

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт физиологии им. И.П. Павлова  
Российской академии наук

*На правах рукописи*

**Пасатецкая Наталья Анатольевна**

**Рецептор-опосредованная модуляция сигнальной функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -  
АТФазы**

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Е.В. Лопатина

Санкт-Петербург  
2019

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -АТФаза и ее роль в эмбриогенезе.....	12
1.1.1 Структура Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -АТФазы.....	13
1.1.2 Эндогенные кардиотонические стероиды.....	14
1.1.3 Насосная функция Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -АТФазы .....	16
1.1.4 Трансдукторная функция Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -АТФазы.....	17
1.2 Гомоцистеин и его производные.....	19
1.2.1 Морфологические изменения в скелете при гипергомоцистеинемии.....	21
1.2.2 Морфологические изменения в сердечно-сосудистой системе при гипергомоцистеинемии.....	22
1.2.3 Гипергомоцистеинемия и ремоделирование тканей.....	24
1.2.4 Взаимодействие гомоцистеина с Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -АТФазой.....	26
1.3 Вклад симпатической нервной системы в процессы пренатального онтогенеза.....	28
1.3.1 Адаптационно-трофическая функция симпатической нервной системы.....	28
1.3.2 Влияние катехоламинов на ремоделирование ткани сердца.....	30
1.3.3 Влияние катехоламинов на ремоделирование ткани кости.....	33
1.3.4 Модуляция насосной функции Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -АТФазы через адренергические сигнальные пути.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1 Характеристика объектов исследования.....	37
2.1.1 Морфология сердца в эмбриогенезе.....	37
2.1.2 Морфология кости в эмбриогенезе.....	38
2.2 Метод органотипического культивирования ткани.....	40
2.2.1 Методика препаровки ткани сердца и кости.....	41
2.3 Микроскопические исследования.....	43
2.4 Иммуногистохимические методы исследования.....	49

2.5 Оценка толщины зоны роста контрольных и экспериментальных эксплантатов.....	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	54
3.1 Участие $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФазы в ремоделировании ткани сердца и кости.....	54
3.2 Исследование гомоцистеин тиолактона в условиях органотипического культивирования ткани сердца и кости.....	58
3.3 Оценка эффектов катехоламинов в условиях органотипического культивирования ткани сердца и кости.....	64
3.3.1 Изучение эффектов адреналина.....	64
3.3.2 Изучение эффектов норадреналина.....	76
3.4. Участие катехоламинов в рецептор-опосредованной модуляции трансдукторной функции $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФазы.....	83
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	89
ВЫВОДЫ.....	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

## ВВЕДЕНИЕ

### 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  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза.

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

Активное изучение участия  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза модулирует ноцицептивный сигнал в ансамбле опиоидоподобный рецептор- $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза-медленный натриевый канал семейства  $\text{Na}_v1,8$ . (Krylov et al., 1999; Лопатина, Поляков, 2011).

Эндогенные гликозиды модулируют сигнальную функцию  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы трансдуктор-опосредованно, то есть прямо, регулируя ее активность. Многочисленные данные свидетельствуют, что  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза участвует в образовании мультимолекулярного сигнального комплекса, включающего Src-киназу, рецептор эпидермального фактора роста,  $\text{Ca}^{2+}$ - 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  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы катехоламинами.

### **Научная новизна**

Разработана оригинальная авторская методика органотипического культивирования костной ткани 10-12-дневных куриных эмбрионов.

Комплексный подход, основанный на использовании метода органотипического культивирования ткани, фармакологического анализа и метода реконструкции оптических срезов впервые позволил оценить участие  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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  $\beta_1$ -адренорецепторы. Стимулирующее рост эксплантатов ткани кости действие норадреналина, по-видимому, опосредовано  $\alpha$ -адренорецепторами. Остеотоксическое действие адреналина и норадреналина в концентрации  $10^{-4}$  М связано с активацией  $\beta_2$ -адренорецепторов.

В условиях органотипического культивирования ткани сердца впервые доказана возможность модуляции сигнальной функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы адреналином рецептор-опосредованно, через  $\beta_1$ -адренорецептор. В органной культуре костной ткани адреналин влияния на трансдукторную функцию  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы не оказывает.

Норадреналин рецептор-опосредованно модулирует сигнальную функцию  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы как в клетках ткани сердца (через  $\beta_1$ -адренорецепторы), так и в клетках ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов (предположительно, через  $\alpha_1$ -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. 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.

До настоящей работы считалось, что клетки зоны роста в органной культуре формируют монослой (Коновалов и др., 1977; Хавинсон и др., 2012).

### **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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -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 выявить механизмы, 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 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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы.
4. Катехоламины модулируют трансдукторную функцию  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -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 использованием морфометрического критерия – индекса площади, позволяет оценить изменение процессов клеточного роста и пролиферации в плоскости. Использование лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 710 в сочетании с иммуногистологическими 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).

По материалам диссертации опубликовано девять статей, в том числе четыре статьи в журналах из перечня ВАК, четыре статьи в базе данных WoS и Scopus, двенадцать тезисов.

### **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 40 работ отечественных и 154 зарубежных авторов.

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.

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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФаза и ее роль в эмбриогенезе

Адаптация организма к различным внутриутробным воздействиям увеличивает шансы на выживание, но изменяет нормальное развитие органов и систем организма. Фетальное программирование представляет собой физиологическое изменение (увеличение или угнетение) функций в критическом периоде развития плода, сопровождающееся отдаленными последствиями для организма (Lucas, 1991). Активно исследуется связь между особенностями течения внутриутробного периода, антропометрическими показателями новорожденных и последующим развитием во взрослом возрасте гипертензии и ряда других заболеваний (Barker, 1990; Law, Shiell, 1996; White et al., 2009; Huxley et al., 2000). Среди неблагоприятных воздействий на плод, с которыми наиболее часто сталкиваются беременные женщины, выделяют: нарушение маточно-плацентарного кровотока, сопровождающееся гипоксией плода и развитием преэклампсии, и нарушение поступления нутриентов с пищей.

На протяжении многих лет преэклампсия является одной из серьезных мультисистемных патологических осложнений беременности. По различным данным частота распространенности преэклампсии в мире от 2,3 до 23%, в России 13-16% (Доброхотова и др., 2015). Единственным методом лечения тяжелой степени преэклампсии на сегодняшний день является родоразрешение независимо от срока гестации. При средней и легкой степени тяжести используется медикаментозная терапия и пролонгирование беременности. Особую роль в формировании артериальной гипертензии и преэклампсии могут играть эндогенные кардиотонические стероиды (Яковлева и др., 2011; Ишкараева и др., 2015; BUCKALEW, 2018). Единственным рецептором для кардиотонических стероидов является Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФаза (Bagrov, 2009).

#### 1.1.1 Структура Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу открыл датский химик J. C. Skou в 1957 году. Его эксперименты впервые показали существование в клеточной мембране белковой структуры перекачивающей ионы натрия из клетки и ионы калия в клетку (Bagrov, 2009).

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза состоит из двух субъединиц  $\alpha$ - и  $\beta$ -.  $\alpha$ -субъединица (110 kDa) состоит из 10 трансмембранных сегментов и содержит участки связывания с АТФ, ионами  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , формирует сайт связывания для кардиотонических стероидов. Регуляторная  $\beta$ -субъединица (50 kDa) состоит из одного трансмембранного домена и играет важную роль в трансляции, транспорте и стабилизации  $\alpha$ -субъединицы в плазматической мембране. Обнаружено семь дополнительных белков, получивших название по их консервативной последовательности FX $\gamma$ D, состоящих из одного трансмембранного домена. Эти белки связываются со специфическими доменами  $\alpha/\beta$ -субъединичного комплекса и модулируют каталитические свойства  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы (Bagrov, 2009).

В сердце обнаружены три  $\alpha$ -изоформы и три  $\beta$ -изоформы, сочетающихся друг с другом в любых комбинациях.  $\alpha$ -изоформы идентичны между собой приблизительно на 87% (Pierre, Xie 2006).  $\alpha_1$ -субъединица  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы присутствует в тканях сердца животных всех видов, в то время как распределение  $\alpha_2$ - и  $\alpha_3$ -субъединиц носит видоспецифичный характер. Например, в сердце взрослых грызунов экспрессируются  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -изоформы, в сердце собак и обезьян экспрессия  $\alpha_2$ -субъединицы не обнаружена. В тканях сердца человека зарегистрированы все изоформы  $\alpha$ -субъединицы. (Despa, Bers 2007). Локализация и функциональная плотность  $\alpha$ -субъединицы в мембране кардиомиоцитов также различается между видами (McDonough et al., 1996; Silverman et al., 2005; Despa, Bers 2007).

Информация о локализации и субъединичном составе  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в клетках кости ограничена.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза обнаружена в большом количестве на базолатеральной поверхности, в светлой зоне и в зоне гофрированной каемки остеокластов птиц, что свидетельствует о важной роли фермента в

ремоделировании костной ткани (Akisaka, Gay, 1986; Baron et al., 1986). Однако в данных исследованиях субъединичный состав  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы не определялся. В дальнейшем на клетках линии RAW264.7 (предшественниках остеокластов) удалось продемонстрировать экспрессию  $\alpha_1$ - и  $\beta_2$ -изоформ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы (Makihira et al., 2011). В остеобластоподобных клетках человека зарегистрирована экспрессия двух  $\alpha$ - ( $\alpha_1$ - и  $\alpha_3$ -) и двух  $\beta$ - ( $\beta_1$ - и  $\beta_2$ ) изоформ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы (Mobasher et al., 2000). Считается что основной физиологической ролью  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в остеобластах является поддержание гомеостаза  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  при формировании костной ткани (Francis et al., 2002).

### 1.1.2 Эндогенные кардиотонические стероиды

Кардиотонические стероиды или карденолиды состоят из стероидного ядра с ненасыщенным пятичленным лактонным кольцом в семнадцатом положении и сахаров, связанных с агликоном через углерод в третьем положении. Исследования зависимости между структурой и действием этих веществ показали, что лактонное кольцо и стероидное ядро в равной мере необходимы для проявления активности (Кацунг, 2008).

В 1991 году Hamlyn et al. выделили из плазмы крови человека стероид, не отличимый от оубаина растительного происхождения и названный эндогенным оубаином (Hamlyn et al., 1991). С тех пор эндогенный оубаин был так же выделен из бычьих надпочечников, гипоталамуса и клеток мозгового слоя надпочечников крыс (Федорова и др. 2008). Концентрация эндогенного оубаина в плазме крови человека колеблется в наномолярном диапазоне (0.6 до 1.2 нМ) (Hamlyn et al., 1991). Концентрация оубаина в плазме крови крыс может быть выше, поскольку  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза менее чувствительна к оубаину (Куценко, 2004). Эндогенный оубаин синтезируется в надпочечниках и выделяется под влиянием гормональных стимулов. Биосинтез происходит в клетках пучковой зоны (*zona fasciculata*) коры надпочечников, выделение происходит под действием адренкортикотропного гормона, агонистов  $\alpha_1$ -адренорецепторов и ангиотензина

II. Что свидетельствует о вовлечении симпатической нервной системы в процесс регуляции выделения оубаина в кровоток. Предшественниками эндогенного оубаина являются прогестерон и прегненолон. Ингибирование  $3\beta$ -гидроксистероид дигидрогеназы, участвующей в синтезе прогестерона, стимулирует секрецию эндогенного оубаина, так же как и добавление в культуру самого гормона (Schoner, 2002).

Goto et al. в 1990 году выделил субстанцию, не отличимую от дигоксина из мочи человека. Позднее другие исследователи показали, что бычьи надпочечники содержат дегликозированный аналог дигоксина (Bagrov et al., 2009). Путь синтеза дигоксина в клетках млекопитающих остается неизвестным. Полагают, что дигоксин может поступать с пищей и накапливаться в тканях надпочечников. Содержание эндогенного дигоксина в плазме возрастает при почечной недостаточности, у новорожденных, при гипертензии беременных и остром инфаркте миокарда. У крыс дигоксин препятствует гипертензиногенному эффекту оубаина, уменьшая активность ренина и ангиотензина II в плазме крови, уменьшает уровень эpineфрина и значительно увеличивает уровень предсердного и мозгового натрийуретического пептида (Schoner, 2002). Ряд исследований свидетельствует против антагонизма дигоксина и оубаина у человека (Bagrov et al., 2009).

Изоформы  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы различаются по чувствительности к кардиотоническим стероидам. Отличия в структуре кардиотонических стероидов обеспечивает разницу в связывании с рецептором (афинность, скорость ассоциации и диссоциации). Природа рецептора, тканевая и видовая специфичность, так же играют роль в разнообразии реализуемых эффектов. Например: у грызунов чувствительность изоформ  $\alpha$ - субъединицы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы к оубаину снижается в ряду  $\alpha_3 \gg \alpha_2 > \alpha_1$ . Однако  $\alpha_1$ -изоформа наиболее чувствительна к маринобуфагенину, а  $\alpha_3$  наименее чувствительна к данному стероиду. В миокарде желудочков крысы оубаин уменьшает экспрессию  $\alpha_1$ - субъединицы, дигоксин же не оказывает влияния на ее экспрессию (Dvela et al., 2007). Необходимо отметить что  $\alpha$ - субъединица  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -

АТФазы млекопитающих и птиц гомологична на 92-95% (Fambrough et al., 1983). Сравнительный анализ результатов экспериментов органотипического культивирования ткани сердца, спинальных ганглиев и сетчатки 10-12-дневных куриных эмбрионов доказал, что действие оубаина на рост исследуемых тканей является дозозависимым и тканеспецифичным. В сердце оубаин связывался с высокоафинной  $\alpha_3$ - субъединицей  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и стимулировал рост эксплантатов ткани сердца в концентрации  $10^{-10}$  М (Лопатина и др., 2005). В то время как в культуре спинальных ганглиев аналогичная концентрация оубаина вызывала 50% ингибирование роста нейритов (Пенниайнен и др., 2008). В экспериментах по культивированию эксплантатов ткани сетчатки оубаин в концентрации  $10^{-10}$  М практически не влиял на рост экспериментальных эксплантатов, однако оказывал трофотропное действие в более низких дозах ( $10^{-13}$  М) (Лопатина и др., 2008а).

### 1.1.3 Насосная функция $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФазы

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза имеет два основных конформационных состояния: E1 и E2. Связывание молекулы оубаина с рецептором на  $\alpha$ -субъединице стабилизирует фермент в конформации E2P, что является причиной остановки транспортной активности фермента.

Как ионный насос  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза регулирует объем и осмолярность клетки, рН и концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$ , поддерживает мембранный потенциал. Еще в перимплантационном периоде развития активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы играет важную роль в транспорте ионов  $\text{Na}^+$  в бластоцель и влияет на образование, распределение, проницаемость плотных контактов между трофобластическими клетками (Wiley 1984; Manejwala et al., 1989; Watson 1992; Violette et al., 2006; Giannatselis et al., 2011; Marikawa and Alarcon 2012). Адекватное накопление жидкости и расширение полости бластоцисты имеют решающее значение для взаимодействия между эмбрионом и эпителием матки во время имплантации (Camara et al., 2017).



### 1.1.4 Трансдукторная функция $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы

Долгое время считалось, что  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза в организме выполняет исключительно насосную функцию. В дальнейшем оказалось, что кардиотонические стероиды в низких концентрациях способны активировать  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазу и запускать внутриклеточные сигнальные каскады (Xie, 2001; Xie, Askari 2002; Xie, Cai, 2003; Schoner, Schiener-Bobis, 2005), участвовать в регуляции процессов клеточного роста и полиферации (Xie et al., 1999; Лопатина и др., 2005; 2008а; 2008б), модулировать ноцицептивный сигнал в ансамбле опиоидоподобный рецептор- $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза-медленный натриевый канал семейства  $\text{Na}_v1,8$ . (Лопатина, Поляков, 2011). Термин трансдуктор сигнала, описывающий возможное участие  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, в регуляции клеточного роста и экспрессии различных генов впервые был использован в 1999 г (Xie 2001).

В раннем эмбриогенезе задействована не только насосная, но и трансдукторная функция  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы. Экспериментально показано, что связывание оубаина с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой дозозависимо регулирует активацию Src-киназы и проницаемость плотных контактов в клетках трофэктодермы мыши во время преимплантационного развития (Giannatselis et al., 2011). Таким образом, трансдукторная функция  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы не менее важна для развития эмбриона. Эндогенный оубаин, циркулирующий в организме матери, оказывает значимое влияние на рост и развитие тканей и органов плода. Внутривнутрибрюшинное введение антител к оубаину беременным мышам снижало уровень оубаина в крови на 80% и вызывало значительное снижение массы тела потомства, увеличение сердца и угнетение роста почек и печени (Dvela-Levitt et al., 2015). Изучение эмбриональной почки подтвердило, что связывание оубаина с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой ведет к активации рецептора инозитол-3-фосфата ( $\text{IP}_3$ ), что в свою очередь вызывает серию медленных кальциевых осцилляций и активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa\text{B}$ , который защищает развивающуюся почку от неблагоприятных воздействий (Khodus et al., 2011). Также известно, что оубаин

дозозависимо регулирует рост нервной ткани и пролиферацию тканей сердца и сетчатки куриных эмбрионов (Лопатина и др., 2005; Пеннияйнен и др., 2008; Лопатина и др., 2008a).

Обнаружение  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в кавеолах и наличие кавеолин-связывающих доменов на  $\alpha$ -субъединице (Liu, Xie, 2010), привело к созданию модели «Signalosome». В соответствии с этой моделью  $\alpha$ -субъединица  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы является компонентом мультимолекулярного сигнального комплекса, включающего кавеолин, Src-киназу, рецептор эпидермального фактора роста,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -обменник,  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы различного типа, фосфолипазу C,  $\text{IP}_3$ -рецептор и другие рецепторы (Кривой, 2014).

Важнейшим и наиболее изученным белком, участвующим в реализации трансдукторной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, является Src-киназа.  $\alpha_1$ -субъединица  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы непосредственно взаимодействует с Src-киназой и формирует функциональный рецепторный комплекс (Tian et al., 2006; Liu, Xie, 2010). Исходно комплекс  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза/Src-киназа находится в неактивном состоянии, однако связывание оубаина с  $\alpha$ -субъединицей  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы вызывает конформационные изменения фермента, что ведет к фосфорилированию Src-киназы (Xie, 2003) и диссоциации киназного домена от  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы. Необходимо отметить, что данный эффект оубаина не зависит от полного угнетения транспортной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы (Pierre, Xie, 2006).

