии Ар₄А на фоне 100 мкМ ингибитора NO-синтаз L-NAME (А), на фоне 10 мкМ ингибитора гуанилатциклазы ODQ (Б), а также на фоне 10 мкМ ингибитора протеинкиназы С хелеретрина (В). Эффект Ар₄А (снижение амплитуды

кальциевых волн) подавляет хелеретрин, но не L-NAME или ODQ. * - статистически значимое отличие параметра от значения в контрольных условиях, # - статистически значимое различие между группами (ANOVA). $P < 0.05$, ns – статистически не значимо.

4.8.3. Влияние ингибирования фосфодиэстераз на эффекты диаденозиновых полифосфатов в сердце крысы (на примере Ar_4A)

Итак, в нескольких сериях экспериментов нами было показано, что диаденозиновые полифосфаты, но не HA_{D+} снижают сократимость желудочкового миокарда, изолированного сердца крысы в базальных условиях. Кроме того, в экспериментах, выполненных в нашей лаборатории было показано, что диаденозиновые полифосфаты (в отличие от HA_{D+}) способны подавлять инотропные эффекты, вызываемые адренергической стимуляцией желудочкового миокарда [Пахомов и др. 2017]. Можно предположить, что действие диаденозинполифосфатов в кардиомиоцитах связано с регуляцией уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), так как именно это соединение определяет в значительной мере сократимость кардиомиоцитов как в покое, так и при адренергической стимуляции. Эти результаты и предположения легли в основу нашей дальнейшей работы, направленной на выяснение внутриклеточных механизмов, определяющих действие диаденозиновых полифосфатов.

Известно, что в кардиомиоцитах центральным элементом, определяющим сократимость и уровень цАМФ, являются фосфодиэстеразы (ФДЭ). Нами была исследована роль ФДЭ нескольких типов в опосредовании эффектов диаденозинполифосфатов. Как и в предыдущих разделах, в силу сходства эффектов Ar_4A и Ar_5A , в качестве тестового соединения использовали только диаденозинтетрафосфат. Всего нами было выполнено 2 серии экспериментов в данном разделе работы.

В первой серии экспериментов нами было изучено влияние неселективного блокатора ФДЭ IBMX на инотропные эффекты диаденозинтетрафосфата (Рисунок 4.33. А). IBMX полностью подавлял ингибиторный эффект Ar_4A в желудочковом миокарде крысы ($n=6$, $P < 0.05$). При действии диаденозинтетрафосфата (10 мкМ) в присутствии 10 мкМ IBMX развиваемое давление, максимальная скорость сокращения и максимальная скорость расслабления были близки к значениям, наблюдаемым в контрольных

условиях: $93.9 \pm 10\%$, $99.5 \pm 6\%$ и $97.5 \pm 7.2\%$ (от контрольного уровня), соответственно (Рисунок 4.33 В)

Во второй серии экспериментов использован селективный блокатор сGMP-зависимой фосфодиэстеразы второго типа (ФДЭ2) - EHNA. В отличие от IBMX, влияние Ar_4A на инотропию сохранялось практически полностью при действии ингибитора ФДЭ2 (Рисунок 4.33 Б). Развиваемое давление, максимальная скорость сокращения и расслабления в данных экспериментах снижалась на $32 \pm 12\%$, $29 \pm 10,4\%$ и $35 \pm 11,3\%$ ($n=5$) соответственно (Рисунок 4.33 Г). Таким образом, влияние Ar_4A на инотропию при самостоятельном действии и действии на фоне EHNA статистически не различались ($P > 0.05$).

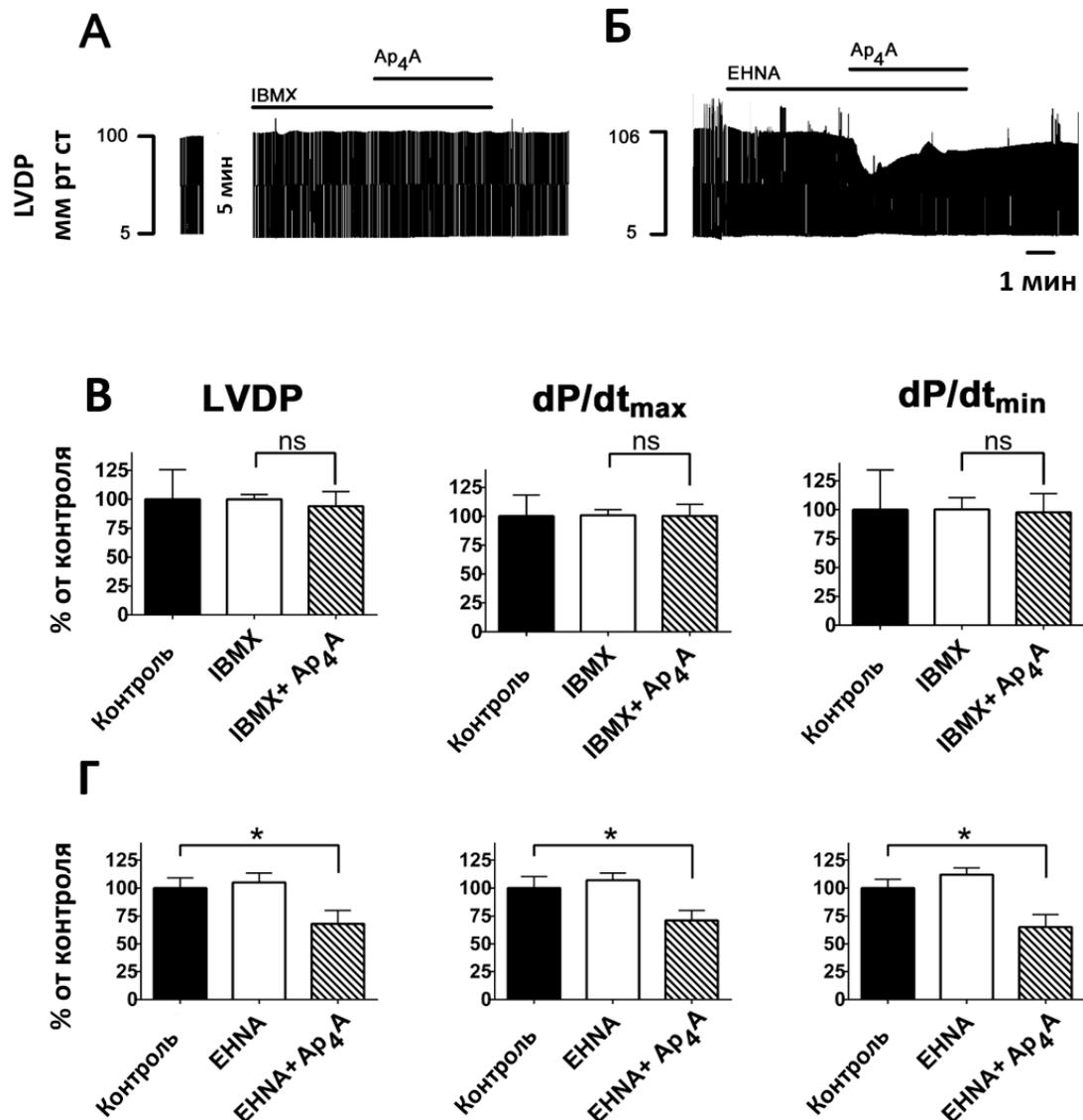


Рисунок 4.33. Неселективный ингибитор ФДЭ IBMX в концентрации 10 мкМ полностью подавляет ингибиторный эффект Ар₄А в желудочковом миокарде крысы, в то время как селективный ингибитор ФДЭ второго типа EHNA (10 мкМ) не оказывает влияния на эффект 10 мкМ Ар₄А. (А)- Репрезентативные фрагменты записи сокращений левого желудочка при действии Ар₄А и IBMX. (Б)- Репрезентативные фрагменты записи сокращений левого желудочка изолированного сердца при действии Ар₄А и EHNA. (В)- Влияние Ар₄А на параметры сократимости (LVDP, dP/dt,max; dP/dt,min) в присутствии IBMX. (Г)- Влияние Ар₄А на параметры сократимости в присутствии EHNA). *- p<0.05, ns – статистически не значимо. Как и в случае с Ар₄А, IBMX, но не EHNA подавлял ингибиторный эффект Ар₄А.

5. ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, в данной работе исследованы эффекты двух диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ в сердце млекопитающих. Прежде чем приступить к обсуждению полученных результатов следует напомнить, почему среди целого ряда диаденозиновых полифосфатов для экспериментов в данной работе отобраны диаденозинтетра- и пентафосфат, а среди (замещенных) производных динуклеотидполифосфатов выбран никотинамидадениндинуклеотид.

Синтез диаденозиновых полифосфатов, и, в первую очередь, Ар₄А, происходит с участием основных ферментных систем, имеющихся во всех клетках и тканях организма [Kisselev et al., 1998; Tshori et al., 2014]. НАД⁺ является соединением, которое абсолютно необходимо для жизнедеятельности клеток. Диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ накапливаются внутри клеток в большом количестве [Pintor et al., 1991; Pintor et al., 1993; Pintor et al., 1995; Luo et al., 1999; Westhoff et al., 2003; Luo et al., 2004; Moreschi 2006]. Неудивительно, что данные вещества, как и АТФ, в ходе эволюции приобрели функцию внутри- и внеклеточных регуляторных соединений [Burnstock 2017]. На сегодняшний день число публикаций, посвященных регуляторной роли внеклеточного диаденозинтетрафосфата, достигло нескольких тысяч. Однако, изучение роли этого класса соединений в физиологии сердца остается недостаточным.

Среди причин выбора диаденозинтетра- и пентафосфата, а также НАД⁺ в данной работе следует упомянуть следующие:

- Ар₄А – первый, из открытых диаденозиновых полифосфатов [Westhoff et al., 2003];
- Ар₄А – «базовый» диаденозинполифосфат: синтез всех остальных диаденозинполифосфатов происходит на его основе [Westhoff et al., 2003];
- Ар₄А – наиболее изученный в гладкой мускулатуре, так в ряде научных публикаций доказано, что это соединение регулирует тонус сосудов *in vivo* [Schlüter et al., 1994];
- Ар₄А – является регуляторным соединением во множестве тканей; является основным полифосфатом, высвобождаемым тромбоцитами; его эффекты хорошо изучены в ЦНС и периферической нервной системе [Rodriguez del Castillo et al., 1988; Schluter et al., 1994; Rubino et al., 1996];

- Ap_4A – именно на примере диаденозинтетрафосфата показано, что соединения этого класса стабильнее к действию эктонуклеотидаз, чем АТФ [Drygalski et al., 2000];
- Ap_5A – при рассмотрении литературных данных диаденозинпентафосфат, по совокупности, оказывал более выраженные эффекты в сердечно-сосудистой системе, чем другие диаденозиновые полифосфаты [Pohl et al., 1991; Kikuta et al., 1994; Stavrou et al., 1998];
- НАД⁺ сходен по структуре с диаденозиновыми полифосфатами, а точнее диаденозиновым дифосфатом; НАД⁺ можно рассматривать, как соединение, относящее к классу динуклеотидполифосфатов. На сегодняшний день доказано, что он является котрансмиттером, полноценным ингибиторным нейромедиатором в гладкомышечной ткани, однако, его эффекты в сердце не изучены [Abbracchio et al., 1998; Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Durnin et al., 2012; Mutafova-Yambolieva et al., 2012; Mutafova-Yambolieva et al., 2014; Burnstock et al., 2017].

5.1. Эффекты диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ в сердце млекопитающих

В нашей работе впервые показано, что как диаденозиновые полифосфаты, так и НАД⁺ способны оказывать влияние на работу миокардиальной ткани сердца млекопитающих. Ap_4A , Ap_5A и НАД⁺ оказывают воздействие на биоэлектрическую активность, при этом основным эффектом является снижение длительности потенциалов действия. Кроме того, диаденозиновые полифосфаты (но не НАД⁺) оказывают влияние на инотропию рабочего миокарда, а точнее, вызывают снижение сократимости. Сначала рассмотрим влияние пуриновых соединений на биоэлектрическую активность сердца.

В сердце крысы максимально выраженное влияние диаденозиновых полифосфатов на длительность потенциалов действия наблюдалось в предсердном и желудочковом миокарде, самый незначительный эффект был зарегистрирован в межпредсердной перегородке и миокардиальной ткани легочных вен.

Как указано выше, диаденозиновые полифосфаты вызывали только снижение длительности ПД, т.е. их эффект был монофазным. В отличие от эффектов

диаденозиновых полифосфатов, действие НАД⁺ было двухфазным. При действии НАД⁺ наблюдали кратковременное увеличение длительности ПД, сменявшееся противоположным эффектом - укорочением ПД (сходным с эффектом Ар₄А и Ар₅А). При действии диаденозиновых полифосфатов увеличения длительности ПД не наблюдали. Возможно, указанный положительный эффект НАД⁺ опосредован активацией Р₂Х-пуринорецепторов. Действие НАД⁺ было наиболее выражено в желудочковом миокарде, наиболее слабо НАД⁺ влиял на потенциалы действия в миокардиальных рукавах легочных вен и в межпредсердной перегородке.

Внеклеточный НАД⁺ обладал существенным влиянием на биоэлектрическую активность пейсмекерного миокарда крысы. В синоатриальном узле НАД⁺ достоверно снижал частоту генерации ПД и скорость медленной диастолической деполяризации. Выраженный рост скорости фронта ПД при действии НАД⁺ указывает на то, что данное пуриновое соединение приводит к существенной гиперполяризации и подавлению автоматической активности в истинном пейсмекере сердца.

В целом, влияние исследуемых пуриновых соединений на биоэлектрическую активность в желудочковом миокарде было более выражено, чем в предсердном. Этот факт послужил одной из причин того, что внутриклеточные механизмы действия пуриновых соединений изучали именно с использованием желудочкового миокарда. Далее обсудим влияние пуриновых соединений на инотропию желудочкового миокарда.

На основании литературных данных, широко представленных в обзоре литературы и касающихся комедиаторной роли внеклеточного НАД⁺ в гладкомышечных тканях, источником которого являются вегетативные нервы, можно предположить, что и в сердце НАД⁺ в большей степени, чем диаденозиновые полифосфаты, является комедиаторным регулятором активности вегетативных нервов. Его прямое действие на рабочий миокард является лишь дополнительным механизмом.

При изучении действия пуриновых соединений **на сократимость миокарда**, эксперименты проводили на изолированном по Лангендорфу сердце крысы. Ритм навязывали, чтобы учесть хроно-инотропные воздействия, возникающие вследствие влияния пуриновых соединений на ритм работы пейсмекера сердца. Нами было показано, что НАД⁺ не вызывает снижения давления, развиваемого левым желудочком и не вызывает снижения скорости сокращения желудочка. Поскольку сократимость миокарда в основном зависит от колебаний уровня кальция [Ca²⁺]_i, мы решили оценить

влияние НАД⁺ **на динамику цитоплазматического кальция** в кардиомиоцитах (кальциевый имиджинг). В этих экспериментах мы показали, что НАД⁺ не вызывал изменения амплитуды кальциевых волн в энзиматически изолированных желудочковых кардиомиоцитах.

Таким образом, НАД⁺ не влияет на инотропию желудочкового миокарда и динамику цитоплазматического кальция в базальных условиях (т.е. при отсутствии стимулирующего действия циркулирующего адреналина или симпатических нервов).

В экспериментах на изолированных волокнах Пуркинье НАД⁺ достоверно укорачивал длительность ПД, кроме того мы наблюдали тенденцию к снижению спонтанного ритма, генерируемого волокнами Пуркинье. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что прямые эффекты НАД⁺, не связанные с регуляцией вегетативных нервов, направлены на снижение ритма работы сердца и также могут быть связаны с влиянием на проводящую систему сердца.

