

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Пустовит Ксения Борисовна

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

Специальность 03.03.01 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2018

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: *Кузьмин Владислав Стефанович*
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: *Азаров Ян Эрнестович - доктор биологических наук, доцент, Институт физиологии Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук, ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, лаборатория физиологии сердца, главный научный сотрудник*

Зиятдинова Нафиса Ильгизовна - доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», институт фундаментальной биологии и медицины, кафедра охраны здоровья человека, профессор

Маломуж Артем Иванович - кандидат биологических наук, Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение ФГБУН ФИЦ КазНЦ РАН, лаборатория биофизики синаптических процессов, старший научный сотрудник

Защита диссертации состоится 17 декабря 2018 г. в 15³⁰ часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1. Факс: (495)939-43-09.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/151270718/>

Автореферат разослан 15 ноября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.03.06
доктор биологических наук

 Умарова Б.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время показано, что кроме АТФ и аденозина в пуринергической сигнализации роль транмиттеров выполняют и другие пуриновые соединения. Количество пуриновых соединений, у которых обнаруживается регуляторная активность, постоянно растет. К таким соединениям относят диаденозиновые полифосфаты (Ar_nA) и никотинамидадениндинуклеотид (НАД+).

Диаденозиновые полифосфаты – класс пуриновых соединений, представляющих собой две молекулы аденина, соединенные полифосфатным мостиком ($n=2-6$). Известно, что Ar_nA являются эндогенными соединениями, присутствующие в значимых количествах практически во всех тканях многоклеточных животных, эукариотических и прокариотических клетках. Проведены сотни исследований, посвященных изучению свойств внутриклеточных диаденозинполифосфатов [Burnstock et al., 1997]. Внеклеточная активность диаденозиновых полифосфатов была показана недавно [Flores et al., 1999]. Внеклеточные Ar_nA могут регулировать работу различных тканей, являясь, вероятно, агонистами пуриновых рецепторов.

Показано, что такое хорошо известное соединение, как НАД+ также обладает внеклеточной активностью, проявляет свойства нейротрансмиттера [Burnstock 2009; Burnstock 2017]. Структурно, НАД+ является производным диаденозиндифосфата. Физиологическая роль внеклеточного НАД+ как регуляторного соединения в целом ряде тканей, в том числе в сердце, остается малоизученной.

Степень разработанности темы. Установлено, что существует несколько специфических регулируемых механизмов высвобождения диаденозиновых полифосфатов и НАД+ [Pintor et al., 1992]. Целый ряд Ar_nA и их производных может обладать нейротрансмиттерными свойствами [Pareira et al., 2000]. Показано, что внеклеточные Ar_nA могут оказывать регуляторное действие в сердечно-сосудистой системе (ССС) [Vahlensieck et al., 1996]. Среди целого ряда соединений (Ar_2A – Ar_6A), диаденозинтетра- и диаденозинпентафосфат (Ar_4A , Ar_5A) демонстрируют наибольшую активность в ССС [Drygalski et al., 2000]. Тем не менее, эффекты Ar_nA в ССС изучены недостаточно.

В данной работе внимание сосредоточено на прямых эффектах исследуемых пуриновых соединений в сердце, то есть эффектов, реализуемых непосредственно в миокардиальной ткани сердца и гладкомышечной ткани коронарных сосудов.

Целью данной работы является исследование эффектов и механизмов действия внеклеточных диаденозинтетра-, диаденозинпентафосфата и никотинамидадениндинуклеотида в сердце млекопитающих.

В соответствии с целью поставлены следующие задачи:

1. Исследовать эффекты Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на сократимость сердца млекопитающих;
2. Изучить влияние Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на биоэлектрическую активность рабочего миокарда сердца млекопитающих;
3. Изучить эффекты Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на биоэлектрическую активность пейсмекерного миокарда и проводящей системы сердца млекопитающих;
4. Провести анализ сократимости коронарных артерий под влиянием Ar_4A , Ar_5A 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 изучена кардиотропная активность внеклеточных Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$. (2) Впервые исследована роль внеклеточных Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ в регуляции биоэлектрической активности сердца млекопитающих; показано, что соединения влияют на длительность потенциалов действия (ПД) 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 коронароконстрикторными 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 P_1 -рецепторов, так и P_2 -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 $IK_{Ach/Ado}$, тогда как в сердце крыс - активация фосфодиэстераз (ФДЭ) под действием протеинкиназы С.

Теоретическая и практическая значимость. В работе проведено исследование эффектов и механизмов действия в сердце диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$.

Впервые изучена способность Ar_nA и $НАД^+$ влиять на пейсмекер сердца, электрическую активность и сократимость рабочего миокарда, тонус коронарных артерий, что позволило оценить роль указанных пуриновых соединений как потенциальных регуляторов насосной функции сердца. В ходе выполнения работы изучено влияние Ar_nA и $НАД^+$ на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани в составе стенки легочных вен, что позволило оценить проаритмический потенциал пуриновых соединений. Таким образом, данная работа направлена на решение фундаментальной задачи – исследование нового механизма регуляции работы сердца, связанного с действием малоизученных пуриновых соединений, относящихся к классу диаденозиновых полифосфатов; исследование роли указанных соединений как потенциальных факторов, дополняющих вегетативный нервный контроль деятельности различных отделов сердца.

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 сократительной активности 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 соединений на колебания уровня цитоплазматического кальция в желудочковых кардиомиоцитах осуществляли при использовании метода «кальциевого имиджинга». Наконец, исследовали сократительные ответы изолированных сосудов при действии пуриновых соединений в изометрическом режиме с использованием системы Wire Myograph.

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 $I_{K_{Ach/Ado}}$ либо, обусловленная протеинкиназой C , 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, заключения, а также выводов. Диссертационная работа проиллюстрирована 44 рисунками и 3 таблицами. Список использованной литературы включает 350 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе было использовано 376 самцов белых (аутбредных) крыс (300-350 г, 3-5 мес), из которых 346 было использовано для исследования биоэлектрической и сократительной активности сердца, 15 для изучения кальциевой динамики, 15 для исследования сократительного ответа изолированных сосудов при действии пуриновых соединений. В работе было использовано 54 самца аутбредных морских свинок (250-300 г., 3-4 мес) в различных электрофизиологических экспериментах. Также было использовано 13 самцов кроликов породы шиншилла (2000-2500 г, 4-5 мес.) (Табл.1).

Таблица 1. Объекты исследования, типы препаратов.

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

(1) Внутриклеточная регистрация потенциалов действия в различных отделах сердца. Для оценки влияния пуриновых соединений на биоэлектрическую активность сердца регистрировали ПД в изолированных препаратах сердца. Для получения многочлеточных препаратов животных декапитировали (выбор метода эвтаназии обусловлен необходимостью получения жизнеспособных препаратов сердца), вскрывали грудную клетку, извлекали сердце и помещали в емкость с перфузионным раствором Тироде стандартного состава комнатной температуры, отмывали от крови. Далее проводили выделение многочлеточных препаратов предсердий, стенки желудочка, межпредсердной перегородки, легочных вен. Перфузию осуществляли раствором Тироде при 37С и скорости протока 10мл/мин, ПД регистрировали с эндокардиальной стороны. При анализе полученных записей

определяли длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД50 и 90), в записях, полученных в опытах на синоатриальном узле (САУ), определяли также частоту генерации ПД, скорость медленной диастолической деполяризации и максимальную скорость нарастания переднего фронта ПД. Для регистрации и анализа данных использовали программное обеспечение (ПО) «Power Graph 3.3.8» (ООО «ДИСофт» Россия) и MiniAnalysis (Synaptosoft, США).

(2) Регистрация сократительной активности сердца. После эвтаназии, грудную клетку животных вскрывали, извлекали сердце, помещали канюлю в аорту, изолированное сердце (ИС) подключали к перфузионной системе. Нормоксическую ретроградную перфузию по Лангендорфу осуществляли при 37°C раствором Тироде при постоянном перфузионном давлении, которое составляло 80 мм рт ст.

Регистрацию сократительной активности проводили при постоянном навязываемом ритме (6,25 Гц). В ходе эксперимента непрерывно регистрировали и записывали давление в левом желудочке ИС, используя датчик давления («mpx5050dpt», Motorola Ltd., США), на основе которого оценивали следующие параметры: развиваемое давление (LVDP), максимальная скорость сокращения и расслабления (dP/dt_{\max} или dP/dt_{\min}) левого желудочка. Параметры рассчитывали с помощью ПО «Power Graph 3.3.8» (ООО «ДИСофт», Россия).

