

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Биличенко Андрей Сергеевич

Влияние активации двух различных центров связывания растворимой гуанилатциклазы, реализующих NO-зависимый и NO-независимый механизмы, на регуляцию активируемых растяжением ионных каналов кардиомиоцитов желудочков сердца крыс

Специальность: 1.5.5 – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре физиологии медико-биологического факультета РНИМУ им Н. И. Пирогова.

Научный руководитель:

Камкин Андрей Глебович - доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Ширинский Владимир Павлович - доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточной подвижности ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова» МЗ РФ.

Азаров Ян Эрнестович – доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией физиологии сердца ФГБУ науки «Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук»

Одношилкина Юлия Геннадьевна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры нормальной физиологии ФГБУ ВО "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

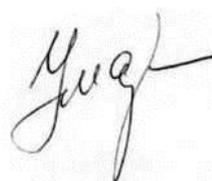
Защита диссертации состоится «30» октября 2023 года в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские годы, д.1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

Email: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/593776662/> и на сайте Диссовет 2.0 <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.7/2654>

Автореферат разослан «29» сентября 2023 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета, доктор
биологических наук



Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Одним из ключевых аспектов работы сердечной мышцы является электромеханическое сопряжение. Однако еще в 1967 году Ursula Theophile (позднее Ursula Ravens) и R. Kaufmann упомянули в своей статье, что в сердце может быть и обратное отношение между электрическими и механическими процессами, то есть преобразование механического сигнала в электрический (Kaufmann et Theophile, 1967). Год спустя, в 1968 году, британский ученый Max J. Lab высказал предположение о существовании механоэлектрической обратной связи в сердце и допустил возможность того, что механические изменения ткани при работе сердца может менять форму потенциалов клеток сердца (Lab, 1968). Позднее, в 1971 году, M.J.Lab опубликовал статью на эту тему с R. Kaufmann, R. Hennekes, H. Krause, показав, что механическое воздействие на сердечную ткань может менять форму монофазного потенциала кардиомиоцита (Kaufmann et al., 1971). Хотя M.J.Lab и его соавторы опубликовали достаточно много статей, эти представления не нашли поддержки у специалистов потому, что в своих работах ученые регистрировали монофазные потенциалы, а эксперты считали, что они регистрируют изменения потенциала в результате изменения контакта между внеклеточным электродом и тканью, поскольку переходное сопротивление под внеклеточным электродом (электродом-присоской) спонтанно меняется при сокращениях сердца и эти изменения практически неотличимы от самого эффекта.

Ситуация кардинально изменилась после того, как А.Г.Камкин с соавторами начиная с 1982 года опубликовали ряд работ, где при помощи внутриклеточных микроэлектродов на фоне дозированного растяжения фрагментов сокращающейся ткани сердца убедительно показали изменения формы потенциалов действия при растяжении ткани. Именно они напрямую доказали факт наличия в сердце механоэлектрической обратной связи и в сокращающейся ткани сердца в норме и при патологии и смогли предварительно продемонстрировать механизмы этого явления (Kamkin et al., 1988). Позднее, начиная с 1998 года, под руководством А.Г.Камкина методом patch-clamp, позволяющим исследовать ионные токи и каналы на изолированных клетках и разработанной уникальной методики аксиального растяжения клеток в сочетании с измерением whole-cell токов и/или single channels токов, были получены данные о том, что в основе механоэлектрической обратной связи лежит работа катион неселективных механоуправляемых ионных каналов (MGCh), а ток через них вызывает изменения потенциалов действия (Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2003a).

Механоэлектрическая обратная связь играет значительную роль в регуляции нормальной активности сердца, обеспечивая его адекватный ответ на изменяющееся механическое воздействие среды. В частности, механоэлектрическая обратная связь является одним из компонентов таких

классических адаптивных эффектов сердца, как эффект Франка-Старлинга и эффект Анрепа (Jiang et al., 2021). Возможно, еще более важным фактом является то, что при патологических изменениях сердечной мышцы именно нарушения механоэлектрической обратной связи могут вызывать критические последствия, например, такие как аритмии (Камкин и др., 2003). Так было показано, что чувствительность к растяжению особенно высока у гипертрофированных кардиомиоцитов желудочков крыс со спонтанной гипертензией и у кардиомиоцитов желудочков пациентов с терминальной стадией сердечной недостаточности (Kamkin et al., 2003b). Подобно здоровым кардиомиоцитам желудочков сердца, механическая стимуляция патологической ткани при меньшем растяжении также может вызывать нарушения ритма, включая фибрилляцию мышц. Таким образом, механоуправляемые каналы кардиомиоцитов играют важную роль не только в работе здорового сердца, но, прежде всего, при патологических состояниях, и изучение регуляторных механизмов этого явления представляется одной из ключевых задач, как для фундаментальной физиологии, так и для прикладных областей, в частности фармакологии и медицины.

Вместе с тем, механизмы этой регуляции еще практически не изучены. Одним из таких механизмов, а реально, первым из найденных, является регуляция проводимости MGCh оксидом азота (NO), описанная А.Г.Камкиным и соавторами в 2010 году и в более поздних работах (Kamkin et al., 2010). При этом, за счет наличия в клетке NO синтаз (NOS), продукция NO которыми возрастает при растяжении клеток, этот механизм может быть центральным клеточным механизмом, регулирующим проводимость MGCh. Обычно NO связывается с сайтом в β -субъединице растворимой гуанилилциклазы (sGC) что ведет к ее активации (Cary et al., 2005; Fernhoff et al., 2009; Martin et al., 2012). Хорошо известно, что NO-чувствительная sGC, катализирует образование внутриклеточного мессенджера циклического гуанозинмонофосфата (cGMP) и считается основным рецептором внутриклеточного NO, продуцируемого NOS в клетках (Boycott et al., 2020; Seddon et al., 2007). В то же время, в $\alpha 1$ -субъединице sGC были определены другие участки в качестве целевых мест для другого типа стимулятора sGC. Этот стимулятор sGC, BAY 41-2272, работает по NO-независимому механизму, но также вызывает продукцию внутриклеточного мессенджера cGMP (Stasch et al., 2001). Помимо этих механизмов возможно и прямое S-нитрозилирование MGCh при помощи NO.

Вместе с тем этот круг вопросов до настоящего времени был совершенно не исследован.

Цель и задачи исследования. Цель работы – исследовать влияние активации двух различных центров связывания растворимой гуанилатциклазы, реализующих NO-зависимый и NO-независимый механизмы, на регуляцию активируемых растяжением ионных каналов кардиомиоцитов желудочков сердца крыс.

Для выполнения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние донора NO SNAP – стимулятора NO-зависимого регуляторного места связывания в β -субъединице sGC на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 (V_{rev}) в отсутствие растяжения и при растяжении клетки в K^+_{in}/K^+_{out} и Cs^+_{in}/Cs^+_{out} средах.

2. Изучить влияние BAY 41-2272 – стимулятора NO-независимого регуляторного места связывания в $\alpha 1$ -субъединице sGC, на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 в отсутствие растяжения и при растяжении клетки, и оценить влияние донора NO SNAP на данные параметры на фоне действия BAY 41-2272.

3. Изучить влияние ингибитора sGC ODQ на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 в отсутствие растяжения и при растяжении клетки и оценить влияние донора NO SNAP на данные параметры на фоне действия ODQ.

4. Изучить влияние ингибитора cGMP-зависимой протеинкиназы KT5823 на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 в отсутствие растяжения и при растяжении клетки и оценить влияние донора NO SNAP на данные параметры на фоне действия KT5823.

5. Изучить влияние активатора cGMP-зависимой протеинкиназы 8Br-cGMP на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 в отсутствие растяжения и при растяжении клетки и оценить влияние донора NO SNAP на данные параметры на фоне действия 8Br-cGMP.

6. Изучить влияние ингибитора S-нитрозилирования аскорбиновой кислоты на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 в отсутствие растяжения и при растяжении клетки и оценить влияние донора NO SNAP на данные параметры на фоне действия аскорбиновой кислоты.

7. Изучить уровень экспрессии генов известных SAC в кардиомиоцитах желудочков сердца крысы.