Интересным фактом является то, что НАД⁺ вызывал укорочение желудочковых ПД без изменения кальциевой динамики и снижения сократимости. Следует отметить, что изменение длительности ПД, особенно на уровне 90%, не обязательно связано с изменениями сократимости. Так, например, агонисты β -адренорецепторов в сердце приводят к снижению длительности ПД, но при этом вызывают сильный положительный инотропный эффект [Szentandrassy et al., 2012]. Укорочение ПД на уровне 90% реполяризации без изменения сократимости может быть обусловлено стимуляцией калиевых ионных реполяризирующих токов и не быть связано с влиянием на кальциевый входящий ток L-типа.

Помимо изучения эффектов НАД⁺, нами было исследовано влияние **Ar₄A и Ar₅A на сократительную активность** желудочкового миокарда изолированного сердца крысы. Мы показали, что в отличие от НАД⁺, оба соединения обладают отрицательным инотропным действием. Диаденозиновые полифосфаты вызывали снижение частоты сердечных сокращений в изолированном сердце, работающем в собственном ритме, также снижение давления, развиваемого в левом желудочке, максимальной скорости сокращения и расслабления. По сравнению с эффектами Ar₄A, диаденозинпентафосфат вызывал большее снижение сократительной активности.

Для понимания взаимосвязи изменения сократимости желудочкового миокарда сердца при действии диаденозиновых полифосфатов и изменения концентрации

внутриклеточного кальция в кардиомиоцитах, как и в случае с НАД⁺, мы провели эксперименты по изучению динамики цитоплазматического кальция в кардиомиоцитах желудочков сердца крысы. В результате впервые показано, что Ар₄А и Ар₅А в базальных условиях вызывают значительное снижение амплитуды кальциевых волн в желудочковых кардиомиоцитах.

Подобные результаты, включая данные о влиянии диаденозиновых полифосфатов на биоэлектрическую активность миокарда, свидетельствуют, что снижение инотропии, наблюдаемое при действии диаденозиновых полифосфатов, можно связать с укорочением ПД и подавлением кальциевого тока L-типа (I_{CaL}), что, в свою очередь, ведет к снижению уровня цитоплазматического кальция ($[Ca^{2+}]_i$), который и определяет сократимость миокарда. Снижение $[Ca^{2+}]_i$ и сократимости при действии диаденозиновых полифосфатов может происходить и с участием I_{CaL} -независимых механизмов, связанных с подавлением выбросов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СПР). Можно предположить, что влияние НАД⁺ и диаденозиновых полифосфатов на кальциевый ток L-типа кардиомиоцитов различно.

Помимо экспериментов по изучению роли диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ на биоэлектрическую активность в сердце крысы, нами были проведены эксперименты на препаратах сердца другого лабораторного животного- морской свинки. Следует отметить, что электрофизиологически сердце морской свинки и крысы существенно различаются. Кардиомиоциты рабочего миокарда морской свинки обладают выраженной фазой плато, которая обычно характерна для крупных млекопитающих. Такая особенность электрофизиологии сердца морской свинки позволила с помощью несложных экспериментов оценить влияние на токи, характерные для фазы плато ПД.

Внутриклеточная регистрация потенциалов действия в изолированном препарате правого предсердия морской свинки показала, что исследуемые соединения вызывают ярко выраженное уменьшение длительности ПД, в том числе ДПД₉₀, однако максимальное снижение длительности ПД наблюдалось на уровне 25% реполяризации. Особенно важно отметить, что, если в концентрации 10 мкМ НАД⁺ и Ар₄А не вызывали достоверного изменения амплитуды ПД, то 100 мкМ НАД⁺ и Ар₄А достоверно снижали амплитуду ПД в рабочем миокарде.

Таким образом, исследуемые соединения более выражено влияют на фазу плато в ПД морской свинки. Эти результаты позволяют предположить, что у морской свинки исследуемые соединения в базальных условиях, могут подавлять кальциевый ток L-типа, служащий триггером для поступления кальция в цитоплазму. Возможно, что крыса и морская свинка различаются по чувствительности ионного тока L-типа к диаденозиновым полифосфатам, однако, на основании полученных результатов окончательного заключения сделать нельзя.

У морской свинки гораздо легче, чем у крысы, зарегистрировать электрическую активность истинного пейсмекера. Для изучения эффектов пуриновых соединений в САУ морской свинки использовали отведения, характерные для истинного пейсмекера. Как и в сердце крысы, у морской свинки исследуемые соединения вызывали достоверную гиперполяризацию. НАД⁺, Ар₄А и Ар₅А существенно замедляли скорость медленной диастолической деполяризации, вызывали достоверное снижение синусного ритма. Важно отметить, что под действием пуриновых соединений электрическая активность из типичной для истинного пейсмекера менялась на характерную для латентного пейсмекера – с резким переходом от МДД к переднему фронту ПД, что считается признаком миграции водителя ритма [Vinogradova et al., 1998]. Именно миграцией пейсмекера в пределах САУ можно объяснить отсутствие замедления синусного ритма при аппликации соединений в концентрации 10 мкМ, вызывающей выраженное замедление МДД в точке регистрации. Таким образом, эффекты пуриновых соединений в пейсмекерном миокарде двух млекопитающих животных – крысы и морской свинки сходны.

Исследуемые соединения вызывали увеличение скорости фронта ПД в пейсмекерной области морской свинки. Как известно, фаза деполяризации ПД в клетках центральной части САУ в нормальных условиях обеспечивается кальциевым током L-типа [Boyett et al., 2000], в то время как на периферии в развитии деполяризации участвует натриевый ток, проводимый натриевыми каналами Nav1.5, типичной для миокарда изоформы. Тем не менее, в клетках центральной части экспрессируются натриевые каналы «нейрональных» изоформ, которые при гиперполяризации мембраны получают возможность активации и участия в обеспечении фазы деполяризации ПД [Lei et al., 2004]. По-видимому, в нашем случае увеличение dV/dt_{max} объясняется именно

вовлечением в процесс деполяризации натриевого тока благодаря вызванной полифосфатами гиперполяризации.

5.2. Эффекты диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ в сравнении с эффектами АТФ и аденозина в сердце крысы

В данной работе было проведено сопоставление эффектов диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ и «классических», хорошо изученных агонистов пуриновых рецепторов P1- и P2-типа, которыми являются аденозин и АТФ.

Итак, при рассмотрении биоэлектрической активности оказалось, что Ар₄А, Ар₅А и НАД⁺, как и АТФ, и аденозин действуют сходным образом, а именно снижают длительность потенциалов действия в предсердном миокарде крысы. Исключением остается «положительная» фаза действия НАД⁺. Однако, как мы писали ранее, подобный эффект являлся кратковременным и обнаруживался не во всех экспериментах.

При изучении сократительного ответа изолированного сердца установлено, что АТФ и аденозин вызывают положительный инотропный эффект, однако Ар₄А и Ар₅А напротив, приводят к снижению параметров сократимости желудочкового миокарда сердца крысы (отрицательный инотропный эффект). НАД⁺ не оказывал действия на сократительную активность сердца. Таким образом, можно предположить, что действие диаденозиновых полифосфатов в миокарде не связано с эффектом их метаболита – аденозина.

5.3. Рецепторные механизмы действия НАД⁺ и диаденозиновых полифосфатов в сердце крысы

Как было отмечено, НАД⁺ при влиянии на биоэлектрическую активность миокарда крысы вызывал как негативные эффекты, проявляющиеся в снижении длительности ПД, так и кратковременные положительные—увеличение ДПД. Надо заметить, что подобное действие проявлялось только в предсердном миокарде, но не в желудочковом. Мы провели серию экспериментов по выявлению рецепторных механизмов действия НАД⁺ в миокарде крысы. В литературе есть данные о том, что НАД⁺ может быть агонистом как P2, так и P1-пуринорецепторов [Alefishat et al., 2015],

однако в наших экспериментах, это не подтвердилось. Блокатор P1-пуринорецепторов DPSPX не оказал значимого действия на эффекты НАД⁺. Можно заключить, что эффекты НАД⁺ в миокарде опосредованы активацией P2-пуринорецепторов. В пользу данного вывода говорят результаты экспериментов с применением блокаторов пуриновых рецепторов P2-типа. Так, блокатор P2-пуриновых рецепторов сурамин вызвал подавление эффекта НАД⁺, подобное действие оказал и PPADS, также блокатор P2-рецепторов.

Отдельная серия экспериментов была посвящена изучению рецепторных механизмов положительного эффекта действия НАД⁺, а именно увеличения длительности ПД. Известно, что группа P2-пуринорецепторов состоит из двух подтипов: P₂X и P₂Y-рецепторов, сопряженных в основном с G_{q/11}-белком. Пуриновые P₂X-рецепторы являются лиганд-активируемыми ионными каналами, проницаемыми для ионов Na⁺, K⁺ и Ca²⁺ [Benham, 1987]. Связывание P₂X-рецепторами лиганда обычно приводит к следующим событиям: возникновению входящего неселективного катионного тока и сдвигу мембранного потенциала в положительную сторону (деполяризации). Как правило, деполяризация, вызванная активацией P₂X, приводит к развитию входящего кальциевого тока, который обеспечивается потенциалзависимыми кальциевыми каналами плазматической мембраны Ca_{v1.x}, что способствует дальнейшей деполяризации и дополнительному поступлению Ca²⁺ в цитоплазму клетки. Например, в гладкой мускулатуре активация P₂X приводит к развитию сократительного ответа, возникновению потенциалов действия, а в кардиомиоцитах - к усилению сократимости [Benham et al., 1987]. Мы предполагаем, что кратковременное увеличение ДПД при действии НАД⁺ может быть опосредовано активацией рецепторов P₂X-подтипов. Так, применение блокаторов P₂X-подтипов рецепторов (iso-PPADS и Evans Blue) полностью подавляло положительный эффект НАД⁺, однако не влияло на развитие последующей фазы действия НАД⁺ -- снижения длительности ПД. На основании полученных данных можно сделать вывод, что увеличение длительности ПД обусловлено активацией P₂X рецепторов, а отрицательный (ингибиторный) эффект НАД⁺ - стойкое снижение длительности ПД может быть обусловлено активацией рецепторов P₂Y.

Внеклеточные диаденозиновые полифосфаты позиционируются как агонисты пуриновых рецепторов [Laubinger et al., 2003; Lewis et al., 2000; Nahum et al., 2006]. Предполагается, что Ар_nА могут активировать как P1, так и P2 типы пуринорецепторы в

различных тканях, включая миокардиальную [Arvola et al., 2004; Brandts et al., 1998; 2003; Conant et al., 2000; McDonald et al., 2002; Neumann et al., 1999; Vahlensieck et al., 1999]. В работе Hoyle показано, что изменение инотропии, вызванное диаденозиновыми полифосфатами объясняется одновременной активацией как P₁, так и P₂-пуринорецепторами [Hoyle et al., 1996]. Также встречаются данные о том, что за счет активности гидролаз пирофосфатаз\фосфодиэстераз, А_пА подвергаются гидролизу до конечного продукта - аденозина, и эффекты, регистрируемые при действии А_пА, обеспечиваются активацией P₁-пуринорецепторов аденозином, а не исходным соединением [Vollmaier et al., 2003]. Таким образом, представления о рецепторных механизмах действия А_пА в миокарде до сих пор остаются противоречивыми.

В нашей работе, эффекты диаденозиновых полифосфатов в миокарде крысы полностью подавлялись блокаторами P₂-пуринорецепторов (сурамин, PPADS), в то время как DPCPX (блокатор P₁-рецепторов) не оказывал значимого влияния на действие диаденозиновых полифосфатов.

Подводя промежуточные итоги, можно заключить, что снижение длительности ПД в миокарде крысы при действии диаденозинтетра- и диаденозинпентафосфата, как и при действии НАД⁺ обусловлено активацией P₂Y-подтипов пуриновых рецепторов.

Эксперименты с блокаторами пуриновых рецепторов помимо прочего, позволяют нам дополнить выдвинутые ранее предположения о том, что эффекты диаденозиновых полифосфатов не обусловлены образующимся при их деградации аденозином. Мы показали, что эффекты А_{п4}А и А_{п5}А обусловлены активацией P₂-типа рецепторов, но не P₁-рецепторов. Этот факт также свидетельствует в пользу того, что не аденозин определяет эффекты диаденозиновых полифосфатов в сердце крысы.

Предполагается, что ингибиторное влияние внеклеточного НАД⁺ в гладкой мускулатуре может быть обусловлено активацией P₂Y₁- или P₂Y₁₁-рецепторов [Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Mutafova-Yambolieva et al., 2012; Moreschi et al., 2006; Grahnert et al., 2009; Klein et al., 2009]. Также в работах [Yanachkov et al., 2016; Steinmetz et al., 2000] приведены данные, что эффекты диаденозиновых полифосфатов могут быть опосредованы активацией P₂Y₁ и P₂Y₁₁ – рецепторов. Оба подтипа рецепторов присутствуют практически во всех висцеральных тканях (гладкой мускулатуре сосудов и полых органов), однако в сердце крысы пуриновые рецепторы P₂Y₁₁ не обнаружены

[Kennedy et al., 2017]. Следовательно, наиболее вероятным рецептором, определяющим снижение длительности ПД в миокарде крысы при действии диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ является P₂Y₁ рецептор. Вероятно, что и негативный инотропный эффект в желудочковом миокарде крысы также обусловлен активацией этого подтипа рецепторов.

Помимо этого, известно, что P₂Y-рецепторы способны к гомо- и гетероолигомеризации [Nishimura et al., 2017]. В работах [Ecke et al., 2008] описываются случаи гетеродимеризации P₂Y₁/P₂Y₁₁ рецепторов. Также обнаружены функциональные P₂Y₁, P₂Y₄, P₂Y₆, P₂Y₁₂ и P₂Y₁₃ гомо-олиго комплексы. Исходя из современных представлений о строении и функционировании пуриновых рецепторов, существует возможность гетеродимеризации пуринорецепторов P₂Y₁-подтипа в миокарде крысы. Результаты данной работы предполагают, что в естественных условиях ингибиторные эффекты диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ могут реализоваться посредством активации не только P₂Y₁-подтипа пуринорецепторов, но и димеров этого рецептора с рецепторами других подтипов. Димеризация рецепторов или менее тесное их взаимодействие в клеточной мембране (колокализация) может существенно влиять на результирующий эффект исследуемых пуриновых соединений, делать его специфичным, т.е. отличным от эффектов других пуриновых соединений, таких как АТФ.

Согласно классическим представлениям, взаимодействие диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ с P₂Y₁ рецепторам, сопряженными с G_q-белком, должно приводить к активации PLC, накоплению IP₃, активации РКС и высвобождению Ca²⁺ через инозитол-трифосфатные рецепторы из кальциевых депо [Moreschi et al., 2006]. Помимо этого, активация G_q-сопряженных рецепторов может приводить к накоплению NO в клетке. Рост концентрации NO происходит за счет увеличения концентрации кальция, выбрасываемого через IP₃- рецепторы и дальнейшей активации NO-синтазы. Эффект активации P₂Y₁ рецепторов, таким образом, определяется тремя факторами – уровнем цитоплазматического кальция, активированной протеинкиназой С (а точнее, разнообразными протеинкиназами, относящимися к группе протеинкиназ типа С) и оксидом азота. Физиологический эффект при действии этих внутриклеточных регуляторов сильно зависит от исходных условий, состояния клетки, степени активации различных внутриклеточных сигнальных путей и конечных мишеней. Важно также, что

преобладающий внутриклеточный сигнальный каскад, активируемый при стимуляции G_q -сопряженных рецепторов, зависит не только от типа самого рецептора, но и от типа агониста: эта особенность подтверждена недавним открытием явления «смещенного агонизма» (biased agonism) [Smyth et al., 2018]. Ниже, будут рассмотрены возможные внутриклеточные механизмы передачи сигналов и реализации эффектов при действии диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺.