(3) Регистрация ионных токов в кардиомиоцитах методом Patch-clamp в конфигурации whole-cell. Исследование влияния диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ на калиевые токи аномального (входящего) выпрямления проводили с использованием энзиматически изолированных кардиомиоцитов предсердия морской свинки. Для регистрации указанных ионных токов использовали систему на базе усилителя Axopatch 200A (Molecular Devices, США), а также стандартные протоколы фиксации потенциала [Абрамочкин и др., 2015]. Для регистрации и анализа данных использовали ПО Clampfit 9.2 (Molecular Devices, CA, USA).

(4) Регистрация колебаний уровня цитоплазматического кальция. В экспериментах по регистрации колебания уровня цитоплазматического кальция были использованы энзиматически изолированные кардиомиоциты желудочков сердца крысы, которые окрашивали Ca^{2+} -чувствительным проникающим флуоресцентным зондом Fluo-4AM по стандартной методике. Ca^{2+} -зависимую

флюоресценцию регистрировали с помощью системы на основе флюоресцентного микроскопа Zeiss LSM700 (Германия) и CCD-камеры, либо на основе конфокального микроскопа в ритмически стимулируемых кардиомиоцитах (2 Гц), перфузируемых стандартным раствором Тироде. Для анализа данных использовали ПО AxioVisionRelease 4.8.2 SP1, ZEN (CarlZeiss), ImageJ 1.51 включая Bio-Formats Explorer, а также Origin 9.0.

(5) Исследование сокращения сосудов в изометрическом режиме. Для оценки влияния пуриновых соединений на сократимость сосудов использовали кольцевые препараты артерии межжелудочковой перегородки с интактным эндотелием. С помощью изометрического миографа Wire Myograph оценивали усилие, развиваемое кольцевыми препаратами, по методике, подробно описанной ранее [Tarasova et al., 2003]. Для регистрации и анализа данных использовали ПО LabChart 6.0.

Протоколы экспериментов. В работе Ар₅А, Ар₄А и НАД⁺ использовали в концентрациях 1-100 мкМ (5 мин). В экспериментах с ИС, экспериментах с многоклеточными препаратами, а также с изолированными кардиомиоцитами блокаторы или ингибиторы действовали в течение 5 мин, после чего на фоне блокаторов проводили инфузию диаденозиновых полифосфатов или НАД⁺ (10 мкМ) также в течение 5 мин.

В экспериментах с кольцевыми препаратами коронарной артерии Ар₅А и Ар₄А подавали в концентрации 1 мкМ, затем 3 мкМ, 10 мкМ и 30 мкМ последовательно, с периодами отмывки после предварительной адаптации и активации (серотонин, КСI). НАД⁺ использовали в концентрации 10 мкМ, 30 мкМ и 100 мкМ.

Статистическая обработка данных. 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 ± стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

1. *Влияние Ar_4A , Ar_5A и НАД⁺ на сократительную активность желудочкового миокарда изолированного сердца крысы*

Внеклеточные Ar_4A и Ar_5A оказывали существенное влияние на работу сердца крысы: в сердце, работающем в навязанном ритме, наблюдали снижение развиваемого давления (LVDP) при действии 10 мкМ Ar_4A и Ar_5A на $40,6\pm 4\%$ и $80,5\pm 3\%$ от контрольных значений ($p < 0.05$, $n=6$ и $n=6$). Максимальная скорость нарастания давления (dP/dt_{max}) и максимальная скорость расслабления в левом желудочке при действии 10 мкМ Ar_4A (dP/dt_{min}) снижалась на $19,5\pm 3\%$ и $18,5\pm 5\%$ от контрольных значений ($p < 0.05$). Ar_5A также вызвал подавление dP/dt_{max} и dP/dt_{min} - на $75,2\pm 3\%$ и $70\pm 6\%$, соответственно. Эффект 10 мкМ Ar_5A был более выраженным ($p < 0.05$) в сравнении с эффектом 10 мкМ Ar_4A .

Диаденозиновые полифосфаты вызывали снижение частоты сердечных сокращений в изолированном сердце, работающем в собственном ритме. Так Ar_4A и Ar_5A (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%, $n=7$, $p < 0.05$).

На основе предшествующей экспериментальной работы предполагалось, что НАД⁺ может также, как и диаденозиновые полифосфаты, оказывать влияние на инотропию сердца. Однако в нашей работе внеклеточный НАД⁺ не оказывал значимого влияния на сократимость желудочкового миокарда.

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

2.1. *Эффекты Ar_4A , Ar_5A и НАД⁺ в рабочем миокарде сердца крысы*

Основным эффектом при действии Ar_4A , Ar_5A и НАД⁺ в рабочем миокарде сердца является снижение длительности потенциалов действия. В концентрации 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; в правом предсердии (ПП) - на $22\pm 2\%$ ($n=7$, $p < 0.05$) и $29\pm 2\%$ ($n=7$, $p < 0.05$) от контрольных значений, соответственно. В желудочковом миокарде ДПД₉₀ снижалась на $28\pm 3\%$ и $55\pm 4\%$ (от контрольных значений) при аппликации 10 мкМ Ar_4A и Ar_5A ($p < 0.05$, $n=6$) (Рис.1). В межпредсердной перегородке (МПП) Ar_4A (10 мкМ) вызывал

снижение ДПД90 на $11 \pm 3\%$ от контрольных значений ($n=5$, $p<0.05$); Ar_5A также статистически значимо уменьшал ДПД90 на $7 \pm 2\%$ ($n=5$, $p<0.05$).

Внеклеточный $NAД^+$ (10 мкМ) так же, как и диаденозиновые полифосфаты, вызывал укорочение ПД: в ЛПП - до $77 \pm 3\%$ от контрольной длительности ($p<0.05$, $n=8$); в ППП - до $78 \pm 3\%$ ($p<0.05$, $n=6$); в миокарде **правого желудочка** - до $57 \pm 6\%$ ($p<0.05$, $n=6$) от контрольных значений (Рис.2). При действии 10 мкМ $NAД^+$ в МПП было зарегистрировано снижение ДПД90 на 10% ($n=5$, $p<0.05$). Эффект Ar_4A и Ar_5A и $NAД^+$ в МПП был наименьшим (Рис.1; Рис. 2).