Научная новизна. В рамках данной работы впервые было изучено влияние второго, NO-независимого механизма активации sGC у изолированных кардиомиоцитов, осуществляемый через активацию ее NO-независимого активного центра, с помощью BAY 41-2272 на механосенситивные токи.

Таким образом, было изучено влияние разных концентраций BAY 41-2272 в динамике времени на поздние токи изолированных кардиомиоцитов, характеризующие работу SAC. Впервые в динамике времени были исследованы изменения позднего тока в K^+_{in}/K^+_{out} растворах под действием разных концентраций BAY 41-2272 совместно с донором NO SNAP. Кроме того, в работе впервые были показаны эффекты растяжения клеток в K^+_{in}/K^+_{out} и Cs^+_{in}/Cs^+_{out} растворах на фоне BAY 41-2272 и на фоне BAY 41-2272 с последующим добавлением SNAP.

Впервые было изучено влияние ODQ, селективного ингибитора sGC, в динамике времени на поздние токи изолированных кардиомиоцитов, характеризующие работу SAC, продемонстрированы изменения позднего

тока в K^+_{in}/K^+_{out} растворах под действием ODQ, совместно с донором NO SNAP при отсутствии и наличии растяжения клетки.

Впервые было изучено влияние KT-5823, селективного ингибитора PKG, в динамике времени на поздние токи изолированных кардиомиоцитов, характеризующие работу SAC, продемонстрированы изменения позднего тока в K^+_{in}/K^+_{out} растворах под действием KT-5823, совместно с донором NO SNAP при отсутствии и наличии растяжения клетки.

Впервые было изучено влияние 8Br-cGMP, активатора PKG, в динамике времени на поздние токи изолированных кардиомиоцитов, характеризующие работу SAC, продемонстрированы изменения позднего тока в K^+_{in}/K^+_{out} растворах под действием 8Br-cGMP, совместно с донором NO SNAP при отсутствии и наличии растяжения клетки.

Впервые было изучено влияние аскорбиновой кислоты, ингибитора S-нитрозилирования, в динамике времени на поздние токи изолированных кардиомиоцитов, характеризующие работу SAC, продемонстрированы изменения позднего тока в K^+_{in}/K^+_{out} растворах под действием аскорбиновой кислоты, совместно с донором NO SNAP при отсутствии и наличии растяжения клетки.

Впервые было показано значение двух различных путей регуляции SAC с помощью NO: путем S-нитрозилирования и через sGC-зависимый путь.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты представленной работы развивают современные представления о функционировании сердца на клеточном уровне. Данная работа продолжает серию электрофизиологических исследований функционирования кардиомиоцитов в целом и роль механоправляемых и механосенситивных каналов в частности. Впервые показана не только роль NO в регуляции механосенситивных токов, но и показан сложный характер такой регуляции: зависимость от концентрации, времени и состояния клетки. В ходе экспериментов выявлены неочевидные закономерности, которые ставят новые вопросы относительно дополнительных путей регуляции механосенситивных токов и открывают новые перспективы исследований в данной области.

Полученные теоретические данные имеют непосредственное практическое значение, так как могут стать базой для разработки фармакологических препаратов, направленных на регуляцию механосенситивных токов, которые, как известно, вносят большой вклад в развитие многих сердечных патологий, включая аритмии.

Методология и методы исследования. В данной работе исследовали влияние растяжения, а также различных химических соединений на электрические параметры кардиомиоцитов. Ионные токи изучали в изолированных кардиомиоцитах желудочков сердца крысы методом patch-clamp в конфигурации whole-cell. Растяжение проводили с помощью

оплавленного стеклянного стилуса и микроманипулятора. Введение химических веществ производили с использованием перфузионной системы.

Положения, выносимые на защиту

1. NO вызывает двухфазный эффект при отсутствие растяжения клетки: I_{K1} сначала увеличивается, затем уменьшается, I_L и $I_{L,ns}$ в области более отрицательных потенциалов, чем V_0 , сначала увеличиваются, затем уменьшаются. При этом клетка претерпевает сначала деполяризацию, а затем – гиперполяризацию. Ионы Gd^{3+} устраняют развитие NO-индуцированных токов. Растяжение клетки вызывает I_{SAC} , который устраняется NO.

2. Стимуляция NO-независимого пути sGC, уменьшает механосенситивные токи в отсутствие растяжения клетки, а NO на этом фоне еще больше уменьшает эти токи. Активация NO-независимого пути sGC устраняет I_{SAC} , вызванный растяжением клеток. Дополнительное количество NO не приводит к значимым изменениям.

3. Ингибирование sGC уменьшает механосенситивные токи и вызывает гиперполяризацию мембраны. NO на этом фоне значительно увеличивает эти токи и уводит мембранный потенциал в сторону деполяризации. Ингибирование sGC устраняет механосенситивные токи при растяжении клетки и вызывает ее гиперполяризацию, а дополнительное введение NO снова увеличивает эти механосенситивные токи.

4. Ингибирование cGMP-зависимой протеинкиназы уменьшает I_L и вызывает гиперполяризацию клетки, а введение донора NO на его фоне не приводит к значимым изменениям. На фоне растяжения клетки ингибирование cGMP-зависимой протеинкиназы сначала увеличивает I_{SAC} , а через некоторое время ингибирует его. Дополнительно введенный донор NO не оказывает эффекта.

5. Активация cGMP-зависимой протеинкиназы вызывает увеличение механосенситивных токов и деполяризацию клетки. NO устраняет этот ток и возвращает мембранный потенциал к исходным значениям. На фоне растяжения клетки активация cGMP-зависимой протеинкиназы или же непосредственное действие аналога cGMP 8Br-cGMP уменьшает механосенситивные токи, а дополнительное количество NO на этом фоне уменьшает их в еще большей степени.

6. В отсутствие растяжения клетки устранение S-нитрозилирования белков не влияет на механосенситивные токи, а NO на этом фоне уменьшает их. Однако на фоне растяжения устранение S-нитрозилирования полностью элиминирует токи вызванные растяжением клетки, а дополнительное введение донора NO не влияет на I_L .

7. В кардиомиоцитах желудочков сердца крысы экспрессируются гены белков каналов TRPC1, TRPM7, PKD1/TRPP1, PKD2/TRPP2, TMEM63A, TMEM63B, TRPV2, Piezo1.

Личный вклад автора. Личный вклад Биличенко А.С. присутствует на всех этапах выполнения настоящей работы: участие в планировании экспериментов, выделение изолированных кардиомиоцитов, проведение электрофизиологических экспериментов, выделение РНК, биоинформатический анализ, статистическая обработка данных, участие в обобщении результатов и подготовка публикаций.

Степень достоверности данных. Полученные в ходе работы данные достоверны, воспроизводимы и получены с использованием целесообразных современных экспериментальных методик и обработаны адекватным образом. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальных научных источников.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликованы 4 печатные работы, в том числе 4 статьи в журналах индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Апробация результатов. Полученные результаты были представлены и обсуждены:

- Научный доклад о полученных результатах диссертационной работы на объединенном заседании кафедры физиологии медикобиологического факультета и лаборатории электрофизиологии ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова. МЗ Российской Федерации 26 октября 2022 года, протокол номер 2.

- На XXIV съезде Российского физиологического общества им. И.П. Павлова (11- 15 сентября 2023, г. Санкт-Петербург, Россия).

- Апробация по месту выполнения на объединенном заседании кафедры физиологии медикобиологического факультета и лаборатории электрофизиологии ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова. МЗ Российской Федерации 31 мая 2023 года, протокол номер 5.

- Доклад на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова 14 июня 2023.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 180 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, заключения и выводов. Список литературы включает 283 источника. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 25 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследований. Данная работа была выполнена на кардиомиоцитах, выделенных из желудочков сердца самцов крыс. В работе использовали крыс линии Вистар в возрасте от 6 до 9 недель с весом в пределах 220 гр (49 шт.). Перед экспериментом крыс содержали в виварии в течение 4 недель при соотношении освещенного и темного периода 12:12 ч в стандартных клетках Т4, корм и вода предоставлялись без ограничения.