В различных типах клеток обнаружены 2 пути, запускаемые оубаином, связанные с клеточным ростом: EGFR/Src-Ras-ERK путь и PI3K1A-PDK-Akt путь. В клетках, способных к пролиферативному росту оубаин вызывает как стимуляцию, так и ингибирование роста в зависимости от типа клеток. В высокодифференцированных кардиомиоцитах, в которых низкие (не токсичные) концентрации оубаина вызывают гипертрофический рост, эти два пути активируются параллельно, но только PI3K1A-PDK-Akt путь отвечает за гипертрофию клеток (Wu 2013).

## 1.2. Гомоцистеин и его производные

Во время беременности особую роль играет фолиевая кислота (витамин В9). Витамин В9 участвует в регуляции формирования плаценты, роста и дифференцировки тканей кровеносной, иммунной и нервной систем плода, предотвращает развитие различных пороков у ребенка. При нарушении поступления нутриентов с пищей особое место занимает проблема коррекции фолатдефицитных состояний. Дефицит фолиевой кислоты как и других витаминов группы В, обнаруживается у 40-60% жителей России (Бицадзе и др., 2016). Необходимо отметить, что даже незначительный дефицит фолатов провоцирует развитие гипергомоцистеинемии – важного фактора осложненного течения беременности и развития врожденной патологии плода.

Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, не входящая в структуру белков и принимающая участие в метиленовом цикле, является промежуточным продуктом трансметиляции. Гомоцистеин был выделен в 1932 году. Состояния, сопровождающиеся гипергомоцистеинемией и гомоцистеинурией, впервые были описаны в 1962 году при обследовании детей с нарушением умственного развития (Gerritsen, 1962). При этой патологии наблюдается марфаноподобный фенотип, поражение зрения и склонность к тромбозам любой локализации. Содержание гомоцистеина в плазме крови в норме составляет от 5 до 15 мкм/л (Perla-Kaján et al., 2007, Steed and Tyagi, 2011), подчиняется циркадианному ритму и коррелирует с возрастом и полом. У взрослых, по сравнению с детьми, содержание гомоцистеина повышено в два раза. У мужчин его концентрация на 20% выше, чем у женщин, однако скорость нарастания уровня гомоцистеина у женщин выше. После наступления менопаузы различия нивелируются. При концентрации гомоцистеина в плазме крови 15– 30 мкм/л диагностируется умеренная гипергомоцистеинемия; при 30–100 мкм/л – гипергомоцистеинемия средней тяжести, а выраженная гипергомоцистеинемия свыше 100 мкм/л (Чокинэ и др., 2011).

Источником гомоцистеина в клетке является метионин – незаменимая аминокислота, поступающая в организм с продуктами питания. При

взаимодействии метионина с АТФ образуется S-аденозилметионин. Метильная группа S-аденозилметионина непосредственно переносится на акцептор с образованием S-аденозилгомоцистеина, который является непосредственным предшественником гомоцистеина. Катаболизм S-аденозилгомоцистеина осуществляется с помощью S-аденозилгомоцистеин гидролазы и приводит к образованию гомоцистеина и аденозина (Плоцкий 2009). Дальнейшие превращения гомоцистеина связаны с реметилированием или транссульфурированием. При отрицательном балансе метионина гомоцистеин подвергается реметилированию метионин синтазой с образованием метионина или гомоцистеин метилтрансферазой с образованием бетаина (Perla-Kaján et al., 2007). Реметилирование широко распространено во всех тканях организма, особенно активно оно происходит в печени и почках. При достаточном уровне метионина гомоцистеин подвергается транссульфурированию и превращается цистатионин  $\beta$ - синтазой в цистеин. Пути транссульфурирования представлены только в печени, почках, поджелудочной железе и тонком кишечнике (Steed and Tyagi, 2011).

Гомоцистеин метаболизируется метионил-тРНК синтазой с образованием гомоцистеин тиолактона. Гомоцистеин тиолактон вызывает апоптоз эндотелиальных клеток независимо от каспазного пути. Продуцируемый внутри клеток гомоцистеин тиолактон может секретироваться, подвергаться гидролизу и включаться во внутриклеточные и внеклеточные белки. Внутримолекулярные тиоэфирные связи гомоцистеин тиолактона способны к нуклеофильным реакциям, особенно со свободными аминогруппами остатков лизина в белках. Его включение в белки (N-гомоцистеинилирование) приводит к нарушению их структуры и потере функции (Perla-Kaján et al., 2007). N-гомоцистеинилирование увеличивает чувствительность белков к окислительному стрессу, вызывает формирование токсических амилоидо-подобных протофибрил и стимулирует аутоиммунный ответ (Zivkovic et al., 2013).

В норме содержание гомоцистеин тиолактона в плазме крови у человека варьируется от 0 до 34,8 nmol/L и составляет 0,002-0,3% от общего гомоцистеина (Rašić-Marković et al., 2009).

Молекулы гомоцистеина и гомоцистеин тиолактона свободно проникают через плаценту и оказывают тератогенное и фетотоксичное действие. На ранних этапах развития наиболее уязвимы к токсическому действию гомоцистеина и его производных ткани сердца, кости, печени и нервной системы (Robert et al 2003).

Впервые предположение о наличии связи между гипергомоцистеинемией и заболеваниями костей было выдвинуто в 1966 году, когда McKusick обнаружил нарушение структуры коллагена у пациентов с гомоцистеинурией (McKusick 1966). А исследование возможной роли гомоцистеина в развитии сердечно-сосудистых заболеваний началось с работ McCully в 1969 году, которые показали предрасположенность к атеротромбозу пациентов с тяжелой гипергомоцистеинемией (McCully, 1969).

### **1.2.1 Морфологические изменения в скелете при гипергомоцистеинемии**

Первая модель тяжелой гипергомоцистеинемии, созданная с помощью генетической инженерии, была описана в 1995 году. Гомозиготные мутанты, у которых отсутствовал фермент цистатионин- $\beta$ -синтаза ( $CBS^{-/-}$ ), имели уровень гомоцистеина в 40 раз превышающий нормальное значение, выраженную задержку роста, ожирение печени и высокий уровень смертности в течение 5 недель после рождения (Watanabe et al., 1995). В тканях кости на ранних стадиях развития цистатионин- $\beta$ -синтаза экспрессируется в хондробластах в зоне начала оксификации кости. У взрослых мышей синтез фермента регистрируется в надхрящнице и надкостнице. Изучение развития скелета мышей линии  $CBS^{-/-}$  проведенной Robert et al. показало, что в процессе эндохондральной оксификации формируются укороченные кости. В возрасте 1 месяца регистрируется расширение ростовой пластины с нарушением расположения хондроцитов и

задержкой их дифференциации (Robert et al., 2005). В возрасте 3 месяцев бедренные и большеберцовые кости CBS<sup>-/-</sup> мышей были меньше по сравнению с контролем, в то время как плечевые и локтевые кости не отличались от контрольных значений. Другие скелетные аномалии включали кифосколиоз и арахнодактилию (Robert et al., 2005).

В качестве модели умеренной и промежуточной степени гипергомоцистеинемии как правило используют экспериментальных животных содержащихся на диете богатой метионином или гомоцистеином (Levasseur, 2009). Через 12 недель у крыс, содержащихся на диете богатой гомоцистеином, уровень гомоцистеина в плазме крови был в 10 раз выше, чем в контрольной группе. Гистологическое исследование бедренных костей показало сильную потерю трабекулярной костной массы (93% в области дистальной части бедренной кости и 52% в области шейки бедра) (Hertmann et al., 2007a). В другом исследовании у цыплят, содержащихся на диете обогащенной гомоцистеином в течение 8 недель, наблюдалось значительное увеличение веса, продольное и радиальное увеличение большеберцовых костей с выраженной оссификацией эпифизов (Masse et al., 2003).

Поскольку гомоцистеин свободно проникает через плаценту, для оценки влияния умеренной гипергомоцистеинемии на структуру эпифизарного хряща в эмбриогенезе Azizi et al. исследовали новорожденных крысят, чьи матери содержались на диете богатой гомоцистеином. Обнаружена умеренная потеря трабекулярной массы, связанная с эндохондральной оссификацией (Azizi et al., 2010).

### **1.2.2 Морфологические изменения в сердечно-сосудистой системе при гипергомоцистеинемии**

В экспериментах Rosenquist et al. инкубация куриных эмбрионов с гомоцистеином приводила к развитию у них дефектов межжелудочковой перегородки сердца, нервной трубки и брюшной стенки (Rosenquist et al.1996).

Похожее исследование было проведено Li et al.. Инкубация с гомоцистеином коррелировала с нарушением развития сердца и кровеносных сосудов у куриных эмбрионов (Li et al., 1999). У животных с гипергомоцистеинемией так же отмечено накопление интерстициального и периваскулярного коллагена в миокарде (Herrmann et al., 2007b).

Joseph et al. показали, что наличие гипергомоцистеинемии коррелирует с концентрической желудочковой гипертрофией, которая проявляется в комбинации гипертрофического роста кардиомиоцитов и пролиферации не мышечных клеток сердца с накоплением коллагена (Joseph et al., 2003). Зарегистрировано увеличение веса левого желудочка, размеров кардиомиоцитов, утолщение задней стенки и межжелудочковой перегородки у пациентов с уровнем гомоцистеина в плазме крови  $>15$  mmol/L (Herrmann et al., 2007b). При введении больших доз гомоцистеина отмечается развитие желудочковой дилатации и истончения стенки сердца (Sundstrom and Vasan, 2005).

У крыс при гипергомоцистеинемии наблюдается утолщение стенки сосудов, разрушение эластина и повышение артериального давления. Механизм, приводящий к повреждению сосудов гомоцистеином, не установлен. Считается, что гомоцистеин атакует клетки эндотелия сосудов и запускает сигнальные каскады, замедляющие их рост. Легко окисляющийся гомоцистеин подвергается самоокислению с образованием перекиси водорода и супероксид аниона (Zivkovic et al., 2013). Кроме того, гомоцистеин связан с гипертрофией гладкомышечных клеток сосудов. Полагают, что радикалы, образующиеся при окислении гомоцистеина, активируют цитокины, стимулирующие пролиферацию. Повреждение эндотелиальных клеток сосудов так же сопровождается выделением ростовых факторов провоцирующих пролиферацию расположенных рядом гладкомышечных клеток (Steed and Tyagi, 2011).

### **1.2.3 Гипергомоцистеинемия и ремоделирование тканей**

Процесс ремоделирования костной ткани происходит на протяжении всей жизни с участием остеобластов и остеокластов. Остеобласты строят кость, секретируя коллагеновый матрикс, в то время как остеокласты передвигаются по поверхности матрикса и разрушают кость. Herrmann et al. предложил 4 механизма влияния гомоцистеина на ремоделирование костной ткани: увеличение активности остеокластов, уменьшение активности остеобластов, уменьшение кровотока кости и прямое влияние молекулы гомоцистеина на костный матрикс (Herrmann et al., 2005a).

Исследования Herrmann et al., проведенные на культуре остеокластов человека показали значимую роль гомоцистеина в метаболизме кости (Herrmann et al., 2005b; 2007a; 2007b; 2007c; 2008; 2009). Тартрат резистентная кислая фосфатаза (TRAP) используется как маркер функции остеокластов на протяжении 30 лет (Minkin, 1982). Фермент участвует во внутриклеточной переработке продуктов деградации костного матрикса и может выделяться через базолатеральную мембрану остеокластов (Halleen et al., 1999). В 2005 году было обнаружено, что гомоцистеин дозозависимо ( $10^{-4}$ - $10^{-5}$ М) стимулирует активность TRAP (Herrmann et al., 2005b).

Резорбция кости остеокластами осуществляется с участием кислот (неорганический матрикс) и лизосомальных протеаз (органический матрикс), которые выделяются через область щеточной каемки в пространство между клеточной мембраной и внеклеточным костным матриксом. Одной из важных протеаз, вовлеченных в процесс резорбции, является катепсин К (Vaananen et al., 2000). Гомоцистеин в концентрации  $10^{-4}$ М стимулировал активность фермента приблизительно на 40% (Herrmann et al., 2005b).

Кроме того, известно, что гомоцистеин стимулирует синтез интерлейкина-6, который может модулировать развитие и дифференцировку остеокластов (Thaler et al., 2011).

Обнаружено, что у крыс с гипергомоцистеинемией концентрация остеокальцина (ОС) снижена на 40% по сравнению с крысами контрольной группы, что свидетельствует об уменьшении активности остеобластов (Herrmann



et al., 2007c). Однако в другом исследовании, проведенном на культуре первичных остеобластов человека, установлено, что гомоцистеин стимулирует активность щелочной фосфатазы, секреции N-концевого пептида про-коллагена I типа (PINP) и остеокальцина (Herrmann et al., 2008). Щелочная фосфатаза, PINP и остеокальцин продуцируются остеобластами на разных стадиях дифференцировки и отражают различные аспекты функционирования остеобластов и формирования кости (Siggelkow et al., 1999). Щелочная фосфатаза является маркером пролиферативной фазы (1-12 дни), PINP характерен для фазы созревания матрикса (12-20 дни), а остеокальцин преимущественно экспрессируется в течение фазы минерализации матрикса (с 20 дня) (Herrmann et al., 2008). Таким образом, гомоцистеин стимулирует активность остеобластов человека на 25% (Herrmann et al., 2008), что, однако меньше чем стимулирующий эффект гомоцистеина на остеокласты. Авторы предполагают, что главным патологическим механизмом потери костной массы, вызванной гомоцистеином, *in vivo* может являться дисбаланс между остеобластами и остеокластами (Herrmann et al., 2008).

В настоящее время нет описания единого механизма, лежащего в основе ремоделирования ткани сердца гомоцистеином и его производными. Доказано, что гомоцистеин влияет на уровень мембранного потенциала покоя митохондрий. В кардиомиоцитах низкая концентрация гомоцистеина (0,1mM) вызывает гиперполяризацию мембраны митохондрий, увеличение концентрации АТФ и транслокацию NADPH оксидазы (NOX 2) в ядро. Средняя концентрация гомоцистеина (1,1 mM) способствует округлению митохондрий, незначительному уменьшению мембранного потенциала, небольшому уменьшению концентрации АТФ, транслокации NOX 2 в ядро, и индукции флип-флоп перестановки мембранных липидов. Высокие концентрации гомоцистеина (2,7mM) способствуют дальнейшему снижению концентрации АТФ, транслокации NOX 2 в ядро и образованию активных форм кислорода и активации каспазы-3. Изменение мембранного потенциала митохондрий свидетельствует о реализации митохондриального пути апоптоза при действии гомоцистеина на кардиомиоциты

(Spikens et al., 2007). Также активация гомоцистеином p38 MAPK каскада в кардиомиоцитах приводит к накоплению активных форм кислорода, которые, в свою очередь, уменьшают сократимость кардиомиоцитов и приводят к гибели клетки (Wang et al. 2012).

Еще одним из механизмов объясняющих токсические эффекты гомоцистеина является развитие стресса эндоплазматического ретикулума. Стресс эндоплазматического ретикулума это состояние, при котором неправильно сложенные белки накапливаются в просвете эндоплазматического ретикулума. Нарушение фолдирования и созревания белков активирует сигнальные каскады, запускаемые несвернутыми белками (UPR). Сильный стресс эндоплазматического ретикулума и уменьшение функционального ответа UPR могут привести к апоптозу (Abcouwer et al., 2002). Гомоцистеин увеличивает в 4 раза экспрессию фактора роста эндотелия (VEGF) сосудов через ATF4 (активационный транскрипционный фактор 4)-зависимую активацию VEGF транскрипции (10 mM). Метаболит гомоцистеина - гомоцистеин тиолактон в аналогичной концентрации вызывает восьмикратное увеличение экспрессии VEGF (Perla-Kaján et al., 2007).

#### **1.2.4 Взаимодействие гомоцистеина с Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазой**

Кроме негативного влияния на ткань кости и сердечно-сосудистую систему повышенный уровень гомоцистеина инициирует развитие дефекта нервной трубки (Brauer and Tierney 2004), осложнения при беременности (Perla-Kaján et al., 2007) и нейродегенеративные заболевания, такие как: деменция, депрессия, шизофрения, инсульт, болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона (Hrnčić et al., 2010). Эпилептические припадки (судороги) являются одним из симптомов гипергомоцистеинемии. Разработаны модели для тестирования возможных антиконвульсивных субстанций с использованием конвульсивных (8 mmol/kg) и субконвульсивных (5,5 mmol/kg) доз гомоцистеина (Rašić-Marković et al., 2009).

Рядом исследователей обнаружено уменьшение  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазной активности при нейродегенерации, эпилепсии и гипергомоцистеинемии (Streck et al., 2002, Hrnčić et al., 2010, Scherer et al., 2013). Показано, что при умеренной степени гипергомоцистеинемии наблюдается значительное уменьшение содержания  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ - изоформ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в клетках коры головного мозга, в то время как количество  $\alpha_3$ - изоформы практически не меняется. Изменение уровня экспрессии генов  $\alpha$ -субъединиц  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, тем не менее не зафиксировано, что свидетельствует о влиянии гомоцистеина на посттранскрипционные модификации м-РНК или на деградацию фермента (Scherer et al., 2013).

Точный механизм, лежащий в основе ингибирующего  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу действия гомоцистеина остается неизвестным. Исследования кинетики  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, проведенные Streck et al. показали, что гомоцистеин ингибирует натриевую помпу, не конкурируя с АТФ (Streck et al., 2002). Предполагают, что ингибирование помпы гомоцистеином происходит вследствие окисления тиоловых групп, опосредованного свободными радикалами, которые взаимодействуют с сайтом связывания АТФ (Rašić-Marković et al., 2009). Кроме того, хорошо известно, что  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза очень чувствительна к окислительному стрессу. Разрушение фосфолипидного окружения фермента или прямое его повреждение активными формами кислорода и продуктами перекисного окисления липидов может являться одним из механизмов снижения активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы гомоцистеином (Zakharova et al., 2006).

