

УДК 612.815

© Коллектив авторов, 2003.

А.Н.Васильев, В.В.Кравцова, А.В.Прокофьев, Е.В.Ващинкина, И.И.Кривой ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ТЕСТИРОВАНИЯ СЕРДЕЧНЫХ ГЛИКОЗИДОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К $\alpha 2$ ИЗОФОРМЕ Na,K-АТФазы

Санкт-Петербургский государственный университет
Санкт-Петербург, Россия

Аннотация: Опыты проводили на изолированных препаратах диафрагмы крысы (экспрессирующих $\alpha 1$ и $\alpha 2$ изоформы Na,K-АТФазы) и препаратах очищенной Na,K-АТФазы почек овцы ($\alpha 1$ изоформа). Показано, что ацетилхолин (100 нМ) не влияет на активность Na,K-АТФазы почек овцы, но существенно увеличивает электрогенный вклад $\alpha 2$ изоформы в мембранный потенциал покоя скелетных мышечных волокон диафрагмы крысы. Эффективность оуабаина, блокирующего электрогенный вклад $\alpha 2$ изоформы, в присутствии ацетилхолина возрастает почти на порядок (аффинность достигает ~ 10 нМ). Предполагается, что данный методический подход может быть удобным чувствительным физиологическим тестом для сердечных гликозидов, селективных к $\alpha 2$ изоформе Na,K-АТФазы, считающейся ключевым регулятором кальциевого баланса в сердечной мышце.

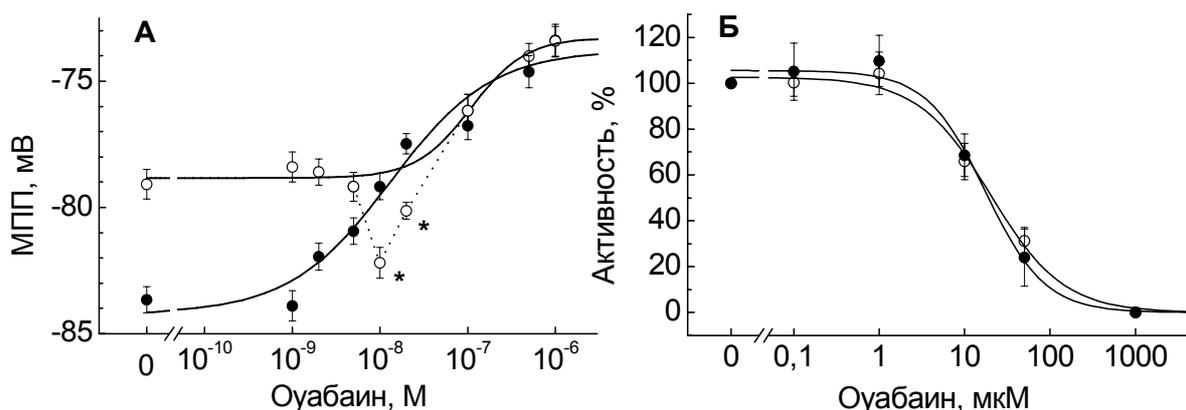
Ключевые слова: изоформы Na,K-АТФазы, сердечные гликозиды, оуабаин, эндогенные дигиталисоподобные факторы

Физиологическое действие сердечных гликозидов обусловлено их способностью связываться с наружным участком каталитической α -субъединицы Na,K-АТФазы и ингибировать ее активность [6, 9]. По последним данным, инотропное действие сердечных гликозидов (при частичном угнетении Na,K-АТФазы) обусловлено повышением внутриклеточной концентрации Na^+ и локальным накоплением Ca^{2+} в участках кластеризации регуляторных изоформ α -субъединицы Na,K-АТФазы с Na^+ , Ca^{2+} -обменником, различными Ca^{2+} -каналами и рецепторами в местах тесного прилегания плазматической мембраны к сарко (эндо) плазматическому ретикулуму и митохондриям [1, 7]. Для млекопитающих известны четыре изоформы α -субъединицы ($\alpha 1$ - $\alpha 4$), различающихся свойствами, а также чувствительностью к сердечным гликозидам. Предполагается, что основную насосную функцию в клетке выполняет изоформа $\alpha 1$, тогда как прочие являются вспомогательными (регуляторными) [6, 9]. Из тканей млекопитающих и человека выделены эндогенные дигиталисоподобные факторы (ЭДПФ), которые рассматривают как новый класс кардиостероидов, причем изоформы α -субъединицы, предположительно, являются специфичными рецепторами для ЭДПФ [2, 7]. Поскольку $\alpha 2$ изоформа считается ключевым регулятором кальциевого баланса в сердечной мышце [5], представляется важным выявление ингибиторов, специфичных к данной изоформе. Однако существующие подходы, как правило, основаны на оценке активности Na,K-АТФазы в препаратах тканей,