Растворы. Перфузионный раствор для изоляции кардиомиоцитов из желудочка сердца крысы. При выделении использовали раствор, содержащий в мМ: NaCl 118, KCl 4, MgCl₂ 1, NaHPO₄ 1.6, NaHCO₃ 24, пируват натрия 5, таурин 20 и глюкозу 10, pH 7.4±0.02.

Раствор для выдерживания кардиомиоцитов. Для выдерживания кардиомиоцитов применяли раствор KB («Kraftbrühe»), содержащей (ммоль/л): глутаминовую кислоту 50, KCl 30, KH₂PO₄, таурин 20, глюкозу 10, MgSO₄ 3, EGTA 0.1, HEPES 10 с pH 7.3 (доведенной KOH).

Перфузионный раствор, используемый для исследований методом *patch clamp*. Для исследования изолированных кардиомиоцитов желудочков сердца крысы методом *patch clamp* использовали следующий раствор: NaCl 150 мМ, KCl 5.4 мМ, CaCl₂ 1.8 мМ, MgCl₂ 1.2 мМ, HEPES 5 мМ, глюкоза 20 мМ (pH 7.4). В качестве внутрипипеточного раствора использовали следующий раствор: KCl 140 мМ, MgCl₂ 5.5 мМ, Na₂ATP 5 мМ, EGTA 0.01 мМ, HEPES 10 мМ (pH 7.2). В ряде экспериментов с целью устранения калиевых токов в перфузионном растворе заменяли KCl 5.4 мМ на CsCl 5.4 мМ, а во внутрипипеточном растворе – KCl 140 мМ на CsCl 140 мМ.

Биологически активные вещества. Растворы биологически активных веществ, действия которых на клетки изучали, вводили в камеру с помощью перфузионной системы состоящей из перистальтических насосов и силиконовых или полипропиленовых трубок.

Были использованы следующие растворы. В качестве донора NO использовали SNAP (S-Nitroso-N-acetylpenicillamine или 5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine) в концентрациях 50-400 мкМ. SNAP вызывает активацию sGC и образование cGMP по NO-зависимому пути, и, как показано в обсуждении, оптимальная концентрация для такой активации равна 200 мкМ.

Для стимуляции sGC использовали ее активатор BAY 41-2272 или 5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine, в концентрации 10 мкМ, применяемую в сходных исследованиях (Chen et al., 2020; Mujoo et al., 2008).

Для инактивации sGC использовали ингибитор ODQ или 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one в концентрациях 10 и 5 мкМ, соответственно, и которые эффективно блокируют sGC (Sips et al., 2011).

Для инактивации cGMP-зависимой протеинкиназы использовали ингибитор KT5823 или (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-Гексагидро-10-метоксугуанолил-2,9-диметил-1-оксо-9,12-эпокси-1H-дииндоло[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]пирроло[3,4-*i*][1,6]бензодиазепин-10-карбоновая кислота, метил эфир в концентрации 1 мкМ – эффективной для ингибирования протеинкиназы, что показано ранее в сходных работах (Maas et al., 2008; Vila-Petroff et al., 1999).

Для активации cGMP-зависимой протеинкиназы использовали ее активатор 8Br-cGMP или 8-бromo-cGMP в концентрации 200 мкМ, которая обычно применяется в исследованиях токов кардиомиоцитов (Koitabashi et al., 2010).

Использовали блокатор S-нитрозилирования L-аскорбиновую кислоту или 3-Охо-L-gulofuranolactone в концентрации 10 мкМ (Ohtani et al., 2012).

Как субстрат для синтеза NO с помощью NOS вводили L-Arginine в концентрациях 50 и 100 мкМ.

Изоляция кардиомиоцитов из желудочков крыс. Кардиомиоциты желудочков изолировали, используя стандартную технику диссоциации при помощи коллагеназы (Gödecke et al., 2001). Анестезию животных проводили с помощью инъекции 2% раствора рометара внутримышечно из расчета 0,2 мл/кг. Животным перед вскрытием внутрибрюшинно вводили гепарин (5000 U kg⁻¹ I.P.), после чего через 15 мин начинали процедуру. Вскрывали грудную клетку и очищали аорту от соединительной ткани. Сердце вырезали, и аорту надевали на жестко зафиксированную пластиковую канюлю диаметром около 2 мм. На аорту накладывали лигатуру у начала канюли так, чтобы не перекрывался вход в коронарные артерии. Затем включали систему перфузии, заполненную раствором для изоляции кардиомиоцитов, на скорости 5 мл/мин и температуре раствора 37 °С. В течение 5 мин сердце (коронарные сосуды) промывались данным раствором.

Затем перфузия переключалась на такой же раствор, в который были предварительно добавлены 0.1% коллагеназы типа II (Worthington, Lakewood, N. J., США) и 20 мкМ CaCl₂. Перфузия шла в пределах 22 мин.

После завершения ретроградной перфузии с ферментом сердце промывали в течение 5 мин раствором КВ («Kraftbrühe»). После завершения отмывания сердца раствором КВ желудочки отделяли, резали на полоски в чашке Петри в растворе КВ и затем, в пластиковом стаканчике их аккуратно встряхивали, чтобы освободить клетки в раствор КВ. Полученную суспензию клеток фильтровали, и выдерживали в среде КВ при комнатной температуре 2 ч. Затем пипетировали содержимое и 1 - 2 капли помещали в перфузионную камеру объемом 1 мл, закрепленную на предметном столике микроскопа и включали перфузионную систему, содержащую исходно перфузионный раствор, используемый для исследований методом patch clamp с Ca²⁺, состав которого описан выше. После отивывания от КВ и адаптации клеток к новой среде в течение 10 мин начинали электрофизиологические эксперименты.

Локальное осевое растяжение при помощи оплавленной patch-пипетки (стилуса). Помещенные в раствор клетки оседают на дно камеры и одной из своих, обычно концевых частей, адгезируют к стеклянной поверхности дна. Именно в этой области подводится patch-пипетка, которая используется для whole-cell регистрации и одновременно для дополнительной фиксации клетки. Для растяжения клетки применяли слегка оплавленную со стороны кончика patch-пипетку (стеклянный стилус), которая эффективно прилипает к поверхности клетки. Стилус фиксировали на расстоянии 40 мкм от patch-пипетки. Для локального растяжения проводили, как это принято многими авторами, смещение стеклянного стилуса, что и приводило к растяжению части клетки на участке между patch-

пипеткой и стеклянным стилусом (Kamkin et al., 2000). При этом как видно из рис. 3 увеличивается длина саркомеров.

Клетки растягивали на одну треть их длины, для чего фиксировали расстояние между patch-пипеткой и стеклянным стилусом примерно в 40 мкм.

Смещение стилуса и, как следствие, растяжение клетки по оси X и, следующий за этим, сдвиг по оси Y, перемещают верхнюю часть клетки по отношению к нижней части клетки, которая остается прикрепленной к покровному стеклу, являющемуся дном перфузионной камеры. Такая механическая стимуляция может модулировать активность механоуправляемых каналов, или же запускать механоиндуцированные сигнальные каскады, связанные с ионными каналами.

Метод измерения токов. Изучение токов кардиомиоцитов проводили с использованием метода *patch clamp* в конфигурации *whole-cell*.

Запись K^+ и Ca^{2+} patch-clamp токов в конфигурации whole-cell выполняли с использованием усилителя Axopatch 200B и программного обеспечения pClamp 10 (Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния, США). Данные были отфильтрованы на частоте 2 кГц, отображены на частоте 5 кГц и оценены с помощью программного обеспечения. Миоциты перфузировали в небольшой записывающей камере (RC-26; Warner Instrument Corp, Брансуик, Коннектикут, США; объем 150 мкл), установленной на инвертированном микроскопе с внешним раствором K^+_{out} или раствором Cs^+_{out} .