Остается открытым вопрос, вызваны ли токсические эффекты гомоцистеина непосредственно самим гомоцистеином или его метаболитами. Известно, что гомоцистеин тиолактон крайне токсичен для центральной нервной системы. В исследовании, проведенном Rasic-Markovic et al. в 2009 году, при однократном париемальном введении гомоцистеина крысам в дозе 8 mmol/kg через 30 минут наблюдалось стойкое уменьшение активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в мембране клеток гиппокампа, активность фермента в мембранах клеток коры и ствола мозга не изменялась. В отличие от гомоцистеина, в аналогичных экспериментальных

условиях эффект гомоцистеин тиолактона развивался быстрее, и препарат ингибировал активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы во всех исследуемых структурах мозга. (Rasic-Markovic et al., 2009).

### **1.3. Вклад симпатической нервной системы в процессы пренатального онтогенеза**

Во время беременности увеличивается адренергическая иннервация миометрия, что позволяет регулировать тонус сосудов и обеспечивать оптимальные условия для маточно-плацентарного кровотока и развития плода. Подобные морфологические изменения являются одним из звеньев общего адаптационного процесса, подтверждающие трофическую роль нервной системы в организме (Аржанова 2010).

#### **1.3.1 Адаптационно-трофическая функция симпатической нервной системы**

Предположения о механизме трофического влияния нервной системы на периферические ткани и органы было разработано Самуэлем в его книге «Трофические нервы». Самуэль обосновывал необходимость признать существование специальных трофических нервных волокон, регулирующих метаболизм тканей. При наблюдении за деятельностью сердца, И.П. Павлов выдвинул предположение о существовании трофических нервов. В своем докладе «О трофической иннервации» он утверждал: «Может быть, гипотетические сейчас для нас, трофические нервы уже находятся даже в руках физиологов и притом для главного органа животного. Сорок лет назад физиологией было доказано, что, кроме известной ранее пары ритмических сердечных нервов: замедляющих и ускоряющих, существует, несомненно, еще пара особых сердечных нервов, которые можно было характеризовать как влияющие – опять-таки антагонистически – на жизнеспособность сердечного мускула: поднимающие и

понижающие ее. Один нерв усиливал сердечный удар, обуславливал более быструю протекающую систолу, повышал возбудимость мускула, устранял диссоциацию отделов сердца и всякие вообще беспорядки в сердце, когда они наступали при неблагоприятных условиях; другой – имел прямо противоположное действие на сердце. Что они такое эти нервы? Может быть, это – сосудистые нервы коронарной системы? Но против этого имеются очень веские экспериментальные данные: действие этих нервов обнаруживается на вырезанном, обескровленном сердце. Тогда ничего другого не остается, как признать их именно за трофические нервы» (И.П. Павлов Собр. соч., т. I). В 1922-1923 гг. в физиологической лаборатории Ленинградского медицинского института под руководством Л.А. Орбели, А.Г. Гинецинский показал, что раздражение симпатического нерва приводит к восстановлению работоспособности утомлённой скелетной мышцы (Григорьев, Григорьян, 2007). Повышение возбудимости и сократимости и увеличение силы мышечных сокращений утомленной мышцы под действием катехоламинов получило название "феномен Орбели-Гинецинского". В 1948 г. Л.А. Орбели выступил с теорией адаптационно-трофической функции симпатической нервной системы в организме. Адаптационно-трофическое влияние симпатической нервной системы распространяется на все органы и возбудимые ткани, включая ЦНС и выражается в изменении возбудимости органа или ткани (адаптационное влияние) вследствие изменения обменных процессов (трофическое влияние).

Дальнейшие исследования, проведенные В.А. Говыриным, продемонстрировали, что симпатические влияния осуществляются за счет медиатора, выделяемого адренергическими сосудодвигательными нервами, иннервирующими кровеносные сосуды. Катехоламины медленно инактивируются в тканях и после выделения сосудодвигательными нервами достигают эффекторных клеток с током крови и путем диффузии. Экспериментальные данные, полученные физиологами казанской физиологической школы в начале XXI века, позволили впервые установить, что в основе этого феномена лежит

синхронизирующее выброс квантов медиатора в нервно-мышечном препарате действие норадреналина (Самигуллин 2001; Бухараева 2001).

### 1.3.2 Влияние катехоламинов на ремоделирование ткани сердца

Не смотря на то, что действие медиаторов симпатической нервной системы на изменение механической функции мышечных тканей изучено достаточно хорошо, количество исследований, посвященных влиянию катехоламинов на регуляцию процесса тканевого моделирования ограничено.

В период эмбриогенеза у птиц симпатические нервные стволы формируются с 6 по 8 день, но контакта нервных волокон с сердцем не происходит до 10-11 дня инкубации (Kirby et al., 1980). Однако адренорецепторы появляются на поверхности клеток с 4 дня эмбрионального развития, намного раньше, чем зарегистрировано прямое участие адренергических нервов в регуляции сердечного ритма (Higgins et al., 1981).

Реализация эффектов медиаторов симпатической нервной системы норадреналина и адреналина осуществляется через  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторы, которые относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белками (Caron, Lefkowitz 1993). Рецептор состоит из одной белковой молекулы. Гидрофильные N-концевой и C-концевой фрагменты находятся соответственно во внеклеточной и внутриклеточной среде, а между ними расположены 7 липофильных трансмембранных доменов (TMD1-TMD7), соединенных тремя внеклеточными (ECL1-ECL3) и тремя цитоплазматическими (ICL1-ICL3) петлями. Каждый из семи трансмембранных доменов образован 20-28 аминокислотами.

Сайт связывания рецептора с лигандом представлен 15 аминокислотными остатками. TMD1, TMD4 и TMD7 являются сайтами связывания для  $\beta$ -адренорецепторов птиц (Frielle et al., 1988; Raymond et al., 1990). Наиболее важным участком для специфического связывания агониста с  $\beta$ -адренорецептором человека являются TMD4 и TMD7 (Frielle et al., 1988; Kobilka et al., 1988). В молекуле адренорецептора выделили ортостерический и

аллостерический сайты связывания лигандов. Оба сайта связывания находятся близко друг от друга и большинство лигандов, связываясь с адренорецептором, взаимодействуют сразу с обоими сайтами (Congreve et al., 2011). Внутриклеточные петли 2 и 3 (ICL2 и ICL3) обеспечивают взаимодействие с G-белком (Raymond et al., 1990; Congreve et al., 2011). Локализация и количественное распределение адренорецепторов определяют реакцию тканей на адреномиметические вещества (Schaeffers et al., 1999).

Основными адренорецепторами в ткани сердца являются  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -адренорецепторы. На их долю приходится до 90% от общего количества адренорецепторов, причем в норме соотношение  $\beta_1$ : $\beta_2$ -адренорецепторов в миокарде составляет 4(3):1. При развитии сердечной патологии соотношение изменяется в сторону увеличения плотности  $\beta_2$ -адренорецепторов.  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -адренорецепторы идентичны по аминокислотному составу на 54% (Frielle et al., 1988). Различие между подтипами обусловлено положением серина 211/203(5.42) ( $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -адренорецепторы соответственно) и тирозина 308(7.35) ( $\beta_2$ -адренорецептор), эти аминокислоты играют важную роль в селективном связывании с агонистом (Kikkawa et al., 1998; Vanni et al., 2009).

$\beta_1$ -адренорецепторы локализованы на всей поверхности мембраны кардиомиоцитов и связаны с Gs белками. Их стимуляция приводит к увеличению концентрации цАМФ, последующей активации протеинкиназы А, фосфорилированию ряда белков-мишеней и, в конечном итоге, увеличению сократительной функции сердца. Фосфорилирование рианодиновых рецепторов и  $\text{Ca}^{2+}$  каналов L-типа увеличивает захват  $\text{Ca}^{2+}$  и последующее его высвобождение саркоплазматическим ретикуломом. Фосфорилирование фосфоламбана ингибирует кальциевую АТФазу саркоплазматического ретикулума (SERCA) и обеспечивает накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в депо. Фосфорилирование сердечного тропонина I и сердечного миозин-связывающего белка уменьшает аффинность миофиламентов к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  и изменяет кинетику мостиков, внося свой вклад в инотропный эффект стимуляции  $\beta_1$ -адренорецепторов (Tilley, 2011). Активация  $\beta_1$ -адренорецепторов приводит к увеличению силы и частоты сокращений *in vitro*,

а их удаление полностью прекращает сокращения при перфузии изопротеренолом (Xiang, 2011).

Стимуляция  $\beta_1$ -адренорецепторов также увеличивает вероятность возникновения спонтанных внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$  осцилляций ( $\text{Ca}^{2+}$  волн), вызывает гипертрофию в культуре кардиомиоцитов новорожденных и взрослых крыс. Более того, было показано, что в культуре кардиомиоцитов желудочков взрослых крыс гипертрофия клеток при стимуляции  $\beta_1$ -адренорецепторов изопротеренолом развивается только в присутствии  $\beta_2$ -адреноблокаторов (Schafer et al., 2000). При этом гипертрофия кардиомиоцитов не зависит от активации ERK и протеинкиназы А, а требует активации Akt/GATA4 сигнального пути (Morisco et al., 2000) или активации тирозинкиназы (Schafer et al., 2000).

А отличие от  $\beta_1$ -адренорецепторов  $\beta_2$ -адренорецепторы связаны с G-белками двух типов (Gs и Gi) и обеспечивают двухфазный эффект.  $\beta_2$ -адренорецептор-зависимая стимуляция Gs белков приводит к локальному увеличению концентрации цАМФ. В кардиомиоцитах многих видов млекопитающих стимуляция  $\beta_2$ -адренорецепторов приводит к изменению функции  $\text{Ca}^{2+}$  каналов L-типа без влияния на сократительные белки и белки саркоплазматического ретикулула (Ming et al., 2004). Однако в кардиомиоцитах новорожденных крыс активация  $\beta_2$ -адренорецепторов вызывает накопление цАМФ, изменение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и увеличение сократимости миокарда (Rybin et al., 2003). В кардиомиоцитах человека стимуляция  $\beta_2$ -адренорецепторов вызывает фосфорилирование регуляторных белков протеинкиназой А как и при стимуляции  $\beta_1$ -адренорецепторов (Ming et al., 2004).

Запуск сигнальных каскадов с участием Gs или Gi белка при активации  $\beta_2$ -адренорецепторов зависит от интенсивности и продолжительности стимуляции рецепторов (Devic et al., 2001) и фосфорилирования протеинкиназой А третьей петли и проксимального участка С-конца  $\beta_2$ -адренорецептора (Zaugg and Schaub, 2004). Активирование  $\beta_2$ -адренорецептор-Gi комплекса ингибирует активность аденилатциклазы, синтез цАМФ и активацию протеинкиназы А. Комплекс  $\beta_2$ -адренорецептор-Gi подвергается эндоцитозу, в то время как активированные  $\beta_1$ -



адренорецепторы остаются на поверхности мембраны (Scherbacova et al., 2007). Блокада  $\beta_2$ -адренорецепторов увеличивает апоптоз, вызванный норадреналином, в культуре кардиомиоцитов крысы (Communal et al., 1999; Zaugg et al., 2000).

В последнее время возрос интерес к роли  $\alpha$ -адренорецепторов в ремоделировании миокарда. Доказано наличие в сердце  $\alpha_1$ -адренорецепторов подтипов  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  и  $\alpha_{1D}$  (O'Connell et al., 2014). Их количество не велико и составляет всего 10%. Однако исследования последних лет показали, что длительная активация  $\alpha_1$ -адренорецепторов запускает трофические сигнальные каскады в развивающемся сердце. Так же показано, что сигнальные каскады, опосредованные активацией  $\alpha_1$ -адренорецепторов могут нивелировать отрицательный эффект гиперстимуляции  $\beta_1$ -адренорецепторов при сердечной недостаточности (O'Connell et al., 2014).  $\alpha_1$ -адренорецепторы связаны с G-белком подтипа Gq/11 (Gaq), который активирует фосфолипазу C $\beta$ 1 на плазматической мембране. Активация фосфолипазы C ведет к увеличению уровня инозитол трифосфата и диацилглицерола. Инозитол трифосфат вызывает выход Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточного депо, а диацилглицерол активирует протеинкиназу C. Однако в отличие от других рецепторов связанных с Gq-белками  $\alpha_1$ -адренорецепторы локализованы на ядерной мембране кардиомиоцитов и не обнаружены в фибробластах. Предполагают, что активация  $\alpha_1$ -адренорецепторов приводит к развитию физиологической гипертрофии без фиброза, предотвращает гибель кардиомиоцитов, усиливает сократительную функцию сердца при сердечной недостаточности.

### **1.3.3 Влияние катехоламинов на ремоделирование ткани кости**

Ремоделирование костной ткани представляет собой баланс двух разнонаправленных процессов: разрушение старой костной ткани остеокластами и формирование новой кости остеобластами. На самом деле, разрушение и формирование костной ткани это части одного физиологического процесса, а значит, дифференцировка и созревание остеокластов и остеобластов должны

регулироваться общими механизмами. Участие катехоламинов в регуляции роста ткани кости впервые было продемонстрировано Maassen в 1950-х годах (Maassen 1952). Позднее было доказано наличие  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов на поверхности остеокластов и остеобластов. Фармакологические и генетические исследования показали наличие экспрессии  $\beta$ -адренорецепторов на поверхности остеокластов и остеобластов различных клеточных линий используемых при исследовании механизмов ремоделирования костной ткани. Однако разные клеточные линии имеют не одинаковый состав подтипов  $\beta$ -адренорецепторов на поверхности клеток. Экспериментально показано наличие  $\beta_2$ -адренорецепторов на поверхности клеток линий ROS17/2.8, SaOS-2, HOS, MG-63, и первичной культуры клеток остеобластов мыши. Экспрессия  $\beta_2$ -адренорецепторов также зарегистрирована в культуре остеокластов (Aitken et al., 2009; Kondo et al., 2013). Kellenberger et al. зарегистрировали экспрессию  $\beta_1$ -адренорецепторов в культуре клеток SaOS-2, TE-85, OHS-4, однако не обнаружили их в культуре первичных остеобластов человека (Kellenberger et al., 1998). На основании сравнительного анализа наличия  $\beta$ -адренорецепторов в клеточных линиях Kellenberger выдвинул предположение, что различные композиции подтипов  $\beta$ -адренорецепторов могут отражать стадии дифференцировки остеобластов в источнике культуры клеток (Kellenberger et al., 1998).

В экспериментах *in vivo* зарегистрировано уменьшение числа остеобластов, скорости формирования кости на трабекулярных поверхностях и уровня экспрессии коллагена I типа при введении изопротеренола или других агонистов адренорецепторов. Напротив, при блокаде адренорецепторов неселективным  $\beta$ -адреноблокатором пропранололом, или в исследованиях с использованием генетически модифицированных мышей лишенных  $\beta_2$ -адренорецепторов наблюдалось увеличение числа остеобластов и массы костной ткани (Bonnet et al., 2008). Однако при изучении мышей лишенных как  $\beta_2$ -адренорецепторов, так и  $\beta_1$ -адренорецепторов, было обнаружено значительное уменьшение формирования костной ткани (Pierroz et al., 2006). Данные свидетельствуют о том, что, по-видимому, увеличение костной массы при блокаде или отсутствии  $\beta_2$ -

адренорецепторов может наблюдаться лишь при сохранности  $\beta_1$ -адренорецепторов. Хотя точный вклад  $\beta_1$ -адренорецепторов в регуляцию процессов роста костной ткани не установлен, предполагают, что активация  $\beta_1$ -адренорецепторов может стимулировать рост костной ткани опосредованно через системные влияния (Bonnet et al., 2008).

В экспериментах *in vitro* показано, что агонисты адренорецепторов стимулируют остеокластогенез увеличивая экспрессию RANKL остеобластами (Elefteriou et al., 2005). Активация  $\beta_2$ -адренорецепторов так же приводит к выработке других факторов способствующих созреванию остеокластов таких как интерлейкин-6, интерлейкин-11 и простагландин E2 (Takeuchi et al., 2001; Togari and Arai, 2008). Однако некоторые исследования свидетельствуют о возможности регуляции катехоламинами не только процессов резорбции кости, но и пролиферации остеобластов. Исследования Suzuki et al на клетках линии остеобластов мыши MC3T3-E1 выявили дозозависимое стимулирующее действие адреналина через  $\alpha_1$ -адренорецепторы с участием РТХ-чувствительных G-белков (Suzuki et al., 1998).

### **1.3.4 Модуляция насосной функции $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФазы через адренергические сигнальные пути**

Активация протеинкиназы А (через  $\beta_1$ -адренорецептор, связанный с аденилатциклазой) и протеинкиназы С (через  $\alpha_1$ -адренорецептор, связанный с фосфолипазой С) увеличивают систолический объем через фосфорилирование  $\text{Ca}^{2+}$  каналов L-типа, рианодиновые рецепторы и фосфоламбан. Ингибирование  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы оказывает положительное инотропное действие из-за уменьшения  $\text{Ca}^{2+}$  выхода через  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -обменник и увеличения захвата  $\text{Ca}^{2+}$  саркоплазматическим ретикулумом (Fuller, 2013). Despa et al. (2008) было показано что активация  $\beta$ -адренорецепторов и последующее фосфорилирование фосфолеммана протеинкиназой А ведет к активации  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в кардиомиоцитах. Фосфолемман относится к семейству FXYD белков, названных

по консервативному мотиву на внеклеточном N-концевом домене. Фосфолемман (FXVD1), единственный FXVD белок, экспрессирующийся в сердечной ткани, имеет множество сайтов фосфорилирования в цитозольном C-конце. Фосфолемман фосфорилируется по Ser 68 протеинкиназой A и протеинкиназой C и по Ser 63 только протеинкиназой C (Bers and Despa, 2009). Исследования обнаружили, что дефосфорилирование фосфолеммана значительно уменьшает аффинность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы к  $\text{Na}^+$  и в меньшей степени к  $\text{K}^+$  без изменения максимального уровня транспорта (Despa et al., 2008). Физиологической ролью фосфолеммана является предотвращение  $\text{Ca}^{2+}$  перегрузки и запуска аритмий путем ограничения уровня внутриклеточного  $\text{Na}^+$  при стимуляции  $\beta$ -адренорецепторов (Despa et al., 2008). Генетическое удаление фосфолеммана приводит к стойкой гипертрофии миокарда. Сердца мышей с нокаутом фосфолеммана демонстрируют высокий уровень фиброза, возможно вследствие частичной гипертрофии миокарда и уменьшения максимального уровня расслабления (Wang et al., 2010).

Исследование участия адренорецепторов в регуляции сигнальной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы ранее не проводилось.