При расщеплении диаденозиновых полифосфатов могут образовываться АТФ, АДФ – т.е. P_2Y -агонисты. Как указано выше, АТФ вызывает положительный, а диаденозиновые полифосфаты – отрицательный инотропный эффект. Разнонаправленное действие АТФ и Ar_4A , и Ar_5A может объясняться активацией различных P_2Y -пуринорецепторов. Вероятнее всего, АТФ, вызывая накопление IP_3 , приводит к повышению уровня кальция в цитоплазме, и таким образом, вызывает положительный инотропный эффект. При этом эффект высвобождаемого кальция через инозитол-трифосфатные рецепторы преобладает над эффектом активации РКС. В данной работе установлено, что диаденозиновые полифосфаты приводят к снижению уровня цитоплазматического кальция (что и вызывает отрицательный инотропный эффект у крысы), а не его увеличению. Ранее показано, что основными рецепторами АТФ в сердце являются P_2Y_2 , P_2Y_4 , в то время как рецептором диаденозиновых полифосфатов может быть P_2Y_1 .

5.4. Внутриклеточные сигнальные каскады, опосредующие эффекты НАД⁺ и диаденозиновых полифосфатов в миокарде сердца крысы

При стимуляции P_2Y -пуринорецепторов может происходить накопление оксида азота и активация сигнального каскада, включающего циклический гуанозинмонофосфат (NO/sGC/cGMP). Для проверки вовлеченности данного каскада в реализацию эффектов диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ были проведены эксперименты с использованием ингибитора растворимой гуанилатциклазы (sGC) – ODQ, а также ингибитора NO-синтазы – L-NAME. Было показано, что ни один из ингибиторов не повлиял на развитие эффекта ни диаденозиновых полифосфатов, ни НАД⁺.

Поскольку P_2Y_1 рецепторы сопряжены с $G_{q/11}$ белками и, соответственно, могут активировать фосфатидилинозитольный внутриклеточный сигнальный каскад, нами была изучена роль фосфолипаз C и D (PLC и PLD, соответственно) в реализации эффектов Ar_4A , Ar_5A и $HAД^+$ в миокарде. В работе были использованы блокаторы PLC и PLD - U73122 и FIP1.

Ингибиторы U73122 и FIP1 являются стандартными реактивами при исследовании роли фосфолипазы C и D в реализации тех или иных сигнальных каскадов.

Вещество U73122 использовано для ингибирования PLC в огромном количестве исследований. Однако, в ряде новых работ показано, что U73122 может обладать малой эффективностью, быть неселективным, а также обладать целым рядом побочных эффектов. Например, в ряде тканей U73122 не предотвращал накопления инозитолтрифосфата, т.е не оказывал ингибирующего действия относительно PLC [Alter et al., 1994]. Показано также, что U73122 может вызывать подавление калиевого ацетилхолинзависимого тока $I_{K_{ACh}}$ [Cho et al., 2001]. Кроме того, показано, что U73122 может оказывать прямо противоположное исходно предполагаемому действие, а именно активацию фосфолипазы C [Klein et al., 2011]. В дополнение, U73122 подавляет активность кальциевых АТФаз в различных типах клеток, и, тем самым, влияет на величину кальциевых выбросов из внутриклеточных депо. Вероятно, что эффективность U73122 как ингибитора PLC в значительной степени определяется условиями эксперимента, типом ткани, а также изоформами фермента, преобладающими в данной ткани. Поэтому, несмотря на отсутствие эффекта при аппликации U73122, мы продолжили исследование каскада PLC/PKC в реализации эффектов пуриновых соединений.

Нами была изучена роль протеинкиназы C (PKC) в реализации эффектов диаденозиновых полифосфатов. Для PKC в миокарде существуют различные мишени, в том числе ионные каналы. Различные авторы описывают как активационные, так и ингибиторные влияния PKC на ток I_{CaL} [Singer-Lahat et al., 1992; Bourinet et al., 1992; Zhang et al., 1997; Hu et al., 2000], что может быть связано с участием различных изоформ PKC, экспрессируемых в сердце; для решения этого вопроса требуется их избирательная активация. Так, показано, что увеличение активности PKC ϵ , как хроническое [Yue et al., 1990], так и при аппликации селективного агониста [Hu et al., 2000], подавляет ток I_{CaL} . На основании этого, мы использовали неселективный

блокатор РКС - хелеретрин. В экспериментах с изолированным сердцем, как и с изолированными препаратами предсердий крысы, а также при исследовании динамики кальциевых волн, нами было показано, что хелеретрин подавляет влияние диаденозиновых полифосфатов на биоэлектрическую активность (в предсердном миокарде) и сократимость (в желудочковом миокарде). Также в экспериментах на изолированном предсердном миокарде хелеретрин подавлял эффекты НАД⁺.

В предыдущих экспериментах [Пахомов и др. 2017] было показано, что диаденозиновые полифосфаты (в отличие от НАД⁺) способны подавлять инотропные эффекты, вызываемые адренергической стимуляцией желудочкового миокарда. Можно предположить, что действие диаденозиновых полифосфатов в кардиомиоцитах связано с регуляцией уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), так как именно это соединение определяет, в значительной мере, сократимость кардиомиоцитов как в покое, так и при адренергической стимуляции. Эти результаты и предположения легли в основу нашей дальнейшей работы, направленной на выяснение внутриклеточных механизмов, определяющих действие диаденозиновых полифосфатов.

Известно, что в кардиомиоцитах центральным элементом, определяющим уровень цАМФ являются фосфодиэстеразы (ФДЭ). Нами была исследована роль ФДЭ в опосредовании эффектов диаденозинполифосфатов. В первой серии экспериментов нами было изучено влияние неселективного блокатора ФДЭ IBMX на инотропные эффекты диаденозинтетрафосфата. IBMX полностью подавлял ингибиторный эффект Ар₄А в желудочковом миокарде крысы. Во второй серии экспериментов использовали селективный блокатор сGMP-зависимой фосфодиэстеразы второго типа (ФДЭ₂) - EHNA. В отличие от IBMX, влияние Ар₄А на инотропию сохранялось практически полностью при действии ингибитора ФДЭ₂.

Ранее было показано, что активность фосфодиэстераз может стимулироваться протеинкиназами типа С. Механизм этой стимуляции остается до конца не изученным, хотя предполагалось, что он может является сGMP зависимым. В наших экспериментах было показано, что ингибирование гуанилатциклаз не приводит к изменению эффектов диаденозиновых полифосфатов. Суммируя результаты всех наших экспериментов, можно предположить, что при действии диаденозиновых полифосфатов (по крайней мере в желудочковом миокарде) происходит активация фосфодиэстераз под действием

PKC. Каковы механизмы активации ФДЭ протеинкиназами группы C, и являются ли эти механизмы cGMP-независимыми, на данном этапе исследования остается неизвестным.

Подводя итоги, можно заключить, что в сердце крысы «ингибиторные» эффекты диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺, вероятно, реализуются посредством активации P₂Y₁-рецепторов, сопряженных с G_{q/11} белками с дальнейшей активацией протеинкиназы C и фосфодиэстераз, что в свою очередь приводит к снижению уровня цАМФ и дальнейшему подавлению I_{CaL}, изменению калиевых реполярирующих токов.

5.5. Рецепторные и внутриклеточные механизмы действия НАД⁺ и диаденозиновых полифосфатов в сердце морской свинки

Сопоставив описанные изменения пейсмекерной активности под действием НАД⁺, Ar₄A и Ar₅A с данными литературы, мы обратили внимание на сходство наблюдаемых эффектов с хорошо известным действием на пейсмекерную активность ацетилхолина и его аналогов, а также аденозина. Еще большее сходство эффектов исследуемых веществ с холинергическими стало очевидно после проведенных экспериментов на рабочем миокарде правого предсердия морской свинки.

Наблюдаемые эффекты диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ можно было бы объяснить подавлением кальциевого тока L-типа, однако, наблюдаемая в препаратах синоатриального узла гиперполяризация указывала на то, что действие на кальциевый ток в данном случае может быть не прямым, а опосредованным этой гиперполяризацией, которая в свою очередь может быть обусловлена активацией калиевого ацетилхолинзависимого тока I_{KACH}. Данный ток, кроме того может вносить вклад и в уменьшение длительности ПД и в замедление медленной диастолической деполяризации. Известно, что калиевые ацетилхолинзависимые каналы могут активироваться не только мускариновыми рецепторами, но и другими рецепторами, сопряженными с G_i-белками, в частности, пуринорецепторами P₁ [Kurachi, 1995]. Практически полное подавление эффектов Ar₅A вызывал селективный блокатор P₁ рецепторов DPCPX. Эти результаты однозначно указывают, что именно активация тока I_{KACH} посредством P₁-пуринорецепторов служит основным и, возможно, единственным механизмом реализации эффектов полифосфатов и НАД⁺ в предсердном миокарде морской свинки.

Для проверки предположения об участии тока I_{KAc} в реализации описанных эффектов в суправентрикулярном миокарде морской свинки были проведены опыты с аппликацией высокоселективного пептидного блокатора каналов этого тока терциапина, компонента яда медоносной пчелы. Оказалось, что терциапин в концентрации 1 мкМ практически полностью снимал действие 100 мкМ Ar_5A , даже если был апплицирован на фоне уже развившегося эффекта этого соединения. Таким образом, данные микроэлектродных экспериментов и пэтч-кламп дают основания для уверенности, что в предсердном миокарде морской свинки исследуемые соединения действительно активируют калиевый ацетилхолинзависимый ток, вероятно, за счет стимуляции P1 пуринорецепторов. Именно этим объясняется сходство действия исследуемых веществ и ацетилхолина на электрическую активность рабочего и пейсмекерного предсердного миокарда морской свинки.

Итак, в сердце морской свинки выраженные эффекты Ar_5A , Ar_4A и $НАД^+$ достигаются только при использовании большей концентрации (100 мкМ), чем в миокарде крысы, и реализуются через иной тип рецепторов – P1. Молекулярный механизм заключается в активации сопряженных с P1-рецепторами G_i -белков и открытии калиевых ацетилхолинзависимых каналов, проводящих ток I_{KAc} . За счет активации данного тока происходит уменьшение длительности ПД в предсердном миокарде, а в клетках синоатриального узла также гиперполяризация и замедление автоматической активности. Таким образом, механизмы действия диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$ различны в сердце морской свинки и крысы и являются видоспецифичными.

5.6. Эффекты $НАД^+$, Ar_4A и Ar_5A на изолированные коронарные артерии крысы

Известно, что *in vivo* эффект диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$ в сердце складывается из действия на миокард и коронарные сосуды, и таким образом, вазоконстрикторный эффект в значительной степени влияет на работу сердца.

Мы показали, что в изолированных кольцевых препаратах коронарных артерий межжелудочковой перегородки крысы (предварительно активированных серотонином (10 мкМ), с интактным эндотелием) из трех исследуемых соединений только Ar_5A в

концентрации 100 мкМ имел стойкий достоверный вазоконстрикторный эффект. При аппликации НАД⁺ наблюдалась стабильная вазодилатация, что также является немаловажным в регуляции работы сердца.

5.7. Возможная физиологическая и патофизиологическая роль диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ в сердце

В литературе имеются данные и предположения, что помимо прямого действия на миокардиальную ткань, НАД⁺ и диаденозиновые полифосфаты могут оказывать модуляторное действие, которое реализуется в присутствии нейромедиаторов вегетативной нервной системы (влияющих на работу сердца). Модуляторное действие пуриновых соединений также может быть связано с регуляцией секреции ацетилхолина или норадреналина, т.е. с регуляцией на пресинаптическом уровне [Абрамочкин и др. 2017]. Таким образом, диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺, скорее всего, являются соединениями, регуляторная роль которых реализуется несколькими способами: при действии на миокард в базальных условиях и при адренергической активации; на коронарное кровообращение, на вегетативную иннервацию сердца.

В данной работе показано, что при действии на пейсмекерный миокард НАД⁺ снижает ЧСС. Известно, что в гладкомышечной ткани НАД⁺ является ингибиторным медиатором. Возможно, что «физиологическая» роль НАД⁺ в сердце, как и в гладкой мускулатуре, является «ограничивающей» или «тормозящей», и проявляется в большей степени при адренергической/симпатической стимуляции.

Диаденозиновые полифосфаты могут принимать участие в контроле патофизиологических явлений. Показано, что диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ [Karimova et al., 2017; Потехина и др., 2018] могут оказывать «антиаритмическое» действие – подавляют эктопическую активность в миокардиальной ткани легочных вен, вызванную адренергической стимуляцией.

Как указано выше, основным эффектом диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ на биоэлектрическую активность рабочего миокарда является укорочение ПД. Этот эффект, сам по себе, можно рассматривать как про- так и антиаритмический. Поскольку укорочение ПД означает снижение длительности рефрактерного периода в миокарде, - это облегчает возникновение аритмий. В то же время укорочение ПД приводит к

снижению длительности уязвимых периодов, что, в свою очередь, можно рассматривать как антиаритмическое действие. Конечный эффект диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ в аспекте их влияния на аритмии, вероятно, определяется множеством сопутствующих факторов.

Проаритмогенное действие диаденозиновых полифосфатов может быть значимым при образовании тромбов в предсердиях, которым сопровождаются ряд сердечно-сосудистых заболеваний, так как при этом происходит активация тромбоцитов и высвобождение большого количества пуриновых соединений.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги исследования, можно заключить, что как диаденозиновые полифосфаты, так и НАД⁺ способны оказывать существенное влияние на работу сердца млекопитающих. Обнаруженные эффекты Ар₄А, Ар₅А и НАД⁺ в миокарде крысы опосредуются пуриновыми мембранными рецепторами Р₂У-типа, возможно подтипом Р₂У₁. В сердце морской свинки эффекты Ар₄А, Ар₅А и НАД⁺ реализуются посредством активации Р₁-пуринорецепторов. Вероятно, что диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺, высвобождаемые вегетативными нервами в физиологических условиях, либо попадающие во внеклеточную среду из других источников, представляют собой компоненты пуринергической регуляторной системы и являются частью ранее не изученного механизма регуляции работы сердца.

Известно, что часть Р₂У-рецепторов сопряжена с G_{q/11} белками, и их активация может приводить к передаче сигнала через несколько внутриклеточных каскадов. В диссертационной работе изучена роль сигнального каскада, включающего оксид азота (NO/sGC/cGMP), а также протеинкиназу С (РКС) в реализации эффектов диаденозиновых полифосфатов. Показано, что сигнальный каскад оксида азота не принимает участия в реализации эффектов исследуемых соединений, и, вероятнее всего, эффекты пуриновых соединений опосредуются активацией РКС, по крайней мере в сердце крысы.

Следует указать, что в миокарде крысы ингибитор фосфодиэстераз подавлял эффекты диаденозиновых полифосфатов. В миокарде морской свинки влияние исследуемых пуриновых соединений подавлялось при блокировании калиевого ацетилхолинзависимого тока (I_{K_{ACh}}).

Таким образом, проведенное исследование позволяет предложить механизм действия внеклеточных диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺, включающий рецепторный и внутриклеточный этапы: в сердце крыс активация Р₂У-рецепторов, вероятно сопряженных с G_{q/11} белками, приводит к стимуляции протеинкиназы С и фосфодиэстераз (сGMP-независимых), что в свою очередь приводит к снижению уровня цАМФ и, возможно, подавлению I_{CaL}, снижению уровня цитоплазматического кальция, изменению калиевых реполяризирующих токов. В сердце морской свинки эффекты Ар₄А,

Ar_5A и $НАД^+$ реализуются через P_1 -пуринорецепторы с дальнейшей активацией калиевого тока IK_{ACH} .

Итак, прямые эффекты диаденозиновых полифосфатов в сердце, т.е. эффекты, не связанные с рефлекторной регуляцией или регуляцией активности вегетативных нервов, являются «тормозными» - выражаются в подавлении автоматии, снижении длительности ПД, а также снижении сократимости и уровня цитоплазматического кальция в желудочковом миокарде. Результаты работы позволяют выдвинуть гипотезу, что для Ar_nA физиологическая роль может заключаться в дополнении парасимпатических «тормозных» влияний, особенно в желудочках, где холинергическая иннервация низка.