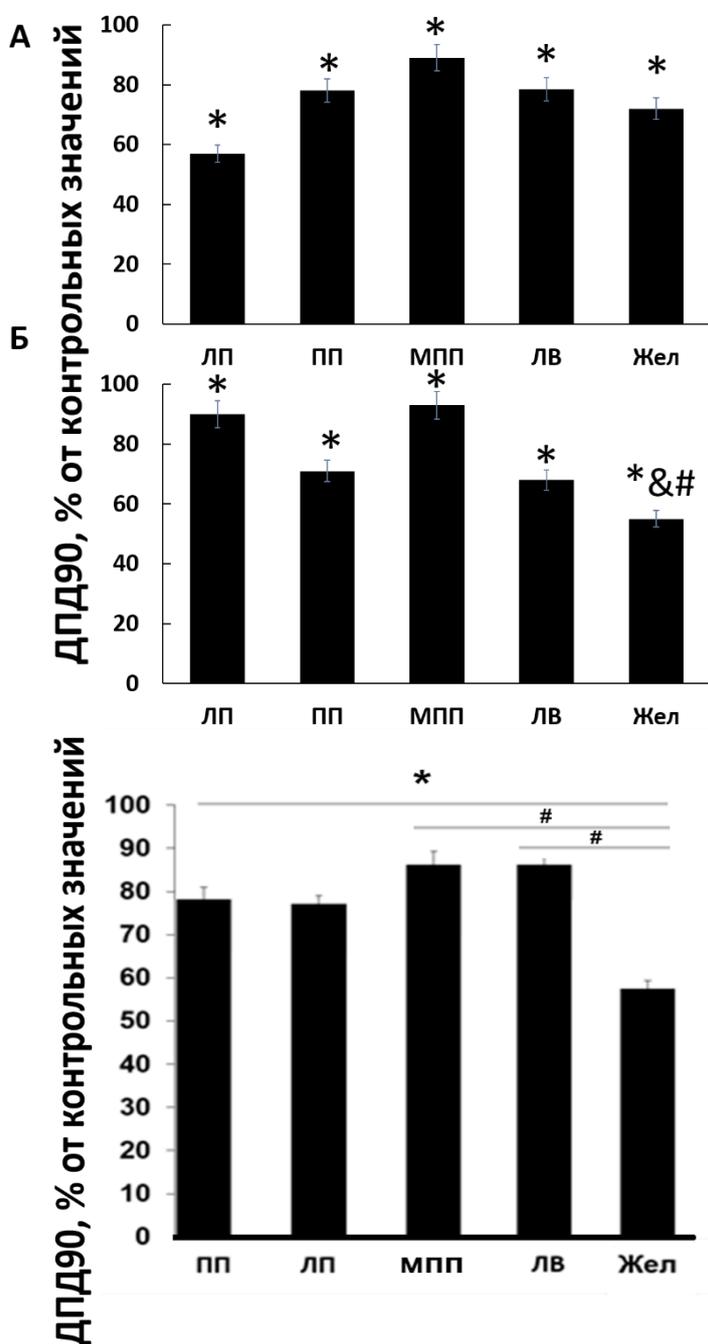


Рис. 1. Длительность ПД на уровне 90% реполяризации по сравнению с контрольными значениями при действии 10 мкМ Ar_4A (А) и Ar_5A (Б) 10 мкМ. ЛП-левое предсердие; ПП-правое предсердие; МПП-межпредсердная перегородка; ЛВ-легочные вены; Жел-правый желудочек; *- $p<0.05$ - отличие параметра от значения в контрольных условиях; &- $P<0.05$ - различия между группами Жел и ЛП; #- $P<0.05$ - различия между группами Жел и МПП.

Рис. 2. Снижение длительности ПД (ДПД90) при действии 10 мкМ $NAД^+$ в различных отделах сердца крысы. Контрольные значения были приняты за 100%. *- $p<0.05$; #- $P<0.05$.

2.2. Эффекты НАД+ в пейсмекерном миокарде сердца крысы

В данной части работы изучали влияние НАД+ на биоэлектрическую активность ритмоводителя сердца. При использовании препаратов сердца крысы, включающих синоатриальный узел (САУ), удалось выполнить серию экспериментов только с НАД+. В САУ крысы НАД+ в концентрации 10 мкМ подавляет автоматию: снижает частоту генерации ПД, скорость медленной диастолической деполяризации (СМДД), скорость фронта ПД (dP/dt_{max}) и длительность ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50) (Рис.3). Частота генерации ПД в САУ при действии НАД+ снижалась до $82\pm4\%$; ДПД50 до $66\pm3\%$, скорость МДД до $25\pm3\%$ от контрольных значений, в то время как dP/dt_{max} увеличивалась на $16\pm4\%$ по сравнению с контрольным значением. Указанные эффекты были статистически значимыми ($p<0.05$, $n=5$).

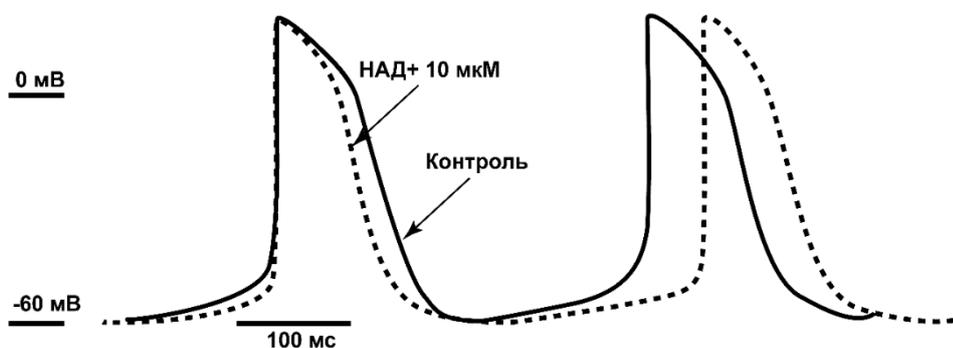


Рис. 3. Примеры экспериментальных записей «пейсмекерных» ПД, отведенных от области САУ, в препаратах сердца крысы в контроле и при действии НАД+ 10 мкМ.

2.2.1. Влияние Ar_4A , Ar_5A и НАД+ на потенциалы действия волокон Пуркинью

Регистрация ПД волокон Пуркинью в сердце крысы затруднена, поэтому, в экспериментах использовали препараты изолированных свободнолежащих участков волокон Пуркинью сердца кролика. В концентрации 10 мкМ НАД+ вызывал снижение длительности ПД (ДПД90) в работающих при постоянном навязываемом ритме волокнах Пуркинью кролика до $82\pm4\%$ от контроля ($p<0.05$, $n=5$). Схожий эффект наблюдался и при действии 10 мкМ Ar_4A и Ar_5A : ДПД90 снижалась до $84\pm2\%$ и $87\pm3\%$ от контроля, соответственно ($p<0.05$, $n=4$). В волокнах Пуркинью ДПД50 снижалась до $78\pm5\%$ от контроля при действии НАД+

($p < 0.05$, $n = 5$) и до $72 \pm 6\%$ и $92 \pm 5\%$, соответственно, ($p < 0.05$, $n = 4$) при действии 10 мкМ Ar_4A и Ar_5A (Рис. 4).

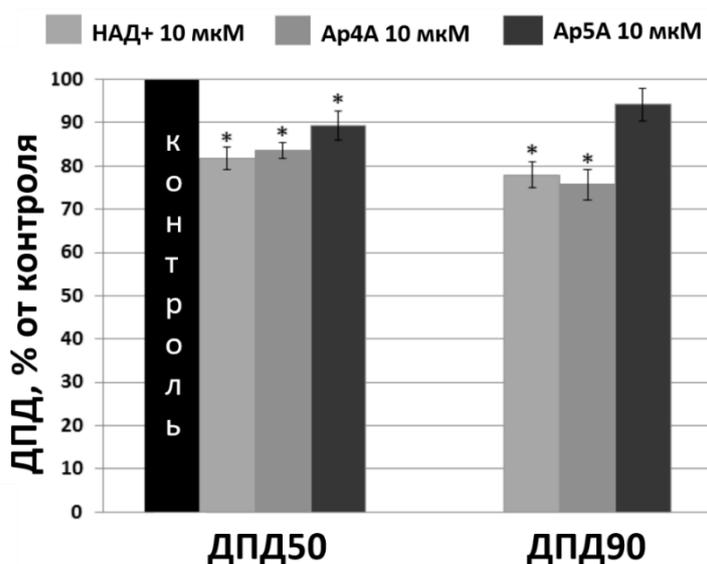


Рис. 4. Длительность ПД на уровне 90% и 50% реполяризации (ДПД90 и ДПД50) при действии 10 мкМ Ar_4A ($n = 4$), Ar_5A ($n = 4$) и НАД+ ($n = 5$) в волокнах Пуркинье кролика, * - $p < 0.05$.

2.3. Эффекты Ar_4A и НАД+ в рабочем миокарде морской свинки

Также, как и в рабочем миокарде крысы, у морской свинки исследуемые соединения вызвали снижение длительности ПД. При действии НАД+ и Ar_4A в концентрации 10 мкМ ДПД50 снижалась на $10 \pm 4\%$ и $17 \pm 5\%$; при действии в концентрации 100 мкМ - на $57 \pm 6\%$ и $47 \pm 5\%$ ($n = 6$, $p < 0.05$). Длительность ПД на уровне 90% реполяризации также снижалась: ДПД90 достоверно уменьшалась при действии 10 мкМ НАД+ и Ar_4A на $17 \pm 3\%$ и $18 \pm 8\%$; на $56 \pm 4\%$ и $43 \pm 8\%$ при действии 100 мкМ пуриновых соединений ($n = 6$, $p < 0.05$) (Рис. 5).