экспрессирующих единственную изоформу $\alpha 1$ (эритроциты, почки). Подход, использованный в данной работе, основан на данных об избирательной активации ацетилхолином (АХ) в низкой концентрации $\alpha 2$ изоформы Na,K-АТФазы в мышечных волокнах диафрагмы крысы [4].

Опыты проводили на изолированных препаратах диафрагмы самцов белых крыс в камере с проточным физиологическим раствором, азрируемым карбогеном при 28⁰С. Величину мембранного потенциала покоя (МПП) регистрировали во внесинаптическом районе мышечных волокон с помощью стандартной микроэлектродной техники. Активность Na,K-АТФазы оценивали спектрофотометрическим методом с использованием системы сопряженных ферментов (пируваткиназа-лактатдегидрогеназа) по концентрации восстановленного никотинамидаденинуклеотида при длине волны 340 нм (Beckman DU-7). В тексте и на рисунках приведены средние значения величин с ошибками, полученные в результате регистрации МПП более 100 волокон 4-6 мышц и измерения активности Na,K-АТФазы в 3-4 опытах в триплетах.

Скелетными мышечными волокнами экспрессируются $\alpha 1$ и $\alpha 2$ изоформы Na,K-АТФазы, аффинности которых к оуабаину у грызунов (в том числе у крысы) различаются на 2-3 порядка [6, 9]. В диапазоне до 1 мкМ оуабаин ингибирует только изоформу $\alpha 2$, что применяют в физиологических исследованиях для ее селективного подавления. Нами через 1 час инкубации мышц в растворе с оуабаином (1 нМ - 1 мкМ)



наблюдалась дозо-зависимая ($K_{0,5}=109\pm 39$ нМ) деполяризация мембраны волокон от исходного значения МПП $-78,9\pm 0,5$ мВ до величины $-73,3\pm 1,0$ мВ, то есть электрогенный вклад $\alpha 2$ изоформы в МПП составил в покое $5,6\pm 1,1$ мВ (рис. А). Отметим, что оубаин в концентрации 10-20 нМ вызывал гиперполяризацию волокон величиной 2-3 мВ (данные точки, отмеченные на рис. А звездочками, исключены из процедуры моделирования), что, так же как и в опытах на кардиомиоцитах [3], возможно объясняется активацией $\alpha 2$ изоформы Na,K-АТФазы. В присутствии АХ (100 нМ) исходная величина МПП была существенно выше ($-84,4\pm 0,7$ мВ), причем оубаин также вызывал дозо-зависимую деполяризацию мембраны волокон до того же уровня, что и в контроле: $-73,8\pm 1,0$ мВ. То есть электрогенный вклад $\alpha 2$ изоформы в этих условиях вырос до $10,4\pm 1,6$ мВ. Важно отметить, что величина $K_{0,5}$ блокирующего эффекта оубаина стала почти на порядок меньше по сравнению с контролем: 13 ± 6 нМ (рис. А). В опытах на препаратах очищенной Na,K-АТФазы почек овцы ($\alpha 1$ изоформа) величины $K_{0,5}$ для оубаина в контроле и в присутствии АХ не отличались: 20 ± 3 мкМ и 18 ± 3 мкМ, соответственно (рис. Б).

Рисунок. Зависимость МПП мышечных волокон диафрагмы крысы (А) и активности Na,K-АТФазы почек овцы (Б) от концентрации оубаина в контроле (светлые кружки) и в присутствии АХ в концентрации 100 нМ (темные кружки).

