

На правах рукописи

Пасатецкая Наталья Анатольевна

**РЕЦЕПТОР-ОПОСРЕДОВАННАЯ МОДУЛЯЦИЯ СИГНАЛЬНОЙ
ФУНКЦИИ Na^+, K^+ -АТФАЗЫ**

Специальность 03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2019

Работа выполнена в лаборатории физиологии возбудимых мембран Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и отделе экспериментальной физиологии и фармакологии Центра доклинических и трансляционных исследований Института экспериментальной медицины Национального медицинского исследовательского центра имени В. А. Алмазова Минздрава России.

Научный руководитель: **Лопатина Екатерина Валентиновна**

доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Зверев Алексей Анатольевич**

кандидат биологических наук, доцент кафедры охраны здоровья человека ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»

Сердобинцев Михаил Сергеевич

доктор медицинских наук, профессор, руководитель направления "Костно-суставная хирургия и ортопедия" ФГБУ "СПБ НИИФ" Минздрава России

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 г. в __ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций (Д 002.020.01) при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте <http://www.infran.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета
доктор биологических наук

Ордян Наталья Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности. Заболевания сердечно-сосудистой системы и остеопороз занимают третье и четвертое место в мире среди наиболее опасных неинфекционных и социально значимых заболеваний. В настоящее время полагают, что данные заболевания имеют общие патогенетические механизмы (Болотнова и др. 2013; Varenna et al., 2013; Yang et al., 2014; Платицына и др., 2016).

Эмбриональный период развития отличается активной пролиферацией клеток формирующих ткани и органы развивающегося организма. Именно в это время закладывается фундамент для правильной работы органов и систем в дальнейшем онтогенезе. Любые отклонения в условиях внутриутробного развития вызывают включение адаптационных механизмов, направленных на повышение выживаемости плода, однако изменяющих структуру и функцию органов. Эти изменения в сочетании с другими факторами риска могут проявляться развитием гипертензии и ряда других заболеваний во взрослом возрасте (Lucas, 1991; Barker, 1990; Law, Shiell, 1996; White et al., 2009; Huxley et al., 2000).

Процессы регуляции клеточного роста и пролиферации в период эмбриогенеза многогранны и до конца не изучены. В последнее время появились данные о том, что особую роль в модуляции процессов клеточного роста и пролиферации играют эндогенные дигиталисоподобные факторы. Единственным рецептором эндогенных кардиотонических стероидов является Na^+, K^+ -АТФаза.

Na^+, K^+ -АТФаза играет важную роль в поддержании гомеостаза ионов Na^+ и K^+ в клетке. После обнаружения в крови теплокровных животных и человека эндогенных кардиотонических стероидов в наномолярных концентрациях, не влияющих на насосную функцию Na^+, K^+ -АТФазы, и путей их биосинтеза в тканях надпочечников и гипоталамусе, стало понятно, что физиологическая роль фермента намного сложнее.

Активное изучение участия Na^+ , K^+ -АТФазы в регуляции процессов тканевого моделирования началось, после того, как было доказано, что связывание фермента с эндогенными кардиотоническими стероидами запускает внутриклеточные сигнальные каскады (Xie, 2001; Xie, Askari 2002; Xie, Cai, 2003; Schoner, Schiener-Bobis, 2005) и участвует в модуляции процессов клеточного роста и пролиферации (Xie et al., 1999; Лопатина и др., 2005; 2008а; 2008б; 2016). Параллельно было обнаружено, что Na^+ , K^+ -АТФаза модулирует ноцицептивный сигнал в ансамбле опиоидоподобный рецептор- Na^+ , K^+ -АТФаза-медленный натриевый канал семейства $\text{Na}_v1.8$. (Krylov et al., 1999; Лопатина, Поляков, 2011).

Эндогенные гликозиды модулируют сигнальную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы трансдуктор-опосредованно, то есть прямо, регулируя ее активность. Многочисленные данные свидетельствуют, что Na^+ , K^+ -АТФаза участвует в образовании мультимолекулярного сигнального комплекса, включающего Src-киназу, рецептор эпидермального фактора роста, Ca^{2+} - каналы различного типа, фосфолипазу C, и другие рецепторные белки (Schoner, Schiener-Bobis, 2007; Reinhard et al., 2012; Aperia et al., 2016; Orlov et al., 2017). Возможность рецептор-опосредованной модуляции сигнальной функции фермента доказана в ходе изучения физиологической активности коеновой кислоты (Лопатина, Поляков, 2011; Lopatina et al., 2016). Экспериментальные исследования позволили выдвинуть предположение о том, что изменение функциональной активности Na^+ , K^+ -АТФазы в качестве трансдуктора сигнала в организме может быть связано с рецептор-опосредованными эффектами со стороны вегетативной нервной системы и ряда других факторов, в частности колебаниями уровня гомоцистеина и гомоцистеин тиолактона.

Исследование эндогенных дигиталисоподобных факторов, катехоламинов и гомоцистеин тиолактона, являющихся факторами риска развития осложнений беременности, и анализ их действия на процессы кардио- и остеоремоделирования в норме является актуальным и значимым не только для определения реакции тканей плода на неблагоприятные условия развития, но и важным

прогностическим фактором определяющим возможность развития патологии в дальнейшем.

Поскольку заболевания сердечно-сосудистой системы часто сопровождаются остеоремоделированием, изучение единых тонких механизмов ремоделирования сердечной и костной тканей необходимо для поиска наиболее эффективных комплексных подходов к лечению и профилактике сочетанных патологий.

Цель исследования. Исследовать возможность рецептор-опосредованной модуляции сигнальной функции Na^+ , K^+ -АТФазы в условиях органотипического культивирования ткани сердца и кости 10-12-дневных куриных эмбрионов.

Задачи исследования:

1. Разработать методику органотипического культивирования ткани кости.
2. Сравнить действие дигиталисоподобных факторов на процессы роста и пролиферации клеток зоны роста эксплантатов ткани сердца и кости.
3. Изучить действие гомоцистеин тиолактона на процесс тканевого моделирования в условиях органотипической культуры ткани сердца и кости.
4. Исследовать участие Na^+ , K^+ -АТФазы в реализации остео- и кардиотоксического действия гомоцистеин тиолактона.
5. Оценить вклад адренорецепторов в регуляцию процесса тканевого моделирования в условиях органотипической культуры ткани сердца и кости.
6. Оценить возможность рецептор-опосредованной модуляции трансдукторной функции Na^+ , K^+ -АТФазы катехоламинами.

Научная новизна. Разработана оригинальная авторская методика органотипического культивирования костной ткани 10-12-дневных куриных эмбрионов. Доказано наличие α_1 - и α_3 - изоформ Na^+ , K^+ -АТФазы и β_1 -адренорецепторов на поверхности клеток, формирующих зону роста эксплантатов исследуемых тканей.