Внеклеточный $НАД^+$ хоть и не оказывал влияния на сократимость миокарда, но снижал автоматию и длительность ПД в различных отделах сердца, вызывал коронародилатацию. Известно, что в гладкомышечной ткани $НАД^+$ является ингибиторным медиатором. Возможно, что физиологическая роль $НАД^+$ в сердце, как и в гладкой мускулатуре, является «ограничивающей» и проявляется в подавлении эффектов чрезмерной адренергической/симпатической стимуляции.

7. ВЫВОДЫ

1. Внеклеточные Ap_4A , Ap_5A , но не $НАД^+$ вызывают подавление сократимости желудочкового миокарда сердца крысы;
2. Основным эффектом всех трех соединений - Ap_4A , Ap_5A и $НАД^+$ на биоэлектрическую активность, является снижение длительности потенциалов действия в рабочем миокарде млекопитающих;
3. В пейсмекерном миокарде Ap_4A , Ap_5A и $НАД^+$ подавляют автоматию, то есть вызывают снижение скорости медленной диастолической деполяризации, вызывают гиперполяризацию; в проводящей системе сердца пуриновые соединения вызывают снижение длительности потенциалов действия;
4. Внеклеточный Ap_5A и $НАД^+$ оказывают влияние на тонус коронарных артерий. Диаденозинпентафосфат вызывает коронарokonстрикцию, в то время как $НАД^+$ - коронародилатацию;
5. Эффекты внеклеточных Ap_4A , Ap_5A и $НАД^+$ в миокарде опосредуются мембранными пуриновыми рецепторами;
6. Рецепторные механизмы действия Ap_4A , Ap_5A и $НАД^+$ на биоэлектрическую активность в сердце крысы обусловлены преимущественно активацией мембранных пуриновых рецепторов P2-типа, в то время как у морской свинки эффекты всех трех соединений определяются рецепторами P1-типа;
7. Влияние внеклеточных Ap_4A , Ap_5A и $НАД^+$ на биоэлектрическую активность рабочего миокарда в сердце крысы не связаны с активацией синтазы оксида азота и растворимых гуанилатциклаз, но обусловлены активацией протеинкиназ C; в сердце морской свинки внеклеточные Ap_4A , Ap_5A и $НАД^+$ приводят к активации тока $I_{K_{Ach/Ado}}$;
8. Влияние внеклеточных Ap_4A , Ap_5A на сократимость желудочкового миокарда, по крайней мере в сердце крысы, определяется подавлением колебаний уровня цитоплазматического кальция. Указанный отрицательный инотропный эффект формируется за счет зависимого от протеинкиназы C стимулирования фосфодиэстераз в цитоплазме кардиомиоцитов.

8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- 7TM - семидоменные рецепторы
- ANP – предсердный натрийуретический пептид
- Ar_nA - диаденозиновые полифосфаты
- CD203 или E-NPPs - эктонуклеазная пирофосфатаза
- CD38 - АДФ-рибозилциклаза/цикло-АДФР – гидролаза
- CD39 или ENTPD1 - трифосфат-дифосфогидролаза
- CD73 - экто-5'-нуклеотидаза
- DAG – диацилглицерол
- eNOS – эндотелиальная NO-синтаза
- IC_{CaL} – кальциевый ток L-типа
- I_f – активируемый гиперполяризацией ток
- IK_{АТР} - калиевый АТФ-зависимый ток
- IK_{АCh/Адо} - ацетилхолин\аденозин зависимый калиевый ток
- IK_{АCh} – ацетилзависимый калиевый ток входящего выпрямления
- IK_{Ca} - калиевые кальций - чувствительные каналы, проводящие ток IK_{Ca}
- IP₃ – инозитол-3-фосфат
- L-NAME- NG-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
- LVDP - давление, развиваемое левым желудочком
- LVEDP (КДД) – конечно-диастолическое давление
- NT5-5' - нуклеотидазы
- ODQ - 1H-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one
- PANX - паннексин
- PGI₂ - простаглицлин
- PI-3-K - фосфоинозитид-3-киназа
- PIP₂ – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат
- PKC – протеинкиназа C
- PLC – фосфолипаза C
- PPADS - (pyridoxal phosphate 6-azophenyl-2,4-disulfonic acid
- RyR - рианодиновые рецепторы
- Ar₄A - диаденозин-тетрафосфат

Ar₅A - диаденозин-пентафосфат
АВ-узел – атрио-вентрикулярный узел
АДФ – аденозиндифосфат
АМФ- аденозинмонофосфат
АТФ – аденозинтрифосфат
АХ – ацетилхолин
АЦ – аденилатциклаза
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ГДФ – гуанозиндифосфат
ГМФ – гуанозинмонофосфат
ГТФ – гуанозинтрифосфат
ДПД25 – длина потенциала действия на уровне 25% реполяризации
ДПД50 – длина потенциала действия на уровне 50% реполяризации
ДПД90 – длина потенциала действия на уровне 90% реполяризации
ИМФ - инозин-монофосфат
ИС- изолированное сердце
КДД (LVEDP) - конечно-диастолическое давление
ЛВ - легочные вены
ЛП - левое предсердие
МДД – медленная диастолическая деполяризация
МПП – межпредсердная перегородка
НАД⁺ - никотинамидадениндинуклеотид (NAD, НАД, НАД⁺, β-НАД)
НА - норадреналин
НМ - никотинамид
НМН - никотинамидаденинмононуклеотид
НМР - никотинамидрибозил
ПД – потенциал действия
ПП - правое предсердие
САУ – синоатриальный узел
СПР – саркоплазматический ретикулум
Сх43 – коннексин 43
ФДЭ – фосфодиэстераза

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭКГ - электрокардиограмма

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамочкин Д.В., Кузьмин В.С., Сухова Г.С., Розенштраух Л.В. Изменения последовательности активации в синоатриальном узле кролика при адренергических воздействиях // Кардиология - 2009. - Т.49(6) - С.50-52.
2. Абрамочкин Д.В., Пустовит К.Б., Кузьмин В.С. Диаденозиновые полифосфаты подавляют эффекты стимуляции симпатических нервов в пейсмекере сердца кролика // Бюлл.эксп. биол. и мед. - 2017. - Т.163. - № 5. - С. 536-540.
3. Елисеев В.В. Роль аденозина в регуляции сердечно-сосудистой системы // Хим.-фарм, журнал- 1987. - №8. - С. 910-919.
4. Закс В.А., Капелько В.И., Куприянов В.В. и др. Роль АТФ и фосфокреатина в регуляции сокращений и защиты ишемического сердца // Физиол. ж. СССР - 1988. - Т. 74. - С. 217-223.
5. Зиганшии А.У., Зиганшина Л.Е. Фармакология рецепторов АТФ // Москва: издательство ГЕОТАР Медицина, 1999.
6. Зиганшин А.У. Роль рецепторов АТФ (P2-рецепторов) в нервной системе // Неврологический вестник. - 2005. - Т. XXXVII, вып. 1-2. - С.45-53.
7. Зиганшин А.У. P2-рецепторы: перспективная модель для будущих лекарств // Москва: Геотар-Медиа. - 2009. - 136с.
8. Лопухин Ю.М. Экспериментальная хирургия // Москва: Медицина, С. 344, 1971.
9. Пахомов Н.В., Пустовит К.Б., Абрамочкин Д.В., Кузьмин В.С. Роль диаденозин-пентафосфата и никотинамидадениндинуклеотида (nad⁺) как потенциальных нуклеотидных комедиаторов в адренергической регуляции работы сердца // Нейрохимия. - 2017. - Т.34. - № 1. - С. 1-10.
10. Потехина В.М., Кузьмин В.С., Абрамочкин Д.В. Внеклеточный диаденозиновый тетрафосфат подавляет эктопическую активность в миокардиальной ткани легочных вен у взрослых, но не у новорожденных крыс // Вестник московского университета. Серия 16: Биология. – 2018. - в печати

11. Пустовит К.Б., Кузьмин В.С., Сухова Г.С. Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) на сократительную и биоэлектрическую активность сердца крысы // РФЖ им. И.М. Сеченова. - 2014. - Т. 100. - № 4. - С. 445-457.
12. Пустовит К.Б., Кузьмин В.С., Сухова Г.С. Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (NAD⁺) на биоэлектрическую активность пейсмекера и проводящей системы сердца // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2015. - Т.159(2). - С.4-6.
13. Сосулина Л.Ю. Обратимое подавление деятельности сердца в связи с проблемой гипобиоза: эффекты нуклеотидов и ингибиторов 1-го комплекса дыхательной цепи // Автор, канд. дисс., Москва, 2000.
14. Тарасова О.С., Мартьянов А.А., Родионов И.М. Роль медиаторов в регуляции артериального давления // Природа. - 2001. - Т. 11. - С. 21–27.
15. Abbracchio M.P., Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? // Pharmacol Ther. - 1994. - V.64. - P.445–475.
16. Abbracchio M.P., Saffrey M.J., Höpker V., Burnstock G. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum // Neuroscience. - 1994. - V.59. - P.67–76.
17. Abbracchio M.P. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family// Trends Pharmacol Sci. - 2003. - V.24. - P.52–55.
18. Abbracchio M.P. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy // Pharmacol reviews. - 2006. - V.58. - P.281–341.
19. Agteresch H.J., Dagnelie P.C., Van den Berg J.W., Wilson J.H. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications // Drugs. - 1999. - V.58. - P.211–232.
20. Alefishat E., Alexander S.P.H., Ralevic V. Effects of NAD at purine receptors in isolated blood vessels // Purinergic Signalling. - 2015. - V.11. - P.47–57.
21. Alexander S.P., Benson H.E., Faccenda E., Pawson A.J. The Concise Guide to Pharmacology 2013/14: G protein-coupled receptors // Br. J.Pharmacol. - 2013. - V.170(8). - P.1459-1581.

22. Alter C.A., Amagasu M., Shah K., Jolly Y.C., Major C., Wolf B.A. U-73122 does not specifically inhibit phospholipase C in rat pancreatic islets and insulin-secreting beta-cell lines // *Life Sci.* - 1994. - V.54(8). - P.107-112.
23. Alvarado-Castillo C., Harden T. K., Boyer J. L. Regulation of P2Y1 receptor-mediated signaling by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2 // *Mol Pharmacol.* - 2005. - V.67. - P.114–122.
24. Alvarado-Castillo C., Lozano-Zarain P., Mateo J., Harden T. K., Boyer J. L. A fusion protein of the human P2Y1 receptor and NTPDase1 exhibits functional activities of the native receptor and ectoenzyme and reduced signaling responses to endogenously released nucleotides // *Mol Pharmacol.* - 2002. - V.62. - P.521–528.
25. Arvola L., Bertelsen G., Hassaf D., Ytrehus K. Positive inotropic and sustained anti-beta-adrenergic effect of diadenosine pentaphosphate in human and guinea pig hearts. Role of dinucleotide receptors and adenosine receptors // *Acta Physiol Scand.* - 2004. - V.182(3). - P.277-285.
26. Baldwin S.A., Mackey J.R., Cass C.E., Young J.D. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development // *Mol Med Today.* - 1999. - V.5. - P. 216–224.
27. Barnard E. A., Burnstock G., Webb T. E. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family // *Trends Pharmacol Sci.* - 1994. - V.15. - P. 67–70.
28. Barnard EA, Simon J. An elusive receptor is finally caught: P2Y₁₂, an important drug target in platelets // *Trends Pharmacol Sci.*- 2001 .- V.22(8). - P.388-391.
29. Baxi M.D., Vishwanatha J.K. Diadenosine polyphosphates: biological and pharmacological significance // *J Pharmacol Toxicol Methods.* - 1995. - V.33. - P.121–128.
30. Belardinelli L., Mattos E.C., Berne R.M. Evidence for adenosine mediation of atrioventricular block in the ischemic canine myocardium // *J Clin Invest.*- 1981. - V.68. - P.195–205.
31. Belardinelli L., Isenberg G. Actions of adenosine and isoproterenol on isolated mammalian ventricular myocytes // *Circul Res.* - 1983. - V.53. - P.287–297.
32. Belardinelli L. Modulation of atrioventricular transmission by adenosine // *Prog Clin Biol Res.* - 1987. - V.230. - P.109–118.

33. Belardinelli L., Linden J., Berne R.M. The cardiac effects of adenosine // *Prog Cardiovasc Dis.* - 2006. - V.32. - P.73–97.
34. Belhassen B., Pelleg A. Electrophysiologic effects of adenosine triphosphate and adenosine on the mammalian heart: clinical and experimental aspects // *J Am Coll Cardiol.* - 1984. - V.4. - P.414–424.
35. Benham C.D., Tsien, R.W. A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle // *Nature.* - 1987. - V.328. - P.275–278.
36. Berger F., Ramírez-Hernández M. H., Ziegler M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P) // *Trends Biochem Sci.* - 2004. - V.29. - P.111–118.
37. Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling // *Nature reviews. Molecular cell biology.* - 2003. - V.4. - P.517–914.
38. Billington R.A. Emerging Functions of Extracellular Pyridine Nucleotides // *Mol Med.*-2006. - V.12. - P.324–327.
39. Bo X., Fischer B., Maillard M., Jacobson K.A., Burnstock G. Comparative studies on the affinities of ATP derivatives for P₂-purinoceptors in rat urinary bladder // *Br J Pharmacol.* - 1994. - V.112. - P.1151–1159.
40. Boarder M.R., Turner J.T., Erb L, Weisman G.A. Classification of P₂ Purinoceptors. Not all G protein-coupled P₂ purinoceptors can be classed as P₂Y // *TiPS.* - 1994. - V.15(8). - P.280–281.
41. Bobalova J., Mutafova-Yambolieva V.N. Co-release of endogenous ATP and noradrenaline from guinea-pig mesenteric veins exceeds co-release from mesenteric arteries // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* - 2001. - V.28. - P.397–401.
42. Boehm, S. & Kubista, H. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors // *Pharmacol Rev.* - 2002. - V.54. - P.43–99.
43. Bonaventura C, Cashion R., Colacino J.M., Hilderman R.H., Alteration of hemoglobin function by diadenosine 5',5'''-P₁,P₄-tetraphosphate and other alarmones. // *J. Biol. Chem.* - 1992. - V.267. - P. 4652–4657.
44. Bourinet E., Fournier F., Lory P., Charnet P., Nargeot J. Protein kinase C regulation of cardiac calcium channels expressed in *Xenopus* oocytes // *Pflugers Arch.* – 1992. – V.421(2-3). – P.247-255.

45. Born G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // *Nature*. - 1962. - V.194. - P.927-929.
46. Boyett MR., Honjo H., Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. // *Cardiovasc Res*. - 2000. - V.47(4). - P.658-87.
47. Brandts B, Brandts A, Wellner-Kienitz M-C. Non-receptor- mediated activation of I K(ATP) and inhibition of I K(Ach) by diadenosine polyphosphates in guinea-pig atrial myocytes // *J Physiol*. - 1998. - V.512. - P.407–420.
48. Brandts B., Borchard R., Dirkmann D., Wickenbrock I., Sievers B., van Bracht M., Prull M.W., Trappe H.J. Diadenosine-5-phosphate exerts A1-receptor-mediated proarrhythmic effects in rabbit atrial myocardium // *Br J Pharmacol*. - 2003. - V.139(7). - P.1265-1272.
49. Breen L.T., Smyth L.M., Yamboliev I., Mutafova-Yambolieva V.N. beta-NAD is a novel nucleotide released on stimulation of nerve terminals in human urinary bladder detrusor muscle // *Am J Physiol Renal Physiol*. - 2006. - V.290. - P.486–495.
50. Broetto-Biazon A-C., Bracht A., Ishii-Iwamoto E.L, Valqui'ria de Moraes Silva, Kelmer-Bracht A.M. The action of extracellular NAD⁺ on Ca²⁺ efflux, hemodynamics and some metabolic parameters in the isolated perfused rat liver // *Eur J Pharmacol*. - 2004. - V.484. - P.291– 301.
51. Broetto-Biazon A-C., Bracht F., Bracht L., Kelmer-Bracht A.M., Bracht A. Transformation and action of extracellular NAD⁺ in perfused rat and mouse livers // *Acta Pharmacol Sin*. - 2009. - V.30(1). - P.90–97.
52. Brouillette J., Clark RB., Giles WR., Fiset C. Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes // *J Physiol*. - 2004. - V.15. - P.559.
53. Burnstock G., Dumsday B., Smythe A. Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide // *Br J Pharmacol*. - 1972. - V.44. - P.451–461.
54. Burnstock G., Satchell D.G., Smythe A. A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species // *Br J Pharmacol*. - 1972. - V.46. - P.234–242.