Таким образом, исследование, позволяющее оценить участие веществ, являющихся факторами риска развития патологии плода, на процессы ремоделирования ткани сердца и кости в эмбриональный период онтогенеза является актуальным. Полученные результаты не только расширят представления о фундаментальных физиологических механизмах кардио- и остеоремоделирования в норме, но и сделают возможным прогнозирование развития патологии исследуемых систем организма в детском и взрослом возрасте.

## ГЛАВА 2 Материалы и методы

### 2.1 Характеристика объектов исследования

#### 2.1.1 Морфология сердца в эмбриогенезе

Несокращающееся трубчатое сердце наблюдается у куриных эмбрионов после 29 часов инкубации. Со стадии 7 сомитов (33 часа инкубации) в цитоплазме миобластов появляются неупорядоченные миозиновые филаменты (Manasek 1968). На 2-е сутки трубчатое сердце куриного эмбриона состоит из миокарда и эндокарда, разделенного кардиогелем, и активно сокращается, хотя пейсмекеры и проводящая система сердца еще не развиты (Pennisi et al., 2003). Происходит активная секреция и накопление вещества кардиогеля. В субсарколеммальных зонах начинается формирование цепочек саркомеров посредством зачаточных Z дисков (Крамарь, 1995). На 3-и сутки формируется атриовентрикулярное кольцо, являющееся частью центральной проводящей системы (Martinsen, 2005). Начиная с этого периода, в миокарде куриных эмбрионов выделяется расположенная под эпикардом компактная зона, губчатый и трабекулярный слои (Khloronin, 1976). Миофибриллы связанные с вставочными дисками и *zonula adherents* играют ведущую роль в сократительной активности кардиомиоцитов. В саркомерах таких фибрилл определяются диски Z; диски A, I не выражены (Крамарь, 1995). В дальнейшем увеличение сократительной активности сердца сопровождается уменьшением секреторной деятельности кардиомиоцитов и резорбцией кардиогеля. Развивающийся миофибрилярный аппарат характеризуется увеличением количества элементарных нитей, входящих в миофибриллы и степени упорядоченности миофиламентов. В период с 6-х суток инкубации до 2-х суток постнатального развития наблюдается семикратное нарастание количества миофибрилл (Крамарь, 1995). На 8-е сутки инкубации в кардиомиоцитах появляются два типа митохондрий: высокоактивные митохондрии с узкими кристами и электронноплотным матриксом, которые составляют основную часть

популяции и митохондрии с расширенными, малочисленными кристами и слабоконтрастным матриксом. (Крамарь, 1995). Одновременно с развитием митохондриального и миофибриллярного аппаратов происходит накопление гранул гликогена в цитоплазме кардиомиоцитов (Khloronin, 1976). К концу пренатального периода развития происходит постепенное истончение губчатого слоя, место которого занимает компактный миокард (Крамарь, 1995). С нарастающей дифференцировкой кардиомиоцитов наблюдается постепенное снижение митотического индекса клеток. Наиболее интенсивно делятся кардиомиоциты желудочков, расположенных в поверхностных слоях миокарда, что свидетельствует о преимущественно аппозиционном росте периферического компактного желудочкового миокарда. Кардиомиоциты предсердий пролиферируют менее интенсивно, однако вскоре после вылупления эта разница нивелируется (Rumyantsev 1977).

### **2.1.2 Морфология кости в эмбриогенезе**

Процесс эндохондрального формирования кости представляет собой пролиферацию формирующих матрикс хондроцитов и их дифференциацию в неспособные к делению гипертрофированные клетки, которые участвуют в ремоделировании и минерализации хрящевого матрикса, что ведет к последующему замещению его костью в ростковой пластинке.

К 9 суткам инкубации куриных эмбрионов большая часть хрящевого диафиза длинных костей конечности состоит из созревающих хондроцитов с высокой метаболической активностью. Соотношение длины хрящевого диафиза к его поперечному сечению составляет 13:1. По периметру диафиза формируется периост и появляется костная ткань. На 12 сутки инкубации большинство хондроцитов в диафизе бедренной кости становятся гипертрофированными со слабым проявлением метаболической активности. К этому времени соотношение длины диафиза к его диаметру составляет 16:1. Костная ткань по периметру диафиза хрящевой закладки становится губчатой с множеством трабекул,

пространство между которыми заполнено кровеносными сосудами и остеогенными клетками. Максимальная толщина каждой трабекулы составляет 5-8 мкм и увеличивается за счет накопления костного матрикса. Хрящевой диафиз длинных костей 11-12-суточных куриных эмбрионов постепенно незначительно расширяется по направлению к метафизам. Таким образом, продольный рост хрящевой закладки значительно опережает увеличение ее поперечного диаметра. Формирование первичных центров окостенения в хрящевых закладках птиц сопровождается появлением в костномозговой полости клеточных элементов кроветворения и остеогенеза. В терминальных участках кровеносных сосудов прорастающих в диафиз располагаются 2 популяции периваскулярных клеток. Одни из них ферментативно разрушают хрящевой матрикс, другие поглощают и расщепляют его фрагменты. Оба типа клеток относят к макрофагальной системе, выполняющих функцию одноядерных хондрокластов. Начинаясь резорбция хряща приводит к расширению полости диафиза, где накапливаются стволовые и коммитированные клетки остеогенеза и гемопоэза, что способствует ремоделированию кости со стороны эндостальной поверхности диафиза. При развитии скелета птиц хрящевые закладки интенсивно растут, и диафиз на 70 % состоит из гипертрофированных хондроцитов. На 16-17 сутки инкубации происходит очаговая резорбция хряща с гипертрофированными хондроцитами, формирование хрящевых каналов с кровеносными сосудами, гемопоэтическими и остеогенными клетками. В бедренной кости 17 суточных куриных эмбрионов они достигают зоны созревающих хондроцитов, а к 19 суткам эмбриогенеза уже пронизывают всю ширину росткового хряща, достигая зоны пролиферирующих клеток и проникая в эпифизы. После формирования хрящевых каналов между костным диафизом и гипертрофированным хрящом создаются условия для ремоделирования кости. В результате субэндостальной резорбции костного диафиза обеспечивается увеличение диаметра костномозговой полости при активном приросте кости со стороны периоста. Таким образом, на последних этапах эмбриогенеза и после рождения в зонах роста скелетных закладок конечностей курицы одновременно протекают два процесса: формирование

костной ткани на фрагментах локально минерализованного хрящевого матрикса и его резорбция мононуклеарными и многоядерными хондрокластами (Житников 2012).

## 2.2 Метод органотипического культивирования ткани

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.

В качестве экспериментальных животных использовали 10-12-дневные куриные эмбрионы. 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 рН 7.2 . Состав среды (Лопатина и др., 2005) представлен в таблице 1:

Таблица 1. Состав питательной среды для культивирования.

Вещество	Производитель	Содержание в среде на 100 мл
Раствор Хенкса	Биолот, Россия	50 мл
Среда Игла MEM	Биолот, Россия	40 мл
Сыворотка эмбриональная телячья (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Южная Америка	10 мл
Глюкоза 40%	Новосибхимфарм, Россия	0,6 мл
Гентамицин	Биолот, Россия	10000 ед



В работе использовали следующие реактивы:

1. оубаина октагидрат (Sigma, США),
2. дигоксин (Мосхимфармпрепараты, Россия),
3. адреналин (Sigma, США),
4. норадреналин (ЭкоФармПлюс, Россия),
5. атенолол (Sigma, США),
6. пропранолол (НПК «Асконт+», Россия),
7. гомоцистеин тиолактон (Sigma, США).

Исследуемые вещества добавляли в экспериментальные чашки Петри в широком диапазоне концентраций. За контрольные принимали эксплантаты, культивируемые в условиях питательной среды стандартного состава.

### **2.2.1 Методика препаровки ткани сердца и кости**

Исследование проводили в стерильных условиях. Яичную скорлупу протирали 70% спиртом. Стерильным пинцетом разбивали скорлупу над воздушным мешком (с тупого конца яйца) и удаляли осколки скорлупы, скорлуповую и хориоаллантаоисную мембраны. С помощью пинцета переносили эмбрион за шею на препаровальный столик. Эмбрион поворачивали на спинку и расправляли крылья. Ножницами вскрывали грудную клетку, извлекали сердце и помещали в чашку Петри диаметром 90 мм с небольшим количеством питательной среды, расположенную на хладагенте. После чего отрезали бедро, глазным пинцетом переносили его в другую стоящую на хладагенте чашку Петри диаметром 90 мм. Дальнейшую препаровку осуществляли в ламинаре.

Препаровка ткани сердца: При помощи пинцета и пика для микрохирургии глаза в стерильных условиях желудочки отделяли от предсердий. Затем осуществляли забор материала, кусочки ткани сердца размером около 1 мм помещали в стерильные чашки Петри диаметром 40 мм на коллагеновую подложку.

Препаровка ткани кости: В стерильных условиях бедренную кость и кости голени очищали от мышц и надкостницы. Очищенные кости переносили в чашку Петри с небольшим количеством питательной среды. Затем пикой делали разрез вдоль бедренной кости и выделяли кусочки ткани диаметром 1-2 мм, которые помещали в отдельные стерильные чашки Петри диаметром 40 мм на коллагеновую подложку.

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  $36,8^{\circ}\text{C}$  на 10 минут. Далее заливали в чашки по 3 мл питательной среды и ставили в термостат на 30 минут. Затем извлекали чашки Петри из термостата и добавляли в питательную среду исследуемые вещества. Культивирование эксплантатов костной ткани и ткани сердца осуществляли при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в течение трех суток в  $\text{CO}_2$  инкубаторе (Sanyo, Япония). Через трое суток культивирования чашки Петри извлекали из  $\text{CO}_2$  инкубатора и исследовали.

Для количественной оценки влияния исследуемых веществ использовали комплексный подход. В первой части работы применяли морфометрический метод. Учитывая неоднородность морфологической картины эксплантатов, с целью унификации конечных показателей степени роста исследуемой ткани, для ее оценки использовали морфометрический относительный критерий – индекс площади (ИП), который рассчитывали, как отношение площади всего эксплантата к площади центральной зоны (рис. 1).

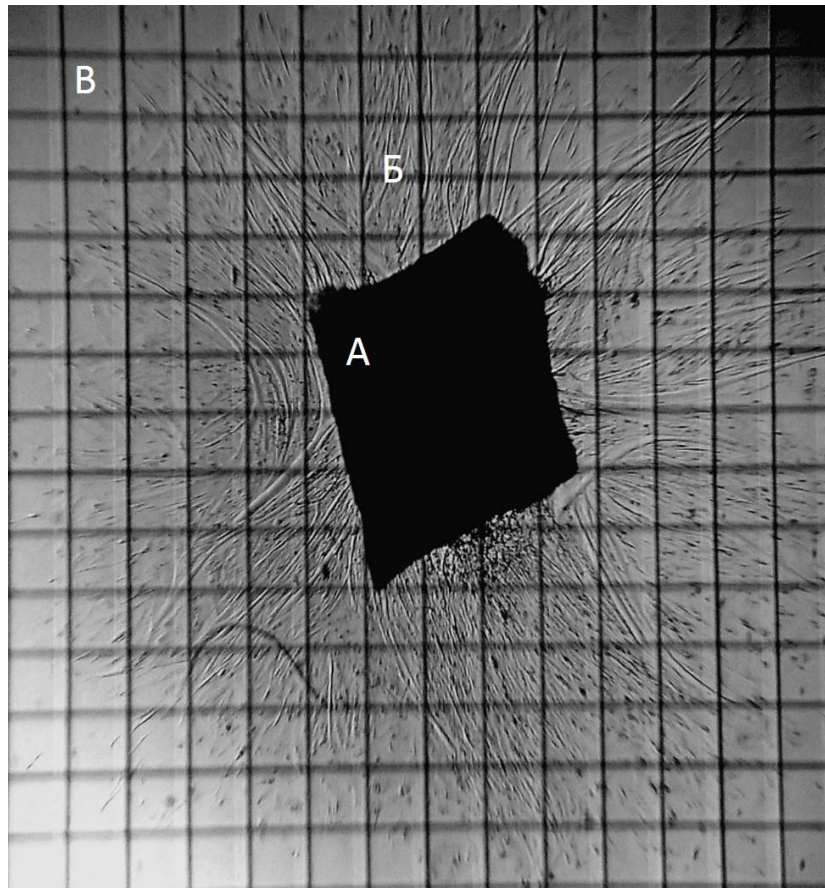


Рисунок 1. Морфометрический анализ исследуемых тканей на примере эксплантата ткани кости. 3-е сутки культивирования в органотипической культуре. А – центральная зона, Б – зона роста, В-коллагеновая подложка.

За условную единицу площади принимали квадрат окуляр-сетки микроскопа, сторона квадрата при увеличении  $3.5 \times 10$  равна 150 мкм. Значение индекса площади контрольных эксплантатов принимали за 100%. Контрольными служили эксплантаты, развивающиеся в условиях питательной среды стандартного состава.

### 2.3 Микроскопические исследования

Витальные неокрашенные препараты органных культур прозрачны, поэтому сливаются с фоном при исследовании с помощью светового микроскопа. Для сохранения нативной структуры эксплантата при микроскопическом исследовании пользуются специальными методами контрастирования. Наиболее высокоэффективным является метод ДИК-контраста, разработанный компанией

Carl Zeiss в 2003 году. Дифференционно-интерференционная микроскопия (ДИК-микроскопия) сочетает в себе эффект фазового контраста и исследования в поляризованном свете. Поляризованный луч из источника света разделяется на два луча, которые проходят через эксплантат разными оптическими путями. Затем эти лучи при слиянии интерферируют, что позволяет получить объемное рельефное изображение. Объемность (рельефность) изображения повышает разрешающую способность оптики приблизительно в шесть раз (Егорова, 2000). На рис. 2 представлен используемый в работе комплекс оборудования на базе лазерного сканирующего микроскопа LSM 710. Для удобства работы с органными и клеточными культурами, культивируемыми в пластиковой посуде (чашках Петри или луночных планшетах) метод ДИК-контраста был модифицирован компанией Carl Zeiss. Сформулированы принципы работы - ПласДИК. В этом случае, в отличие от классического ДИК-контраста, поляризация света происходит после объектива в световом потоке, строящем изображение, т.е. уже после пластиковой посуды. Таким образом, удается избежать цветных искажений (Егорова, 2005). Необходимо отметить, что применение ПласДИК-контраста позволило значительно сократить время, затрачиваемое на получение экспериментальных данных, поскольку отпала необходимость в культивировании экспериментальных объектов на стеклах. В части исследований для улучшения визуализации исследуемые эксплантаты культивировали в чашках  $\mu$ -Dish (IBIDI, Германия) дно которых выполнено с тонкой вставкой из оптически чистого пластика, имеющего коэффициент оптического преломления 1.52, соответствующий стеклу и иммерсионному маслу. Пластик изготовлен с подавлением автофлуоресценции, что позволяет избежать фонового флуоресцентного шума при микроскопии и использовать объектив  $\times 100$ .



Рисунок 2. Инвертированный микроскоп Axio Observer Z1 (моторизованный, термостабилизирующий предметный столик), сканирующий модуль (сканирующая головка), системный блок персонального компьютера с программным обеспечением ZEN\_2011, источник света для возбуждения флуоресценции (диодные и аргоновый лазеры)

На рис.3 представлена прижизненная микрофотография эксплантата ткани сердца 10-дневного куриного эмбриона, выполненная с использованием ПласДИК- контраста.

На эксплантатах ткани сердца через трое суток культивирования можно выделить две зоны – центральную (более плотную) и периферическую, которая расположена в виде характерного ореола вокруг центральной зоны. Периферическая – зона роста представлена пролиферирующими кардиомиоцитами, а также некоторым количеством фибробластов. Кардиомиоциты зоны роста представляют собой одноядерные клетки веретенообразной формы. Фибробласты эксплантатов ткани сердца – крупные клетки с большим овальным ядром и ножками (рис.4).

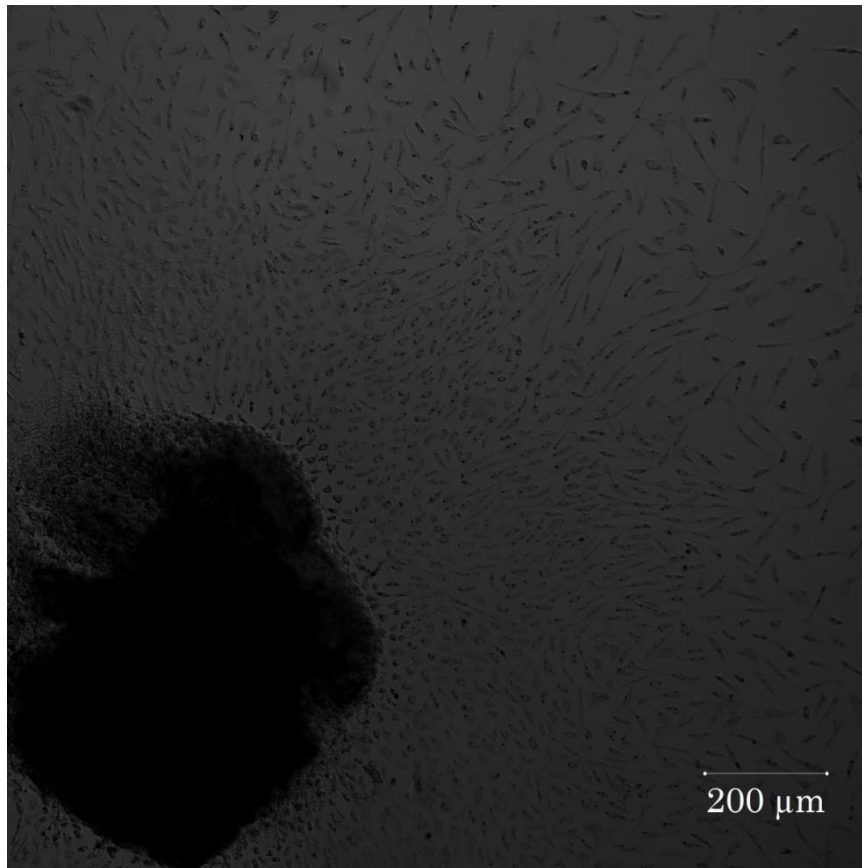


Рисунок 3. Микрофотография эксплантата ткани сердца 10-дневного куриного эмбриона. 3-и сутки культивирования (ув. 10). Контроль. Проходящий свет. Метод ПласДИК-контраста.