Электроды с накладными зажимами из боросиликатного стекла имели концевое сопротивление от 1,5 до 2,5 МОм при заполнении. После образования контакта whole-cell конфигурацию достигали путем разрыва мембраны. Импульсы (140 мс) применяли с частотой 1 Гц, от фиксированного потенциала -45 мВ, что вызывало инактивацию чувствительных к тетродотоксину (ТТХ) токов Na^+ . Токи в ответ на серии коротких (5 мВ) импульсов, подаваемых при -45 мВ, брали для оценки емкости мембраны и сопротивления, при этом компенсацию емкостных токов и токов утечки не применяли. Поскольку амплитуда токов зависит от длины и диаметра клеток (диаметр кардиомиоцитов у контрольных крыс составлял около 25 ± 6 мкм), всегда отбирали клетки одинаковой геометрии; в среднем эти клетки имели емкость мембраны 150 ± 16 пФ. В экспериментальных клетках входное сопротивление составляло около 58 ± 5 МОм. Влияние разного размера растянутой мембраны было сведено к минимуму путем регулировки стеклянных инструментов на одинаковое расстояние S-P в 40 мкм перед применением растяжения. Поскольку механическое растяжение клетки было ограничено небольшой неизвестной областью между S и P, мы не делили индуцированные растяжением токи на общую емкость мембраны. Измерения обычно длились около 30 минут, в течение которых входное сопротивление и емкостной ток были стабильными. Отношения ток/потенциал (кривые I/V) были получены путем подачи серии из 20 импульсов длительностью 140 мс каждый, начиная с

фиксированного потенциала -45 мВ с шагом 10 мВ. Мембранные токи в конце импульса («поздние токи») наносили на график в зависимости от потенциала соответствующего шага зажима. Сопротивление контакта оставалось постоянным, т.е. составляло от $1,5 \pm 0,3$ ГОм до $1,4 \pm 0,4$ ГОм во время растяжения. Кроме того, входное сопротивление и емкость мембраны были неизменными. Следовательно, входящий ток, вызванный растяжением, следует отнести к реальному каналному ионному току, а не к току утечки вокруг контакта. Пересечение полученной кривой I/V с осью потенциала определило нулевой потенциал тока (E_0), который соответствовал мембранному потенциалу в покое клетки вне экспериментальной ситуации (между -70 и -80 мВ). Также осуществляли онлайн-запись общего мембранного тока на уровне фиксированного потенциала -45 мВ (time course).

Значения дифференциального тока, рассчитанные как разница между значениями контрольного тока и значениями тока на фоне растяжения клеток или на фоне введения веществ при -45 или -80 мВ (C^S DI), обозначают как $I_{SAC(-45)}$ и $I_{SAC(-80)}$.

Выделение и очистка мРНК. Уровень экспрессии РНК изучался при помощи технологии секвенирования РНК-транскриптома.

мРНК выделяли непосредственно из кардиомиоцитов с использованием гранул Oligo-dT25 Dyna® (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Гранулы, связанные с мРНК, промывали трис-буферным раствором, содержащим додецилсульфат лития (LiDS) 10 ммоль/л TrisHCl (рН $7,5$); $0,15$ М LiCl; 1 ммоль/л EDTA; $0,1\%$ LiDS. Гранулы ресуспендировали в воде, не содержащей РНКазы (Sigma, Дорсет, Великобритания), и мРНК подвергали обратной транскрипции с использованием клонированной обратной транскриптазы AMV (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Полученную кДНК хранили при -80°C до тех пор, пока она не потребуется.

Секвенирование и анализ РНК. Полученные библиотеки анализировали на концентрацию, распределение по размерам и качество с использованием высокочувствительного набора двухцепочечной ДНК (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), флуорометра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Драйих, Германия) и высокочувствительного анализатора набор D5000 (Agilent, Санта-Клара, Калифорния, США) на TapeStation 4200. Библиотеки нормализовали на основе их молярности, объединяли, а затем количественно определяли с помощью набора для количественного определения библиотек для платформ Illumina (Roche, Базель, Швейцария) с использованием устройства для количественной ПЦР StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Inc., Dreieich, Германия). Полученные объединенные библиотеки загружали при 350 пМ с 1% PhiX в ячейку S2 FlowCell и секвенировали в трех экземплярах с использованием секвенатора нового поколения NovaSeq 6000 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) с чтением парных концов 2×150 п.н.

Сырые данные в формате FASTQ сначала оценивали на качество с использованием FastQC v0.11.5 (доступно онлайн по адресу <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (Andrews, 2010). Затем данные были обработаны Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014) для обрезки адапторных последовательностей. Далее обработанные данные анализировали с помощью Fastp (Chen et al., 2018) для удаления хвостов поли-G и артефактов, специфичных для Novaseq/Nextseq. После указанной первичной обработки данные снова оценивались с использованием FastQC. После QC секвенированные данные выравнивали по отношению к эталонному геному человека GRCh38.p4 с использованием HISAT2 (Kim et al., 2015) с параметрами по умолчанию, а полученные выравнивания SAM были затем преобразованы в формат BAM и отсортированы по координатам с помощью SAM Tools v1. 3.1 (Li et al., 2009). Наконец, отсортированные файлы выравнивания были проанализированы с помощью HTSeq-count v0.6.1p1 (Anders et al., 2015) с использованием опций (-s no -t exon -I gene_id) для генерации исходного подсчета.

Методы обработки результатов. Данные, полученные методом patch-clamp, обрабатывали с помощью пакета коммерческих программ *Molecular Devices Axon pClamp 10.2*. Значимые различия были обнаружены с помощью однофакторного дисперсионного анализа для повторных измерений (ANOVA for RM) с тестом Хольма-Сидака в качестве post-hoc теста. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представляли в виде: среднее \pm ошибка среднего, n – количество экспериментов. Нормальность распределения выборок в работе проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилкса.

Данные секвенирования и анализа ДНК: все эксперименты проводились не менее чем в трех повторениях, а данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Электрофизиологическая работа была выполнена на 188 клетках, которые были получены от 49 крыс. Крысы и клетки, для которых срывался эксперимент (например, не удавалось выделение, не получалось образовать whole-cell конфигурацию patch) в данное количество не включались.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы регистрировали I_{ns} , I_{K1} V_0 (V_{rev}) и рассчитывали I_{SAC} и ΔI_{K1} под действием соединений и соединений на фоне растяжения, но в автореферат вынесены вопросы, относящиеся к непосредственным изменением тока I_{ns} при растяжении (и, как следствие, I_{SAC}) под действием различных соединений, так как именно это являлось ключевым объектом интереса нашей работы.

Локальное растяжение активирует суммарные входящие токи в кардиомиоцитах в K^+_{in}/K^+_{out} среде. При растяжении на 6 мкм отрицательный $I_{L,ns}$ увеличивался (рис. 1). В дальнейшей работе мы

применяем растяжение на 6 мкм, и полученные данные можно воспринимать в качестве контрольных в K^+_{in}/K^+_{out} среде.

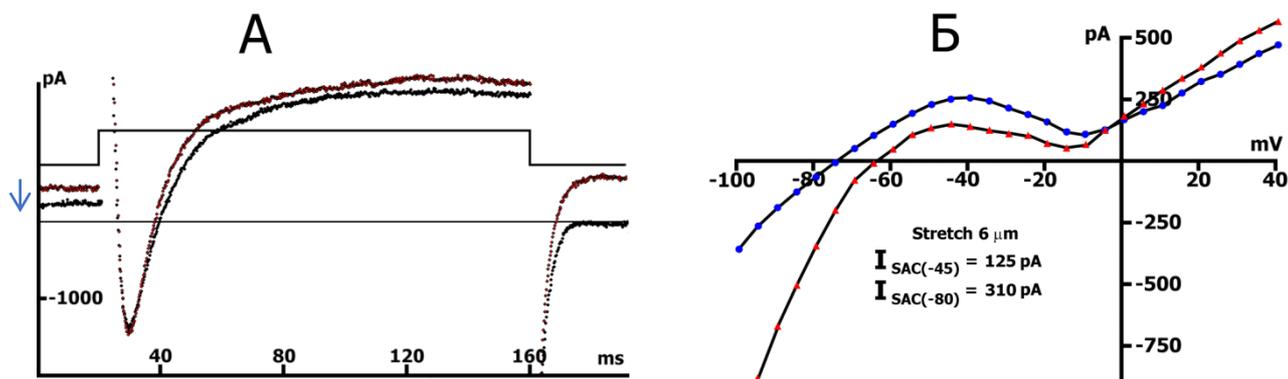


Рисунок 1. А. Online запись (time course) мембранного тока, K^+_{in}/K^+_{out} среда. V_m фиксирован на уровне поддерживаемого потенциала, равного -45 мВ. красная линия – контроль, черная – растяжение клетки на 6 мкм. (стрелка показывает смещение тока) Б. Индукция суммарных входящих токов локальным растяжением на 6 мкм; I/V-кривые до (синие кружки) и во время растяжения (красные треугольники). Оригинальная кривая (статистически обработанные данные см. в таблице 1).