55. Burnstock G. Purinergic receptors // *J. Theor. Biol.* - 1976. - V.62(2). - P.491-503.
56. Burnstock G., Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoreceptor? // *Gen. Pharmacol.* - 1985. - V.16(5). - P.433-440.
57. Burnstock G. Purinergic mechanisms // *Ann N Y Acad Sci.* - 1990. - V.603. - P.1–17.
58. Burnstock G. Distribution and roles of purinoreceptor subtypes // *Nucleos. Nucleot.* - 1991. - V.10. - P.917-930.
59. Burnstock G., King B.F. Numbering of cloned P2 purine receptors // *Drug Rev. Res.* - 1996. - V.38. - P.67-71.
60. Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules // *Neuropharmacol.* - 1997. - V.36. - P.1127–1139.
61. Burnstock G. Current status of P2X receptors: distribution and pathophysiological roles // *Proc. West Pharmacol Soc.* - 1999. - V.42. - P.119-121.
62. Burnstock G., Knight G.E. Cellular distribution and functions of P2 receptor Subtypes in different systems // *Int. Rev. Cytol.* - 2004a. - V.240. - P.31-304.
63. Burnstock G. Cotransmission // *Curr Opin Pharmacol.* - 2004b. - V.4(1). - P.47-52.
64. Burnstock, G. Purinergic signalling--an overview // *Novartis Foundation Symp.* - 2006. - V.276. - P. 26–48.
65. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors // *Cell Mol Life Sci.* - 2007. - V.64(12). - P.1471-1483.
66. Burnstock G. Purinergic cotransmission // *Brain Res Bull.* 2009a.-V.50.-P.355–357.
67. Burnstock G. Purines and Purinoreceptors: Molecular Biology Overview // In: *Encyclopedia of neuroscience.* L.R.Squire, ed.eds. Elsevier, Boston. - 2009b. - V.7 - P.1253-1262.
68. Burnstock, B. B. Fredholm, Verkhatsky. The birth and postnatal development of purinergic signaling // *Acta Physiol.* - 2010. - V.199. - P. 93–147.
69. Burnstock G, Ralevic V. Purinergic signalling and blood vessels in health and disease // *Pharmacol Rev.* - 2014. - V.66. - P.102–192.

70. Burnstock G., Pelleg A. Cardiac purinergic signalling in health and disease // *Purinergic Signal.* - 2015. - V.11. - P.1-46.
71. Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments // *Front Pharmacol.* - 2017.- V.8. - P. 661.
72. Busse R., Ogilvie A, Pohl U. Vasomotor activity of diadenosine triphosphate and diadenosine tetraphosphate in isolated arteries // *Am J Physiol.* - 1988. - V.254(5 Pt 2). - P.828-832.
73. Bultmann R.and Starke K. Evans blue blocks P2x-purinoceptors in rat vas deferens // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* - 1993. - V.348. - P.684-687.
74. Camm A.J., Garratt C.J. Adenosine and supraventricular tachycardia // *N Engl J Med.* - 1991. - V.325. - P.1621–1629.
75. Cappellacci L. 5'-Carbamoyl derivatives of 2'-C-methyl-purine nucleosides as selective A1 adenosine receptor agonists: affinity, efficacy, and selectivity for A1 receptor from different species // *Bioorg Med Chem.* - 2008. - V.16. - P.336–353.
76. Castillo C.J., Moro M.A., Del Valle M., Sillero A., García A.G., Sillero M.A. Diadenosine tetraphosphate is co-released with ATP and catecholamines from bovine adrenal medulla // *J Neurochem.* - 1992. - V.59(2). - P.723-732.
77. Castro E., Torres M., Miras-Portugal MT., Gonzalez MP. Effect of diadenosine polyphosphates on catecholamine secretion from isolated chromaffin cells // *Br J Pharmacol.* - 1990. - V.100(2). - P.360-364.
78. Chan P.J., Su B.C., Tredway D.R. Diadenosine tetraphosphate (Ap4A) and triphosphate (Ap3A) signaling of human sperm motility // *Arch. Androl.* - 1991. - V.27. - P.103–108.
79. Chang H., Yanachkov IB., Dix EJ., Li YF., Barnard MR., Wright GE., Michelson AD., Frelinger AL 3rd. Modified diadenosine tetraphosphates with dual specificity for P2Y1 and P2Y12 are potent antagonists of ADP-induced platelet activation // *J Thromb Haemost.* - 2012 - V.10(12). - P.2573-2580.
80. Charlton S.J., Brown C.A., Weisman G.A., Turner J.T., Erb L., Boarder M.R. PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-purinereceptors // *Br. J. Pharmacol.* - 1006. - V118(3). - P.704-710.

81. Cho H., Youm J.B., Ryu S.Y., Earm Y.E., Ho W. - K. Inhibition of acetylcholine-activated K⁺ currents by U73122 is mediated by the inhibition of PIP₂-channel interaction // *Br. J of Pharmacol.* - 2001. - V.134(5). - P.1066-1072.
82. Clemo H.F., Belardinelli L. Effect of adenosine on atrioventricular conduction. I: Site and characterization of adenosine action in the guinea pig atrioventricular node // *Circul Res.* - 1986. - V.59. - P.427–436.
83. Clemo H.F., Bourassa A., Linden J., Belardinelli L. Antagonism of the effects of adenosine and hypoxia on atrioventricular conduction time by two novel alkylxanthines: correlation with binding to adenosine A₁ receptors // *J Pharm Exp Ther.* - 1987 - V.242. - P.478–484.
84. Conant AR., Theologou T., Dihmis WC., Simpson AW. Diadenosine polyphosphates are selective vasoconstrictors in human coronary artery bypass grafts // *Vasc Pharmacol.* - 2008. - V.48 (4–6). - P.157–164.
85. Conti J.B., Belardinelli L., Utterback D.B., Curtis A.B. Endogenous adenosine is an antiarrhythmic agent // *Circulation.* - 1995. - V.91. - P.1761–1767.
86. Costanzi S., Mamedova L., Gao Z. G., Jacobson K. A. Architecture of P₂Y nucleotide receptors: structural comparison based on sequence analysis, mutagenesis, and homology modeling // *J Med Chem.* - 2004. - V.47. - P.5393–5404.
87. Dahl G., Qiu F., Wang J. The bizarre pharmacology of the ATP release channel pannexin1 // *Neuropharmacology.* -2013. - V.75. - P.583-593.
88. Dalziel H.H., Westfall D.P. Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: Subclassification, distribution and molecular characterization // *Pharmacol Rev.* - 1994. - V.46. - P.450–466.
89. David M., Macías A., Moreno CH. Prieto A., Martínez-Mármol R., González T., Felipe A., Vicente R., Valenzuela T.C. Cardiac Kv1.5 Channelosome V1.5 Channels: identification of a Functional Effects of K_v1.3 Subunit on K Protein Kinase C (PKC) Activity Regulates // *J. Biol. Chem.* - 2012. - V.287. - P.21416-21428.
90. Delaney S.M., Blackburn G.M., Geiger J.D. Diadenosine polyphosphates inhibit adenosine kinase activity but decrease levels of endogenous adenosine in rat brain // *Eur. J. Pharmacol.* - 1997. - V.332. - P.35–42.

91. Dennis D., Jacobson K., Belardinelli L. Evidence of spare A₁-adenosine receptors in guinea pig atrioventricular node // *The American journal of physiology*. - 1992. - V.262. - P.661–671.
92. Dickenson J.M., Hill S.J. Potentiation of adenosine A₁ receptor-mediated inositol phospholipid hydrolysis by tyrosine kinase inhibitors in CHO cells // *Br J pharmacol*. - 1998. - V.125. - P.1049–1057.
93. Ding W.G., Toyoda F., Matsuura H. Regulation of cardiac I_{Ks} potassium current by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate// *Journal Biol Chem*. - 2004. - V.279. - P.50726–50734 .
94. Dobson J.G., Fenton R.A., Adenosine A receptor function in rat ventricular myocytes // *Cardiovasc. Res*. - 1997. - V. 34. - P. 337–347.
95. Dorsam R.T., Kunapuli S.P. Central role of the P₂Y₁₂ receptor in platelet activation // *J Clin Invest*. - 2004. - V.113. - P.340–345.
96. Dos Santos-Rodrigues A., Grañé-Boladeras N., Bicket A., Coe I.R. Nucleoside transporters in the purinome // *Neurochem international*. - 2014. - V.14. - P.197-216.
97. von Drygalski A, Ogilvie A. Ecto-diadenosine 5',5'''-P₁, P₄-tetraphosphate (Ap₄A)-hydrolase is expressed as an ectoenzyme in a variety of mammalian and human cells and adds new aspects to the turnover of Ap₄A // *Biofactors*. - 2000. - V.-11(3). - P.179-87.
98. Drury A.N., Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart // *J. Physiol*. - 1929. - V.68(3). - P. 213-37.
99. Dunne M.J., Findlay I., Petersen O.H. Effects of pyridine nucleotides on the gating of ATP-sensitive potassium channels in insulin-secreting cells // *J Membr Biol*. - 1988. - V.102. - P.205–216.
100. Durnin L., Hwang S.J., Ward S.M., Sanders K.M., Mutafova-Yambolieva V.N. Adenosine 5-diphosphate-ribose is a neural regulator in primate and murine large intestine along with β-NAD(+) // *J Physiol*. - 2012. - V.590. - P.1921–1941.
101. Ecke D, Hanck T, Tulapurkar ME, Schäfer R, Kassack M, Stricker R, Reiser G. Hetero-oligomerization of the P₂Y₁₁ receptor with the P₂Y₁ receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P₂Y₁₁ receptor // *Biochem J*. - 2008. - V.409(1). - P.107-116.

102. Eckle T., Grenz A., Laucher S., Eltzschig H.K. A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice // *J Clin Invest.* - 2008. - V.118. - P.3301–3315.
103. Edgecombe M.H.S, Craddock D.C, Smith A.G, McLennan A.G, Fisher M.J. Diadenosine polyphosphate-stimulated gluconeogenesis in isolated rat proximal tubules // *Biochem. J.*-1997. - V.323. - P.451–456.
104. Ellenbogen K. A. Trial to evaluate the management of paroxysmal supraventricular tachycardia during an electrophysiology study with tecadenoson // *Circulation.* - 2005. - V.111. - P.3202–3208.
105. Elmaleh D.R., Zamecnik P.C., Castronovo Jr. F.P, Straus H.W., Rapaport E. Tc-labeled nucleotides as tumor-seeking radiodiagnostic agents // *Proc Natl Acad Sci.* - 1984. - V.81. - P.918–921.
106. Eltzschig H.K. HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia // *J Exp Med.* - 2005. - V.202. - P.1493–1505.
107. Elzein E., Zablocki J. A1 adenosine receptor agonists and their potential therapeutic applications // *Expert Opin Investig Drugs.* - 2008. - V.17. - P.1901–1910.
108. Erlinge D., Hou M., Webb T. E., Barnard E. A., Moller S. Phenotype changes of the vascular smooth muscle cell regulate P2 receptor expression as measured by quantitative RT-PCR // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1998. - V.248(3). - P.864-70.
109. Erlinge D., Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease // *Purinergic Signal.* - 2008. - V.4. - P.1–20.
110. Erlinge D. P2Y receptors in health and disease // *Adv Pharmacol.* - 2011. - V.61. - P.417–439.
111. Fabritz L. Gene dose-dependent atrial arrhythmias, heart block, and bradycardiomyopathy in mice overexpressing A(3) adenosine receptors // *Cardiovasc Res.* - 2004. - V.62. - P.500–508.
112. Fields R., Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions // *Nat Rev Neurosci.* - 2006. - V.7(6). - P.423-436.
113. de Figueiredo L.F., Gossmann T.I., Ziegler M., Schuster S. Pathway analysis of NAD⁺ metabolism // *Biochem J.* - 2011. - V.439. - P.341–348.

114. Flodgaard and Klenow. Abundant amounts of diadenosine 5',5'''-P₁,P₄-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets // *Biochem J.* - 1982. - V.208(3). - P.737-42.

115. Frolidi G., Belardinelli L. Species-dependent effects of adenosine on heart rate and atrioventricular nodal conduction: mechanisms and physiological implications // *Circ Res.* - 1990. - V.67. - P.960-978.

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

117. Forrester T. Release of ATP from heart. Presentation of a release model using human erythrocyte // *Ann N Y Acad Sci.* - 1990. - V.603. - P.335-351.

118. Franco L., Zocchi E., Usai C., Guida L., Bruzzone S., Costa A., De Flora A. Paracrine roles of NAD⁺ and cyclic ADP-ribose in increasing intracellular calcium and enhancing cell proliferation of 3T3 fibroblasts // *Journal Biol Chem.* - 2001 - V.276. - P.21642-21648.

119. Fredholm B.B., Hedqvist P., Lindstrom K., Wennmalm M. Release of nucleosides and nucleotides from the rabbit heart by sympathetic nerve stimulation // *Acta Physiol Scand.* - 1982. - V.116. - P.285-295.

120. Fredholm B.B., Altiok N. Adenosine A_{2B} receptor signalling is altered by stimulation of bradykinin or interleukin receptors in astrogloma cells // *Neurochem international.* - 1994. - V.25. - P.99-102.

121. Fredholm B.B. Structure and function of adenosine receptors and their genes // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* - 2000. - V.362. - P.364-374.

122. Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors // *Pharmacol Rev.* - 2001. - V.53. - P.527-552.

123. Gaarder A., Jonsen J., Laland S., Hellem., A., Owren P.A. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets // *Nature.* - 1961. - V.192. - P.531-532.

124. Gabriëls G, Rahn KH, Schlatter E, Steinmetz M. Mesenteric and renal vascular effects of diadenosine polyphosphates (AP_nA) // *Cardiovasc Res.* - 2002. - V.56(1). - P.22-32.

125. Gaddum J.H., Holtz P. The localization of the action of drugs on the pulmonary vessels of dogs and cats // *J Physiol.* - 1933. - V.77. - P.139-158.

126. Gallego D., Hernandez P., Clave P., Jimenez M. P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* - 2004. - V.291. - P.584–594.
127. Garrison P.N., Barnes L.D. Determination of dinucleoside polyphosphates // in: McLennan AG, editor, *Ap A and Other Dinucleoside Polyphosphates*, CRC Press, Boca Raton. - 1992. - P.29–61.
128. Gasmi L., McLennan L, Edwards S.W. Priming of the respiratory burst of human neutrophils by the diadenosine polyphosphates, AP4A and AP3A: role of intracellular calcium // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1994. - V.202. - P.218–224.
129. Gasmi L., McLennan L, Edwards S.W. Neutrophil apoptosis is delayed by the diadenosine polyphosphates, Ap5A and Ap6A: synergism with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *Br. J. Haematol.* - 1996. - V.95. - P.637–639.
130. Gasmi L., McLennan L, Edwards S.W. Diadenosine polyphosphates induce intracellular Ca²⁺ mobilization in human neutrophils via a pertussis toxin sensitive G-protein // *Immunol.* - 1997. - V.90. - P.154–159
131. Gaynullina D, Shestopalov V, Panchin Y, Tarasova OS. Pannexin 1 facilitates arterial relaxation via an endothelium-derived hyperpolarization mechanism // *FEBS Lett.* - 2015. - V.589(10). - P.1164-70.
132. Gorzalka S., Vittori S, Volpini R, Cristalli G, von Kügelgen I, Müller C.E. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues // *Mol Pharmacol.* - 2005. - V.67(3). - P.955-964.
133. Graeff R. Mechanism of cyclizing NAD to cyclic ADP-ribose by ADP-ribosyl cyclase and CD38 // *J Biol Chem.* - 2009. - V.284. - P.27629–27636.
134. Grahnert A., Klein C., Hauschildt S. Involvement of P2X receptors in the NAD⁺-induced rise in [Ca²⁺]_i in human monocytes // *Purinergic Signal.* - 2009. - V.5. - P.309–319.
135. Green A.K, Cobbold P.H., Dixon C.J. Cytosolic free Ca²⁺ oscillations induced by diadenosine 5',5'''-P₁,P₃-triphosphate and diadenosine 5',5'''-P₁,P₄-tetraphosphate in single rat hepatocytes are indistinguishable from those induced by ADP and ATP respectively // *Biochem. J.* - 1995. - V.310. - P.629–635.
136. Griffioen K.J., Gorini C., Jameson H., Mendelowitz D. Purinergic P2X receptors mediate excitatory transmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus after hypoxia // *Hypertension.* - 2007. - V. 50. - P. 75–81.