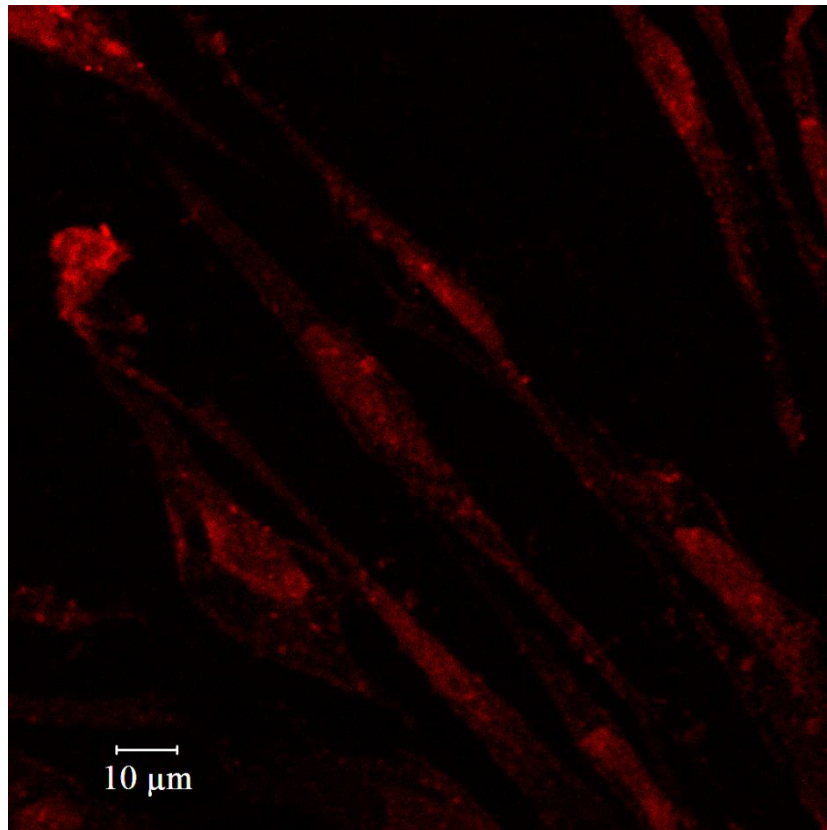


Рисунок 4. Микрофотография фрагмента зоны роста эксплантата ткани сердца 10-дневного куриного эмбриона. 3-и сутки культивирования (ув. 63). Окраска антителами к  $\beta_1$ -адренорецептору (ab3442).

Центральная зона эксплантатов ткани кости имеет решетчатую структуру (рис. 5). Зона роста представлена клетками неправильной формы с продолговатым ядром – пролиферирующими предшественниками остеобластов и остеокластов. Для подтверждения клеточного состава в зоне роста контрольных и экспериментальных эксплантатов ткани кости, клетки окрашивали моноклональными антителами к ядерному рецептору витамина  $D_3$ , который экспрессируется на всех стадиях созревания остеобластов и остеокластов (Gerstenfeld et al., 1995) (рис. 6).

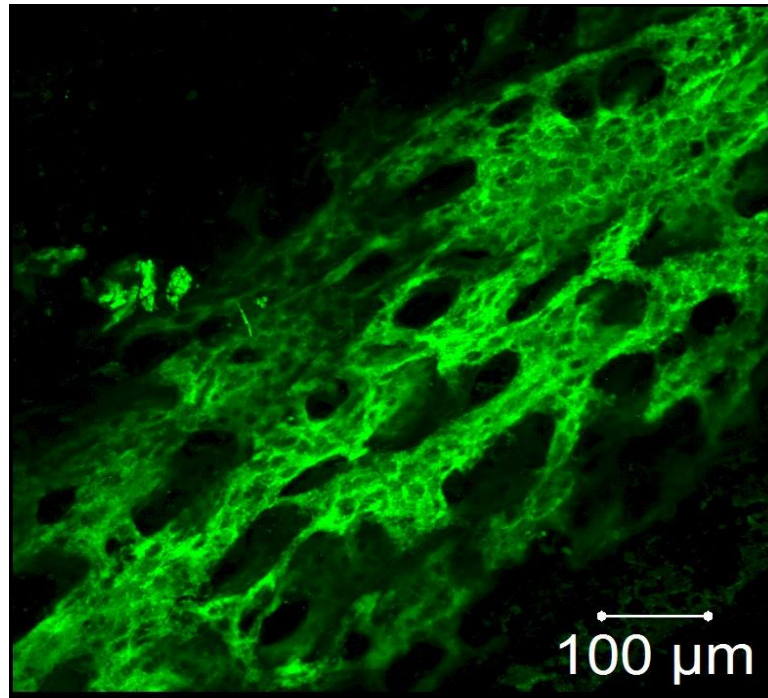


Рисунок 5. Фрагмент центральной зоны эксплантата ткани кости. Контроль. Окраска фаллоидином, конъюгированным с Texas Red (зеленый цвет). (ув. 20).

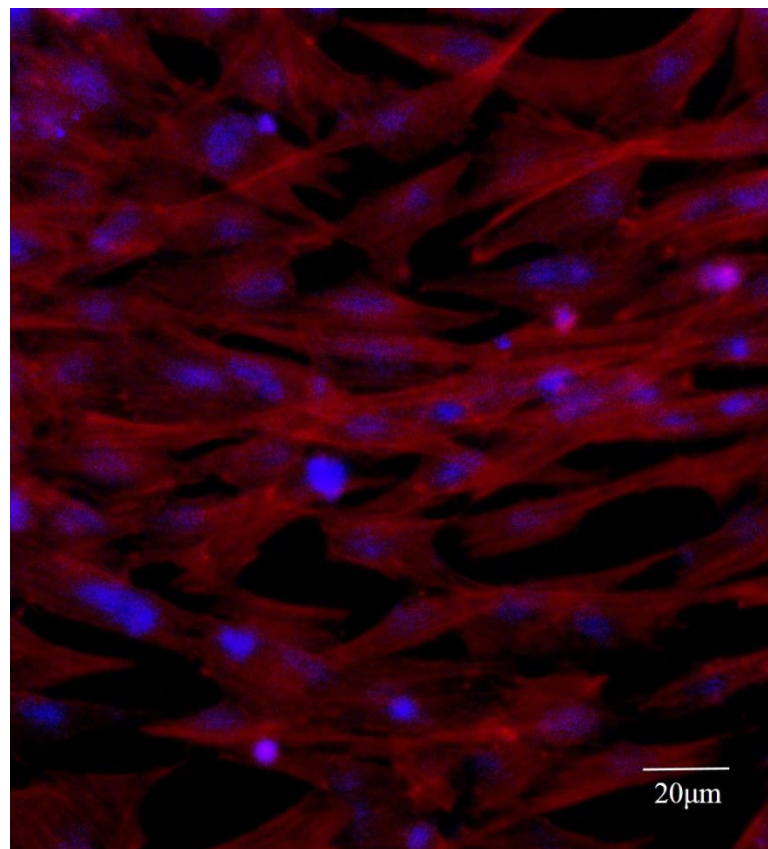


Рисунок 6. Фрагмент зоны роста эксплантата ткани кости. Контроль. Окраска фаллоидином, конъюгированным с Texas Red (красный цвет) и моноклональными антителами к рецептору витамина D<sub>3</sub> (синий цвет) (ув.40).



## 2.4 Иммуногистохимические методы исследования

Для визуализации характера распределения  $\alpha_1$ -,  $\alpha_3$ -изоформы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и  $\beta_1$ -адренорецепторов на поверхности клеток зоны роста эксплантатов ткани сердца и кости, контрольные и экспериментальные эксплантаты окрашивали антителами по стандартному протоколу.

Протокол окраски:

1. Клетки фиксировали 4% раствором формалина (ЛенРеактив, Россия) в течение 3 минут,
2. зафиксированный материал промывали 0,1 М раствором натрий-фосфатного буфера (PBS) с pH 7.4 3 раза (Рабочий раствор фосфатного буфера готовили из таблеток фосфатно-солевого буфера (БиолоТ, Россия) из расчета 1 таблетка PBS/100 мл дистиллированной воды),
3. обрабатывали 0,3% раствором Тритона X-100 (Panreac, Испания) в течение 15 минут,
4. промывали 0,1 М раствором натрий-фосфатного буфера (PBS) 3 раза,
5. эксплантаты инкубировали в 100% эмбриональной телячьей сыворотке (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Южная Америка) в течение 20 минут при  $37^{\circ}\text{C}$  для исключения неспецифического связывания антител.
6. промывали 0,1 М раствором натрий-фосфатного буфера (PBS) 3 раза,
7. эксплантаты инкубировали с первичными антителами в течение 12 часов при  $5^{\circ}\text{C}$  (таблица 2).
8. промывали 0,1 М раствором натрий-фосфатного буфера (PBS) 3 раза,
9. добавляли вторичные антитела на 1 час при  $37^{\circ}\text{C}$  (таблица 2).

Таблица 2. Список используемых антител.

	Название антител	Производитель	Рабочее разведение
Первичные антитела	Антитела крысиные моноклональные VDR Monoclonal Antibody (9A7),	Thermo Fisher Scientific	1:600
	Антитела кроличьи поликлональные Anti-beta 1 Adrenergic Receptor, (ab3442)	Abcam	1:400
	Антитела Anti-alfa 1 Sodium Potassium ATPase (ab2872)	Abcam	1:300
	Антитела Anti-alfa 3 Sodium Potassium ATPase (ab2826)	Abcam	1:300
Вторичные антитела	Антитела козы поликлональные Anti-Rabbit IgG-TRITC (T6778)	Sigma	1:300
	Антитела козы поликлональные Anti- Mouse IgG-FITC (F0257)	Sigma	1:300
	Антитела козы поликлональные Anti-Rat IgG Alexa Fluor® 405 (ab175671)	Abcam	1:300

## 2.5 Оценка толщины зоны роста контрольных и экспериментальных эксплантатов

Для получения прижизненной информации о состоянии клеток, формирующих зону роста эксплантатов тканей сердца и кости в контрольных и экспериментальных чашках Петри, впервые было оптически послойно зарегистрировано формирование слоев клеток на различном уровне от коллагеновой подложки и измерена толщина формирующейся зоны роста в микронах. На рис. 7 представлена 3-D реконструкция эксплантата ткани сердца,

культивируемого в условиях питательной среды стандартного содержания. Аппаратно-программный комплекс ZEN\_2011 позволил осуществить оптическую реконструкцию объекта, зафиксировать наличие клеток на уровнях, находящихся на разной высоте от коллагеновой подложки. Каждый уровень (его высота над коллагеновой подложкой представлена интервалом в микронах на линейке) виртуально окрашен в определенный цвет.

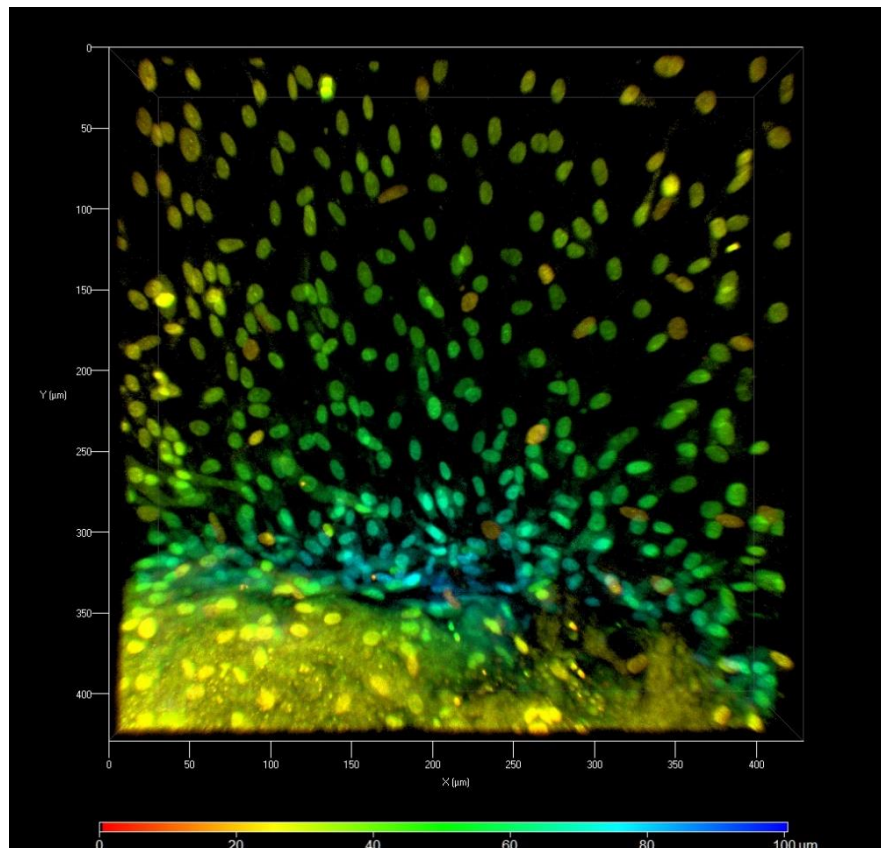


Рисунок 7. Микрофотография эксплантата ткани сердца 10-дневного куриного эмбриона. 3-и сутки культивирования (ув. 20). Контроль. 3D реконструкция.

Введен критерий оценки степени выраженности процессов роста и пролиферации исследуемых тканей в зоне роста – толщина зоны роста. Иные подходы для оценки объемных процессов, происходящих в формирующейся зоне роста не возможны (Лопатина и др., 2015). Была создана библиотека оптических срезов эксплантатов тканей сердца и кости с дальнейшей их трехмерной реконструкцией (рис. 8).

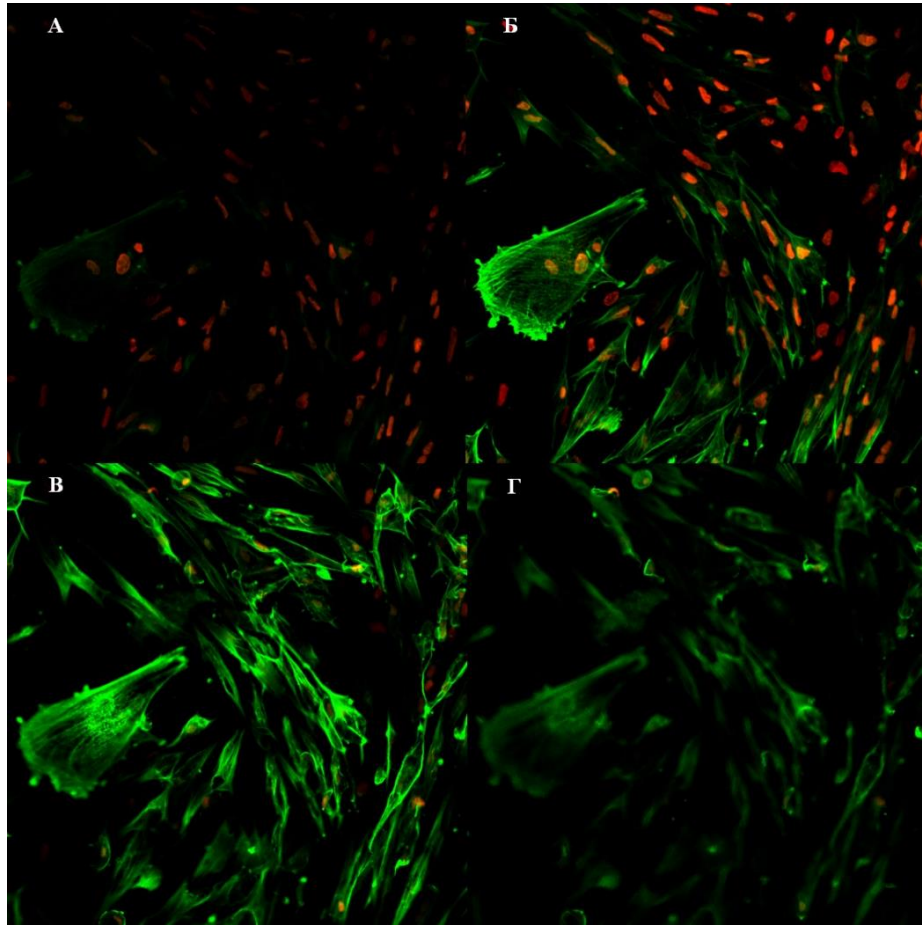


Рисунок 8. Галерея оптических срезов эксплантатов ткани кости. Контроль. Окраска фаллоидином, конъюгированным с Texas Red (зеленый цвет) и DAPI (красный цвет). (ув.40). Пример записи. Срезы А – Г.

Для визуализации клеток зоны роста и создания галереи оптических срезов с последующей 3D реконструкцией окрашивание эксплантатов ткани сердца осуществляли акридиновым оранжевым в 0.01% концентрации. Время экспозиции составляло 5 минут. Краситель окрашивает в зеленый цвет ДНК – длина волны 530 нм, РНК – в красный – длина волны 620 нм. Толщина зоны роста контрольных эксплантатов составила 16 мкм (рис. 9).

Прижизненное окрашивание препаратов ткани кости осуществляли фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Texas Red (Texas Red®-X phalloidin, Life Technologies, USA) и исследовали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Фаллоидин

высокоспецифично связывается с F-актином и позволяет оценить актиновый цитоскелет клеток зоны роста. Толщина зоны роста контрольных эксплантатов составила 37 мкм (рис. 8).