NO вызывает изменения зависимости I_L от потенциала в K^+_{in}/K^+_{out} среде. Мы наблюдали двухфазный эффект – уменьшение с последующим возвратом к близким к исходным значениям положительного горба I/V-кривой (от -55 до -60 мВ) и величины деполяризации (изменение нулевого текущего потенциала V_0) с последующей гиперполяризацией. NO вызывал активацию $I_{L,ns}$ с последующей деполяризацией мембраны, а затем ингибирование $I_{L,ns}$ с последующей гиперполяризацией мембраны (рис. 2). Принимая во внимание настоящие и предыдущие данные (Kamkin et al., 2003; Kamkin et al., 2000), I_{SNAP} , индуцированный NO, является активируемым растяжением I_L , поскольку Gd^{3+} в концентрации 5 мкМ в K^+_{in}/K^+_{out} и Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде не только устраняет этот ток, но и вызывают ингибирование фонового I_L в диапазоне от -80 до -100 мВ, сдвигая V_0 в сторону гиперполяризации, что характерно для активируемого растяжением тока. В совокупности это позволяет заключить, что экзогенный NO активирует SAC, вызывая появление $I_{SAC,ns}$ без растяжения клеток. Регистрация открытия механочувствительных каналов под действием экзогенного NO без растяжения клетки показана, например, для риаудиновых рецепторов. Введенный извне NO увеличивает частоту Ca^{2+} -sparks без растяжения клеток (Petroff et al., 2001). Как в K^+_{in}/K^+_{out} среде, так и в Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде двухфазный эффект экзогенного NO регистрировался при концентрациях SNAP, близких к 200 мкМ – сначала увеличение $I_{SAC,ns}$ без растяжения клеток, затем его снижение до исходных значений и последующее ингибирование. Двухфазные или обратимые эффекты NO

хорошо известны. Например, аналогичный обратимый эффект экзогенного NO был обнаружен и при регистрации освобождения Ca^{2+} через Ca^{2+} -зависимые Ca^{2+} -каналы, связанные с рианодиновыми рецепторами (ryanodine-receptor Ca^{2+} -release channels), которые модулируются растяжением клеток. Экзогенно добавленный NO, как уже упоминалось, обратимо увеличивает частоту Ca^{2+} -sparks (Petroff et al., 2001).

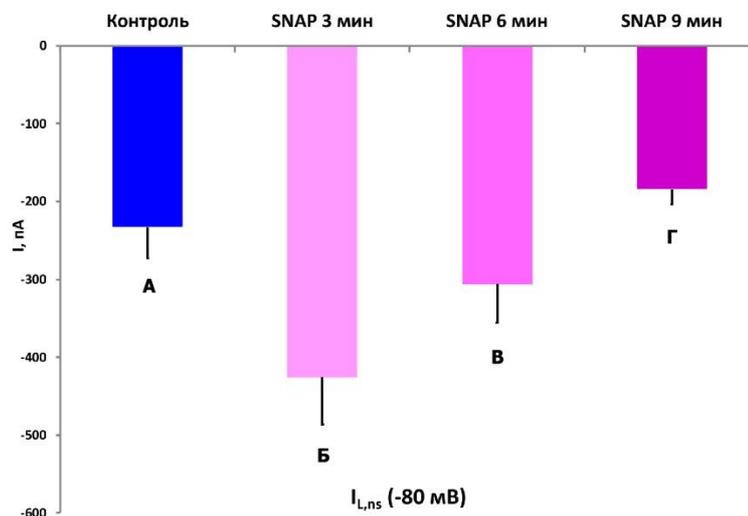


Рисунок 2. Влияние SNAP (200 мкМ) на I/V кривые позднего тока (I_L) у нерастянутой клетки. Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ у нерастянутой клетки при последовательном добавлении в раствор BAY 41-2272 и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=10$, $m=6$.

Исходя из данных, представленных в данном разделе, а также из данных полученных ранее (Kazanski et al., 2010) мы полагаем, что базальный уровень NO необходим для работы SAC. Как показано выше, для активации I_{SAC} необходимо присутствие внутриклеточного NO, который образуется в результате активности NOS. Специфический поглотитель NO РТИО (Dyachenko et al., 2009; Kazanski et al., 2010) (см. обзор (Kazanski et al., 2010)), а также ингибиторы NO-синтазы L-NMMA (Dyachenko et al., 2009) или L-NAME (Kazanski et al., 2010) (см. обзор (Kazanski et al., 2011)) вызывает полное угнетение I_{SAC} . Также в кардиомиоцитах мышей $\text{NOS}3^{-/-}$ I_{SAC} отсутствовал (Kazanski et al., 2010) (см. обзор (Kazanski et al., 2011a)).

NO устраняет суммарный ток, активируемый растяжением в $\text{K}_{in}^+/\text{K}_{out}^+$ среде. В этом исследовании мы продемонстрировали устранение результирующих токов, вызванных растяжением, путем введения 200 мкМ SNAP в $\text{K}_{in}^+/\text{K}_{out}^+$ среде (рис. 3А). Можно предположить, что растяжение открывает SAC, в то время как экзогенный NO вызывает закрытие этих каналов. Напротив, применение растяжения на фоне действия SNAP устраняет результирующие токи (рис. 3Б).

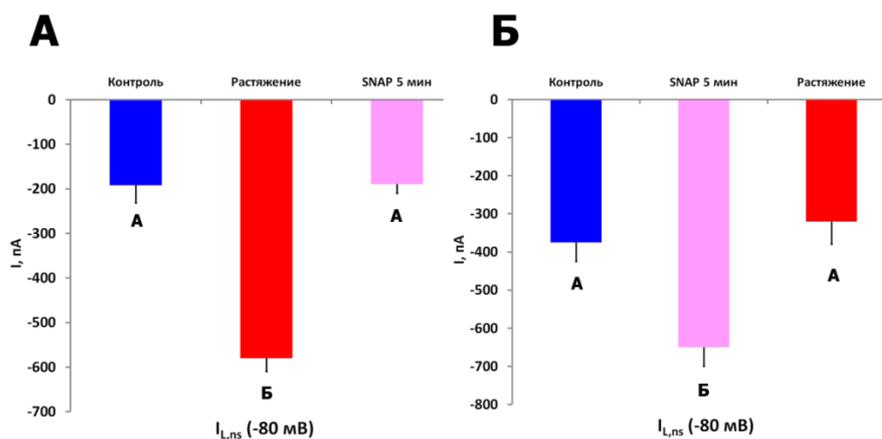


Рисунок 3. Влияние SNAP (200 мкМ) в комбинации с растяжением на 6 мкм на I/V кривые позднего тока (I_L). А – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ при растяжении и последующем добавлении в раствор SNAP на фоне продолжающегося растяжения. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=7$, $m=6$. Б – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ при добавлении в раствор SNAP и последующем растяжении. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=7$, $m=6$.

ВAY 41-2272 устраняет I_{SAC} , который становится ниже исходных, а дополнительное введение 200 мкМ SNAP не влияет на $I_{L,ns}$ (Рис. 4А). Таким образом, ВAY 41-2272 в NO-cGMP-PKG пути индуцирует фосфорилирование SACs, открываемых растяжением клеток, что приводит к полной элиминации индуцированного растяжением I_{SAC} .