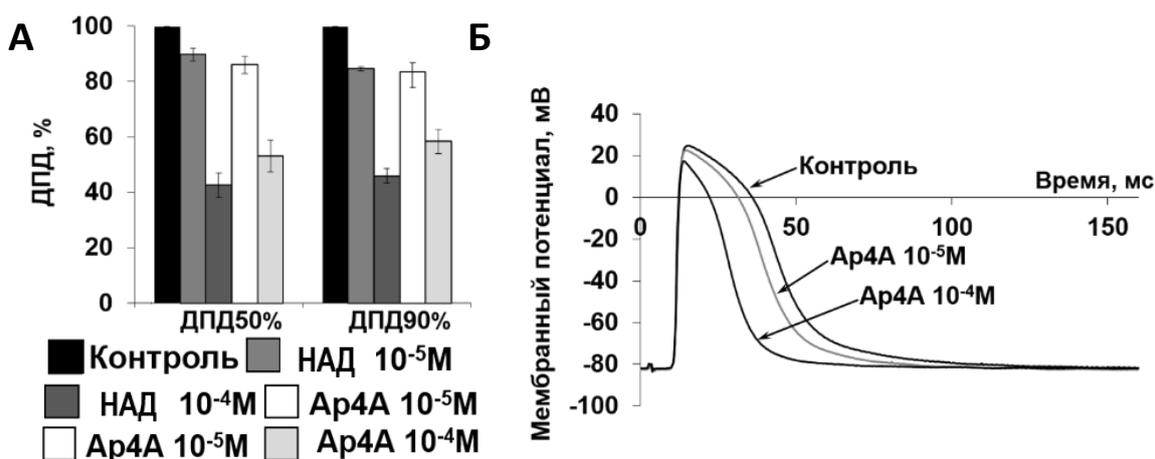
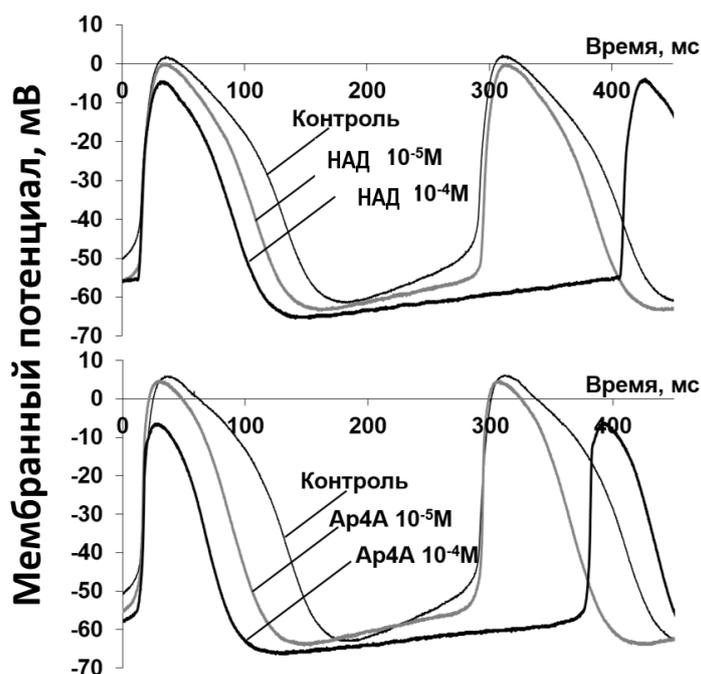


Рис. 5. (А) - Действие Ar_4A и НАД+ в концентрациях 10 мкМ и 100 мкМ на ДПД50 и ДПД90% в рабочем миокарде правого предсердия морской свинки. (Б) - Оригинальные записи ПД в рабочем миокарде правого предсердия морской свинки в контрольных условиях и на фоне действия 10 мкМ и 100 мкМ Ar_4A .

2.4. Эффекты Ar_4A и $НАД^+$ в пейсмекерном миокарде морской свинки

Так как доступ к области истинного водителя ритма в препаратах сердца морской свинки гораздо проще, чем в сердце крысы, то для изучения эффектов Ar_4A , а также $НАД^+$ использовали также этот вид животных. Учитывали отведения электрической активности, характерные только для истинного пейсмекера.

В пейсмекерном миокарде морской свинки (Рис. 6) Ar_4A и $НАД^+$ вызывали ярко выраженное уменьшение длительности ПД, как и в рабочем миокарде (Рис. 5). В концентрации 10 мкМ $НАД^+$ приводил к уменьшению ДПД50 на $17 \pm 3\%$, а в концентрации 100 мкМ – на $39 \pm 4\%$ ($n=6$, $p<0.05$); Ar_4A снижал ДПД50 на $19 \pm 5\%$ и $42 \pm 5\%$ при действии в концентрации 10 и 100 мкМ ($n=6$, $p<0.05$). Пуриновые соединения существенно замедляли скорость медленной диастолической деполяризации. Так, 10 мкМ $НАД^+$ снижал СМДД на $42 \pm 6\%$, а 100 мкМ – на $73 \pm 4\%$ ($n=6$, $p<0.05$). В свою очередь 10 мкМ и 100 мкМ Ar_4A вызывали снижение СМДД на $53 \pm 7\%$ и на $68 \pm 5\%$ ($n=6$, $p<0.05$). В САУ морской свинки только под действием 100 мкМ $НАД^+$ или Ar_4A развивалось достоверное замедление синусного ритма, достигавшее $26,7 \pm 5\%$ и $23,2 \pm 6\%$ от контрольного уровня, соответственно ($n=6$, $p<0.05$). Исследуемые соединения вызывали увеличение скорости нарастания переднего фронта ПД. $НАД^+$ в концентрации 10 мкМ и 100 мкМ увеличивал скорость нарастания переднего фронта ПД на $32 \pm 7\%$ и на $83 \pm 8\%$

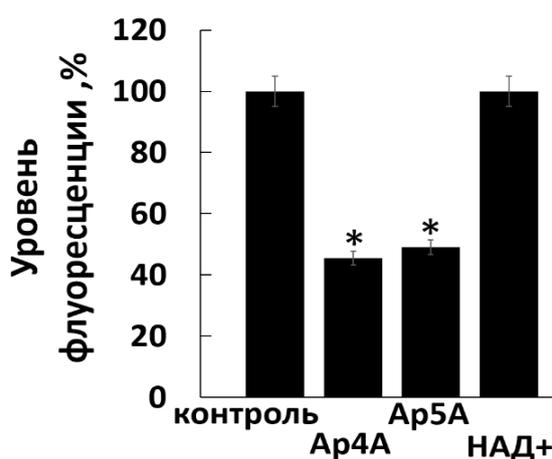


($n=6$, $p<0.05$). Ar_4A (10 мкМ) увеличивал dV/dt_{max} на $30 \pm 3\%$, и в концентрации 100 мкМ – на $88 \pm 6\%$ ($n=6$, $p<0.05$).

Рис. 6. Оригинальные записи пейсмекерной активности в препаратах синоатриального узла морской свинки. Показано сравнение конфигураций электрической активности в контрольных условиях, на фоне действия 10 мкМ и 100 мкМ $НАД^+$ или Ar_4A .

3. Влияние Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на колебания уровня цитоплазматического кальция в желудочковых кардиомиоцитах

Ar_4A и Ar_5A при действии в концентрации 10 мкМ вызвали статистически значимое снижение амплитуды кальциевых волн в изолированных желудочковых кардиомиоцитах (до $45,5 \pm 11\%$ и $49 \pm 13\%$ от контрольного уровня, $p < 0,05$, $n=13$ и $n=14$ клеток от 5 животных). При действии в той же концентрации $НАД^+$ не вызвал изменений колебаний цитоплазматического кальция ($100 \pm 3\%$, $n=13$ клеток от 5 животных, $p > 0,05$) (Рис. 7). Эти результаты, учитывая данные о влиянии диаденозиновых полифосфатов на биоэлектрическую активность миокарда, говорят в пользу того, что снижение инотропии, наблюдаемое в наших экспериментах при действии исследуемых соединений, можно связать со снижением уровня цитоплазматического кальция, уменьшением его высвобождения из внутриклеточных депо или поступления «триггерного» кальция в цитоплазму. Можно предположить, что влияние $НАД^+$ и Ar_nA различно



касательно круговорота цитоплазматического кальция.

Рис. 7. Амплитуда колебаний уровня флуоресценции кальциевого красителя Fluo-4, пропорциональная $[Ca^{2+}]_i$ в желудочковых кардиомиоцитах в контроле и через 5 мин аппликации Ar_4A , Ar_5A или $НАД^+$ (10 мкМ). *- $p < 0,05$.

4. Исследование влияния диаденозиновых полифосфатов и $НАД^+$ на коронарные артерии сердца крысы

Показано, что диаденозинпентафосфат обладает коронароконстрикторным эффектом, тогда как $НАД^+$ является коронародилататором. В концентрации 10 мкМ Ar_5A вызывает сокращение на $5 \pm 0,5\%$ от максимально возможного уровня ($n=5$, $p < 0,05$), $НАД^+$ в концентрации 100 мкМ вызвал достоверный вазодилаторный эффект ($n=5$, $p < 0,05$). Ar_4A в работе не оказывает действия на тонус сосудов.

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

Исследование рецепторных механизмов проводили с использованием блокаторов пуринорецепторов на препаратах левого предсердия сердца крысы, работающих в навязанном ритме. Был использован блокатор P₁-пуринорецепторов - DPCPX (0.1 мкМ), блокаторы P₂-пуринорецепторов PPADS (100 мкМ) и сурамин (10 мкМ), а также селективный блокатор пуриновых рецепторов P₂X-типа – iso-PPADS (10 мкМ).