137. Gustafsson A.J., Muraro L., Dahlberg C., Migaud M., Chevallier O., Khanh H.N., Krishnan K., Li N., Islam M.S. ADP ribose is an endogenous ligand for the purinergic P2Y1 receptor // *Mol Cell Endocrinol.* - 2011. - V.333. - P.8–19.
138. Haag F, Adriouch S, Braß A, Jung C, Möller S, Scheuplein F, Bannas P, Seman M, Koch-Nolte F. Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation // *Purinergic Signal.* - 2007. - V.3(1–2). - P.71–81.
139. Haleen S.J., Evans D.B. Selective effects of adenosine receptor agonists upon coronary resistance and heart rate in isolated working rabbit hearts // *Life sciences.* - 1985. - V.36. - P.127–137.
140. Hansen M.A., Bennett M.R., Barden J.A. Distribution of purinergic P2X receptors in the rat heart // *J Auton Nerv Syst.* - 1999. - V.78. - P.1–9.
141. Hansmann G., Bültmann R., Tuluc F., Starke K. Characterization by antagonists of P2-receptors mediating endothelium-dependent relaxation in the rat aorta // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* - 1997. - V.356. - P.641–652.
142. Harvey R. D., Belevych A.E. Muscarinic regulation of cardiac ion channels // *Br J Pharmacol.* - 2003. - V.139. - P.1074–1084.
143. Hashii M., Minabe Y., Higashida H. voltage-activated Ca²⁺ channels in NG108-15 neuronal cells // *Biochem J.* - 2000. - V.215. - P.207–215.
144. Haskó G., Pacher P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals // *J Leukoc Biol.* - 2008. - V.83. - P.447–455.
145. Headrick J.P., Gauthier N.S., Morrison R.R., Matherne G.P. Chronotropic and vasodilatory responses to adenosine and isoproterenol in mouse heart: effects of adenosine A1 receptor overexpression // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* - 2000. - V.27. - P.185–190.
146. Headrick J.P., Peart J.N., Reichelt M.E., Haseler L.J. Adenosine and its receptors in the heart: regulation, retaliation and adaptation. // *Biochimica et biophysica acta-2011.* - V.1808. - P.1413 – 1428.
147. Hein T.W., Wang W., Zoghi B., Muthuchamy M., Kuo L. Functional and molecular characterization of receptor subtypes mediating coronary microvascular dilation to adenosine // *J Mol Cell Cardiol.* - 2001. - V.33. - P.271–282 .
148. Holden C. P., Padua R. A., and Geiger J. D. Regulation of Ryanodine Receptor Calcium Release Channels by Diadenosine Polyphosphates // *J Neurochem.* - 1996. - V.67(2). - P.574-580.

149. Hopkins S.V. The action of ATP in the guinea-pig heart // *Biochem Pharmacol.* - 1973. - V.22. - P.335–339.
150. Hopwood A.M., Burnstock G. ATP mediates coronary vasoconstriction via P_{2X}-purinoceptors and coronary vasodilatation via P_{2y}-purinoceptors in the isolated perfused rat heart // *Eur J Pharmacol.* - 1987. - V.136. - P.49–54.
151. Hove-Madsen L. Adenosine A_{2A} receptors are expressed in human atrial myocytes and modulate spontaneous sarcoplasmic reticulum calcium release // *Cardiovascular Res.* - 2006. - V.72. - P.292–302.
152. Hoyle CHV, Chapple C, Burnstock G. Isolated human bladder: evidence for an adenine dinucleotide acting on P_{2X}-purinoceptors and for purinergic transmission // *Eur J Pharmacol.* - 1989. - V.174. - P.115–118.
153. Hoyle C.H. Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function // *Gen Pharmacol.* - 1990a. - V.21. - P.827–831.
154. Hoyle C.H., Knight G.E., Burnstock G. Suramin antagonizes responses to P₂-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea-pig urinary bladder and taenia coli // *Br J Pharmacol.* - 1990b. - V.99(3). - P.617-621.
155. Hoyle CHV, Postorino A, Burnstock G. Pre- and postjunctional effects of diadenosine polyphosphates in the guinea-pig vas deferens // *J Pharm Pharmacol.* - 1995. - V.47. - P.926-931.
156. Hoyle CHV, Ziganshin AU, Pintor J, Burnstock G. The activation of P₁-and P₂-purinoceptors in the guinea-pig left atrium by diadenosine polyphosphates // *Br J Pharmacol.* - 1996. - V.118. - P.1294–1300.
157. Hoyle C.H., Edward, G.A. Activation of P₁- and P_{2Y}-purinoceptors by ADP-ribose in the guinea-pig taenia coli, but not of P_{2X}-purinoceptors in the vas deferens // *Br J Pharmacol.* - 1992. - V.107. - P.367–374.
158. Hua S.Y., Tokimasa T., Takasawa S., Furuya Y., Nohmi M., Okamoto H., Kuba K. Cyclic ADP-ribose modulates Ca²⁺ release channels for activation by physiological Ca²⁺ entry in bullfrog sympathetic neurons // *Neuron.* - 1994. - V.12. - P.1073–1079.
159. Huang Y.-J. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2007. - V.104. - P.6436–6441.

160. Hwang SJ., Blair PJ., Durnin L., Mutafova-Yambolieva V., Sanders KM., Ward SM. P2Y1 purinoreceptors are fundamental to inhibitory motor control of murine colonic excitability and transit // *J Physiol.* - 2012. - V.590. - P.1957–1972
161. Humphrey S.M., Holliss D.G., Cartner L.A. Influence of inhibitors of ATP catabolism on myocardial recovery after ischaemia // *J Surg Res.* - 1987. - V.43. - P.187–195.
162. Hu K., Mochly-Rosen D., Boutjdir M. Evidence for functional role of epsilonPKC isozyme in the regulation of cardiac Ca(2+) channels // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2000. – V.279(6). – P.H2658-2664
163. Illes P., Verkhratsky A., Burnstock G., Franke H. P2X receptors and their roles in astroglia in the central and peripheral nervous system // *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry.* - 2012. - V.18. - P.422–438.
164. Iwabuchi S., Kawahara K. Extracellular ATP-prinoceptor signaling and AMP-activated protein kinase regulate astrocytic glucose transporter 3 in an in vitro ischemia // *Neurochem Int.* - 2013. - V.63(4). - P.259-268.
165. Jacobson K.A., Jarvis M.F., Williams M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets // *J Med Chem.* - 2002. - V.45. - P.4057–4093.
166. Jacobson K.A., Costanzi S., Ohno M., Joshi B.V., Besada P., Xu B., Tchilibon S. Molecular recognition at purine and pyrimidine nucleotide (P2) receptors // *Curr Top Med Chem.* - 2004. - V.4. - P.805–819.
167. Jacobson K.A., Gao Z.G. Adenosine receptors as therapeutic targets // *Nature Rev.Drug discovery.* - 2006. - V.5. - P.247–264.
168. Jameson H., Pinol R., Kamendi H., Mendelowitz D. ATP Facilitates Glutamatergic Neurotransmission to Cardiac Vagal Neurons in the Nucleus Ambiguus Heather // *Brain Res. Author Manuscr.* - 2008a. - V.27. - P. 88–92.
169. Jameson H., Pinol R., Mendelowitz D., Purinergic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic and glycinergic neurotransmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus // *Brain Res.* - 2008b. - V.11. - P. 53–62.
170. Jankowski J., Tepel M., van der Giet M., Tente IM, Henning L., Junker R, Zidek W., Schlüter H. Identification and characterization of P(1), P(7)-Di(adenosine-5')-heptaphosphate from human platelets // *J Biol Chem.* - 1999. - V.274(34). - P.23926-23931.

171. Jeffs R.A., Cooper C.L., Harden T.K. Solubilization of a guanine nucleotide-sensitive form of the P2Y-purinergic receptor // *Mol Pharmacol.* - 1991. - V.40. - P.85–92.
172. Jin J., Daniel J.L., Kunapuli S.P. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets // *Journal Biol Chem.* - 1998. - V.273. - P.2030–2034.
173. Jovanovic A., Terzic A. Diadenosine tetraphosphate-induced inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels in patches excised from ventricular myocytes // *Br J Pharmacol.*-1996.- V.117.-P.233–523.
174. Jovanovic A., Alekseev A. E., Terzic A. Intracellular diadenosine polyphosphates: a novel family of inhibitory ligands of the ATP-sensitive K⁺ channel // *Biochem pharmacol.* - 1997. - V.54. - P.219–225.
175. Jovanovic A., Jovanovic S., Mays D.C., Lipsky J.J., Terzic A. Diadenosine 5',5''-P1,P5-pentaphosphate harbors the properties of a signaling molecule in the heart // *FEBS Lett.* - 1998. - V.423(3). - P.314-318.
176. Kaiser R.A., Buxton, I.L. Nucleotide-mediated relaxation in guinea-pig aorta: selective inhibition by MRS2179 // *Br J Pharmacol.* - 2002. - V.135. - P.537–545.
177. Karimova V.M., Pustovit K.B., Abramochkin D.V., Kuz'min V.S. Effect of Purine Co-Transmitters on Automatic Activity Caused by Norepinephrine in Myocardial Sleeves of Pulmonary Veins // *Bull Exp Med.*- 2017. - V.162. - № 11. - P. 589-593
178. Kato I., Yamamoto Y., Fujimura M., Noguchi N., Takasawa S., Okamoto H. CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose, [Ca²⁺]_i, and insulin secretion // *J Biol Chem.* - 1999. - V.274. - P.1869–72.
179. Katsuragi T., Kuratomi L., Sato C., Furukawa T. Hyperreactivity of alpha 1-adrenoceptors, but not of P2X-purinoceptors, in vas deferens of spontaneously hypertensive rats // *Eur J Pharmacol.* - 1991. - V. 199. - P.303–307.
180. Katsuragi T., Tokunaga T., Ohba M., Sato C., Furukawa T. Implication of ATP released from atrial, but not papillary, muscle segments of guinea pig by isoproterenol and forskolin // *Life Sci.* - 1993. - V.53. - P.961–967.
181. Kauffenstein G., Hechler B., Cazenave J.P., Gachet C. Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y receptor // *J Thromb Haemost.* - 2004. - V.2. - P.1980–1988.

182. Kengatharan M., Thiemermann C., Vane J.R. Analysis of the cardiovascular responses to diadenosine pentaphosphate in the anaesthetised rat // *Br J Pharmacol.* - 1994. - V.113. - P.62.
183. Kennedy C. P2Y₁₁ Receptors: Properties, Distribution and Functions // *Adv Exp Med Biol.* - 2017. - V.1051. - P.107-122. 1
184. Keppens S. Effects of diadenosine triphosphate and diadenosine tetraphosphate on rat liver cells. Differences and similarities with ADP and ATP // *Biochem. Pharmacol.* - 1996. - V.52. - P.441–445.
185. Khakh B.S., Burnstock G., Kennedy C., King B.F., North R. A., Seguela P. International union of pharmacology: XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits // *Pharmacol Rev.* - 2001. - V.53. - P.107-118.
186. Kikuta Y., Sekine A., Tezuka S. Intravenous diadenosine tetraphosphate in dogs. Cardiovascular effects and influence on blood gases // *Acta Anaesthesiol Scand.* - 1994. - V.38. - P.284–288.
187. Kim U.H., Han M.K., Park B.H., Kim H.R., An N.H. Function of NAD glycohydrolase in ADP-ribose uptake from NAD by human erythrocytes // *Biochim Biophys Acta.* - 1993. - V. 1178. - P. 121–126.
188. King B.F. Reflections on the purinergic hypothesis: the Burnstock Festschrift in the millennial year // *Auton Neurosci.* - 2001. - V.87. - P.173–177.
189. Kirchhof P. Altered sinus nodal and atrioventricular nodal function in freely moving mice overexpressing the A₁ adenosine receptor // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* - 2003. - V.285. - P.145–153.
190. Kirsch G. E., Codina J., Birnbaumer L., Brown A.M. Coupling of ATP-sensitive K⁺ channels to A₁ receptors by G proteins in rat ventricular myocytes // *Am J Physiol.* - 1990. - V.259. - P.820–826.
191. Kisselev L.L., Justesen J., Wolfson A.D., Frolova L.Y. Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules? // *FEBS Lett.* - 1998. - V.427(2) - P.157-163.
192. Kishore B. K. Expression of NTPDase1 and NTPDase2 in murine kidney: relevance to regulation of P₂ receptor signaling // *Am J Physiol Renal Physiol.* - 2005. - V.288. - P.1032–1043.

193. Kitakaze M., Sekine A., Yamaura T., Nakajima H., Hori M. A novel endogenous vasoactive substance, diadenosine tetraphosphate (Ap₄A), produced in the ischemic heart as a new vasodilatory mediator // *Circulation*. - 1995. - V.92. - P.38.
194. Klein C., Grahnert A, Abdelrahman A., Muuller C.E., Hauschildt S. Extracellular NAD⁺ induces a rise in [Ca²⁺]_i in activated human monocytes via engagement of P2Y₁ and P2Y₁₁ receptors // *Cell Calcium*. - 2009. - V.46. - P.263–272.
195. Klein R.R., Bourdon D.M., Costales C.L., Wagner C.D., White W.L., Williams J.D., Hicks S.N., Sondek J., Thakker D.R. Direct activation of human phospholipase C by its well-known inhibitor U73122 // *J Biol Chem*. - 2011. - V.286(14). - P.12407-12416.
196. Kleta R., Hirsch J., Heidenreich S., Schlüter H., Zidek W., Schlatter E. Effects of diadenosine polyphosphates, ATP and angiotensin II on membrane voltage and membraneconductances of rat mesangial cell // *Pflugers Arch*. - 1995. - V.430(5). - P.713-720.
197. Klishin A., Lozovaya N., Pintor J., Miras-Portugal M.T., Krishtal O. Possible functional role of diadenosine polyphosphates: negative feedback for excitation in hippocampus // *Neuroscience*. - 1994. - V.58. - P.235–236.
198. Klotz K.N. Adenosine receptors and their ligands // *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. - 2000. - V.362 - P.382–391.
199. Koch-Nolte F. ADP-ribosylation of membrane proteins: unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells // *Annu Med*. - 2006. - V.38 - P.188–199.
200. Koles L., Furst S., Illes P. Purine ionotropic (P2X) receptors // *Curr Pharm Des*. - 2007. - V.13(23). - P.2368-2384.
201. Koles L., Gerevich Z., Olivera J.F., Zadori Z.S., Wirkner K. Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol*. - 2008. - V.377(1). - P.1-33.
202. Kugelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes // *Pharmacol Ther*. - 2006. - V.110(3). - P.415-432.
203. Kunapuli S.P., Daniel J.L. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system // *Biochem J*. - 1998. - V.336 - P.513–523.
204. Kurachi Y. G protein regulation of cardiac muscarinic potassium channel // *Am J Physiol*. - 1995. - V.269. - P.821 - 830.