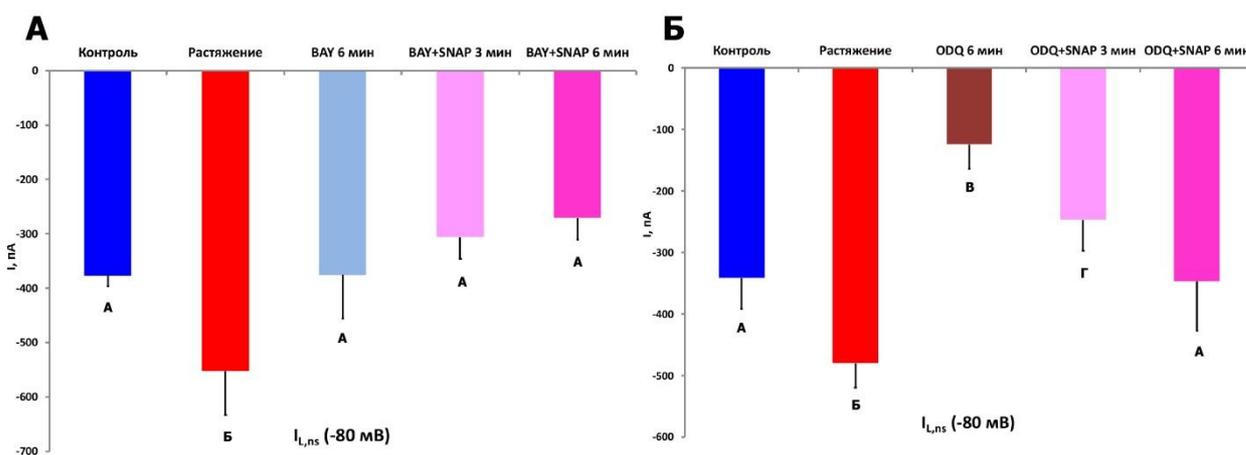


Рисунок 4. А – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ на фоне растяжения клетки при последовательном добавлении в раствор ВAY 41-2272 (10 мкМ) и SNAP (200 мкМ). Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=5$, $m=4$. Б – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ на фоне растяжения клетки при последовательном добавлении в раствор ODQ (5 мкМ) и SNAP (200 мкМ). Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=5$, $m=5$.

ODQ устраняет I_{SAC} . ODQ полностью устраняет вызванные растяжением клетки $I_{L,ns}$, причем ток становится существенно меньше исходного, а дополнительное введение 200 мкМ SNAP его увеличивает, до контрольных значений (рис. 4Б).

Бифазная реакция действия SNAP, характерная для контрольной ситуации, не наблюдается, по-видимому, из-за заблокированного sGC-cGMP-PKG пути. Главное, что ODQ полностью устраняет вызванный растяжением клетки I_{SAC} , а дополнительное введение SNAP его вновь увеличивает.

В интактной клетке блокада sGC должна устранять регуляцию канальной активности через NO-cGMP-PKG путь, который работает благодаря базовой продукции NO синтазами NO. Но есть один нюанс. Хотя имеется существенное количество работ, выполненных с применением ODQ как блокатора sGC и, следовательно, NO-cGMP-PKG пути, к результатам использования этого соединения стоит относиться с осторожностью, поскольку известно, что помимо действия на sGC, ODQ обладает способностью действовать на органические нитраты и оказывает влияние на ферментную систему цитохрома P-450. Более важно, что ODQ блокирует sGC, но при этом, благодаря его метаболическому преобразованию, превращается в ингибитор NOS (Feelisch et al., 1999).

Однако для нашей задачи параллельное блокирование NOS преобразованным ODQ даже более интересно. В этом случае, в наших экспериментах перфузия клеток ODQ выключает не только NO-cGMP-PKG сигналинг, но и, вероятно, работу NOS, т.е. образование NO, а использование РТЮ, связывающего NO, ингибитора NO-синтазы L-NAME (Dyachenko et al., 2009; Kazanski et al., 2010a) (см. для обзора (Kazanski et al., 2011)) и мышей с нокаутом $NOS3^{-/-}$ (Kazanski et al., 2011; Kazanski et al., 2010a) убедительно показало, что в отсутствие NO растяжение не может привести к возникновению I_{SAC} . В этих условиях выраженная активация $I_{L,ns}$ с помощью SNAP на фоне фармакологической блокады sGC с ODQ достаточно убедительно демонстрирует превалирующую роль нитрозилирования SACs.

КТ-5823 уменьшает I_{SAC} . КТ-5823 уменьшал индуцированный растяжением ток, а введенный дополнительно SNAP не оказывал существенного на него (рис. 5А). На первый взгляд может показаться, что уменьшение I_{SAC} у растянутой клетки, вызванное блокированием PKG находится в противоречии с нашей гипотезой о ингибирующей роли NO-sGC-cGMP-PKG пути, однако, есть работа, в которой показано, что активация тока через канал активируемый cGMP происходит еще эффективнее при заблокированной PKG, так как существует отрицательная обратная связь между количеством PKG и активацией sGC (Castro et al., 2010). Так что есть серьезные основания предполагать, что основная роль в этом каскаде, в случае нашего исследования, отводится именно cGMP, а не PKG.

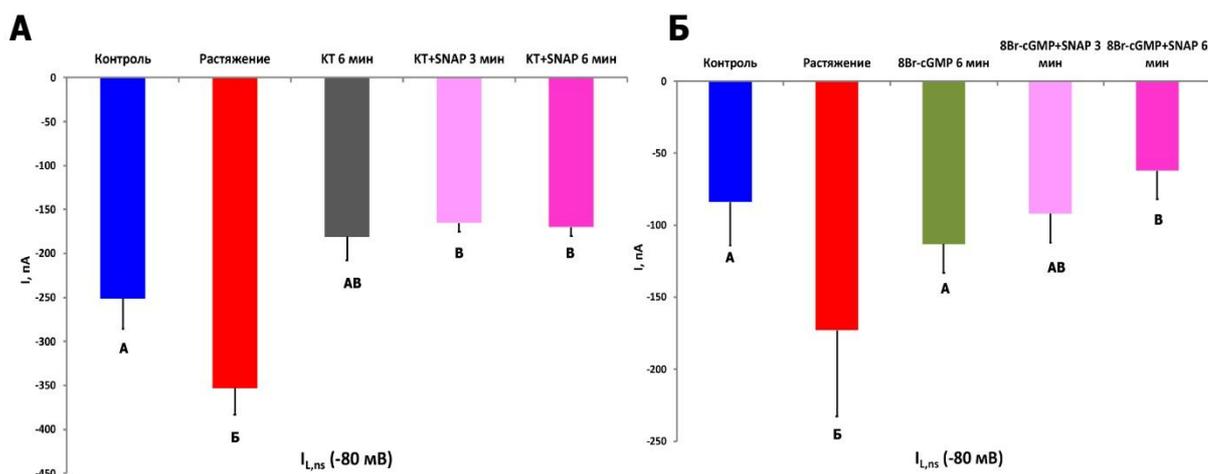


Рисунок 5. А – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ на фоне растяжения клетки при последовательном добавлении в раствор КТ-5823 (1 мкМ) и SNAP (200 мкМ). Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=5$, $m=4$. Б – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ на фоне растяжения клетки при последовательном добавлении в раствор 8Br-cGMP (200 мкМ) и SNAP (200 мкМ). Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=5$, $m=4$.

8Br-cGMP уменьшает I_{SAC} . 8Br-cGMP ингибировал индуцированный растяжением ток I_{SAC} , а дополнительное введение SNAP на фоне продолжающегося растяжения клетки еще в большей степени его ингибировало так, что его значения становились близкими к исходным (рис. 5Б). Мы рассматриваем эту реакцию клетки, как типичную реакцию при ее растянутом состоянии и связываем либо с активацией дополнительного количества PKG, либо (скорее) с прямым действием 8-Br-cGMP на каналы, либо активацией какого-то побочного продукта действия cGMP. Учитывая отсутствие бифазного влияния 8Br-cGMP на I_{SAC} , которое мы наблюдали в случае КТ-5823 и связывали его с вероятной отрицательной обратной связью, оказываемую PKG на образование cGMP (Castro et al., 2010), мы склоняемся к версии, что именно сам cGMP (либо его продукт отличный от PKG) принимает участие в ингибировании I_{SAC} .

Аскорбиновая кислота ингибирует I_{SAC} . Наши результаты демонстрируют, что ингибитор S-нитрозилирования – аскорбиновая кислота полностью устраняет I_{SAC} , вызванный растяжением кардиомиоцита, а дополнительно введенный в среду SNAP не влияет на токи (рис. 6). Очевидно, что полное устранение I_{SAC} с помощью аскорбиновой кислоты можно объяснить, прежде всего, блокадой нитрозилирования SAC. В этом случае SNAP не может проявить свой активирующий эффект.