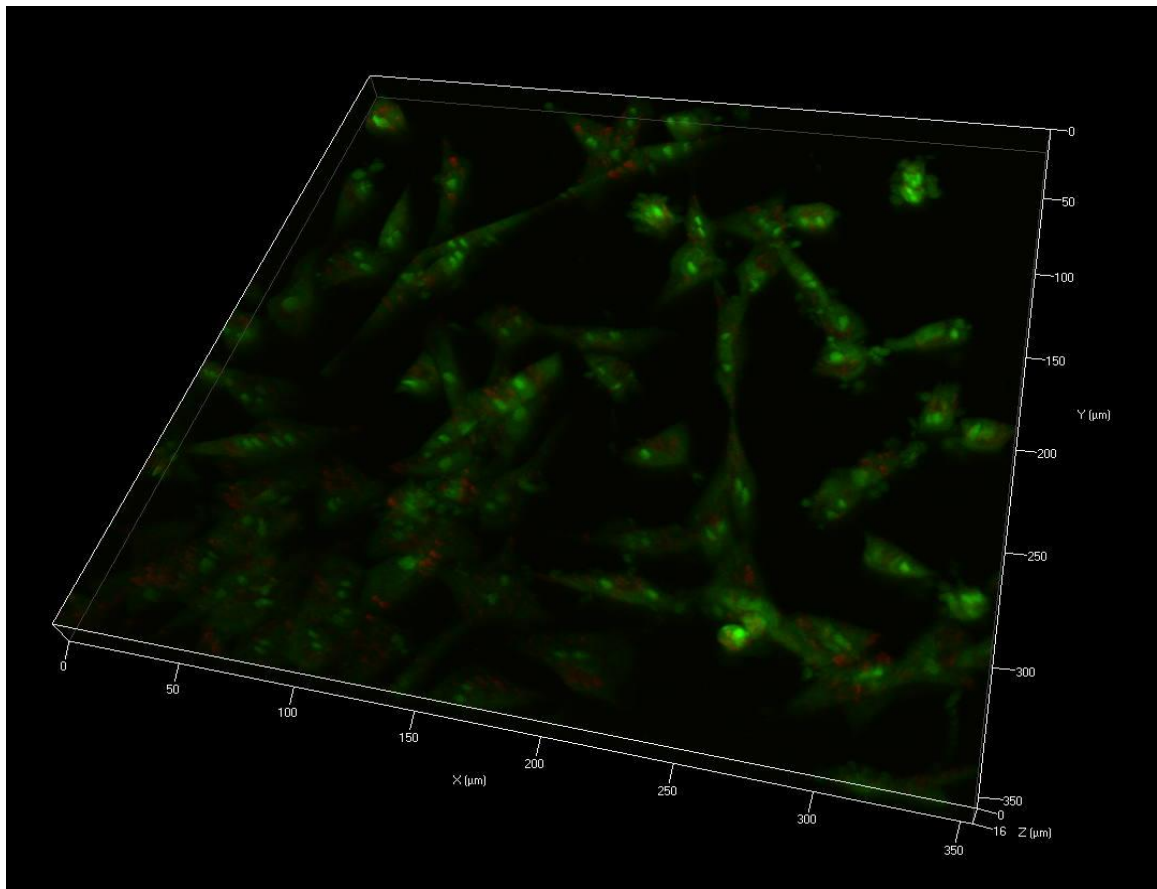


Рисунок 9. 3D-реконструкция фрагмента зоны роста эксплантата сердца (контроль). Окраска акридиновый оранжевый. Толщина зоны роста 16 мкм.

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 среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Участие $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в ремоделировании ткани сердца и кости

Для оценки участия  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в ремоделировании ткани кости оубаин исследовали в диапазоне концентраций от  $10^{-12}$  до  $10^{-4}$  М.

Для того, что бы подтвердить наличие  $\alpha_1$ - и  $\alpha_3$ -изоформы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы на поверхности клеток в зоне роста эксплантатов ткани сердца и кости 10-12-дневных куриных эмбрионов были использованы иммуногистохимические методы исследования. Контрольные и экспериментальные эксплантаты окрашивали антителами к  $\alpha_1$ - и  $\alpha_3$ -изоформам  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы по стандартному протоколу. Проведенные исследования показали, что в клетках зоны роста эксплантатов ткани сердца и кости  $\alpha_1$ - изоформа  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы локализована преимущественно на участке плазматической мембраны над ядром (рис. 10).  $\alpha_3$ -изоформа  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы распределена по всей поверхности плазматической мембраны, однако наибольшая плотность  $\alpha_3$ -изоформ фермента также наблюдается над ядром (рис. 11).

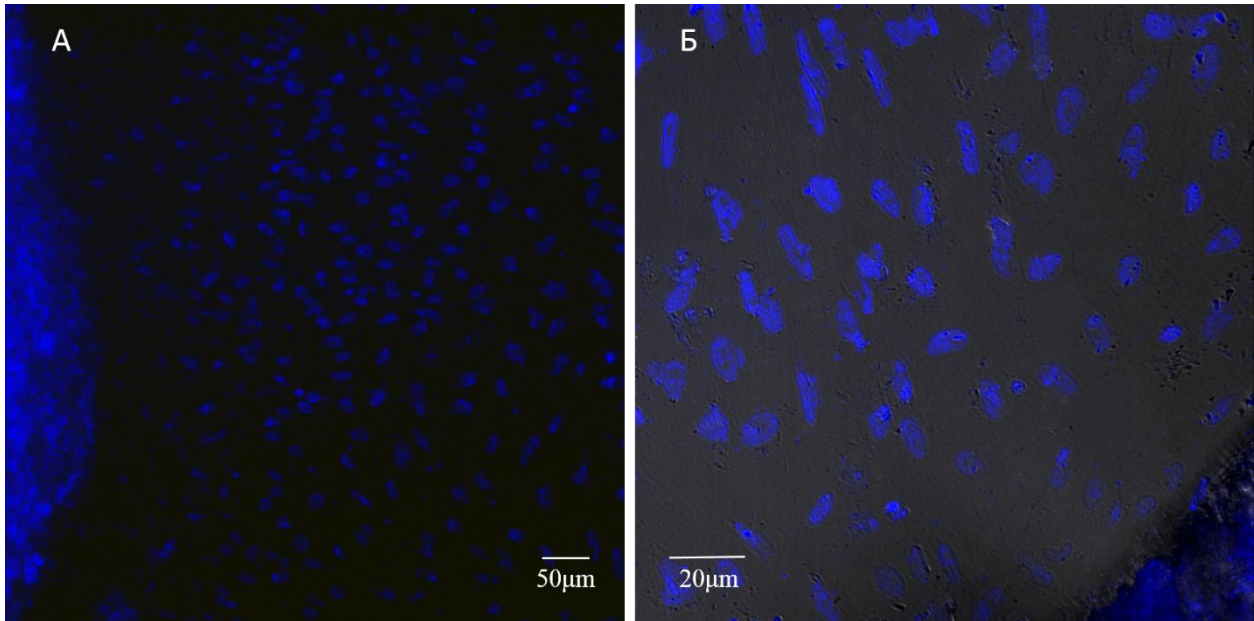


Рисунок 10. Распределение  $\alpha_1$ -изоформы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в клетках зоны роста эксплантатов ткани сердца (А) (ув. 20) и ткани кости (Б) (ув.40). Контроль. Окраска антителами к  $\alpha_1$ -изоформе  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы.

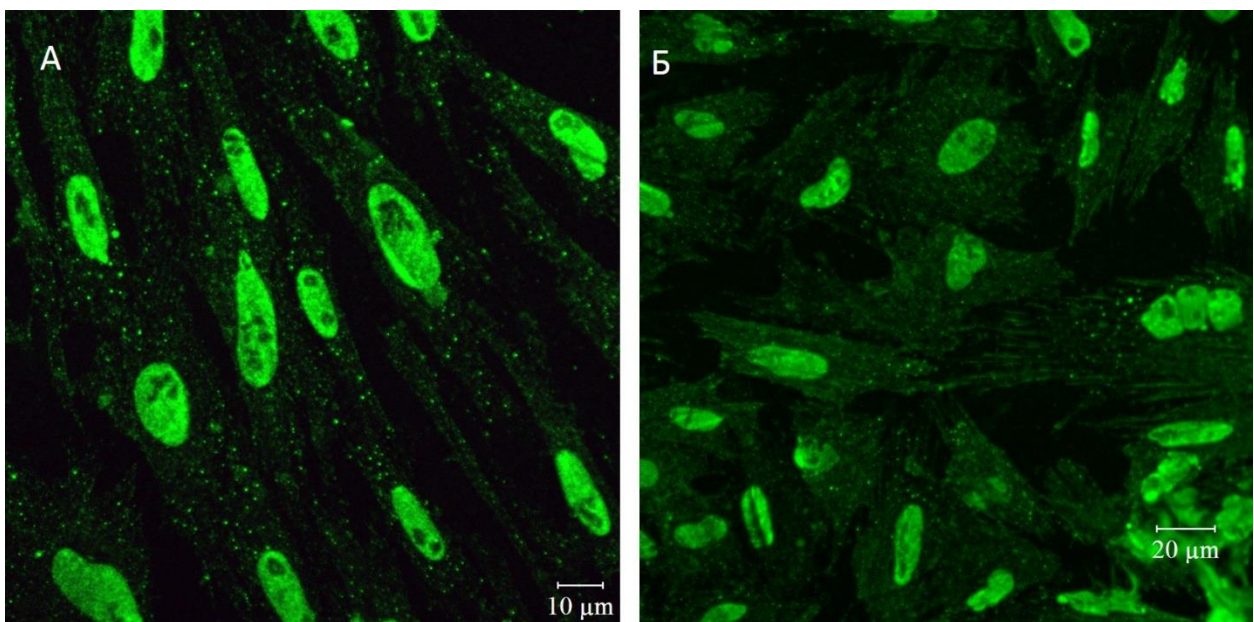


Рисунок 11. Распределение  $\alpha_3$ -изоформы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в клетках зоны роста эксплантатов ткани сердца (А) (ув. 63) и ткани кости (Б) (ув.40). Контроль. Окраска антителами к  $\alpha_3$ -изоформе  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы.

Действие оубаина было дозозависимым в изучаемом диапазоне концентраций. Добавление в питательную среду оубаина в концентрации  $10^{-12}$  М

стимулировало рост эксплантатов ткани кости на  $46 \pm 1,4\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.01$ ). Максимальный трофотропный эффект препарат проявлял в концентрации  $10^{-10}$  М. ИП экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на  $100 \pm 2,1\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.01$ ). При введении в питательную среду оуабаина в концентрациях  $10^{-8}$  и  $10^{-6}$  М было зарегистрировано уменьшение ИП экспериментальных эксплантатов на  $45 \pm 1,1\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) и  $80 \pm 0,5\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) соответственно. В концентрации  $10^{-4}$  М оуабаин практически полностью угнетал рост эксплантатов ткани кости (рис. 12).

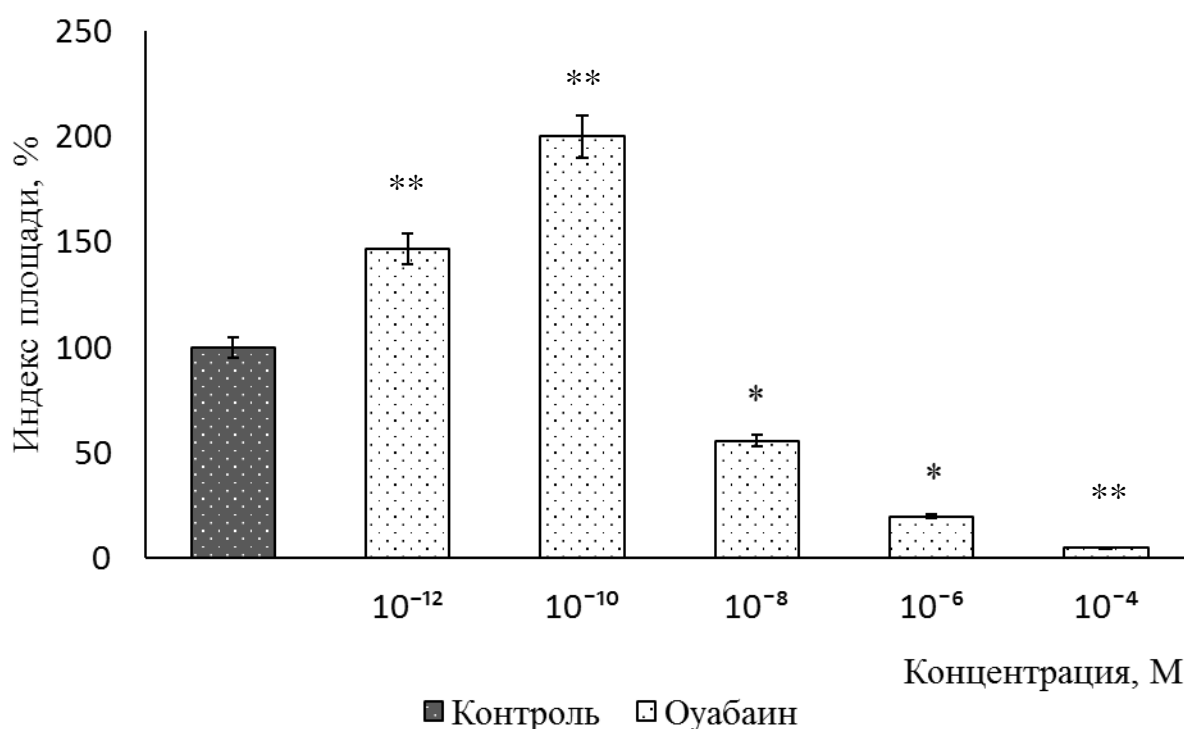


Рисунок 12. Оуабаин в диапазоне концентраций от  $10^{-12}$  до  $10^{-4}$  М дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов, \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние дигоксина на рост эксплантатов ткани сердца в диапазоне концентраций от  $10^{-12}$  до  $10^{-6}$  М. В диапазоне концентраций от  $10^{-12}$  М до  $10^{-8}$  М дигоксин на рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов не влиял. Препарат ингибировал рост эксплантатов ткани сердца в концентрации  $10^{-6}$  М на  $61 \pm 1,6\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 13).



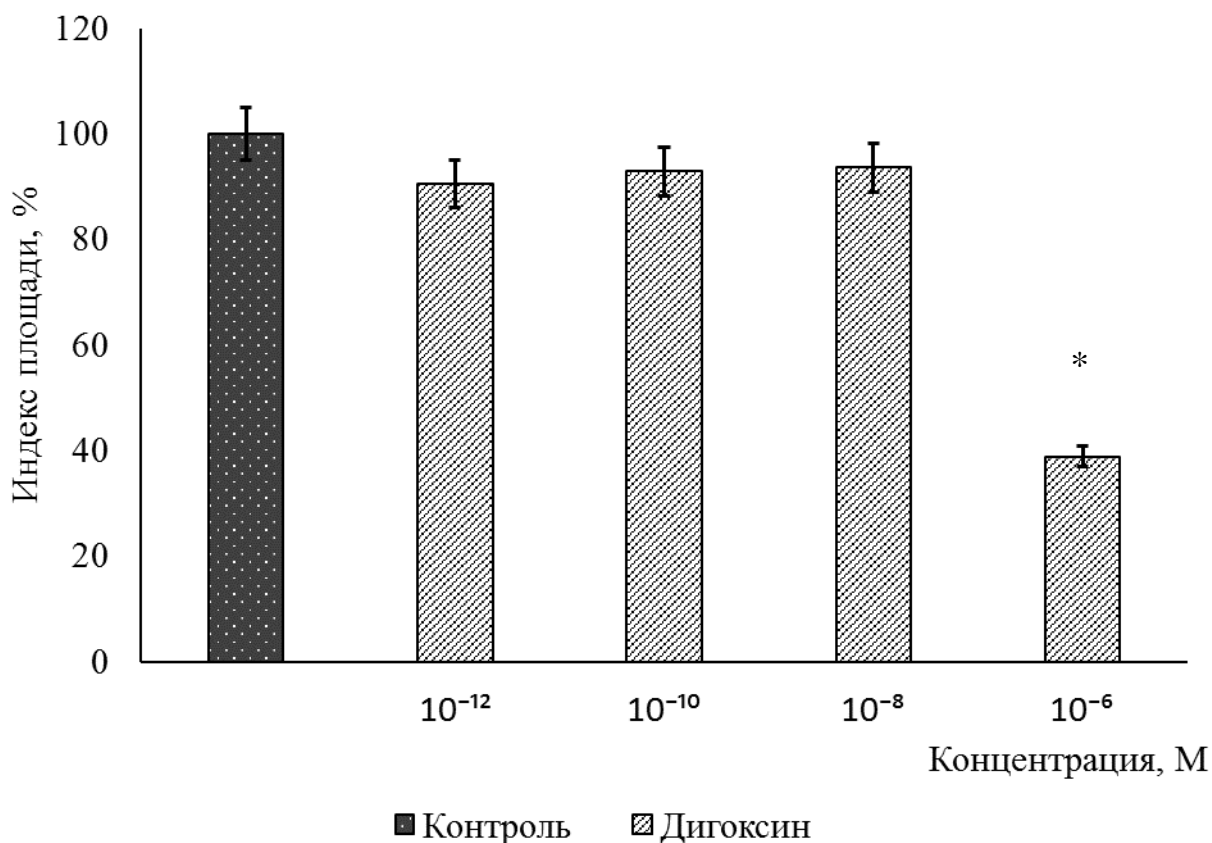


Рисунок 13. Влияние дигоксина на рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов, \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

Сходные данные были получены при исследовании влияния аналогичных концентраций дигоксина на рост эксплантатов ткани кости. В концентрациях от  $10^{-8}$  М до  $10^{-12}$  М препарат не оказывал влияния на рост эксплантатов ткани кости. Индекс площади не отличался от контрольного значения. Дигоксин ингибировал рост экспериментальных эксплантатов в концентрации  $10^{-6}$  М. ИП был ниже контрольного значения на  $69 \pm 1,5\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 14).

Кардиотонические стероиды во всех исследуемых концентрациях на изменение формирования многомерной структуры в зоне роста эксплантатов ткани сердца и кости не влияли. Толщина зоны роста не отличалась от контрольных значений.