В работе показано, что эффекты Ar₄A, Ar₅A и НАД⁺ в сердце крысы вероятнее всего реализуются посредством активации P₂-пуринорецепторов, но не P₁-рецепторов. Сурамин и PPADS достоверно подавляли эффект пуриновых соединений, проявляющийся в снижении длительности ПД (Рис. 8), в то время как DPCPX был не способен оказать влияние на эффекты пуриновых соединений. Также, iso-PPADS не оказывал действия на снижение длительности ПД, вызываемое пуриновыми соединениями. Можно предположить, что снижение длительности ПД в миокарде крысы при действии Ar₄A и Ar₅A, как и при действии НАД⁺ обусловлено активацией P₂Y-подтипов пуриновых рецепторов.

Наиболее вероятным рецептором, определяющим снижение длительности ПД в миокарде крысы при действии диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ является P₂Y₁ рецептор [Mutafova-Yambolieva et al., 2012]. Вероятно, что и негативный инотропный эффект в желудочковом миокарде крысы также обусловлен активацией этого подтипа рецепторов.

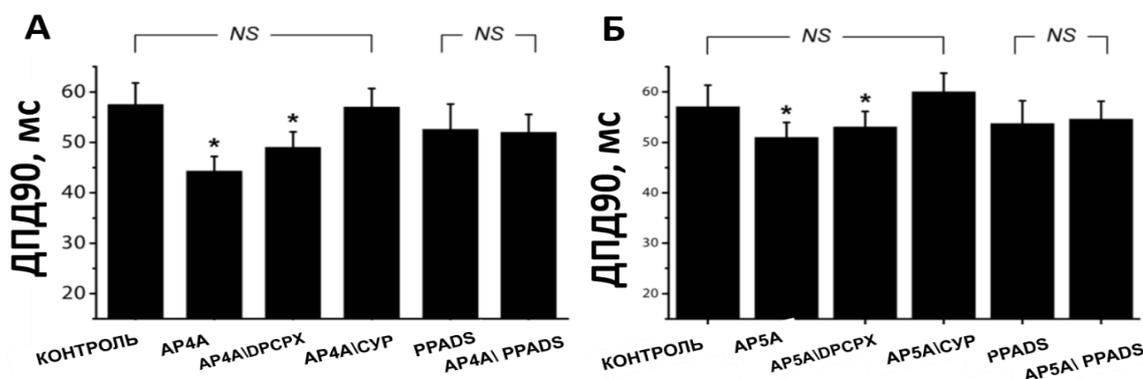


Рис. 8. Влияние блокаторов P₁-пуринорецепторов DPCPX (0.1 мкМ) и P₂-пуринорецепторов - сурамина (сур., 10 мкМ) и PPADS (100 мкМ) на эффекты Ar₄A (10 мкМ) (А) и Ar₅A (10 мкМ) (Б) в ЛП крысы. NS –недостоверно. *- p < 0.05 в сравнении с контролем.

5.1. Исследование рецепторных механизмов действия диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ в сердце морской свинки.

Эффекты DPCPX и терциапина

В сердце морской свинки, в отличие от сердца крысы, диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺ реализуют свои эффекты посредством активации P₁-пуриновых рецепторов, но не P₂-рецепторов. При использовании блокатора P₁-пуриновых рецепторов DPCPX (0.1 мкМ) ДПД90 в рабочем миокарде морской свинки при одновременном действии Ap₅A и DPCPX составляла 99±3% от контрольного значения (n=6; p>0.05). Кроме того, все параметры пейсмекерной электрической активности достоверно возвращались к контрольным значениям при использовании DPCPX или терциапина (1 мкМ), блокатора каналов, проводящих I_{K_{ACh}}. Методом пэтч-кламп на изолированных кардиомиоцитах морской свинки с использованием терциапина также показано, что применение пуриновых соединений ведет к активации тока I_{K_{ACh/Ado}} (Рис. 10).

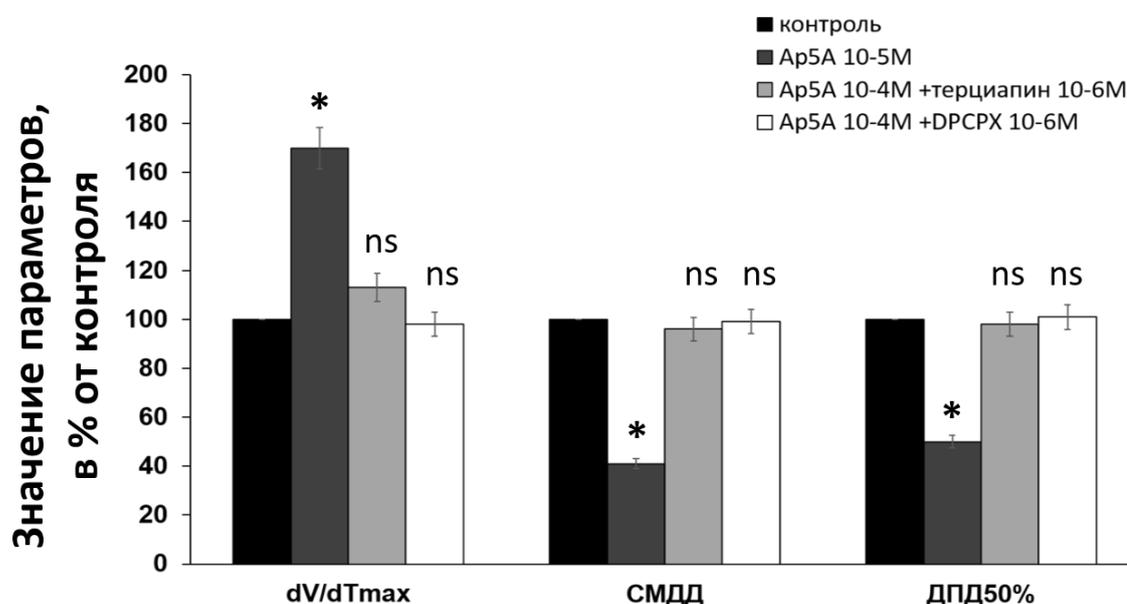


Рис. 9. Параметры пейсмекерной электрической активности (скорость нарастания переднего фронта ПД (dV/dtmax), скорость медленной диастолической деполяризации (СМДД) и длительность ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50%)) при действии 100 мкМ Ap₅A в норме, а также на фоне 1 мкМ терциапина или 1 мкМ селективного блокатора P₁ пуриновых рецепторов DPCPX. *- p<0.05; ns-недостоверное значение.

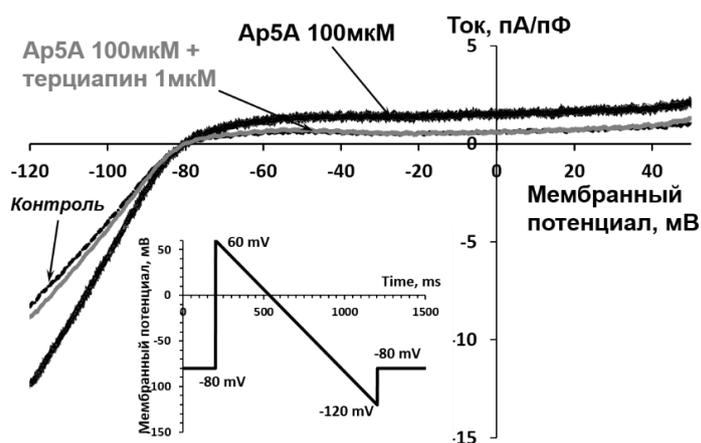


Рис. 10. Вольт-амперные кривые (репрезентативный пример) калиевых токов аномального выпрямления в предсердных кардиомиоцитах морской свинки в контроле (в таких условиях ток аномального выпрямления включает лишь базальный ток I_{K1}) и на фоне 10 мкМ Ар₅А (сумма I_{K1} и I_{KACH}), а также после добавления к Ар₅А блокатора тока I_{KACH} - терциапина (1 мкМ). Ток

аномального выпрямления регистрировали при изменении мембранного потенциала по линейному протоколу, представленному на вставке.

6. Внутриклеточные сигнальные каскады, обуславливающие влияние диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺ на предсердные потенциалы действия 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-синтаз - L-NAME (100 мкМ) на эффекты пуриновых соединений. Было показано, что ни один из ингибиторов не влиял на эффекты Ар₄А или НАД⁺ в сердце (Рис. 11).