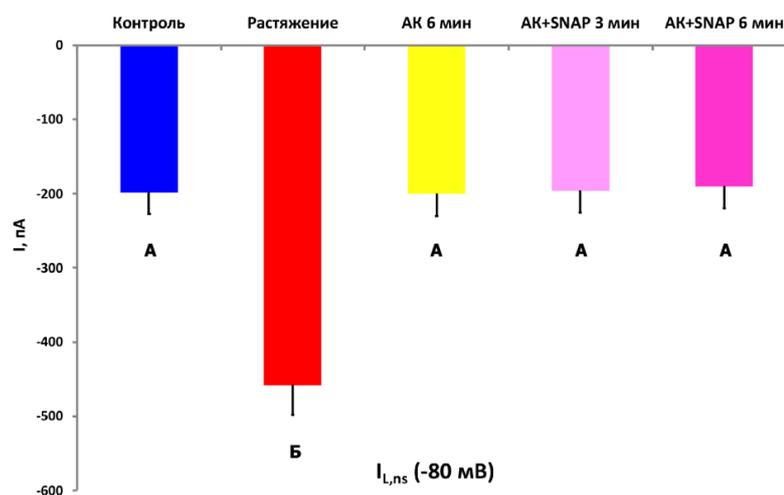


Рисунок 6. Влияние аскорбиновой кислоты (10 мкМ) и ее комбинации со SNAP (200 мкМ) на I_L у растянутой клетки. Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ на фоне растяжения при последовательном добавлении в раствор аскорбиновой кислоты (АК) и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=5$, $m=4$.

Определение транскрипции генов катионнеселективных SAC кардиомиоцитов желудочков крыс. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что вводимые нами вещества действуют на SAC, вместе с тем в литературе нет четкого понимания какие именно SAC, из числа известных на сегодняшний день, экспрессируются в кардиомиоцитах желудочков сердца крысы.

Мы провели анализ транскрипции генов SAC в кардиомиоцитах желудочков сердца крыс и показали в них наличие значительного количества транскриптов для генов каналов TRPC1, TRPM7, PKD1/TRPP1, PKD2/TRPP2, TMEM63A, TMEM63B, TRPV2, Piezo1 (рис. 7). В то же время транскрипты генов других известных SAC, таких как TRPC3, TRPC5, TRPC6, TRPV1, TRPV4, TRPM3, TRPA1, Piezo2 присутствуют в единичных количествах.

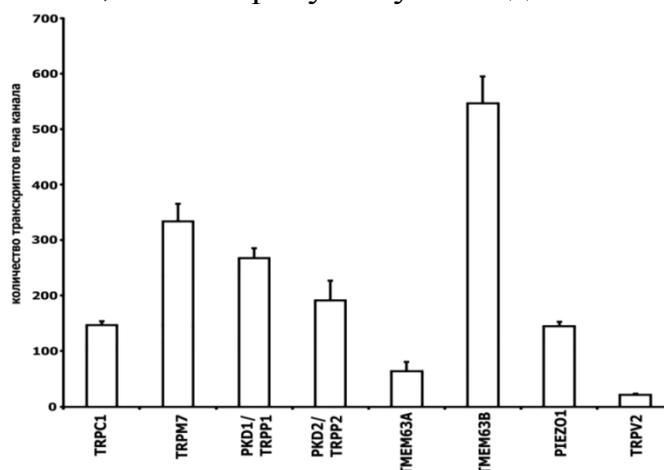


Рисунок 7. Механоуправляемые каналы, гены, которых экспрессируются в кардиомиоцитах желудочков сердца крысы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных и анализа литературы можно сделать вывод, что физиологическая концентрация NO в клетке является обязательным условием работы SAC, так как связывание NO (Kazanski et al., 2011; Kazanski et al., 2010a), блокирование NOS (Kazanski et al., 2011; Dyachenko et al., 2009b; Kazanski et al., 2010a) или использование мышей NOS3^{-/-} (Kazanski et al., 2011; Kazanski et al., 2010a) устраняло эффекты, вызванные растяжением клеток, или предотвращало их развитие (см. для обзора (Kazanski et al., 2011)). Повышение концентрации NO в результате экзогенного добавления доноров на фоне растяжения приводит к элиминации I_{SAC} (Kazanski et al., 2011; Kazanski et al., 2010b).

Экзогенный NO может включать не только NO-зависимый путь модуляции SAC, но и S-нитрозилирование SAC. В интактной клетке NO приводит к двухфазному эффекту: короткая фаза активации Gd³⁺-сенситивного катион неселективного тока I_{L,ns} и более длинная фаза ингибирования этого тока. Короткая фаза активации связана, вероятнее всего, с S-нитрозилованием SACs. А более длительная фаза ингибирования I_{L,ns} может определяться NO-зависимым путем регуляции канальной активности, при котором фосфорилирование SACs снижает их проводимости. Ингибитор S-нитрозилирования – аскорбиновая кислота устраняет вызванную донором NO короткую фазу активации I_{L,ns}, но сохраняет вторую фазу ингибирования I_{L,ns} по NO-зависимому пути: NO-sGC–cGMP–PKG. Более того, аскорбиновая кислота полностью устраняет I_{SAC}, вызванный растяжением клетки, и в этих условиях экзогенный NO не приводит к возникновению первой фазы.

Важно заметить, что доноры NO без растяжения клетки вызывают I_{L,ns}, который эквивалентен I_{SAC}, а на фоне растяжения клетки экзогенный NO устраняет I_{SAC}. Активация NO-независимого sGC–cGMP–PKG пути с помощью BAY41-2272 не могла вызвать исходного S-нитрозилирования SACs поскольку отсутствовал экзогенный NO, и первичной активации I_{L,ns} не было, но в результате активации PKG фосфорилирование SACs снижало I_{L,ns}. Экзогенный NO на фоне активатора sGC BAY41-2272 вызывает ингибирование I_{L,ns}, что, вероятно, объясняется дополнительной активацией sGC. BAY41-2272 устраняет I_{SAC}, вероятно, вследствие активации PKG и фосфорилирования SACs. Но SNAP на фоне растяжения не может еще больше увеличить I_{SAC}.

Блокатор sGC ODQ выключает sGC–cGMP–PKG путь и это приводит к ингибированию I_{L,ns}. Однако, введенный в среду SNAP может вызывать S-нитрозилирование SACs и индуцировать первую фазу – увеличение I_{L,ns}. ODQ, блокируя sGC, уменьшает активность PKG и, следовательно фосфорилирование, однако I_{L,ns} уменьшается, что связано, вероятно, с превращением ODQ в ингибитор NOS в результате метаболического преобразованием. ODQ устраняет также I_{SAC}. Но, введенный на фоне растяжения дополнительно к ODQ SNAP, увеличивает I_{SAC}, что может быть

только в условиях недостатка NO в результате ингибирования NOS изменённым ODQ.

Ингибитор PKG KT-5823 снижает активность PKG, уменьшает фосфорилирование SACs, но увеличивает количество cGMP по механизму отрицательной обратной связи, и, по-видимому, именно это ведет к устранению I_{SAC} , а введение SNAP не влияет на $I_{L,ns}$. 8Br-cGMP уменьшает I_{SAC} , как это и должно происходить за счет активации cGMP-PKG и, следовательно, фосфорилирования или, что вероятнее, увеличении концентрации cGMP.

Наконец, результаты нашего исследования демонстрируют существенный вклад S-нитрозилирования в регуляцию работы SACs. Вместе с тем sGC-cGMP-PKG путь также играет роль в работе SAC, но, по-видимому, с некоторой временной задержкой. Несмотря на очевидный вклад двух этих путей в регуляцию работы механоуправляемых каналов и приведенные в обсуждении возможные варианты такой регуляции, необходимы дополнительные исследования, чтоб определить однозначную роль этих путей.

Таким образом, убедительно показано значение оксида азота NO в регуляции механосенситивных токов и, как следствие, механоэлектрической обратной связи, занимающей одно из ключевых мест в регуляции деятельности сердца в целом. Показана необходимость определенной концентрации NO в кардиомиоците для нормального функционирования механоэлектрической обратной связи. В то же время показана неоднозначность влияния NO на SAC. Связано это с обсуждаемой выше сложностью зависимости между регулируемой функцией и концентрацией NO, состоянием клетки, непосредственным фенотипом кардиомиоцита и т.п. Мы не исключаем также другие пути регуляции работы SAC в тех или иных условиях.