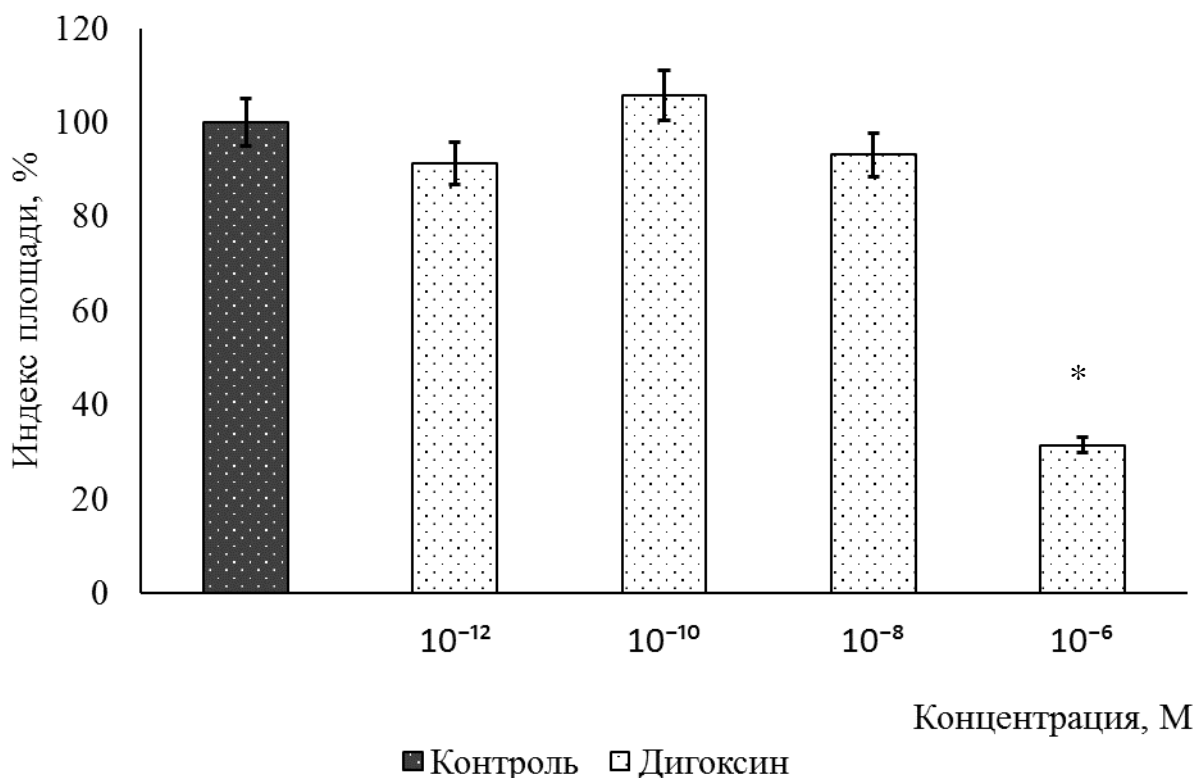


Рисунок 14. В отличие от оуабаина, дигоксин не стимулирует рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов в диапазоне концентраций  $10^{-12}$  М до  $10^{-6}$  М, \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

### 3.2 Исследование гомоцистеин тиолактона в условиях органотипического культивирования ткани сердца и кости

В первой серии экспериментов исследовали влияние гомоцистеин тиолактона диапазоне концентраций ( $7 \times 10^{-9}$  М –  $10^{-3}$  М) на рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов. Действие гомоцистеин тиолактона было дозозависимым. При введении в питательную среду гомоцистеин тиолактона в концентрации  $7 \times 10^{-9}$  М через трое суток культивирования было зарегистрировано уменьшение ИП экспериментальных эксплантатов ткани сердца на  $13 \pm 1\%$  ( $n=120$ ). Индекс площади экспериментальных эксплантатов, культивируемых в питательной среде содержащей гомоцистеин тиолактон в концентрации  $42 \times 10^{-9}$  М был ниже контрольного значения на  $26 \pm 1,5\%$  ( $n=120$ ). Введение в питательную среду

гомоцистеин тиолактона в концентрациях  $7 \times 10^{-7}$  М и  $8 \times 10^{-6}$  М угнетало рост эксплантатов ткани сердца на  $29 \pm 1,6\%$  ( $n=120$ ,  $p<0.05$ ) и  $33 \pm 1,3\%$  ( $n=120$ ,  $p<0.05$ ) соответственно (Рис. 15). Обнаружено, что в концентрации  $10^{-3}$  М гомоцистеин тиолактон ингибировал рост эксплантатов ткани сердца в среднем на  $60 \pm 2\%$  ( $n=120$ ,  $p<0.01$ ). Зарегистрирован кардиотоксический эффект препарата (рис. 15). Стимулирующее рост эксплантатов ткани сердца 10-12 дневных куриных эмбрионов действие гомоцистеин тиолактона не обнаружено.

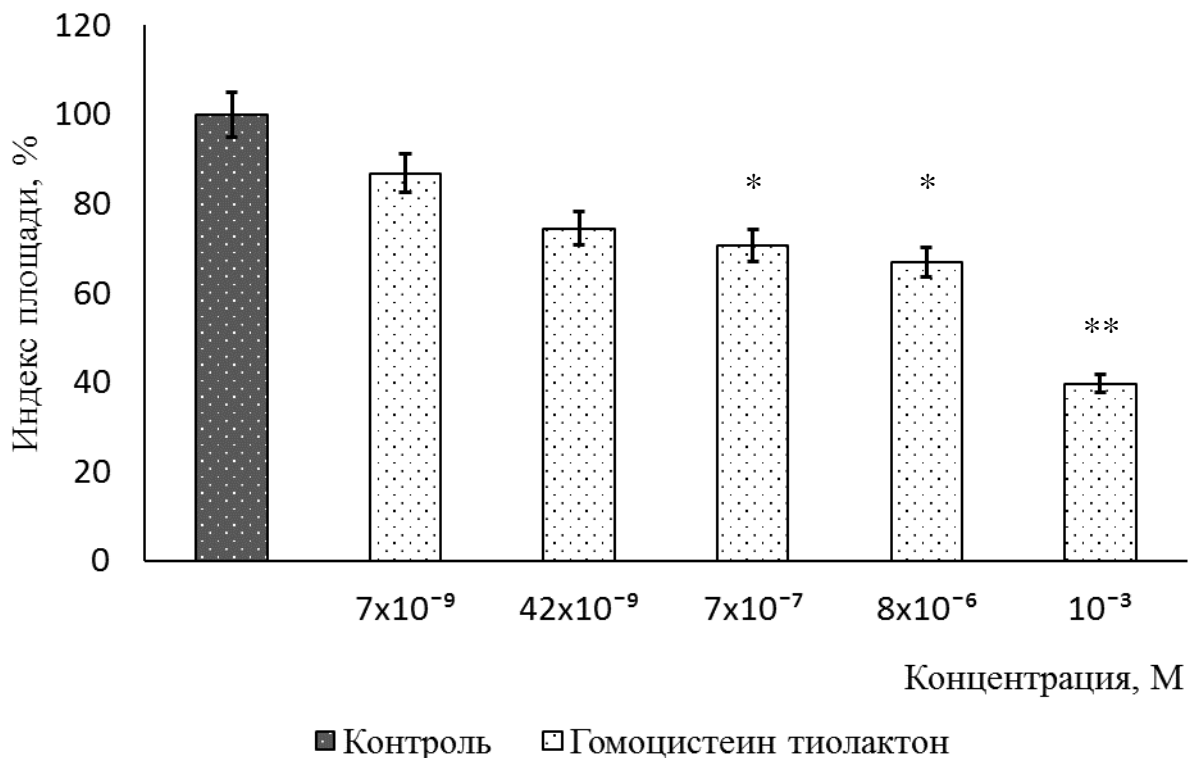


Рисунок 15. Кардиотоксический эффект гомоцистеин тиолактона, \* –  $p<0.05$ , \*\* –  $p<0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

При изучении влияния препарата на рост эксплантатов ткани кости, гомоцистеин тиолактон исследовали в диапазоне концентраций от  $10^{-11}$  М до  $10^{-3}$  М. Действие препарата в указанном диапазоне концентраций являлось дозозависимым. В концентрации  $7 \times 10^{-9}$  М и  $10^{-11}$  М гомоцистеин тиолактон не оказывал выраженного ингибирующего эффекта. ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения (рис. 16). При добавлении в питательную среду гомоцистеин тиолактона в концентрации  $8 \times 10^{-6}$  М ИП

экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $40 \pm 1,6\%$  ( $n=120$ ,  $p<0.05$ ). В концентрации  $10^{-3}$  М гомоцистеин тиолактон ингибировал рост эксплантатов ткани кости на  $58 \pm 1\%$  ( $n=120$ ,  $p<0.05$ ). Зарегистрирован остеотоксический эффект препарата (рис.16).

Толщина зоны роста экспериментальных эксплантатов ткани сердца и кости во всех исследуемых концентрациях не отличалась от контрольных значений.

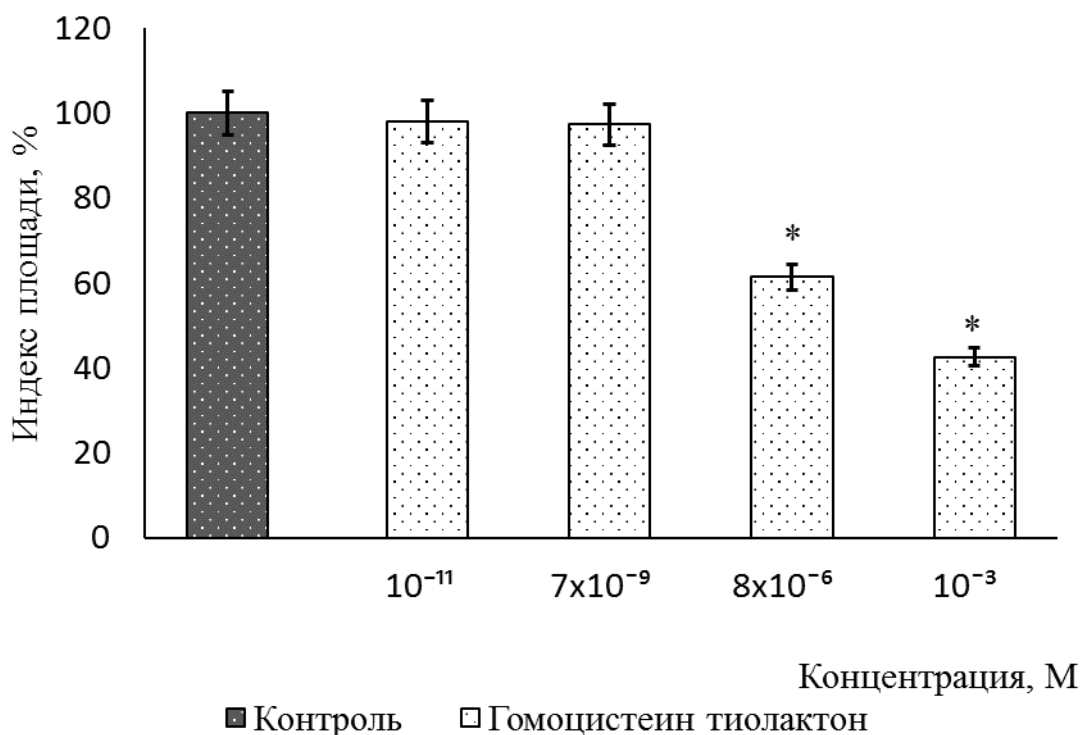


Рисунок 16. Действие гомоцистеин тиолактона на рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневного куриного эмбриона, \* –  $p<0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

Для оценки возможного механизма кардиотоксического действия гомоцистеин тиолактона эксплантаты ткани сердца культивировали в питательной среде, содержащей гомоцистеин тиолактон ( $10^{-3}$  М) и оубаин ( $10^{-8}$  М) (рис. 17). Через трое суток культивирования ИП экспериментальных эксплантатов составил  $5 \pm 0,1\%$  ( $n=120$ ,  $p<0.01$ ) от контрольного значения. Значение ИП не отличалось от ИП эксплантатов, культивируемых в питательной среде содержащей только оубаин ( $10^{-8}$  М).

В следующей серии экспериментов эксплантаты ткани сердца культивировали в питательной среде содержащей гомоцистеин тиолактон ( $10^{-3}$  М) и оуабаин ( $10^{-10}$  М) (рис. 18). Зарегистрированный ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $45 \pm 1,9\%$  ( $n=120$ ,  $p<0.05$ ) и не отличался от ИП эксплантатов, культивируемых в питательной среде содержащей только гомоцистеин тиолактон ( $10^{-3}$  М).

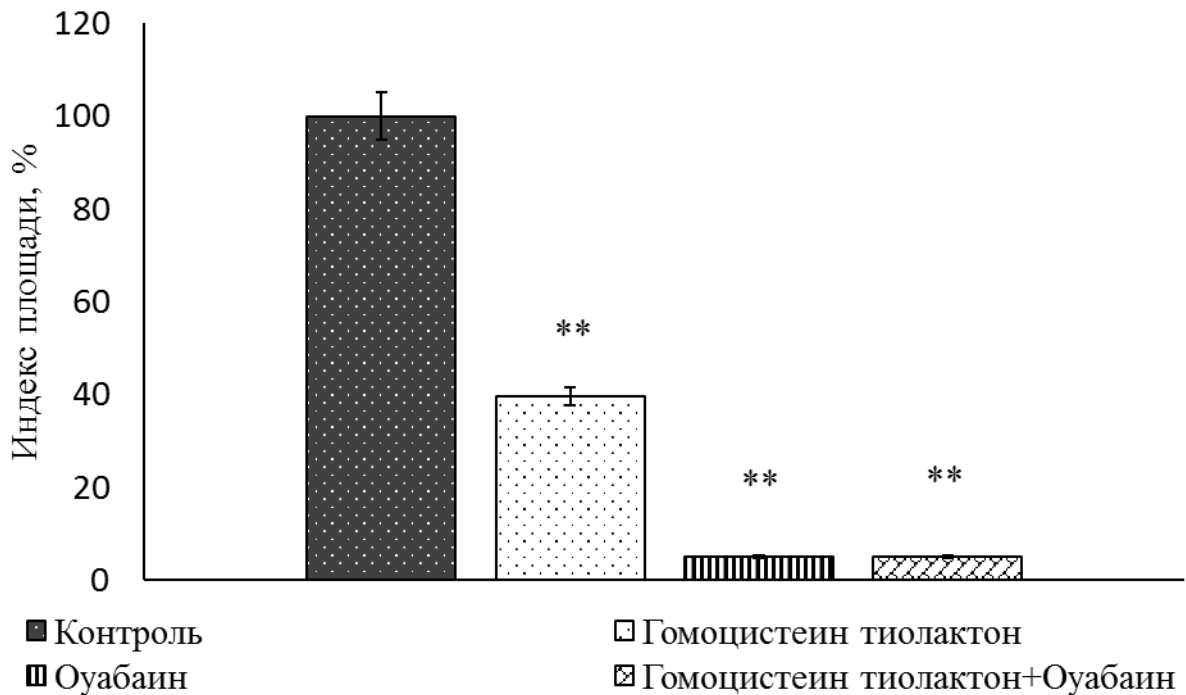


Рисунок 17. Сочетанное действие гомоцистеин тиолактона ( $10^{-3}$  М) и оуабаина ( $10^{-4}$  М) на рост эксплантатов ткани сердца, \*\* –  $p<0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

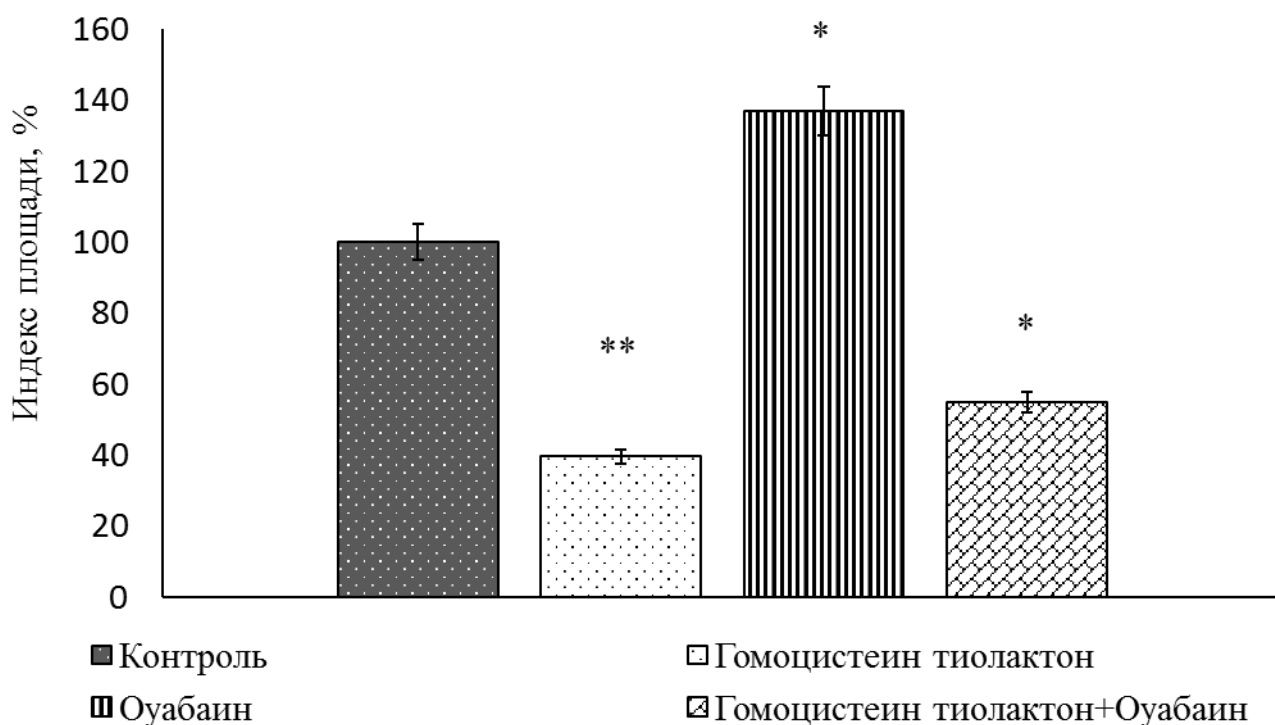


Рисунок 18. Влияние гомоцистеин тиолактона ( $10^{-3}$  М) в присутствии оуабаина ( $10^{-10}$  М) на рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов, \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

Для оценки возможного механизма остеотоксического действия гомоцистеин тиолактона эксплантаты ткани кости культивировали в питательной среде, содержащей гомоцистеин тиолактон ( $10^{-3}$  М) и оуабаин ( $10^{-4}$  М) (рис. 19). ИП экспериментальных эксплантатов составил  $5 \pm 0,1\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.01$ ) от контрольного значения. Таким образом, гомоцистеин тиолактон ( $10^{-3}$  М) не устраняет ингибирующее действие оуабаина ( $10^{-4}$  М) на рост эксплантатов ткани кости.