При одновременном действии L-NAME (100 мкМ) и Ар₄А (10 мкМ) ДПД₉₀ в левом предсердии крысы снизилась до $72 \pm 5\%$ от контрольных значений ($n=6$; $p<0.05$, Рис. 11 А, Г); при действии ODQ (5 мкМ) и Ар₄А (10 мкМ) ДПД₉₀ также уменьшилась - до $76 \pm 5\%$ от контрольных значений ($n=6$; $p<0.05$ Рис. 11 Б,Д), что не отличается от величины эффекта 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 ($n=6$; $p<0.05$); при одновременном действии ODQ (5 мкМ) и НАД⁺ (10 мкМ) ДПД₉₀ также уменьшилась до $77 \pm 7\%$ от контрольных значений ($n=6$; $p<0.05$), что также, как и в случае с Ар₄А, соответствует величине действия 10 мкМ НАД⁺ ($n=6$; $p>0.05$). В работе проведены эксперименты с блокатором РКС – хелеретрином (10 мкМ), для выявления возможного участия протеинкиназы С в развитии эффектов диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺. Из рисунка 11 (В, Е) видно, что эффект Ар₄А (10 мкМ) практически полностью подавлялся хелеретрином. Длительность ПД (ДПД₉₀) при действии Ар₄А на фоне хелеретрина

составила $91 \pm 4\%$ ($p > 0,05$), т.е. как и при действии только хелеретрина ($n=6$). Сходные результаты были получены в экспериментах с Ar_5A и $НАД^+$ (10 мкМ), где длительность ПД не различалась при действии хелеретрина и при его действии одновременно с Ar_5A или $НАД^+$.

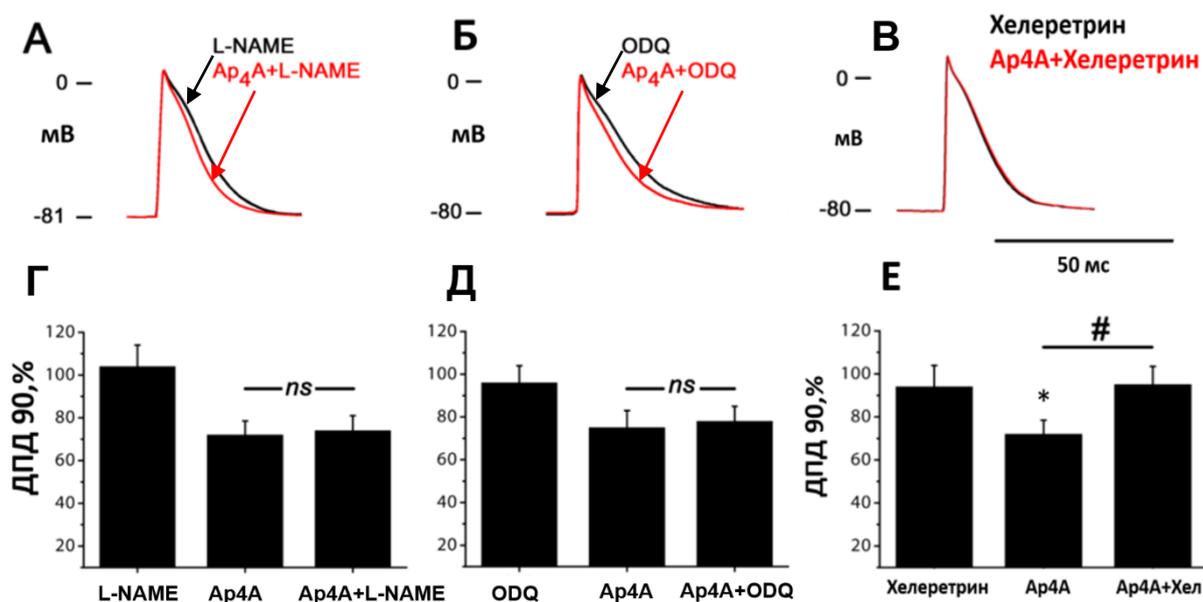


Рис. 11 Длительность ПД в изолированных многоклеточных препаратах предсердия крысы при действии Ar_4A (10 мкМ) на фоне L-NAME (100 мкМ) (А, Г), ODQ (10 мкМ) (Б, Д) или хелеретрина (10 мкМ) (В, Е). *- $P < 0,05$ (от контроля), ns – незначимо ($p > 0.05$).

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

Так как в предыдущих экспериментах не удалось выявить значительного влияния $НАД^+$ на сократимость желудочкового миокарда и кальциевую динамику в базальных условиях, то дальнейшие эксперименты с $НАД^+$ не проводили. Кроме того, поскольку Ar_4A , Ar_5A вызывали сходные изменения длительности потенциалов действия, сократимости и колебаний цитоплазматического кальция, то для дальнейшего исследования внутриклеточных сигнальных каскадов, затрагиваемых диаденозиновыми полифосфатами в желудочковом миокарде, использовали только Ar_4A .

В присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME (100 мкМ) инотропный и лужитропный эффекты Ar_4A не изменялись (Рис. 12 А), снижение параметров,

отражающих сократимость желудочкового миокарда в присутствии L-NAME и диаденозинтетрафосфата, было следующим: развиваемое давление - $38,4 \pm 17,5\%$ dP/dt_{max} - $38,3 \pm 16,6$, dP/dt_{min} - $45,4 \pm 13,6$ ($n=7$). Как и L-NAME, ингибитор растворимых гуанилатциклаз ODQ не оказывал влияния на эффекты Ar_4A (Рис. 12 Б). Снижение развиваемого давления, dP/dt_{max} и dP/dt_{min} при действии диаденозинтетрафосфата на фоне 10 мкМ ODQ составляло $36 \pm 18\%$, $41 \pm 15\%$, $40 \pm 17\%$ (от контрольных значений), соответственно.

В противоположность L-NAME и ODQ, ингибитор протеинкиназы С хелеретрин статистически значимо снижал инотропный и лузитропный эффекты Ar_4A в желудочковом миокарде крысы (Рис. 12 В). Развиваемое давление, максимальная скорость сокращения и максимальная скорость расслабления желудочкового миокарда при действии Ar_4A на фоне 10 мкМ хелеретрина составили: $93,4 \pm 9,7\%$, $94,8 \pm 11\%$ и $84,6 \pm 9,4\%$ от значений в контрольных условиях, соответственно ($n=5$, $P < 0,05$). Таким образом, ингибирование протеинкиназы С подавляло эффекты Ar_4A в желудочковом миокарде.

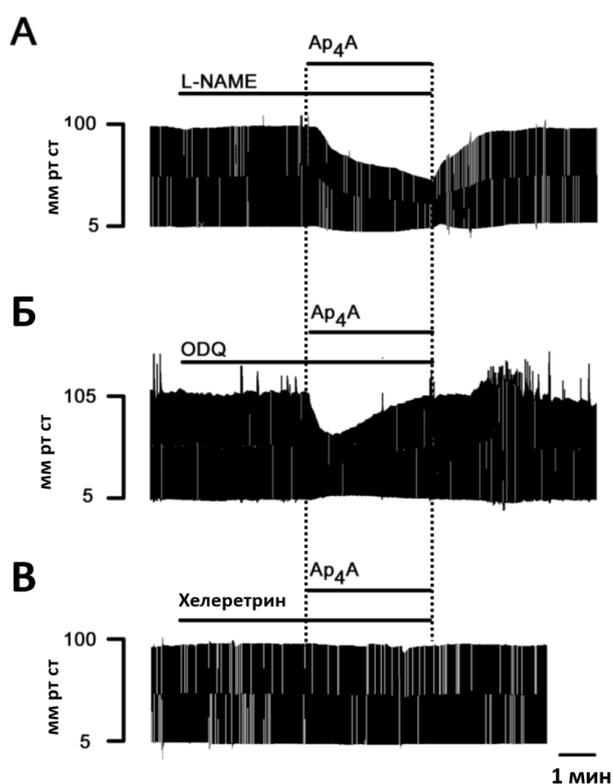


Рис. 12. Репрезентативные фрагменты экспериментальной записи, отражающие изменение развиваемого давления при действии даденозинтетрафосфата на фоне (А) ингибитора NO-синтаз (L-NAME, 100 мкМ), (Б) ингибитора растворимых гуанилатциклаз (ODQ, 10 мкМ) и (В) ингибитора протеинкиназы С (хелеретрин, 10 мкМ).