205. Laubinger W, Wang H, Welte T, Reiser G. P2Y receptor specific for diadenosine tetraphosphate in lung: selective inhibition by suramin, PPADS, Ip5I, and not by MRS-2197 // *Eur J Pharmacol.* - 2003. - V.468(1). - P.9 – 14.
206. Lazarowski E.R., Boucher R. C., Harden T.K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules // *Mol Pharmacol.* - 2003. - V.64. - P.785–795.
207. Lee S., Park M., So I., Earm, Y.E. NADH and NAD modulates Ca(2+)-activated K⁺ channels in small pulmonary arterial smooth muscle cells of the rabbit // *Pflugers Arch.*- 1994. - V.427. - P.378–380.
208. Lee H. C. Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* - 2001. - V.41. - P.317–345.
209. Lee P.C., Bochner B.R., Ames B.N. AppppA, heat-shock stress, and cell oxidation // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1983. - V.80. - P.7496–7500.
210. Lei M1, Jones SA, Liu J, Lancaster MK, Fung SS, Dobrzynski H, Camelliti P, Maier SK, Noble D, Boyett MR. Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking // *J Physiol.* 2004. - V.559(Pt 3). - P.835-848.
211. Legssyer, Poggioli, Renard, Vassortt. Atp and other adenine compounds increase mechanical activity and inositol trisphosphate production in rat heart // *J. of physiol.* - 1988. - V.401. - P.185-199.
212. Lerman B.B., Belardinelli L. Cardiac electrophysiology of adenosine. Basic and clinical concepts // *Circulation.* - 1991. - V. 83 - P. 1499–1509.
213. Levitt B., Head R.J., Westfall D.P. High-pressure liquid chromatographic-fluorometric detection of adenosine and adenine nucleotides: application to endogenous content and electrically induced release of adenylyl purines in guinea pig vas deferens // *Anal Biochem.* - 1984. - V.137. - P.93–100.
214. Li B., Zhong H., Scheuer T., Catterall W. A. Functional role of a C-terminal Gbetagamma-binding domain of Ca(v)2.2 channels // *Mol Pharmacol.* - 2004. - V.66. - P.761–769.
215. Li Y., Ma J., Zhu H., Singh M., Hill D., Greer P.A., Arnold J.M., Abel E.D., Peng T.. Targeted inhibition of calpain reduces myocardial hypertrophy and fibrosis in mouse models of type 1 diabetes // *Diabetes.* - 2011. - V. 60. - P. 2985–2994.

216. Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* - 2001. - V.41. - P.775–787.
217. Löffler M., Morote-Garcia J. C., Eltzschig S. A., Coe I. R., Eltzschig H. K. Physiological roles of vascular nucleoside transporters // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2007. - V.27. - P.1004–1013.
218. Louie S., Kim B.K., Zamecnik P. Diadenosine 5', 5''-P₁, P₄-tetraphosphate, a potential antithrombotic agent // *Thromb Res.* - 1988. - V.49. - P.557-565.
219. Lütthje J., Ogilvie A. The presence of diadenosine 5',5''-P₁,P₃-triphosphate (Ap₃A) in human platelets // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1983. - V.115(1). - P.253-260.
220. Lütthje J., Ogilvie A. Diadenosine triphosphate (Ap₃A) mediates human platelet aggregation by liberation of ADP // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1984. - V.118(3). - P.704-709.
221. Lütthje J., Ogilvie A. Catabolism of AP₄A and AP₃A in Human serum. Identification of isoenzymes and their partial characterization // *Eur J Biochem.* - 1987. - V.169. - P.385–388.
222. Lütthje J., Ogilvie A. Catabolism of AP₄A and AP₃A in whole blood. The dinucleotides are long-lived signal molecules in the blood ending up as intracellular ATP in the erythrocytes // *Eur J Biochem.* - 1988. - V.173. - P.241–245.
223. Lukyanenko V., Gyorke I., Wiesner T.F., Gyorke S. Potentiation of Ca²⁺ Release by cADP-Ribose in the Heart Is Mediated by Enhanced SR Ca²⁺ Uptake Into the Sarcoplasmic Reticulum // *Circ Res.* - 2001. - V.89. - P.614–622.
224. Luo J., Jankowski V., Gungär N., Neumann J., Schmitz W., Zidek W., Schlüter H., Jankowski J. Endogenous diadenosine tetraphosphate, diadenosine pentaphosphate, and diadenosine hexaphosphate in human myocardial tissue. // *Hypertension.* - 2004. - V.43(5). - P.1055-1059.
225. Luo J., Jankowski J., Knobloch M., Van der Giet M., Gardanis K., Russ T., Vahlensieck U., Neumann J., Schmitz W., Tepel M., Deng M.C., Zidek W., Schlüter H. Identification and characterization of diadenosine 5',5''-P¹, P²-diphosphate and diadenosine 5',5''-P¹, P³-triphosphate in human myocardial tissue // *FASEB J.* - 1999. - V.13. - P.695–705.
226. Luthje J, Ogilvie A. The presence of diadenosine 5'' 9,590-P ,P - triphosphate (Ap A) in human platelets // *Biochem Biophys Res 3 Commun.* - 1983. - V.115. - P.253–260.

227. MacDonald P.E., Braun M., Galvanovskis J., Rorsman P. Release of small transmitters through kiss-and-run fusion pores in rat pancreatic beta cells // *Cell Metab.* - 1990. - V.4. - P.283–290.

228. McLennan A.G. Dinucleoside polyphosphates-friend or foe? // *Pharmacol Ther.* - 2000. - V.87. - P.73–89.

229. Malomouzh A.I., Nikolsky E.E., Vyskocil F. Purine P2Y receptors in ATP-mediated regulation of non-quantal acetylcholine release from motor nerve endings of rat diaphragm // *Neurosci. Res.* – 2011. – V.71(3). – P.219-225.

230. Matsubayashi T., Matsuura H., Ehara T. On the mechanism of the enhancement of delayed rectifier K⁺ current by extracellular ATP in guinea-pig ventricular myocytes // *Eur J Physiol.* - 1999. - V.437 - P.635–642.

231. Matsuura H., Tsuruhara Y., Sakaguchi M., Ehara T. Enhancement of delayed rectifier K⁺ current by P2-purinoceptor stimulation in guinea-pig atrial cells // *J Physiol.* - 1996. - V.490.3. - P.647-658.

232. Matsuura H., Ehara T. Modulation of the muscarinic K⁺ channel by P2-purinoceptors in guinea-pig atrial myocytes // *J Physiol.* - 1996. - V.497.2. - P.379-393.

233. Matsuura H., Ehara T. Selective enhancement of the slow component of delayed rectifier K⁺ current in guinea-pig atrial cells by external ATP // *J Physiol.* - 1997. - V.503.1. - P.45-54.

234. Mei Q., Liang B.T. P2 purinergic receptor activation enhances cardiac contractility in isolated rat and mouse hearts // *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* - 2001. - V. 281. - P. H334-41.

235. Mihaylova-Todorova S., Todorov L.D., Westfall D.P. Correlation between the release of the sympathetic neurotransmitter atp and soluble nucleotidases from the guinea pig vas deferens // *J Pharmacol Exp Ther.* - 2001. - V.296. - P.64–70.

236. Miras-Portugal M.T., Gualiz J., Pintor J. The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates // *FEBS Lett.* - 1998. - V.430. - P.78–82.

237. Moreschi I. Extracellular NAD⁺ is an agonist of the human P2Y₁₁ purinergic receptor in human granulocytes // *J Biol Chem.* - 2006. - V.281. - P.31419–31429.

238. Muller C. E. Adenosine receptor ligands-recent developments part I. Agonists // *Curr Med Chem.* - 2000. - V.7. - P.1269–1288.
239. Müller C. E., Ferré S. Blocking striatal adenosine A2A receptors: a new strategy for basal ganglia disorders // *Recent Pat CNS Drug Discov.* - 2007. - V.2. - P.1–21.
240. Müller C.E., Jacobson, K.A. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs // *Biochim Biophys Acta.* - 2011. - V.1808. - P.1290–1308.
241. Mulvany M.J., Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats // *Circ Res.* - 1977. - V.41(1). - P.19-26.
242. Munshi C. Aarhus R., Graeff R., Walseth T.F., Levitt D., Lee H. Identification of the enzymatic active site of CD38 by site-directed mutagenesis // *J Biol Chem.* - 2000. - V.275. - P.21566–21571.
243. Mustafa N.W. Adenosine Receptors, Coronary Blood Flow, and Cardiac Electrophysiology // *Adenosine Receptors in Health and Disease.* - 2009. - V.193 - P.1–25.
244. Mutafova-Yambolieva V.N. Beta-nicotinamide adenine dinucleotide is an inhibitory neurotransmitter in visceral smooth muscle // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2007. - V.104. - P.16359–16364.
245. Mutafova-Yambolieva VN. Neuronal and extraneuronal release of ATP and NAD(+) in smooth muscle // *IUBMB Life.* - 2012. - V.64(10). - P.817–24.
246. Mutafova-Yambolieva V.N., Durnin L. The purinergic neurotransmitter revisited: a single substance or multiple players // *Pharmacol Ther.* - 2014. - V.144(2). - P.162-191.
247. Nahum V, Tulapurkar M, Lévesque SA, Sévigny J, Reiser G, Fischer B. Diadenosine and diuridine poly(borano)phosphate analogues: synthesis, chemical and enzymatic stability, and activity at P2Y1 and P2Y2 receptors // *J Med Chem.* - 2008. - V.49(6). - P.1980–1990.
248. Nakae I, Takahashi M, Takaoka A. Coronary effects of diadenosine tetraphosphate resemble those of adenosine in anesthetized pigs: involvement of ATP-sensitive potassium channels // *Cardiovasc Pharmacol.* - 1996. - V.28. - P.124–133.
249. Neumann, J. Inotropic effects of diadenosine tetraphosphate in isolated canine cardiac preparations // *J Cardiovasc Pharmacol.* - 1999. - V.33. - P.151–156 .

250. Nichols C.G., Ripoll C., Lederer W.J. ATP-sensitive potassium channel modulation of the guinea pig ventricular action potential and contraction // *Circ Res.* - 1991. - V.68. - P.280–287.
251. Nilsson H., Sjöblom N. Distension-dependent changes in noradrenaline sensitivity in small arteries from the rat // *Acta Physiol Scand.* - 1985. - V.125(3). - P.429-435.
252. Nishimura A., Moriya S., Ukai H., Nagai K., Wachi M., Yamada Diadenosine 5',5'''-P₁, P₄-tetraphosphate (Ap₄A) controls the timing of cell division in *Escherichia coli* // *Genes Cells.* - 1997. - V.2. - P.401–413.
253. Ogilvie A., Bläsius R., Schulze-Lohoff E., Sterzel R.B. Adenine dinucleotides: a novel class of signalling molecules // *J Auton Pharmacol.* - 1996. - V.16(6). - P.325-328.
254. Olanrewaju H.A., Mustafa S.J. Adenosine A₂A and A₂B receptors mediated nitric oxide production in coronary artery endothelial cells // *Gen Pharmacol.* - 2000. - V.35. - P.171–177.
255. Olanrewaju H.A., Gafurov B.S., Lieberman E.M. Involvement of K⁺ channels in adenosine A₂A and A₂B receptor-mediated hyperpolarization of porcine coronary artery endothelial cells // *J Cardiovasc Pharmacol.* - 2002. - V.40. - P.43–49.
256. Olsson R.A., Pearson J.D. Cardiovascular purinoceptors // *Physiol Rev.* - 1990. - V.70. - P.761–845.
257. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats // *Nat Protoc.* - 2008. - V.3(9). - P.1422-34.
258. Palmer T.M., Stiles, G.L. Adenosine receptors // *Neuropharmacol.* - 1995. - V.34. - P.683–694.
259. Pastor-Anglada M., Pérez-Torras S. Who Is Who in Adenosine Transport // *Front Pharmacol.* - 2018. - V.14. - P:627.
260. Pereira M.F., Hernández M.D., Pintor J., Miras-Portugal M.T., Cunha R.A., Ribeiro J.A. Diadenosine polyphosphates facilitate the evoked release of acetylcholine from rat hippocampal nerve terminals // *Brain Res.* - 2000. - V.879(1-2). - P.50-54.
261. Pearse B.M. Characterization of coated-vesicle adaptors: their reassembly with clathrin and with recycling receptors // *Methods Cell Biol.* - 1989. - V.31. - P.229–246.

262. Pearson J.D., Gordon J.L. P2 purinoceptors in the blood vessel wal // *Biochem Pharmacol.* - 1989. - V.38. - P.4157–4163.
263. Peart J.N., Headrick J.P. Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways // *Pharmacol Ther.* - 2007. - V.114. - P.208–221.
264. Pelleg A. Cardiac cellular electrophysiologic actions of adenosine and adenosine triphosphate // *Am Heart J.* - 1985. - V.110. - P.688–693.
265. Pelleg A. Cardiac electrophysiologic actions of adenosine and adenosine 5'-triphosphate. // *Physiol Pharmacol.* - 1998. - V.11. - P.143–155.
266. Pelleg A., Katchanov G., Xu J. Autonomic neural control of cardiac function: modulation by adenosine and adenosine 5'-triphosphate // *Am J Cardiol.* - V.79. - P.11–14.
267. Pelleg A., Belardinelli L. Effects of extracellular adenosine and ATP on cardiomyocytes // *RG Landes Company.* - 1998. - P.1–225.
268. Pelleg A., Vassort G. Direct and indirect effects of extracellular ATP on cardiac myocytes. In: Pelleg A., Belardinelli L. Effects of extracellular adenosine and ATP on cardiomyocytes // *RG Landes Company.* - 1998. - P.197–222.
269. Pelleg A., Hurt C.M., Michelson, E. L. Cardiac effects of adenosine and ATP // *Ann N Y Acad Sci.* - 1990. - V.603. - P.19–30.
270. Pelleg A., Hurt C.M., Hewlett E. L. ATP shortens atrial action potential duration in the dog: role of adenosine, the vagus nerve, and G protein // *Can J Physiol Pharmacol.* - 1996. - V.74. - P.15–22.
271. Pelzmann B. NADH supplementation decreases pinacidil-primed I K ATP in ventricular cardiomyocytes by increasing intracellular ATP // *Br J Pharmacol.* - 2003. - V.139. - P.749–754.
272. Pintor J., Rotllam P, Torres M, Miras-Portugal MT. Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release // *Anal Biochem.* - 1992. - V.200(2). - P.296-300.
273. Pintor J., Díaz-Rey M.A., Torres M., Miras-Portugal M.T. Presence of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine // *Neurosci Lett.* - 1992a. - V.136(2). - P.141-144.

274. Pintor J, Miras-Portugal MT. P2 purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system. // *Gen Pharmacol.* - 1995. - V.26(2). - P.229-35.
275. Pintor J., Miras-Portugal T., Fredholm B. Research on purines and their receptors comes of age // *Trends Pharmacol Sci.* - 2000. - V.21. - P.453-456.
276. Pohl U., Ogilvie A., Lamontagne D., Busse R.. Potent effects of AP A3 and AP A on coronary resistance and autacoid release of intact 4 rabbit hearts // *Am J Physiol.* - 1991. - V.260. - P.1692–1697.
277. Pustovit K.B., Kuzmin V.S., Abramochkin D.V. Diadenosine tetra- and pentaphosphates affect contractility and bioelectrical activity in the rat heart via P2 purinergic receptors // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol.* - 2015. - P.1-11.
278. Ralevic V., Burnstock G. Postjunctional synergism of noradrenaline and adenosine5'-triphosphate in the mesenteric arterial bed of the rat // *Eur J Pharmacol.* - 1990. - V.175. - P.291-299.
279. Ralevic V., Burnstock G. Effect of purines and pyrimidines on the rat mesenteric arterial bed // *Circ Res.* - 1991. - V.69. - P.1583–1590.
280. Ralevic V., Hoyle CHV., Burnstock G. Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenosine dinucleotides in rat mesenteric arteries // *J Physiol.* - 1995. - V.483. - P.703–713.
281. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines // *Pharmacol Rev.* - 1998 - V.50. - P.413–492.
282. Reichard P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis // *Annu Rev Biochem.* - 1988. - V.57. - P.349–374.
283. Ripoll C., Martin F., Manuel Rovira., Pintor J., Miras-Portugal M.T., Soria B. Diadenosine polyphosphates. A novel class of glucose-induced intracellular messengers in the pancreatic beta-cell // *Diabetes.* - 1996. - P.1431-1434
284. Rodriguez del Castillo A., Torres M., Delicado E.G., Miras-Portugal M.T. Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules // *J Neurochem.* - 1988. - V.51(6). - P.1696-1703.