Комплексный подход, основанный на использовании метода органотипического культивирования ткани, фармакологического анализа и метода реконструкции оптических срезов впервые позволил оценить участие Na^+, K^+ -АТФазы в процессах остеоремоделирования в эмбриональный период онтогенеза. Показано, что оубаин дозозависимо, но не тканеспецифично регулирует рост эксплантатов ткани сердца и кости. В условиях органотипического культивирования кардиотонический стероид дигоксин в эндогенных концентрациях трофотропных свойств не проявил.

Доказано что остео- и кардиотоксическое действие гомоцистеин тиолактона реализуется за счет ингибирования насосной функции Na^+, K^+ -АТФазы.

В условиях органотипического культивирования получены оригинальные данные о трофотропном влиянии медиаторов симпатической нервной системы на процессы роста и пролиферации клеток ткани сердца и кости в период эмбриогенеза. Установлено, что адреналин и норадреналин тканеспецифично модулируют рост эксплантатов исследуемых тканей. Эффективная стимулирующая рост эксплантатов ткани сердца концентрация катехоламинов составляет 10^{-12} М. Норадреналин стимулирует рост эксплантатов ткани кости в концентрации 10^{-6} М, в то время как адреналин не оказывает трофотропного действия на данную ткань. Фармакологический анализ позволил установить, что регуляция роста ткани сердца адреналином и норадреналином осуществляется через β_1 -адренорецепторы. Стимулирующее рост эксплантатов ткани кости действие норадреналина, по-видимому, опосредовано α -адренорецепторами. Остеотоксическое действие адреналина и норадреналина в концентрации 10^{-4} М связано с активацией β_2 -адренорецепторов.

В условиях органотипического культивирования ткани сердца впервые доказана возможность модуляции сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы адреналином рецептор-опосредованно, через β_1 -адренорецептор. В органной культуре костной ткани адреналин влияния на трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы не оказывает.

Норадреналин рецептор-опосредованно модулирует сигнальную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы как в клетках ткани сердца (через β_1 -адренорецепторы), так и в клетках ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов (предположительно, через α_1 -адренорецепторы).

Использование авторского подхода основанного на применении лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 710 и аппаратно-программного комплекса для визуализации, обработки и анализа изображений ZEN_2011 впервые позволило зарегистрировать формирование трехмерной структуры в зоне роста органных культур. До настоящей работы считалось, что клетки зоны роста в органной культуре формируют монослой (Коновалов и др., 1977; Хавинсон и др., 2012). Проведенные исследования показали, что по своей интенсивности стимулирующий эффект атенолола в концентрации 10^{-4} М не только подобен действию катехоламинов в концентрации 10^{-12} М, но и превосходит его за счет стимуляции образования трехмерной структуры в зоне роста эксплантатов ткани сердца.

Теоретическая и практическая значимость работы. Изучение в модельных экспериментах физиологических процессов регуляции роста и пролиферации клеток ткани сердца и кости в период эмбрионального развития позволяет выявить механизмы, препятствующие развитию нарушений структуры и функции органов при патологическом течении беременности.

Полученные результаты существенно расширяют имеющиеся представления о функционировании Na^+ , K^+ -АТФазы в качестве трансдуктора сигнала в клетках, составляющих сообщество ткани сердца и кости. Сравнительный анализ влияния катехоламинов и препаратов группы бета-адреноблокаторов на процессы ремоделирования исследуемых тканей способствует изучению общих механизмов связывающих заболевания сердечно-сосудистой и опорной систем организма.

Результаты данной работы могут быть использованы для изучения специфической фармакологической активности лекарственных препаратов,

используемых для лечения заболеваний исследуемых систем организма и выявления механизмов, активация которых препятствует их развитию.

Разработанная оригинальная авторская методика органотипического культивирования костной ткани может быть использована для тестирования лекарственных препаратов и остеозамещающих материалов, используемых в травматологии и ортопедии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Клетки зоны роста в органной культуре исследуемых тканей содержат β_1 -адренорецепторы, α_1 - и α_3 -изоформы Na^+, K^+ -АТФазы и формируют многомерную структуру.
2. Оуабаин и дигоксин регулируют процессы роста и пролиферации клеток ткани сердца и кости. Действие дигиталисоподобных факторов дозозависимо и тканеспецифично.
3. Кардио- и остеотоксические эффекты гомоцистеин тиолактона опосредованы его действием на насосную функцию Na^+, K^+ -АТФазы.
4. Катехоламины модулируют трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы рецептор-опосредованно. Вклад отдельных видов адренорецепторов зависит от типа ткани.

Методология и методы исследования. В работе использовался комплексный подход, основанный на использовании метода органотипического культивирования ткани, фармакологического анализа и метода реконструкции оптических срезов. Метод органотипического культивирования ткани является адекватной моделью для изучения трофотропных свойств физиологически активных веществ и лекарственных препаратов. Метод позволяет стандартизировать условия эксперимента, исключить системные влияния организма на изучаемые процессы, сохранить клеточное сообщество исследуемых тканей. Морфометрический метод оценки данных с расчетом индекса площади, позволяет оценить изменение процессов клеточного роста и пролиферации в плоскости. Использование лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 710 в сочетании с иммуногистохимическими

методами дает возможность осуществить трехмерную реконструкцию эксплантатов исследуемых тканей, зарегистрировать формирование многослойной структуры в зоне роста и оценить толщину формирующейся зоны роста в микронах и визуализировать формирование клеточных слоев на разной высоте от коллагеновой подложки.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обусловлена стандартизацией условий культивирования исследуемых тканей, анализом значительного фактического материала данных, адекватным выбором методов статистической обработки.

Материалы работы были представлены в виде устных докладов на молодежной школе-конференции «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (Москва, 2015); XIV Всероссийской молодежной научной конференции (Сыктывкар, 2016); XIII Международной школе-конференции «Адаптация развивающегося организма» (Казань, 2016); III Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» (Санкт-Петербург, 2016); Санкт-Петербургском научном форуме, посвященном 100-летию Физиологического общества им. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, 2017); XXIII съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова (Воронеж, 2017); III Всероссийской (XVIII) молодежной научной конференции «Молодежь и наука на Севере» (Сыктывкар, 2018); XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2018: 2019).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 21 работа, включая 6 статей в рецензируемых журналах из перечня ВАК.

Личное участие автора в получении результатов. Все экспериментальные процедуры, обработка, анализ полученных результатов, подготовка материалов для опубликования выполнены автором лично.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 126 машинописных страницах, состоит из общей характеристики работы, четырех

глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждение результатов), выводов и списка литературы (источников). Диссертация содержит 2 таблицы и 46 рисунков. Библиографический список содержит 41 работу отечественных и 154 зарубежных авторов.