6.2. Влияние ингибирования NO-синтазы и протеинкиназы C на кальцевую динамику в кардиомиоцитах крысы при действии диаденозиновых полифосфатов

Установлено, что ни ингибирование NO-синтазы с помощью L-NAME (100 мкМ, n=5, p>0.05, в течение 5 мин), ни ингибирование растворимых гуанилатциклаз (sGC) с помощью ODQ (10 мкМ, n=5, p>0.05, в течение 5 мин) не приводит к подавлению влияния Ар₄А на кальцевую динамику в изолированных желудочковых кардиомиоцитах крысы (Рис.13. А и Б). Так, 10 мкМ Ар₄А на фоне L-NAME вызывал 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>0.05). С другой стороны, ингибитор протеинкиназы C хелеретрин приводил к значимому снижению эффекта Ар₄А в изолированных кардиомиоцитах: снижения амплитуды кальциевых волн при действии Ар₄А в присутствии хелеретрина не наблюдалось; более того, был зарегистрирован рост амплитуды в этом случае до 105±6% (p<0.05, n=6) от исходного уровня (Рис. 13. В).

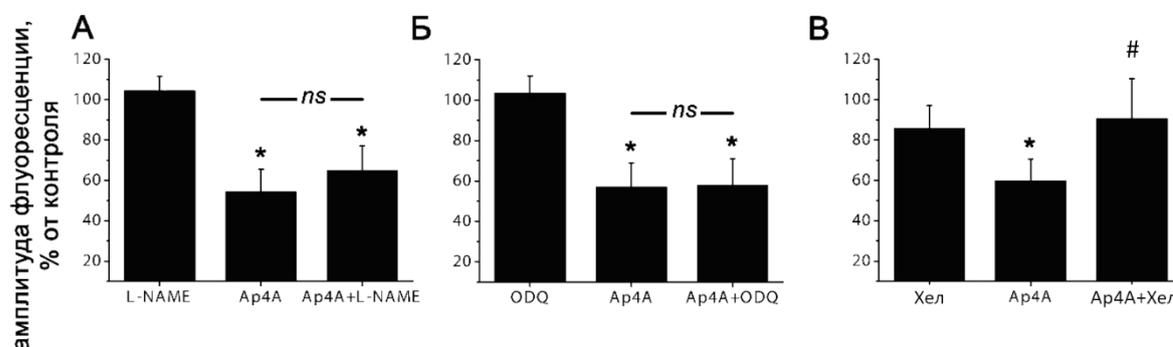


Рис. 13. Влияние Ар₄А в концентрации 10 мкМ на колебания уровня цитоплазматического кальция (флуоресценцию Fluo-4) в изолированных желудочковых кардиомиоцитах крысы в контроле, при действии Ар₄А на фоне 100 мкМ ингибитора NO-синтаз L-NAME (А), на фоне 10 мкМ ингибитора гуанилатциклазы ODQ (Б), а также на фоне 10 мкМ ингибитора протеинкиназы C хелеретрина (В). * - статистически значимое отличие параметра от значения в контрольных условиях, # - статистически значимое различие между группами. P<0.05, ns – статистически не значимо.

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

Центральным элементом, определяющим сократимость и уровень цАМФ в кардиомиоцитах, являются фосфодиэстеразы. В работе исследована роль ФДЭ двух типов в реализации эффектов Ar_4A . Неселективный блокатор фосфодиэстераз IBMX (Рис. 14 А) полностью подавлял ингибиторный эффект Ar_4A в желудочковом миокарде крысы ($n=6$, $P<0.05$). При действии Ar_4A (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 $97.5\pm 7.2\%$, соответственно. При действии селективного блокатора сGMP-зависимой фосфодиэстеразы второго типа – EHNA, в отличие от IBMX, влияние Ar_4A на инотропию сохранялось практически полностью (Рис. 14 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. Таким образом, влияние Ar_4A на сократимость при самостоятельном действии и действии на фоне EHNA статистически не различались ($P>0.05$).

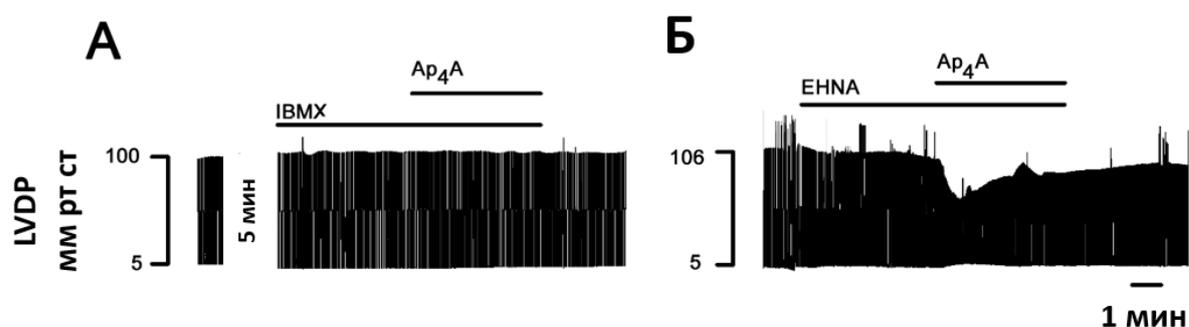


Рис. 14. (А)- Репрезентативные фрагменты записи сокращений левого желудочка крысы при действии Ar_4A и IBMX. (Б)- Репрезентативные фрагменты записи сокращений левого желудочка изолированного сердца при действии Ar_4A и EHNA. LVDP – развиваемое давление.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги исследования, можно заключить, что как диаденозиновые полифосфаты, так и НАД⁺ способны оказывать существенное влияние на работу сердца млекопитающих. Обнаруженные эффекты Ar_4A , Ar_5A и НАД⁺ в миокарде крысы опосредуются пуриновыми мембранными рецепторами P_2Y -типа, возможно

подтипом P_2Y_1 . В сердце морской свинки эффекты Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ реализуются посредством активации P_1 -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 P_2Y -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 P_2Y -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 Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ реализуются через P_1 -пуринорецепторы с дальнейшей активацией калиевого тока $I_{K_{ACh}}$.

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.

ВЫВОДЫ

1. Внеклеточные Ar_4A , Ar_5A , но не $НАД^+$ вызывают подавление сократимости желудочкового миокарда сердца крысы;
2. Основным эффектом всех трех соединений - Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на биоэлектрическую активность, является снижение длительности потенциалов действия в рабочем миокарде млекопитающих;
3. В пейсмекерном миокарде Ar_4A , Ar_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 Ar_5A и $НАД^+$ оказывают влияние на тонус коронарных артерий. Диаденозинпентафосфат вызывает коронароконстрикцию, в то время как $НАД^+$ - коронародилатацию;
5. Эффекты внеклеточных Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ в миокарде опосредуются мембранными пуриновыми рецепторами;
6. Рецепторные механизмы действия Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на биоэлектрическую активность в сердце крысы обусловлены преимущественно активацией мембранных пуриновых рецепторов P_2 -типа, в то время как у морской свинки эффекты всех трех соединений определяются рецепторами P_1 -типа;
7. Влияние внеклеточных Ar_4A , Ar_5A и $НАД^+$ на биоэлектрическую активность рабочего миокарда в сердце крысы не связаны с активацией синтазы оксида азота и растворимых гуанилатциклаз, но обусловлены активацией

протеинкиназы С; в сердце морской свинки внеклеточные Ar_4A , Ar_5A и НАД⁺ приводят к активации тока $I_{KAch/Ado}$;

8. Влияние внеклеточных Ar_4A , Ar_5A на сократимость желудочкового миокарда, по крайней мере в сердце крысы, определяется подавлением колебаний уровня цитоплазматического кальция. Указанный отрицательный инотропный эффект формируется за счет зависящего от протеинкиназы С стимулирования фосфодиэстераз в цитоплазме кардиомиоцитов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

dP/dtmax (или dP/dtmin) - максимальная скорость сокращения (расслабления) левого желудочка; I_{CaL} - кальциевый ток L-типа; $I_{KAch/Ado}$ - ацетилхолин\аденозинзависимый калиевый ток; LVDP - давление, развиваемое в левом желудочке; РКС - протеинкиназа С; sGC - растворимые гуанилатциклазы; Ar_4A - диаденозинтетрафосфат; Ar_5A - диаденозинпентафосфат; Ar_nA - диаденозиновые полифосфаты; ДПД (50, 90) - длительность ПД на уровне реполяризации 50 и 90%; ИС - изолированное сердце; ЛП - левое предсердие; МПП - межпредсердная перегородка; НАД⁺ - никотинамидадениндинуклеотид; ПД - потенциал действия; ПО - программное обеспечение; ПП - правое предсердие; САУ - синоатриальный узел; СМДД - скорость медленной диастолической деполяризации; ССС - сердечно-сосудистая система; ФДЭ - фосфодиэстераза.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI и в изданиях,