В случае кардиомиоцитов из желудочков сердца крысы NO, вероятно, реализует свое действие через каналы TRPC1, TRPM7, PKD1/TRPP1, PKD2/TRPP2, TMEM63A, TMEM63B, TRPV2, Piezo1, гены, которых, как нами было показано, активно транскрибируются в кардиомиоцитах желудочков сердца крыс.

ВЫВОДЫ

1. В отсутствие растяжения кардиомиоцитов в стандартной среде и в среде с заблокированными калиевыми токами донор NO SNAP вызывает увеличение с последующим ингибированием позднего тока, отражающего активацию и инактивацию механоуправляемых каналов – SAC. В обеих средах неспецифический блокатор механоуправляемых каналов Gd^{3+} предотвращает или устраняет развитие NO индуцированного позднего тока. Растяжение клетки в обеих средах вызывает увеличение позднего тока за счет активации тока через

механоуправляемые каналы I_{SAC} , а введение в среду донора NO возвращает его к исходным значениям, таким образом, полностью устраняя I_{SAC} .

2. Стимулятор NO-независимого места связывания растворимой гуанилатциклазы, в отсутствие растяжения клеток уменьшает поздний ток, а дополнительное введение донора NO еще в большей степени уменьшает этот ток до его выхода на постоянный уровень. На фоне растяжения кардиомиоцитов, которое вызывает увеличение позднего тока за счет появления I_{SAC} , ВАУ 41-2272 ингибирует этот ток, полностью устраняя, тем самым, I_{SAC} , а дополнительное введение донора NO не приводит к значимым изменениям.

3. Ингибитор растворимой гуанилатциклазы, в отсутствие растяжения клеток выражено уменьшает поздний ток, а введение донора NO на его фоне увеличивает поздний ток до значений, существенно выше исходных. На фоне растяжения клеток, вызывающего увеличение позднего тока за счет появления I_{SAC} , ODQ выражено уменьшает поздний ток, устраняя, тем самым, I_{SAC} , а дополнительное введение донора NO увеличивает поздний ток до исходных значений.

4. В отсутствие растяжения клеток ингибитор сGMP-зависимой протеинкиназы KT5823 уменьшает поздний ток, а дополнительное введение донора NO вызывает его временное увеличение до исходного уровня с последующим ингибированием. В то же время активатор сGMP-зависимой протеинкиназы 8Br-cGMP вызывает выраженное увеличение позднего тока, а дальнейшее добавление донора NO сразу уменьшает этот ток до исходных значений. На фоне растяжения клеток KT5823 ингибирует поздний ток, устраняя I_{SAC} , а введенный дополнительно донор NO, не меняет его. 8Br-cGMP также ингибирует поздний ток, уменьшая I_{SAC} , а дополнительное введение донора NO еще в большей степени ингибирует поздний ток.

5 Ингибитор S-нитрозилирования SAC – аскорбиновая кислота, в отсутствие растяжения клеток не вызывает изменений позднего тока, а дальнейшее добавление донора NO приводит к его ингибированию. На фоне растяжения клеток, которое вызывает увеличение позднего тока за счет появления I_{SAC} , аскорбиновая кислота уменьшает этот поздний ток до исходных значений, полностью устраняя I_{SAC} ; дополнительно введенный донор NO не вызывает изменений позднего тока по сравнению с контролем.

6. Установлена двойная роль NO в регуляции механоэлектрической обратной связи – одного из ключевых факторов работы сердца в норме и при патологии. Определенный внутриклеточный уровень NO необходим для работы SAC, но увеличение его концентрации приводит к ингибированию их работы. В кардиомиоцитах желудочков сердца крысы экспрессируются гены белков механоуправляемых каналов TRPC1, TRPM7, PKD1/TRPP1, PKD2/TRPP2, TMEM63A, TMEM63B, TRPV2, Piezo1, опосредующие изменение позднего тока при растяжении клеток, и являющиеся потенциальными молекулярными мишенями для NO.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных»

1. Камкин АГ, Митрохин ВМ, Камкина ОВ, Казанский ВЕ, **Биличенко АС**, Родина АС, Золотарева АД, Золотарев ВИ, Сутягин ПВ, Младенов МИ. Гипергравитация увеличивает количество транскриптов генов механоуправляемых и механосенситивных ионных каналов кардиомиоцитов желудочков крыс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023;175(6):681-84. (Scopus, WoS, RSCI, IF = 0,737) **(0,46/0,12*)**

2. Kamkin AG, Kamkina OV, Shim AL, **Bilichenko A**, Mitrokhin VM, Kazansky VE, Filatova TS, Abramochkin DV, Mladenov MI. The role of activation of two different sGC binding sites by NO-dependent and NO-independent mechanisms in the regulation of SACs in rat ventricular cardiomyocytes. *Physiol Rep.* 2022 Apr;10(7):e15246. (Scopus, IF = 2,43) **(5,66/4,8*)**

3. Шим АЛ, Камкин АГ, Камкина ОВ, Казанский ВЕ, Митрохин ВМ, **Биличенко АС**, Филатова ТС, Абрамочкин ДВ. Гадолиний как ингибитор ионных токов в изолированных кардиомиоцитах желудочков крыс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019;168(8):136-41. (Scopus, WoS, IF = 0,95) **(0,69/0,4*)**

4. Mitrokhin V, Filatova T, Shim A, **Bilichenko A**, Abramochkin D, Kamkin A, Mladenov M. L-type Ca²⁺ channels' involvement in IFN- γ -induced signaling in rat ventricular cardiomyocytes. *J Physiol Biochem.* 2019 Feb;75(1):109-115. (Scopus, IF = 2,52) **(1,96/0,8*)**

*Объем в условных печатных листах / вклад автора в условных печатных листах

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

APD (Action Potential Duration) длительность потенциала действия
BKCa (Big Potassium Ca²⁺-activated channels) большие калиевые каналы активируемые Ca²⁺
cGMP (cyclic Guanosine Monophosphate) циклический гуанозин монофосфат
CICR (Calcium Induced Calcium Release) кальцийзависимое высвобождение кальция
DAG (Diacylglycerol) диацилглицерол
ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) внеклеточная сигналрегулируемая киназа
ФАК (Focal Adhesion Kinase) киназа фокальной адгезии
IFN- γ (Interferon- γ) гамма-интерферон
КВ (Kraftbrühe) раствор «Крепкий бульон»
LIM (LIN-11, Isl-1 and MEC-3)
LTCC (L-Type Calcium Current) кальциевый ток L-типа
MGCh (Mechanical-gated Channel) механоуправляемый канал

NO (Nitric Oxide (II)) оксид азота (II)
NOS (NO-synthase) NO-синтаза
NS (non-selective) неселективный
PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) Фосфоинозитид 3-киназа
PKG (Protein Kinase G) протеинкиназа G
PtdIns-3-OH (Phosphoinositide-3-OH kinase) фосфоинозитид 3-OH киназа
RhoA ("Rat Sarcoma Virus" homolog family member A) гомолог Ras A
ROX (Reactive Oxygen Species) реактивные формы кислорода
RNS (Reactive Nitrogen Species) реактивные формы азота
SAC (Stretch Activated Channel) канал активируемый растяжением
SACCa (Stretch-activated K⁺ channel-calcium dependent) активируемый растяжением K⁺ канал зависимый от Ca²⁺
sGC (soluble Guanylate Cyclase) растворимая гуанилатциклаза
TRAAK (TWIK-related arachidonic acid-stimulated K⁺ channel) относящийся к TWIK K⁺ канал стимулируемый арахидоновой кислотой
TREK (TWIK-Related K⁺ Channel) каналы, относящиеся к TWIK
TRP (Transient Receptor Potential) короткий рецепторный потенциал
TWIK (The Weakly Inward Rectifying K⁺ Channel) слабовыпрямляющие K-каналы
МЭОС Механоэлектрическая обратная связь
ПД Потенциал Действия
ПП Потенциал Покоя
ЭМС Электромеханическое сопряжение