Исследования поддержаны субсидией Правительства Санкт-Петербурга для молодых ученых, молодых кандидатов наук вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга в 2015 году; персональным грантом для молодых ученых компании ОПТЭК (представитель Carl Zeiss на территории РФ), грантом РФФИ № 16-34-00831.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

1. Метод органотипической культуры ткани

Исследования проводили на 10-12-дневных куриных эмбрионах. Объектами исследования являлись культивируемые эксплантаты ткани кости и сердца. Каждая серия экспериментов включала 120 контрольных и 120 экспериментальных эксплантатов на каждую исследованную концентрацию действующих веществ.

В работе использовали среду с pH 7.2: раствор Хенкса 50%; среда Игла MEM 40%; эмбриональная сыворотка коровы 10%; глюкоза 0,6%, гентамицин 10000Ед.

Каждая чашка Петри содержала 20 эксплантатов ткани сердца, либо 20 эксплантатов ткани кости. Для прикрепления эксплантатов к коллагеновой подложке чашки Петри помещали в термостат при температуре 36,8° С на 10 минут. Далее заливали в чашки по 3 мл питательной среды и инкубировали в термостате 30 минут. Затем извлекали чашки Петри из термостата и добавляли в питательную среду исследуемые вещества. Культивирование эксплантатов костной ткани и ткани сердца осуществляли при 37° С и 5% CO₂ в течение трех

суток в CO₂ инкубаторе (Sanyo, Япония). Через трое суток культивирования чашки Петри извлекали из CO₂ инкубатора и исследовали.

Для оценки данных применяли морфометрический метод. Морфометрический критерий – индекс площади (ИП) рассчитывали, как отношение площади всего эксплантата к площади центральной зоны. За условную единицу площади принимали квадрат окуляра-сетки микроскопа, сторона квадрата при увеличении 3.5x10 равна 150 мкм. Значение ИП контрольных эксплантатов принимали за 100%.

2. Микроскопические исследования

На эксплантатах ткани сердца через трое суток культивирования можно выделить две зоны – центральную (более плотную) и зону роста, которая расположена в виде характерного ореола вокруг центральной зоны. Зона роста представлена пролиферирующими кардиомиоцитами и фибробластами. Кардиомиоциты зоны роста представляют собой одноядерные клетки веретенообразной формы. Фибробласты – крупные клетки с большим овальным ядром и ножками.

Центральная зона эксплантатов ткани кости имеет решетчатую структуру. В зоне роста расположены клетки неправильной формы с продолговатым ядром – предшественники остеобластов и остеокластов. Для подтверждения клеточного состава в зоне роста эксплантатов ткани кости, клетки окрашивали моноклональными антителами к ядерному рецептору витамина D₃, который экспрессируется на всех стадиях созревания остеобластов и остеокластов (Gerstenfeld et al., 1995).

4. Иммуногистохимические методы исследования

Для подтверждения наличия и визуализации характера распределения α_1 -, α_3 -изоформы Na⁺, K⁺-АТФазы и β_1 -адренорецепторов на поверхности клеток зоны роста исследуемых тканей, эксплантаты окрашивали антителами по стандартному протоколу. В работе использовали: антитела крысиные моноклональные к рецептору витамина D₃ (9A7, Thermo Fisher Scientific, 1:600); антитела кроличьи поликлональные к β_1 -адренорецептору (ab3442,

Abcam, 1:400); антитела к α_1 -изоформе Na^+, K^+ -АТФазы (ab2872, Abcam, 1:300); антитела к α_3 -изоформе Na^+, K^+ -АТФазы (ab2826, Abcam, 1:300). Затем проводили окраску вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами TRITC (T6778, Sigma, 1:300); FITC (F0257, Sigma, 1:300); Alexa Fluor® 405 (ab175671, Abcam, 1:300).

5. Оценка толщины зоны роста контрольных и экспериментальных эксплантатов

С помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и аппаратно-программного комплекса ZEN_2011 зарегистрировано формирование многослойной структуры в зоне роста контрольных и экспериментальных эксплантатов исследуемых тканей и измерена ее толщина в микронах. На рис. 1 представлена 3-D реконструкция эксплантата ткани сердца в контроле. Каждый уровень (его высота над коллагеновой подложкой представлена интервалом в микронах на линейке) виртуально окрашен в определенный цвет. Введен критерий оценки формирования многомерной структуры в зоне роста – толщина зоны роста. Иные подходы для оценки объемных процессов, происходящих в формирующейся зоне роста не возможны (Лопатина и др., 2015).

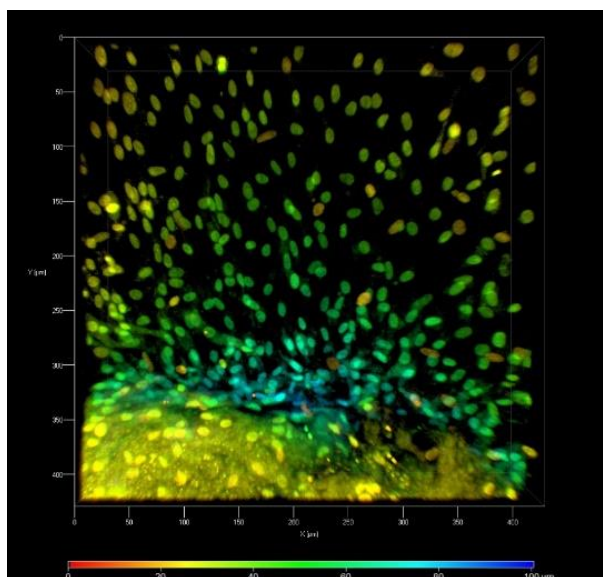


Рисунок 1.

Микрофотография эксплантата ткани сердца 10-дневного куриного эмбриона. 3-и сутки культивирования (ув. 20). Контроль. 3D реконструкция.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 10.0. Использовали t-критерий Стьюдента для двух

независимых выборок. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Участие Na^+, K^+ -АТФазы в ремоделировании ткани сердца и кости

С помощью антител к α_1 - и α_3 -изоформам Na^+, K^+ -АТФазы доказано, что в клетках зоны роста эксплантатов ткани сердца и кости α_1 - изоформа Na^+, K^+ -АТФазы локализована преимущественно на участке плазматической мембраны над ядром (рис. 2). α_3 - изоформа Na^+, K^+ -АТФазы распределена по всей поверхности плазматической мембраны, наибольшая плотность фермента также наблюдается над ядром (рис. 3).