рекомендованных для защиты в диссертационном совете

МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. **Pustovit K. B.**, Ivanova A. D., Kuzmin V. S. Extracellular nad⁺ suppresses adrenergic effects in the atrial myocardium of rats during the early postnatal ontogeny // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2018. — Vol. 165, no. 1. — P. 1–4. (IF=0,546)
2. Pakhomov N., **Pustovit K.**, Potekhina V. Negative inotropic effects of diadenosine tetraphosphate are mediated by protein kinase c and phosphodiesterases stimulation in the rat heart // European Journal of Pharmacology. — 2018. — Vol. 820, no. 1. — P. 97–105. (IF=3,04)
3. **К. Б. Пустовит**, В. М. Потехина, Н. В. Пахомов, В. С. Кузьмин Влияние внеклеточного диаденозинтетрафосфата на биоэлектрическую активность предсердного и желудочкового миокарда крысы на ранних этапах постнатального онтогенеза // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2018. — Т. 73, № 1. — С. 52–59. (IF=0,44)
4. Abramochkin D. V., **Pustovit K. B.**, Kuzmin V. S. Diadenosine polyphosphates suppress the effects of sympathetic nerve stimulation in rabbit heart pacemaker // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2017. — Vol. 163, no. 5. — P. 586–589. (IF=0,546)
5. V. M. Karimova, **K. B. Pustovit**, D. V. Abramochkin, V. S. Kuz'min Effect of purine co-transmitters on automatic activity caused by norepinephrine in myocardial sleeves of pulmonary veins // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2017. — Vol. 162, no. 11. — P. 589–593. (IF=0,546)

6. N. V. Pakhomov, **K. B. Pustovit**, D. V. Abramochkin, V. S. Kuz'min The role of diadenosine pentaphosphate and nicotinamide adenine dinucleotide (nad⁺) as potential nucleotide comediators in the adrenergic regulation of cardiac function // *Neurochemical Journal*. — 2017. — Vol. 11, no. 1. — P. 63–71. (IF=0,404)
7. **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 Archives of Pharmacology*. — 2016. — Vol. 389, no. 3. — P. 303–313. (IF=2,238)
8. **Pustovit K. B.**, Abramochkin D. V. Effects of nicotinamide adenine dinucleotide (nad⁺) and diadenosine tetraphosphate (ap4a) on electrical activity of working and pacemaker atrial myocardium in guinea pigs // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. — 2016. — Vol. 160, no. 6. — P. 733–736. (IF=0,546)
9. Kuzmin V. S., **Pustovit K. B.**, Abramochkin D. V. Effects of exogenous nicotinamide adenine dinucleotide (nad⁺) in the rat heart are mediated by p2 purine receptors // *Journal of Biomedical Science*. — 2016. — Vol. 23, no. 1. — P. 50. (IF=3,466)
10. **Pustovit K. B.**, Kuzmin V. S., Sukhova G. S. Effect of exogenous extracellular nicotinamide adenine dinucleotide (nad⁺) on bioelectric activity of the pacemaker and conduction system of the heart // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. — 2015. — Vol. 159, no. 2. — P. 144–147. (IF=0,546)
11. Abramochkin D.V., **Pustovit K.B.**, Filatova T.S. Effects of diadenosine polyphosphates on inward rectifier potassium currents in rat cardiomyocytes // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. — 2015. — Vol. 70, no. 4. — P. 153–157. (IF=0,44)
12. **Пустовит К.Б.**, Кузьмин В. С., Сухова Г. С. Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) на сократительную и биоэлектрическую активность сердца крысы // *Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова*. — 2014. — Т. 100, № 4. — С. 445–457. IF РИНЦ = 0,545

Тезисы докладов международных и всероссийских конференций:

1. **Pustovit K. B.**, Kuzmin V. S., Abramochkin D. V. Diadenosine polyphosphates alter heart bioelectrical activity in rodent and non-rodent via different receptors and signalling pathways // *Acta Physiologica*. — 2016. — Vol. 219. — P. 21–21.
2. **Pustovit K. B.**, Kuzmin V. S., Abramochkin D. V. Effects of diadenosine polyphosphates on bioelectrical and contractile activity of the rat heart // *Acta Physiologica*. — 2015. — Vol. 215, no. 705. — P. 63–63.
3. **Pustovit K.**, Pakhomov N., Kuzmin V. Extracellular diadenosine tetraphosphate affects contractility and cytoplasm calcium level via protein kinase c pathway // *Acta Physiologica*. — 2017. — Vol. 221, no. Issue Supplement S713. — P. 212–212.
4. **Pustovit K. B.**, Kuzmin V. S., Abramochkin D. V. Exogenous nicotinamide adenine dinucleotide (nad⁺): effects and mechanisms of action on the mammalian heart // *Acta Physiologica*. — 2014. — Vol. 211, no. 697. — P. 80–80.
5. **Пустовит К. Б.**, Пахомов Н. В., Малолина Е. А. Особенности вегетативной регуляции миокардиальной ткани межпредсердной перегородки сердца крысы // *Материалы III международной научной конференции, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора Шилкина Валентина Викторовича "Современные проблемы нейробиологии"*. — Ярославль, 2018. — С. 66–67.
6. Пахомов Н. В., **Пустовит К. Б.**, Малолина Е. А. Роль комедиаторов симпатической системы в регуляции биоэлектрической активности межпредсердной перегородки сердца крысы в раннем постнатальном онтогенезе // *Материалы III международной научной конференции, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора Шилкина Валентина Викторовича "Современные проблемы нейробиологии"*. — Ярославль, 2018. — С. 55–56.

7. **Пустовит К. Б.,** Потехина В. М., Абрамочкин Д. В. Эффекты внеклеточного диаденозинпентафосфата на биоэлектрическую активность миокарда крысы на ранних этапах постнатального онтогенеза // материалы XIV международной конференции, посвященной 80-летию заслуженного деятеля науки РФИ РТ Ситдикова Сарита Габдулхаковича "Адаптация развивающегося организма". — Отечество Казань, 2018. — С. 101–102.
8. **Пустовит К. Б.,** Кузьмин В. С. Антиадренергические эффекты внеклеточного над⁺ у крыс в раннем постнатальном онтогенезе // Вторая молодежная школа-конференция "Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций" : сборник материалов. — Университетская книга Москва, 2017. — С. 21–22.
9. **Пустовит К. Б.,** Кузьмин В. С. Эффекты внеклеточного над⁺ на фоне адренергической стимуляции у крыс в раннем постнатальном онтогенезе // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. — Издательство ИСТОКИ Воронеж, 2017. — С. 142–144.
10. **Пустовит К. Б.,** Абрамочкин Д. В., Кузьмин В. С. Влияние диаденозиновых полифосфатов на биоэлектрическую активность сердца опосредовано активацией P2-пуриновых рецепторов // VI Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии кровообращения, МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, 2-5 февраля 2016 тезисы докладов. — МАКС Пресс Москва, 2016. — С. 131–131.
11. **Пустовит К.Б.** Действие НАД⁺ и Ар4А на электрическую активность рабочего и пейсмейкерного миокарда морской свинки // Ломоносов-2015: XXII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция Биология. — МАКС Пресс Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, 2015. — С. 393–393.
12. **Пустовит К. Б.** Адренергическая и холинергическая регуляция биоэлектрической активности перегородки сердца крысы // Молодежная школа -конференция "Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций" тезисы докладов. — Издательство МГУ Москва, 2015. — С. 13–14.
13. **Пустовит К.Б.** Механизмы действия внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) на биоэлектрическую активность сердца крысы // Международная научная конференция Ломоносов 2014, МГУ имени М.В. Ломоносова, 7-11 апреля 2014 тезисы докладов. — Издательство Московского Университета Москва, 2014. — С. 327–328.
14. **Пустовит К.Б.** Эффекты и механизмы действия внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) в сердце // XIII Всероссийская молодежная научная конференция Института физиологии Коми НЦ УрО РАН Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике тезисы докладов. — Информационно-издательский отдел ФГБУ Института физиологии Коми НЦ УрО РАН Сыктывкар, 2014. — С. 127–127.
15. **Пустовит К. Б.** Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (nad⁺) на биоэлектрическую активность предсердного миокарда крысы // XXII съезд Физиологического общества имени И. П. Павлова: Тезисы докладов. — Изд-во ВолгГМУ Волгоград, 2013. — С. 438–438.