Таким образом, АХ (100 нМ) не влияет на активность $\alpha 1$ изоформы Na,K-АТФазы, но существенно увеличивает электрогенный вклад в МПП $\alpha 2$ изоформы скелетных мышечных волокон крысы. Эффективность блокирующего эффекта оубаина в присутствии АХ возрастает почти на порядок (аффинность достигает ~ 10

нМ), что можно объяснить, предположив, что при активации Na,K-АТФазы АХ-м (увеличение числа циклов в единицу времени) существенно возрастает вероятность связывания оубаина с Na,K-АТФазой. Подобный механизм описан [8]. Таким образом, в присутствии АХ может повышаться чувствительность $\alpha 2$ изоформы к сердечным гликозидам, что может быть удобным чувствительным физиологическим тестом для ее селективных ингибиторов. Выявление таких ингибиторов важно не только для сердечной мышцы, но и для других тканей, экспрессирующих $\alpha 2$ изоформу Na,K-АТФазы, в том числе для скелетных мышц, где эта изоформа, предположительно, участвует в холинергической регуляции мышечного электрогенеза и находится под контролем ЭДПФ [4].

Работа поддержана РФФИ 01-04-49799, программы «Университеты России» УР.07.01.030

Литература

1. Arnon A., Hamlyn J.M., Blaustein M.P. Ouabain augments Ca^{2+} transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na^+ . Am.J.Physiol. 279: H679-H691. 2000.
2. Doris P.A., Bagrov A.Y. Endogenous sodium pump inhibitors and blood pressure regulation: an update on recent progress. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 218: 156-167. 1998.
3. Gao J., Wymore R.S., Wang Y., Gaudette G.R., Krukenkamp I.B., Cohen I.S., Mathias R.T. Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. J.Gen.Physiol. 119: 297-312. 2002.
4. Krivoi I.I., Vasiliev A.N., Kravtsova V.V., Dobretsov M., Mandel F. Porcine kidney extract contains factor(s) that inhibit the ouabain-sensitive isoform of Na,K-ATPase ($\alpha 2$) in rat skeletal muscle: a convenient electrophysiological assay. Ann. N.Y. Acad. Sci. 986: 639-641. 2003.
5. Mathias R.T., Cohen I.S., Gao J., Wang Y. Isoform-specific regulation of the Na^+K^+ pump in heart.

News Physiol. Sci. 15: 176-180. 2000.

6. Mobasheri A., Avila J., Cozar-Castellano I., Brownleader M.D., Trevan M., Francis M.J.O., Lamb J.F., Martin-Vasallo P. Na⁺,K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. Biosci. Reports. 20 (2): 51-91. 2000.

7. Schonher W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. Eur. J.Biochem. 269: 2440-2448. 2002.

8. Stimers J.R., Lobaugh L.A., Liu S., Shigeto N. Lieberman M. Intracellular sodium affects ouabain interaction with the Na/K pump in cultured chick cardiac myocytes. J.Gen.Physiol. 95: 77-95. 1990.

9. Sweadner K.J. Na,K-ATPase and its isoforms // In: Neuroglia (eds. Kettenmann H., Ransom B.R.). Oxford University Press. New York, Oxford: 259-272. 1995.

Vasiliev A.N., Kravtsova V.V., Prokofiev A.V., Vaschinkina E.V., Krivoi I.I.

PHYSIOLOGICAL MODEL FOR CARDIAC GLYCOSIDES TESTING: SPECIFIC INHIBITORS OF $\alpha 2$ -isoformE Na,K-TPase

Saint-Petersburg State University

Saint-Petersburg, Russia

The experiments were made on isolated preparations of rat diaphragm (which express $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -isoform of Na,K-ATPase) and purified Na,K-ATPase from lamb kidney ($\alpha 1$ -isoform). It has been found that acetylcholine (100 nM) does not affect the activity of kidney Na,K-ATPase. However, in rat skeletal muscle fibers it increases electrogenic component of resting membrane potential due to an activation of $\alpha 2$ -isoform of the Na,K-ATPase. In the presence of 100 nM acetylcholine efficacy of ouabain which inhibits $\alpha 2$ -isoform electrogenic component increases by an order of magnitude (~10 nM). This method is considered to be convenient physiological assay for testing cardiac glycosides which selectively inhibit $\alpha 2$ -isoform of the Na,K-ATPase – a major regulator of calcium balance in cardiac muscle.

Кривой Игорь Ильич - доктор биологических наук, заведующий лабораторией нервно-мышечной физиологии, кафедра общей физиологии Санкт-Петербургского государственного университета.

Igor I. Krivoi - Doctor of Biological Sciences, Dept of General Physiology of Saint-Petersburg State University

Correspondence: IgorKrivoi@IK4251.spb.edu