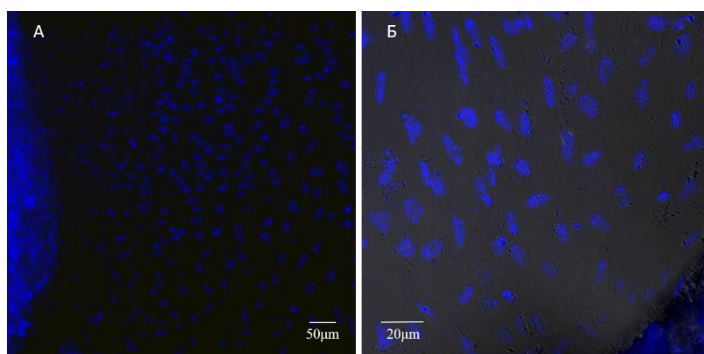


Рисунок 2.
Распределение α_1 -изоформы Na^+, K^+ -АТФазы в клетках зоны роста эксплантатов ткани сердца (А) (ув. 20) и ткани кости (Б) (ув.40). Контроль. Окраска антителами к α_1 -изоформе Na^+, K^+ -АТФазы.

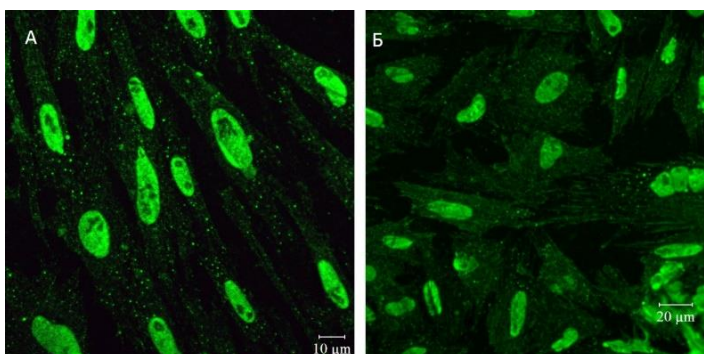


Рисунок 3.
Распределение α_3 -изоформы Na^+, K^+ -АТФазы в клетках зоны роста эксплантатов ткани сердца (А) (ув. 63) и ткани кости (Б) (ув.40). Контроль. Окраска антителами к α_3 -изоформе Na^+, K^+ -АТФазы.

Для оценки участия Na^+, K^+ -АТФазы в ремоделировании ткани кости оуабаин исследовали в диапазоне концентраций от 10^{-12} до 10^{-4} М (рис.4). Максимальный трофотропный эффект препарат проявлял в концентрации 10^{-10} М. ИП экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на $100 \pm 2,1\%$ ($n=120$, $p<0.01$). Оуабаин стимулировал рост эксплантатов ткани сердца в концентрации 10^{-10} М на 33%.

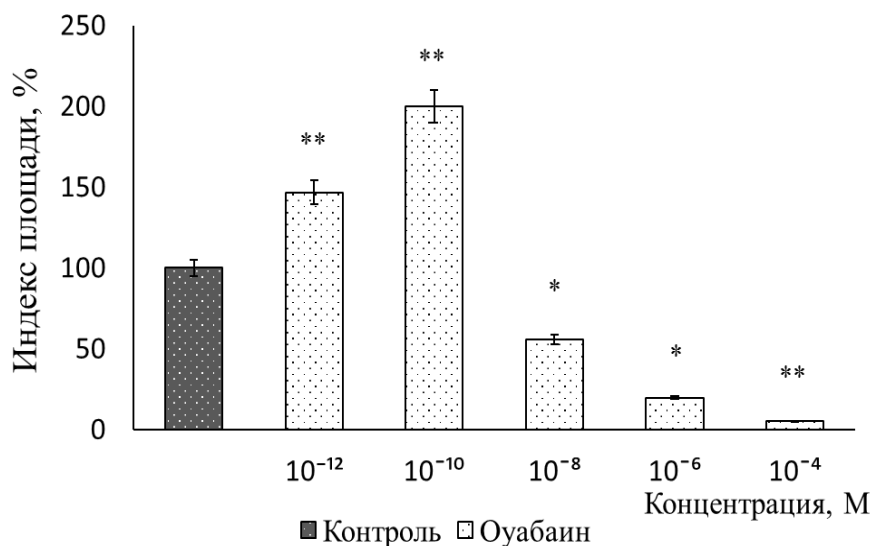


Рисунок 4.
Оуабаин в диапазоне концентраций от 10^{-12} до 10^{-4} М дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов, * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$, достоверные различия относительно контроля.

Далее изучали влияние дигоксина (10^{-12} до 10^{-6} М). В диапазоне концентраций от 10^{-12} М до 10^{-8} М дигоксин на рост эксплантатов ткани сердца и кости 10-12-дневных куриных эмбрионов не влиял. Препарат ингибировал рост эксплантатов ткани сердца в концентрации 10^{-6} М на $61 \pm 1,6\%$ ($n=120$, $p<0.05$), ткани кости на $69 \pm 1,5\%$ ($n=120$, $p<0.05$). Таким образом, в отличие от оуабаина, дигоксин трофотропного действия на рост эксплантатов исследуемых тканей не оказывал.

2. Исследование гомоцистеин тиолактона в условиях органотипического культивирования ткани сердца и кости

Влияние гомоцистеин тиолактона на рост эксплантатов ткани сердца и кости было дозозависимым и не тканеспецифичным. В концентрации 10^{-3} М гомоцистеин тиолактон угнетал рост эксплантатов ткани сердца и кости на $60 \pm 2\%$ ($n=120$, $p<0.01$) и $58 \pm 1\%$ ($n=120$, $p<0.05$) соответственно. Гомоцистеин тиолактон (10^{-3} М) не устранял ингибирующее действие оуабаина (10^{-8} и 10^{-4} М). Кардио- и остеотоксические эффекты препарата сохранялись в присутствии оуабаина (10^{-10} М) (рис. 5;6). Таким образом, кардио- и остеотоксические эффекты гомоцистеин тиолактона опосредованы его действием на насосную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы.