285. Rubino A., Burnstock G. Possible role of diadenosine polyphosphates as modulators of cardiac sensory–motor neurotransmission in guinea-pigs // *J Physiol.* - 1996. - V.495. - P.515–523.
286. Rubio R., Ceballos G., Balcells E. Intravascular adenosine: the endothelial mediators of its negative dromotropic effects // *Eur J Pharmacol.* - 1999. - V.370. - P.27–37.
287. Sauve A.A., Munshi C., Lee H.C., Schramm V.L. The reaction mechanism for CD38. A single intermediate is responsible for cyclization, hydrolysis, and base-exchange chemistries // *Biochem.* - 1998. - V.37. - P.13239–13249.
288. Scamps F. Characterization of a beta-adrenergically inhibited K⁺ current in rat cardiac ventricular cells // *J Physiol.* - 1996. - V.491. - P.81–97.
289. Schott E., Schlimme E. beta-Nicotinamide-alpha-adenine dinucleotide. Synthesis and properties of a coenzyme analog // *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* - 1978 - V.359. - P.1675–1680.
290. Schluter H., Offers E., Bruggemann G.. Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure // *Nature.* - 1994. - V.367. - P.186–188.
291. Schulze-Lohoff E. Zanner S., Ogilvie A., Sterzel R.B. Vasoactive diadenosine polyphosphates promote growth of cultured renal mesangial cells // *Hypertension.* - 1995. - V.26. - P.899–904.
292. Shen J.-B., Yang R., Pappano A., Liang B.T. Cardiac P2X purinergic receptors as a new pathway for increasing Na⁺ entry in cardiac myocytes. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* - 2014. - V. 307. - P. H1469-77.
293. Shimizu K., Shintani Y, Ding, Matsuura H., Bamba T.Potentiation of slow component of delayed rectifier K⁺ current by cGMP via two distinct mechanisms: inhibition of hosphodiesterase 3 and activation of protein kinase G // *Br J Pharmacol.* - 2002. - V.137 - P.127-137.
294. Schmidt AP., Lara DR, Souza DO. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system // *Pharmacol Ther.* - 2007. - V.116(3). - P.401-416.
295. Seman M. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor // *Immunity.* - 2003 - V.19. - P.571–582.

296. Simon J. Characterization and channel coupling of the P2Y(12) nucleotide receptor of brain capillary endothelial cells // *J Biol Chem.* - 2002. - V.277 - P.31390–31400.
297. Singer-Lahat D., Gershon E., Lotan I., Hullin R., Biel M., Flockerzi V., Hofmann F., Dascal N. Modulation of cardiac Ca²⁺ channels in *Xenopus* oocytes by protein kinase C // *FEBS Lett.* – 1992. – V.306(2-3). – P.113-118.
298. Stephens JC, Artz SW, Ames BN. Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp): positive effector for histidine operon transcription and general signal for amino-acid deficiency // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1975. - V.72(11). - P.4389-4393.
299. Smith J.S., Lefkowitz R.J., Rajagopal S. Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors // *Nature Reviews.* - 2018. - V.17. - P. 243–260.
300. Smyth L.M., Bobalova J., Mendoza M.G., Lew C., Mutafova-Yambolieva V.N. Release of beta-nicotinamide adenine dinucleotide upon stimulation of postganglionic nerve terminals in blood vessels and urinary bladder // *J Biol Chem.* - 2004. - V.279. - P.48893–48903.
301. Smyth L.M., Breen L.T., Yamboliev I.A., Mutafova-Yambolieva V.N. Novel localization of CD38 in perivascular sympathetic nerve terminals // *Neurosci.* - 2006. - V.139.- P.1467–1477.
302. Smyth L. M., Breen L. T., Mutafova-yambolieva V.N. Nicotinamide adenine dinucleotide is released from sympathetic nerve terminals via a botulinum neurotoxin A-mediated mechanism in canine mesenteric artery // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* - 2006. - V.271. - P.1818–1825.
303. 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 // *Neuropharmacol.*- 2009. - V.56. - P.368–378.
304. Soliman M. Insulin treatment before resuscitation following hemorrhagic shock improves cardiac contractility and protects the myocardium in the isolated rat heart // *J. Emerg. Trauma. Shock.* 2015- V. 8. - P. 144–148.
305. Song L., Carter S.M., Chen Y., Sitsapesan R. Diadenosine pentaphosphate is a potent activator of cardiac ryanodine receptors revealing a novel high-affinity binding site for adenine nucleotides. // *Br J Pharmacol.*- 2009. - V.156(5). - P.857-67.

306. Stachon A, Stegemann H, Hohage H, Rahn KH, Schlatter E. Effects of diadenosine polyphosphates on the intracellular Ca²⁺ concentration in endothelial cells // *Cell Physiol Biochem.*- 1998. - V.8(4). - P.175-184.
307. Stavrou B.M., Sheridan D.J., Flores N.A. Cardiac electrophysiological and haemodynamic effects of diadenosine polyphosphates in the isolated perfused guinea-pig heart // *J Physiol.*- 1998. - V.509. - P.150–151.
308. Stavrou B.M., Blackburn G.M., Sheridan D.J., Flores N.A. Diadenosine polyphosphates: platelet-derived compounds with potent purinergic actions on cardiac hemodynamics and electrophysiology // *Circulation.* – 1999. – V.100. - P.61.
309. Stavrou B.M., Beck C., Flores N.A. Changes in extracellular pH and myocardial ischemia alter the cardiac effects of diadenosine tetraphosphate and pentaphosphate // *Br J Pharmacol.* - 2001. - V.34. - P.639–647.
310. Stavrou B.M., Lawrence C., Blackburn G.M., Cohen H., Sheridan D.J., Flores N.A. Coronary vasomotor and cardiac electrophysiologic effects of diadenosine polyphosphates and nonhydrolyzable analogs in the guineapig // *J Cardiovasc Pharmacol.* - 2001. - V.37. - P.571–584.
311. Stavrou B.M., Lawrence C., Sheridan D.J., Flores N.A. (1999b) Diadenosine polyphosphates: platelet-derived substances with potent cardiac electrophysiological and haemodynamic effects // *J Mol Cell Cardiol.* - V.-31. -P.63.
312. Steinmetz M, van Le T, Hollah P, Gabriëls G, Hohage H, Rahn KH, Schlatter E. Influence of purinoceptor antagonism on diadenosine pentaphosphate-induced hypotension in anesthetized rats // *J Pharmacol Exp Ther.*- 2000. - V.294(3). - P.963-968.
313. Steinmetz M., Janssen A.K., Pelster F., Rahn K.H., Schlatter E. Vasoactivity of diadenosine polyphosphates in human small mesenteric resistance arteries // *J Pharmacol Exp Ther.* - 2002. - V.302. - P.787–794.
314. Szentandrassy N., Farkas V., Bárándi L., Hegyi B., Ruzsnavszky F., Horváth B., Bányász T., Magyar J., Márton I., Nánási PP. Role of action potential configuration and the contribution of C²⁺a and K⁺ currents to isoprenaline-induced changes in canine ventricular cells // *Br J Pharmacol.* - 2012 - V.167(3). - P.599-611.

315. Sugimura A., Kanatsuka H., Tanikawa T., Ong B.H., Shirato K.. Effect of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) on coronary arterial microvessels in the beating canine heart // *Jpn Circ J.* - 2000. - V.64. - P.868–875.
316. Sumiyoshi R., Nishimura J., Kawasaki J., Kobayashi S., Takahashi S. Diadenosine polyphosphates directly relax porcine coronary arterial smooth muscle // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1997. - V.283. - P.548–556.
317. Tarasova O., Sjöblom-Widfeldt N., Nilsson H. Transmitter characteristics of cutaneous, renal and skeletal muscle small arteries in the rat // *Acta Physiol Scand.* - 2003. - V.177(2). - P.157-166.
318. Tarasova OS, Golubinskaya VO, Kosiakov AN, Borovik AS, Timin EN, Rodionov IM. The role of purinergic and adrenergic transmitters of the sympathetic system in the control of arterial blood pressure variability // *J Auton Nerv Syst.* - 1998. - V.70(1-2). - P.66-70.
319. Tawfik H.E., Schnermann J., Oldenburg P.J., Mustafa S.J. Role of A₁ adenosine receptors in regulation of vascular tone // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* - 2005. - V.288-P.1411–1416.
320. Tepel M., Bachmann J., Schlüter H., Zidek W. Diadenosine polyphosphates increase cytosolic calcium and attenuate angiotensin-II-induced changes of calcium in vascular smooth muscle cells // *J Vasc Res.* - 1996. - V.33(2). - P.132-138.
321. Toda H., Ding W-G., Yasuda Y, Toyoda F., Matsuura H. and Horie M. Stimulatory action of protein kinase Ce isoform on the slow component of delayed rectifier K_{ro} current in guinea-pig atrial myocytes // *Br J Pharmacol.* - 2007. - V.150. - P.1011–1021.
322. Todorov L. D., Mihaylova-Todorova S., Craviso G. L., Bjur R., Westfall D.P. Evidence for the differential release of the cotransmitters ATP and noradrenaline from sympathetic nerves of the guinea-pig vas deferens // *J Physiol.* - 1996. - V.496. - P.731–748.
323. Tshori S, Razin E, Nechushtan H.. Amino-acyl tRNA synthetases generate dinucleotide polyphosphates as second messengers: functional implications // *Top Curr Chem.* - 2014. - V.344. - P.189-206.

324. Umapathy N.S. Extracellular beta-nicotinamide adenine dinucleotide (beta-NAD) promotes the endothelial cell barrier integrity via PKA- and EPAC1/Rac1-dependent actin cytoskeleton rearrangement // *J Cell Physiol.*- 2010. - V.223. - P.215–223.
325. Ussher J.R., Jaswal J.S, Lopaschuk G.D. Pyridine nucleotide regulation of cardiac intermediary metabolism // *Circ Res.* - 2012. - V.111. - P.628–641.
326. Vartanian A., Narovlyansky A., Amchenkova A., Turpaev K., Kisselev L. Interferons induce accumulation of diadenosine triphosphate (Ap3A) in human cultured cells // *FEBS Lett.*- 1996. - V.381. - P.32–34.
327. Vahlensieck U., Boknik P., Knapp J., Linck B., Miiller F.U., Neumann J., Herzig S., Schliiter H., Zidek W. Negative chronotropic and inotropic effects exerted by diadenosine hexaphosphate (AP6A) via A1-adenosine receptors // *Br J Pharmacol.*- 1996.- V.119(5). - P.835-844.
328. Vahlensieck U., Boknic P., Gombosova' I., Huke S., Knapp J., Linck B. Inotropic effects of diadenosine tetraphosphate (Ap4A) in human and animal cardiac preparations // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1999. - V.288. - P.805–813.
329. Varshavsky A. Diadenosine 5', 5'''-P1, P4-tetraphosphate: a pleiotropically acting alarmone? // *Cell.* - 1983. - V.34. - P.711–712.
330. Venetucci L, O'Neill SC, Eisner DA. Does the adenosine A2A receptor stimulate the ryanodine receptor? *Cardiovasc Res.* - 2007. - V.73(1). - P.247-248.
331. Vials A.J., Burnstock G. Differential effects of ATP and 2-methylthioATP-induced relaxation in guinea pig coronary vasculature // *J Cardiovasc Pharmacol.* - 1994. - V.23. - P.757–764.
332. Vinogradova TM, Fedorov VV, Yuzyuk TN, Zaitsev AV, Rosenshtraukh LV. Local cholinergic suppression of pacemaker activity in the rabbit sinoatrial node // *J Cardiovasc Pharmacol* - 1998. - V.32(3). - P.413-424.
333. Vassort, G. Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium // *Physiol Rev.* - 2001. -- V.81. - P.767–806.
334. von Kugelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes // *Pharmacol Ther.* - 2006. - V.110. - P.415–432.

335. Wang J., Irnaten M., Neff R.A., Venkatesan P., Evans C., Loewy A.D., Mettenleiter T.C., Mendelowitz D., Synaptic and Neurotransmitter Activation of Cardiac Vagal Neurons in the Nucleus Ambiguus // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*- 2006. - V. 940. - P. 237–246.
336. Wang N., De Bock M., Decrock E., Bol M., Gadicherla A., Vinken M., Rogiers V., Bukauskas F.F., Bultynck G., Leybaert L. Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels // *Biochim Biophys Acta.* - 2013. - V.1828. - P.35–50.
337. Webb T.E., Boluyt M.O., Barnard E.A. Molecular biology of P2y purinoceptors: expression in rat heart // *J Autonomic Pharmacol.* - 1996. - V.16. - P.303-307.
338. Westfall T.D., Sarkar S., Ramphir N., Westfall D.P., Sneddon P., Kennedy C. Characterization of the ATPase released during sympathetic nerve stimulation of the guinea-pig isolated vas deferens // *Br J Pharmacol.* - 2000. - V.129. - P.1684–1688.
339. White T.D. Characteristics of neuronal release of ATP // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* - 1984. - V.8 - P.487-493.
340. Woodiwiss A.J., Honeyman T.W., Fenton R.A., Dobson J.G. Adenosine A2a-receptor activation enhances cardiomyocyte shortening via Ca²⁺-independent and -dependent mechanisms // *Am J Physiol.* - 1999. - V.276. - P.1434–1441.
341. Xu J., Wang L., Hurt C.M., Pelleg A. Endogenous adenosine does not activate ATP-sensitive potassium channels in the hypoxic guinea pig ventricle in vivo // *Circulation.* - 1994. - V.89(3). - P.1209-1216.
342. 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. - V.30. - P.756–768.
343. Yan L., Burbiel J.C., Maass A., Müller C.E. Adenosine receptor agonists: from basic medicinal chemistry to clinical development // *Expert Opin Emerg Drugs.* - 2003. - V.8. - P.537–576.
344. Yanachkov IB, Chang H, Yanachkova MI, Dix EJ, Berny-Lang MA, Gremmel T, Michelson AD, Wright GE, Frelinger AL New highly active antiplatelet agents with dual specificity for platelet P2Y1 and P2Y12 adenosine diphosphate receptors // *Eur J Med Chem* - 2016. - V.107. - P.204-218.

345. Yang S., Cheek D.J., Westfall D.P., Buxton I.L. Purinergic axis in cardiac blood vessels. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells // *Circ Res.* - 1994. - V.74. - P.401–407
346. Yuan K., Cao C., Bai G.Y., Kim S.Z., Kim S.H. Diadenosine tetraphosphate stimulates atrial ANP release via A(1) receptor: involvement of K(ATP) channel and PKC // *Peptides.* - 2007. - V.28(7). - P.1397-1405
347. Zaza A., Rocchetti M., DiFrancesco D. Modulation of the hyperpolarization-activated current (I_f) by adenosine in rabbit sinoatrial myocytes // *Circulation.* - 1996. - V.94 - P.734–741.
348. Zhang Z.H., Johnson J.A., Chen L., El-Sherif N., Mochly-Rosen D., Boutjdir M. C2 region-derived peptides of beta-protein kinase C regulate cardiac Ca²⁺ channels // *Circ. Res.* – 1997. – V.80(5). – P.720-729.
349. Zhang X., Meng L., He B., Chen J., Liu P., Zhao J., Zhang Y., Li M., An D. The role of P2X7 receptor in ATP-mediated human leukemia cell death: calcium influx-independent // *Acta Biochim Biophys Sin.* - 2009. - V.41. - P.362–369.
350. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* - 2000. - V.362. - P.299–309.