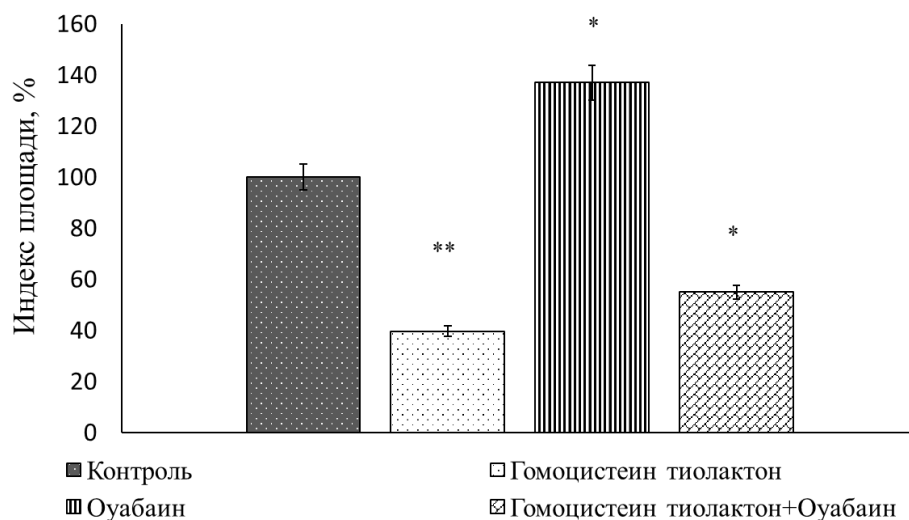


Рисунок 5.
Влияние гомоцистеин тиолактона (10^{-3} М) в присутствии оуабаина (10^{-10} М) на рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, достоверные различия относительно контроля.

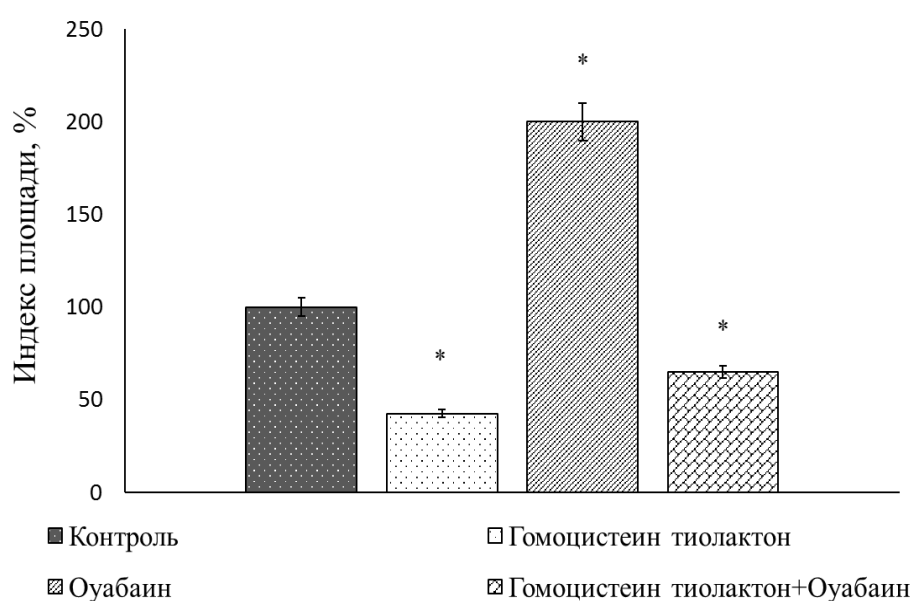


Рисунок 6.
Остеотоксический эффект гомоцистеин тиолактона (10^{-3} М) в присутствии оуабаина (10^{-10} М), * – $p < 0.05$, достоверные различия относительно контроля.

3. Оценка эффектов катехоламинов в условиях органотипического культивирования ткани сердца и кости

Окраска эксплантатов ткани сердца и кости антителами к β_1 -адренорецептору показала, что в клетках зоны роста рецепторы расположены по всей поверхности плазматической мембраны, наибольшая их плотность локализована над ядром (рис. 7).

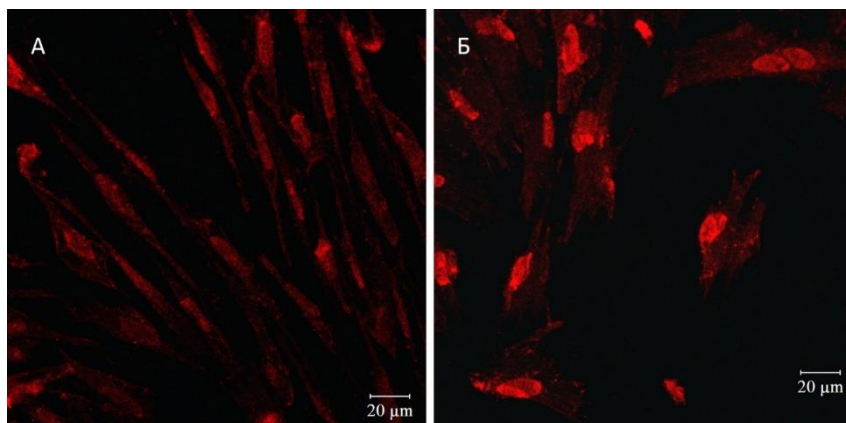


Рисунок 7.
Распределение β_1 -адренорецепторов в клетках зоны роста эксплантатов ткани сердца (А) и ткани кости (Б). Контроль. Окраска антителами к β_1 -адренорецептору. (ув.40).

3.1 Изучение эффектов адреналина

Влияние адреналина на рост эксплантатов ткани сердца исследовали в диапазоне концентраций от 10^{-14} М до 10^{-9} М. В дозе 10^{-12} М препарат проявлял максимальный стимулирующий эффект. ИП был выше контрольного значения на $69 \pm 2,1\%$ ($n=120$, $p<0.05$). Трофотропное действие адреналина отсутствовало на фоне неселективного β -адреноблокатора пропранолола (10^{-10} М) и кардиоселективного β_1 -адреноблокатора атенолола (10^{-4} М). Таким образом, трофотропное действие адреналина в основном реализуется за счет взаимодействия с β_1 -адренорецепторами.

В диапазоне концентраций от 10^{-14} М до 10^{-6} М адреналин на рост эксплантатов костной ткани не влиял. В концентрации 10^{-4} М адреналин угнетал рост эксплантатов ткани кости на $53 \pm 1,7\%$ ($n=120$, $p<0.05$). Ингибирующий эффект препарата отсутствовал на фоне пропранолола (10^{-10} М), но сохранялся в присутствии атенолола (10^{-4} М). Следовательно, остеотоксическое действие адреналина реализуется через β_2 -адренорецепторы.

3.2 Изучение эффектов норадреналина

Влияние норадреналина на рост эксплантатов ткани сердца изучали в диапазоне концентраций от 10^{-13} М до 10^{-9} М. Максимальный трофотропный эффект препарат проявлял в концентрации 10^{-12} М. ИП экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на $18 \pm 1\%$ ($n=120$, $p<0.05$). На фоне атенолола (10^{-4} М) трофотропный эффект норадреналина отсутствовал, что свидетельствует о реализации стимулирующего действия норадреналина

через β_1 -адренорецепторы в условиях органотипического культивирования ткани сердца. Зарегистрировано ингибирующее рост эксплантатов ткани сердца на $31 \pm 1,1\%$ ($n=120$, $p<0.05$) действие норадреналина в концентрации 10^{-9} М.

При исследовании влияния норадреналина на рост эксплантатов ткани кости в диапазоне концентраций от 10^{-10} М до 10^{-4} М оказалось, что максимальное стимулирующее действие препарат проявлял в концентрации 10^{-6} М. ИП экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на $36 \pm 1,2\%$ ($n=120$, $p<0.05$).

Остеотоксическое действие препарата (10^{-5} М) устранял пропранолол (10^{-10} М), но не атенолол (10^{-4} М). Полученные данные позволяют предположить, что ингибирующее рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов действие норадреналина реализуется с участием β_2 -адренорецепторов.

Трофотропный эффект норадреналина (10^{-6} М) на фоне β -адреноблокатора пропранолола (10^{-10} М) сохранялся. Следовательно стимуляция процессов клеточного роста и пролиферации клеток зоны роста эксплантатов ткани кости при действии норадреналина не связана с влиянием препарата на β -адренорецепторы.

4. Участие катехоламинов в рецептор-опосредованной модуляции трансдукторной функции Na^+ , K^+ -АТФазы

В аналогичных экспериментальных условиях было обнаружено, что оуабаин (10^{-8} М) практически полностью угнетает рост эксплантатов ткани сердца (Лопатина и др., 2005). Наши исследования подтвердили этот факт. Добавление в питательную среду адреналина (10^{-12} М) нивелировало ингибирующий эффект оуабаина, что свидетельствует о модуляции трансдукторной функции Na^+ , K^+ -АТФазы адреналином рецептор-опосредованно. Ингибиторный анализ доказал, что в эксплантатах ткани сердца адреналин модулирует сигнальную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы рецептор-опосредованно, через β_1 -адренорецепторы (рис. 8).

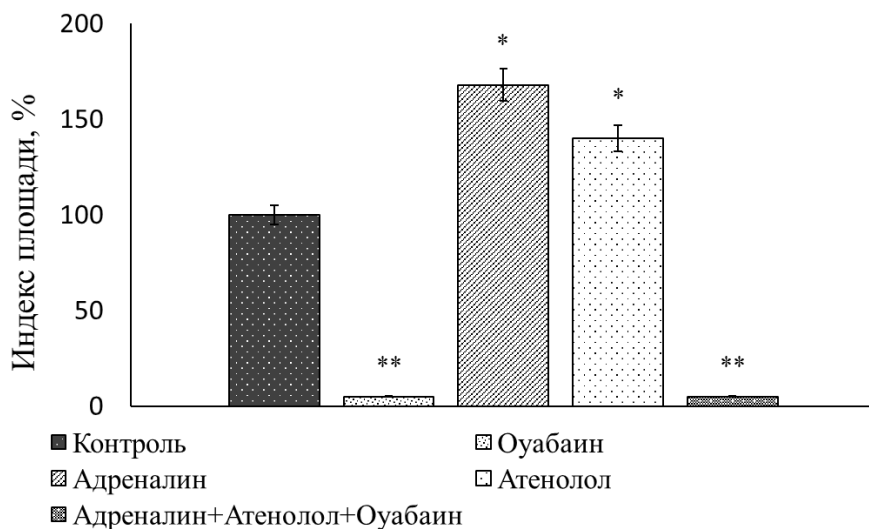


Рисунок 8.

Адреналин (10^{-12} М) не устраняет ингибирующий рост эксплантатов ткани сердца эффект оубаина (10^{-8} М) на фоне блокатора β_1 -адренорецепторов атенолола (10^{-4} М), * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, достоверные различия относительно контроля.

В отличие от ткани сердца, при культивировании эксплантатов ткани кости в среде, содержащей адреналин (10^{-12} М) и оубаин в остеотоксической концентрации (10^{-6} М) ингибирующий эффект оубаина сохранялся. Он зарегистрирован также при культивировании эксплантатов в среде содержащей адреналин (10^{-12} М), атенолол (10^{-4} М) и оубаин (10^{-6} М) (рис. 9).

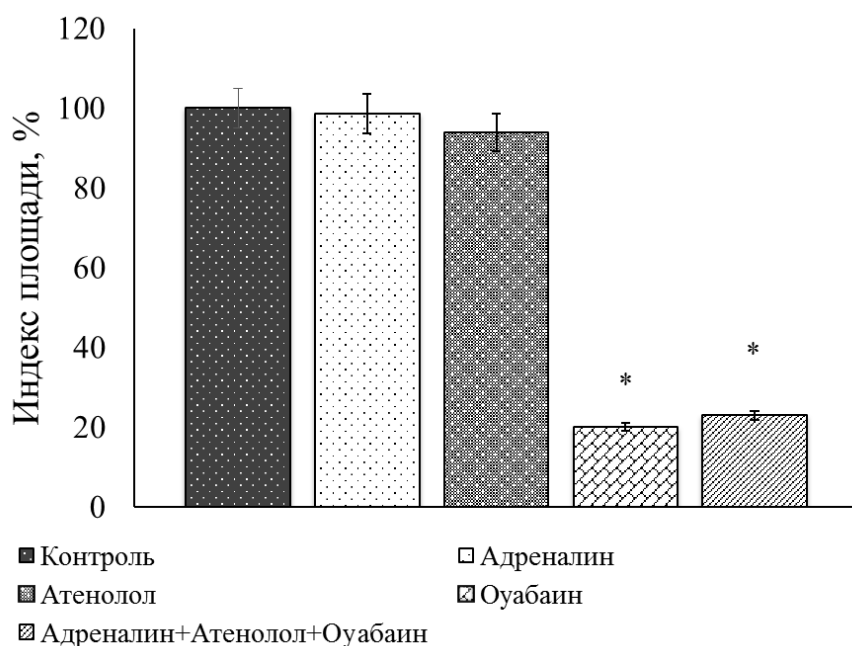


Рисунок 9.

Адреналин не оказывает влияния на сигнальную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы клеток ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов, * – $p < 0.05$, достоверные различия относительно контроля

Норадреналин (10^{-12} М) также как и адреналин (10^{-12} М) способен устранять блокирующее рост эксплантатов ткани сердца действие оубаина (10^{-8} М) рецептор-опосредованно через β_1 -адренорецепторы (рис. 10).

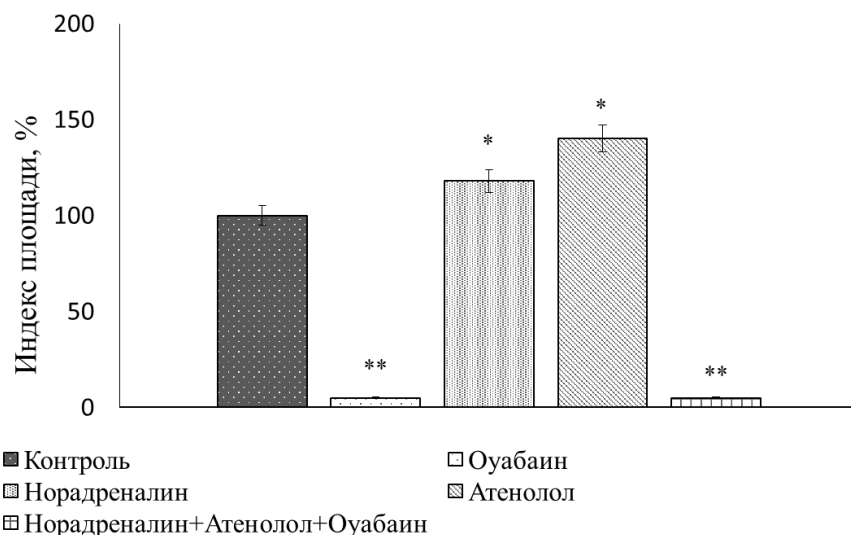


Рисунок 10.

В присутствии атенолола (10^{-4} М) норадреналин (10^{-12} М) не устраняет ингибирующее рост эксплантатов ткани сердца действие оубаина (10^{-8} М), * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, достоверные различия относительно контроля

Остеотоксический эффект оубаина (10^{-6} М) нивелировал норадреналин (10^{-6} М) (рис. 11). ИП экспериментальных эксплантатов практически не отличался от контрольного значения, что свидетельствует о модуляции сигнальной функции Na^+ , K^+ -АТФазы в ткани кости норадреналином.

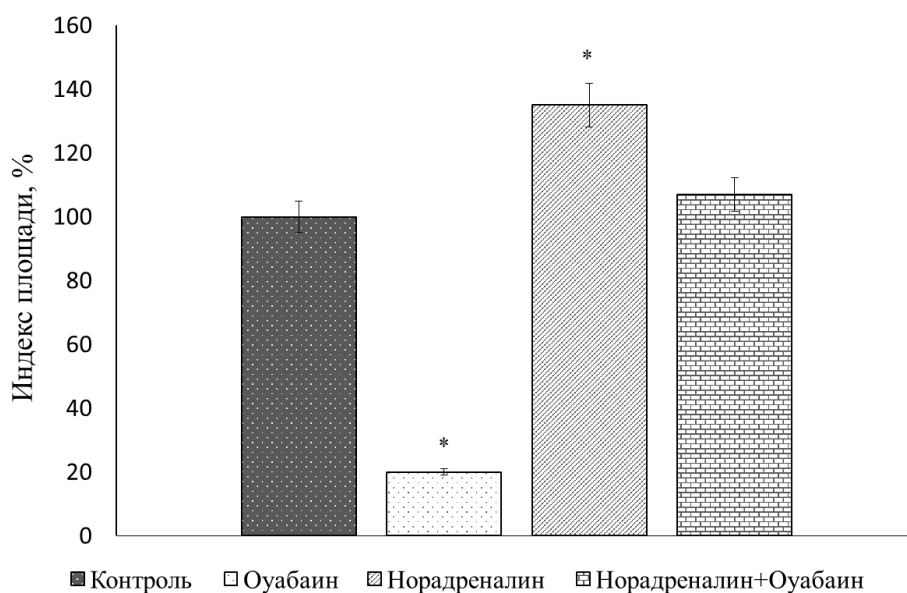


Рисунок 11.

Норадреналин (10^{-6} М) нивелирует остеотоксическое действие оубаина (10^{-6} М), * – $p < 0.05$, достоверные различия относительно контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Функционируя как трансдуктор сигналов, Na^+ , K^+ -АТФаза активирует сопряженные с ней мембранные белки и организованные ансамбли. Результатом такой активности фермента является направленная регуляция процессов клеточного роста и тканевого моделирования.

Модуляция сигнальной функции Na^+ , K^+ -АТФазы может осуществляться трансдуктор-опосредованно, то есть прямо, при взаимодействии с эндогенными

дигиталисоподобными факторами, либо может быть связана с трофотропными рецептор-опосредованными эффектами катехоламинов и колебаниями уровня гомоцистеина.

Проведенные исследования доказали возможность рецептор-опосредованной модуляции сигнальной функции Na^+ , K^+ -АТФазы адреналином в клетках ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов с участием β_1 -адренорецепторов. Модулирующее Na^+ , K^+ -АТФазу действие адреналина является тканеспецифичным, поскольку в эксплантатах ткани кости адреналин влияния на трансдукторную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы не оказывал.

Норадреналин участвует в рецептор-опосредованной модуляции сигнальной функции Na^+ , K^+ -АТФазы как в клетках ткани сердца (через β_1 -адренорецепторы), так и в клетках ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов. Регуляция трансдукторной функции Na^+ , K^+ -АТФазы в клетках ткани кости норадреналином связана, по-видимому, с активацией α_1 -адренорецепторов.

ВЫВОДЫ

1. Впервые в условиях органотипического культивирования ткани с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии доказано, что клетки зоны роста эксплантатов ткани сердца и кости формируют многомерную структуру и содержат β_1 -адренорецепторы, α_1 - и α_3 -изоформы Na^+ , K^+ -АТФазы.
2. Оуабаин, в отличие от дигоксина, стимулирует процесс роста и пролиферации клеток зоны роста исследуемых тканей в эндогенной концентрации 10^{-10} М. Действие дигиталисоподобных факторов дозозависимо и тканеспецифично.
3. Исследования с помощью метода органной культуры ткани и фармакологический анализ свидетельствуют о том, что кардио- и остеотоксические эффекты гомоцистеин тиолактона опосредованы его действием на насосную функцию Na^+ , K^+ -АТФазы.

4. В условиях органотипического культивирования ткани сердца показано, что трофотропный эффект катехоламинов реализуется при участии β_1 -адренорецепторов.
5. Норадреналин, в отличие от адреналина, обнаружил остеостимулирующий эффект. Трофотропное действие норадреналина не связано с активацией β -адренорецепторов. Остеоингибирующий эффект катехоламинов основан на взаимодействии с β_2 -адренорецепторами.
6. Проведенные исследования показали, что катехоламины рецептор-опосредованно модулируют трансдукторную функции Na^+ , K^+ -АТФазы. Их действие тканеспецифично и реализуется при участии как β_1 -, так и α -адренорецепторов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК

1. E.V. Lopatina, A.V. Kipenko, V.A. Penniyaynen, **N.A. Pasatetskaya**, D. Djurich Organotypic tissue culture investigation of homocysteine thiolactone cardiotoxic effect // Acta Physiologica Hungarica. – 2015. – V. 102 (2), – P. 137–142.
2. Е.В. Лопатина, А.В. Кипенко, В.А. Пеннийянен, **Н.А. Пасатецкая**, В.А. Цырлин Использование метода реконструкции оптических срезов для оценки трофотропных эффектов адреналина и атенолола // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2015. – Т. 101. – № 9. – С. 1022-1031.
3. Лопатина Е.В., Кипенко А.В., Пеннийянен В.А., **Пасатецкая Н.А.**, Цырлин В.А. Ремоделирование сердечно-сосудистой системы: причины и следствия // Успехи физиологических наук. – 2016. – №2. – С.45-61.
4. Lopatina E.V., Kipenko A.V., **Pasatetskaya N.A.**, Penniyaynen V.A., Krylov B.V. Modulation of the transducer function of Na^+ , K^+ -ATPase: new mechanism of heart remodeling // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2016. – V. 94(10). – P. 1110-1116.
5. Божкова С.А., **Пасатецкая Н.А.**, Кипенко А.В., Пеннийяненн В.А., Полякова Е.М., Лопатина Е.В. Изучение эффектов ванкомицина в условиях органотипической культуры костной ткани // Трансляционная медицина. – 2016. – Т. 3. – №5. – С. 113-119.
6. **Пасатецкая Н.А.**, Лопатина Е.В., Кипенко А.В., Рубанова Н.С., Цырлин В.А. Реализация трофотропного эффекта катехоламинов в культуре возбудимых и невозбудимых тканей эволюционно различающихся животных // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2018. – Т. 104. – № 5. – С. 590-599.

Публикации в журналах и материалах конференций

7. **Пасатецкая Н. А.**, Кипенко А. В., Лопатин А. И., Полякова Е.М., Лопатина Е. В. Сравнительный анализ влияния фосфомицина и ванкомицина на рост ткани кости в условиях органотипического культивирования // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2016. – № 4. – С. 43- 47.

8. **Пасатецкая Н. А.**, Лопатин А. И., Кипенко А. В., Лопатина Е. В. Изучение токсического эффекта гомоцистеин тиолактона в условиях органотипического культивирования ткани кости // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2017. – №1. – С.6-11.
9. **Пасатецкая Н. А.**, Лопатин А. И., Кипенко А. В., Лопатина Е. В. Ремоделирование костной ткани: возможный вклад адреналина // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2017. – №4 (56). – С. 47-50.
10. Лопатина Е.В., Кипенко А.В., Пенниайнен В.А., **Пасатецкая Н.А.**, Цырлин В.А. Использование оптических срезов для оценки фармакологической активности лекарственных препаратов в условиях органотипического культивирования // Тезисы докладов XXII съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова, Волгоград, Россия, 16-20 сентября 2013. – С. 304.
11. Kipenko A.V., Lopatina E.V., Penniaynen V.A., **Pasatetskaya N.A.**, Tsyrlin V.A. Using high-tech methods of research for the evaluation of the pharmacological activity of the drugs substances in organotypical cell culture // RUSSIA-NATO Advanced Research Workshop on «Prevention of Free Radical Mediated Cardiovascular Injuries due to Radiation, Chemical and Biological Agents», Saint-Peterburg, Russia, 2-4 october, 2013. – P. 10-11.
12. **Пасатецкая Н.А.** Лопатина Е.В. Возможная роль Na^+ , K^+ -АТФазы в реализации трофотропных эффектов катехоламинов // Тезисы молодежной школы-конференции «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций», Москва, Россия, 19 сентября 2015. – С. 21.
13. **Пасатецкая Н. А.** Возможная роль Na^+ , K^+ -АТФазы в реализации трофотропных эффектов катехоламинов // Двадцатая Санкт-Петербургская Ассамблея молодых ученых и специалистов: Сборник тезисов – СПб.:СПбГУПТДб 2015. – С. 92.
14. **Пасатецкая Н. А.**, Лопатин А. И. Анализ токсических эффектов гомоцистеин тиолактона в условиях органотипического культивирования эксплантатов ткани сердца и кости // Материалы XIV Всероссийской молодежной научной конференции, Сыктывкар, Республика Коми, Россия, 25-27 апреля 2016 г. – С. 80.
15. **Пасатецкая Н.А.**, Кипенко А.В., Лопатина Е.В. Фармакологический анализ эффектов гомоцистеин тиолактона в эмбриогенезе. Опыты *in vitro* // Адаптация развивающегося организма: материалы XIII Международной школы – конференции. 9-13 июня 2016г. – Казань. – С. 88.
16. **Пасатецкая Н.А.**, Лопатина Е.В. Анализ вклада катехоламинов в регуляцию роста ткани сердца теплокровных животных, находящихся на различных этапах онтогенеза // Материалы III Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» к 110-летию со дня рождения академика А.В. Иванова. 26-28 сентября 2016г. – СПб: ЗИН РАН. 2016. – С. 93.
17. **Н.А. Пасатецкая**, А.В. Кипенко, В.А. Пенниайнен, Е.В. Лопатина Рецептор-опосредованная модуляция сигнальной функции Na^+ , K^+ -АТФазы // Санкт-Петербургский научный форум посвященный 100-летию Физиологического общества им И.П. Павлова. 17-19 апреля 2017 г. – Санкт-Петербург. – С.80.
18. Лопатина Е.В., Соколова М.Г., Кипенко А. В., **Пасатецкая Н. А.**, Пенниайнен В.А. Физиологические основы патогенеза спинальной мышечной атрофии 2-го типа: индивидуальный подход к фармакокоррекции заболевания. 100-летие Физиологического общества им. И.П.Павлова. Санкт-Петербургский научный форум. Санкт-Петербург, 17-19 апреля 2017г.[тез.докл.] – [СПб:]. - С.60-61.
19. **Пасатецкая Н. А.**, Лопатин А. И., Кипенко А. В., Лопатина Е. В. Анализ трофотропных эффектов катехоламинов в культуре возбудимых и невозбудимых тканей // III Всероссийская (XVIII) молодежная научная конференция «Молодежь и наука на Севере», Сыктывкар, 12-14 марта 2018 г. – С. 165.
20. **Пасатецкая Н.А.**, Гонотков М. А., Лебедева Е.А. Возможный механизм кардиотоксического действия гомоцистеин тиолактона: опыты *in vitro* // Материалы

- XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 12-13 апреля 2018 г. – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2018. – С. 180.
21. **Пасатецкая Н.А.**, Лопатин А.И. Трофотропные эффекты катехоламинов в эмбриогенезе: роль бета адренорецепторов // Материалы XXV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием "Актуальные проблемы биомедицины – 2019", Санкт-Петербург, 28-29 марта 2019 г., – С. 155-156.