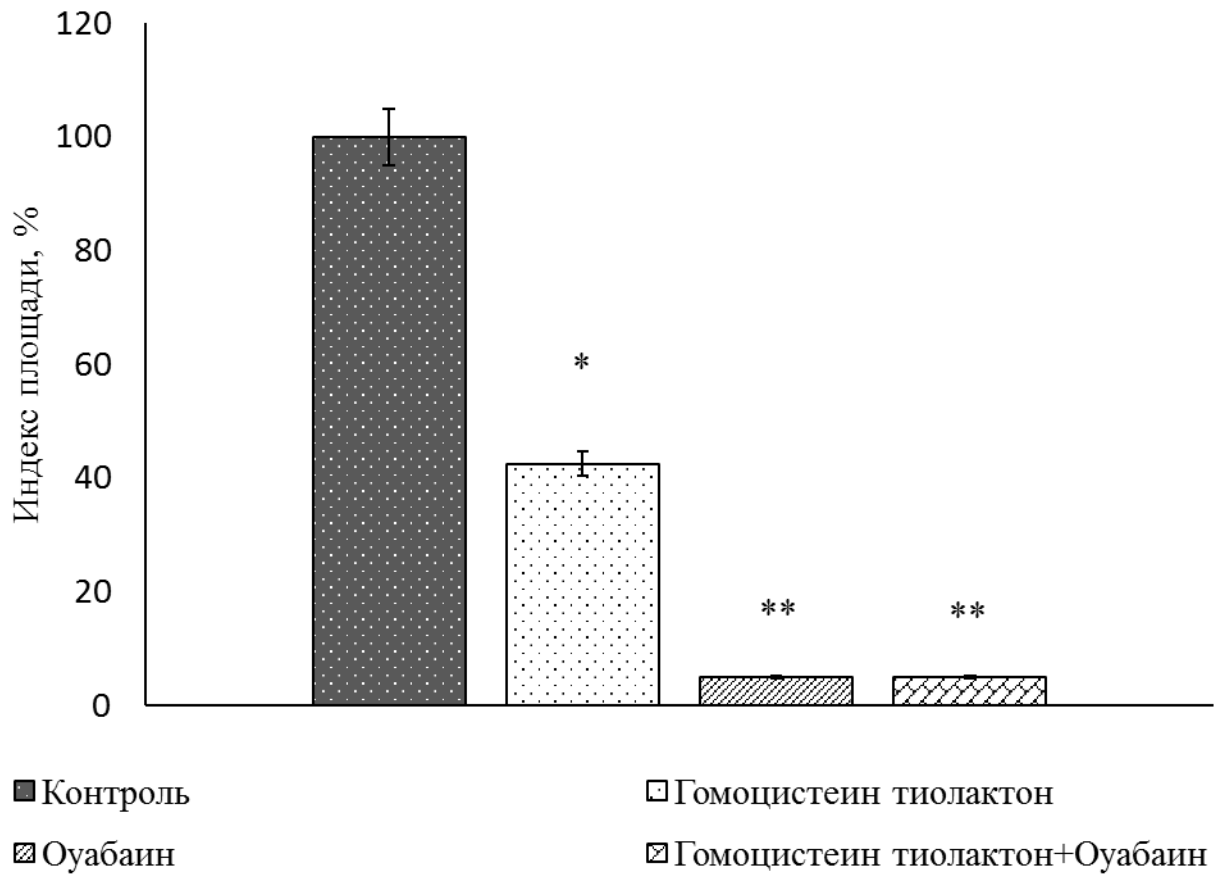


Рисунок. 19. Гомоцистеин тиолактон ( $10^{-3}$  М) не устраняет ингибирующее действие оуабаина ( $10^{-4}$  М) на рост эксплантатов ткани кости, \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

При культивировании экспериментальных эксплантатов в питательной среде, содержащей гомоцистеин тиолактон ( $10^{-3}$  М) и оуабаин ( $10^{-10}$  М) ИП зарегистрированный на третьи сутки культивирования был на  $35 \pm 1,5\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) ниже контрольного значения (рис. 20).

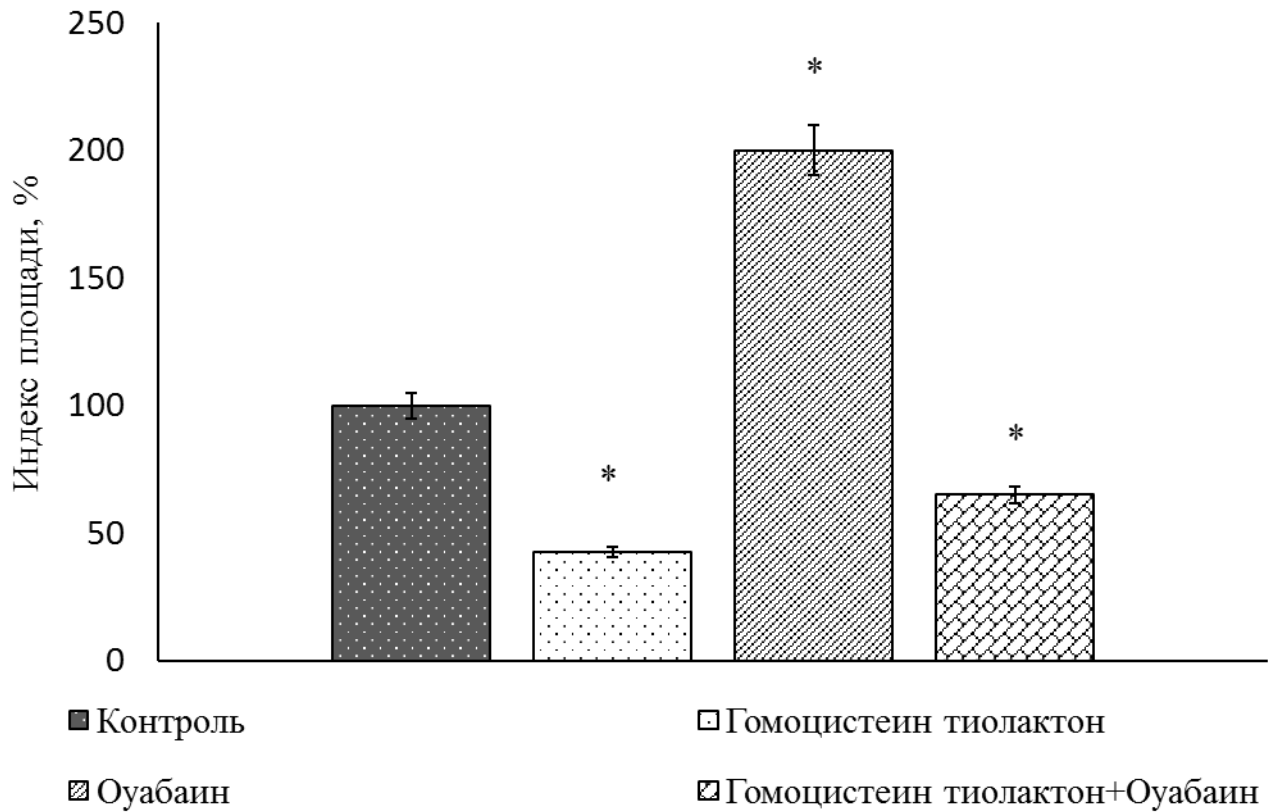


Рисунок 20. Остеотоксический эффект гомоцистеин тиолактона ( $10^{-3}$  М) в присутствии оуабаина ( $10^{-10}$  М), \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

### 3.3 Оценка эффектов катехоламинов в условиях органотипического культивирования ткани сердца и кости

#### 3.3.1 Изучение эффектов адреналина

В следующей серии экспериментов исследовали действие адреналина в диапазоне концентраций от  $10^{-14}$  М до  $10^{-9}$  М на рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов.

Чтобы доказать наличие  $\beta_1$ -адренорецепторов в клетках зоны роста исследуемых тканей использовали антитела. Для визуализации распределения  $\beta_1$ -адренорецепторов на поверхности клеток в зоне роста, эксплантаты ткани сердца



и кости окрашивали антителами к  $\beta_1$ -адренорецептору (рис. 21). Было доказано, что рецепторы расположены по всей поверхности плазматической мембраны, наибольшая их плотность локализована над ядром.

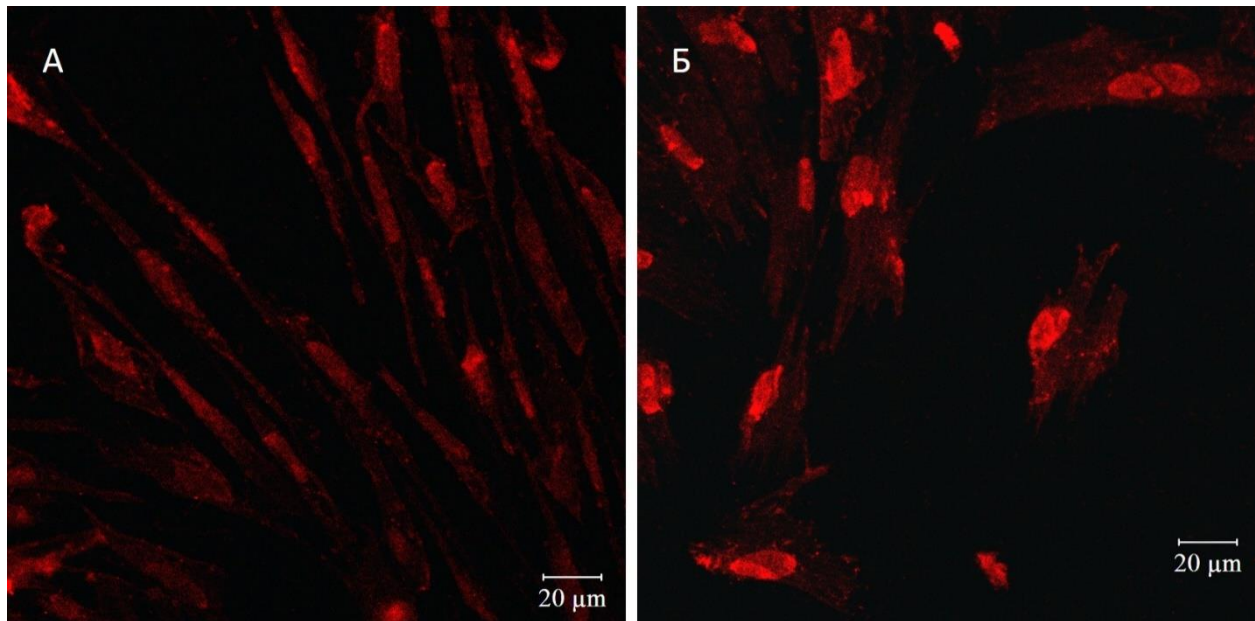


Рисунок 21. Распределение  $\beta_1$ -адренорецепторов в клетках зоны роста эксплантатов ткани сердца (А) и ткани кости (Б). Контроль. Окраска антителами к  $\beta_1$ -адренорецептору. (ув.40).

Добавление в питательную среду адреналина в концентрации  $10^{-14}$  М незначительно стимулировало рост экспериментальных эксплантатов. ИП был выше контрольного значения всего на  $20 \pm 1,9\%$  ( $n=120$ ). В концентрациях  $10^{-13}$  М и  $10^{-12}$  М адреналин стимулировал рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов на  $50 \pm 2\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) и  $69 \pm 2,1\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) соответственно. При введении в питательную среду адреналина в концентрации  $10^{-11}$  М через трое суток культивирования было зарегистрировано увеличение ИП экспериментальных эксплантатов ткани сердца на  $30 \pm 1,6\%$  ( $n=120$ ). Обнаружено, что адреналин в концентрации  $10^{-9}$  М стимулирует рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов на  $10 \pm 1,5\%$  ( $n=120$ ) (рис. 22). Толщина зоны роста эксплантатов ткани сердца 10-12 дневных куриных эмбрионов культивируемых в питательной среде содержащей адреналин ( $10^{-12}$  М) не отличалась от контрольного значения.

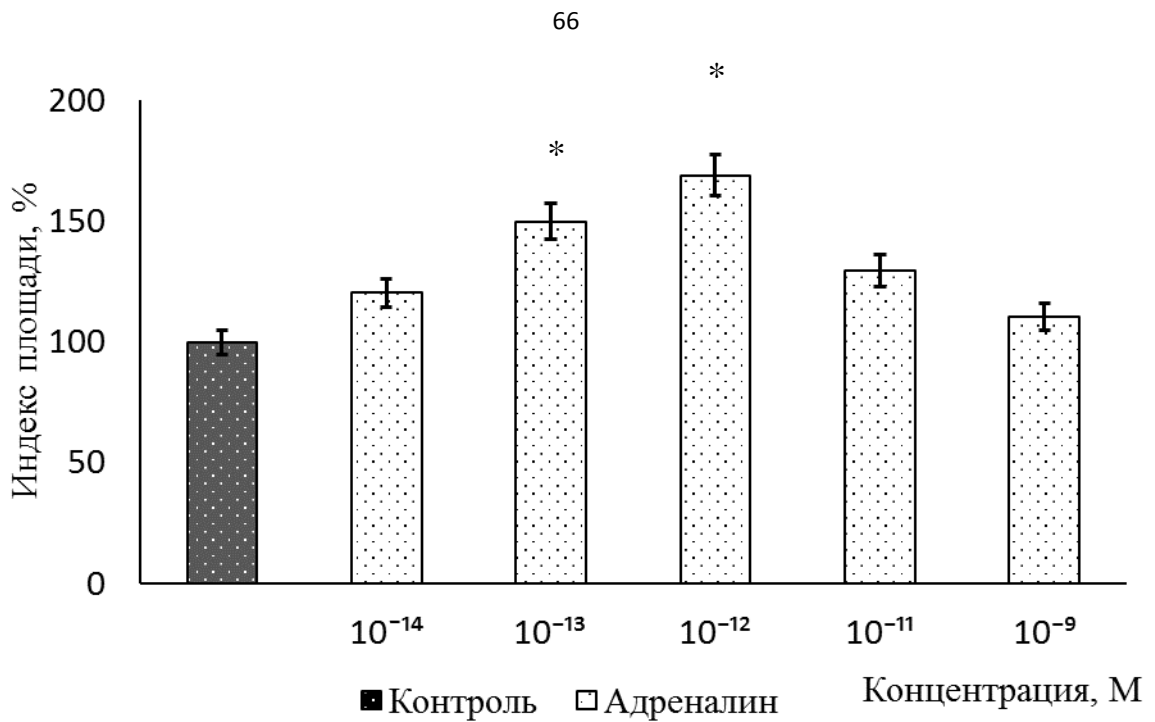


Рисунок. 22. Адrenalин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани сердца, \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние неселективного  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола на рост эксплантатов ткани сердца в органотипической культуре. В диапазоне концентраций от  $10^{-10}$  М до  $10^{-6}$  М пропранолол на рост экспериментальных эксплантатов не влиял. В концентрации  $10^{-4}$  М препарат практически полностью ингибировал рост эксплантатов ткани сердца (рис. 23). ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $95 \pm 0,3\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.01$ ). Толщина зоны роста экспериментальных эксплантатов, культивируемых в питательной среде в присутствии пропранолола во всех исследуемых концентрациях не отличалась от контрольного значения.

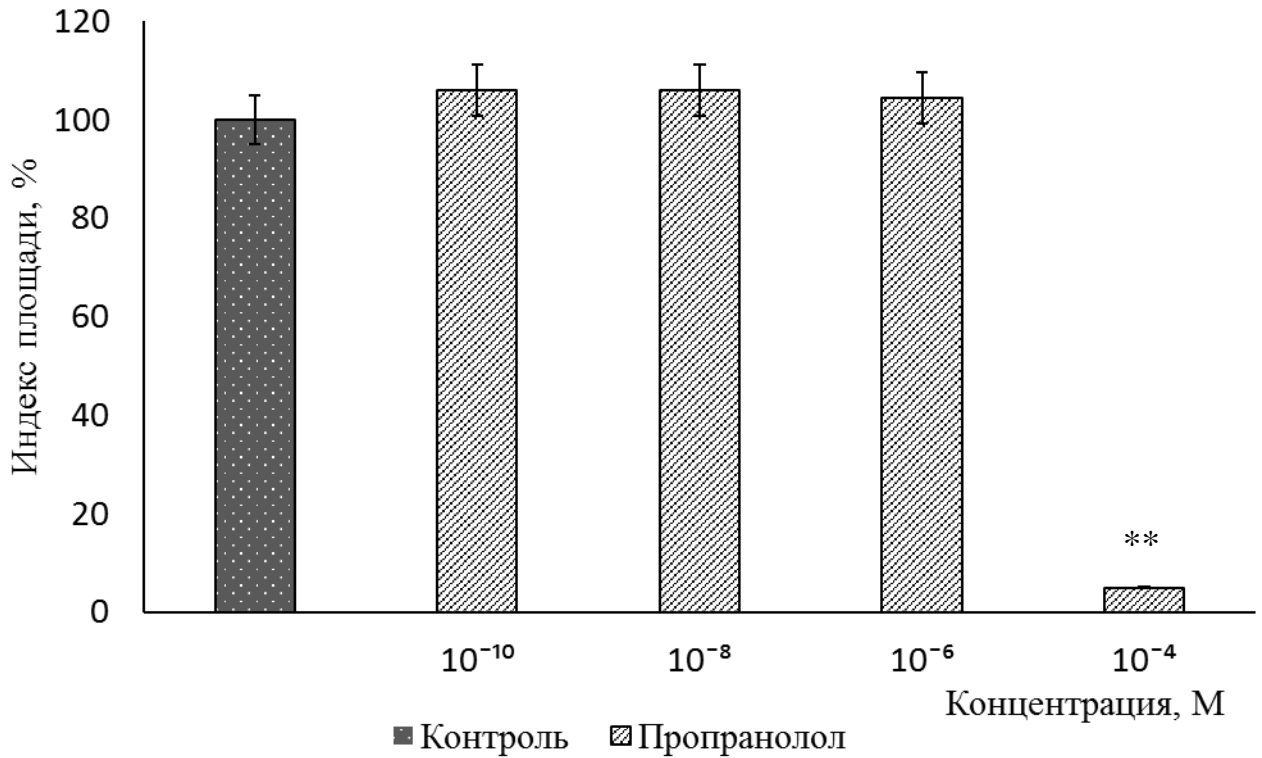


Рисунок 23. Влияние неселективного  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола на рост эксплантатов ткани сердца в органотипической культуре. \*\* –  $p < 0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

Для исследования вовлеченности  $\beta$ -адренорецепторов в механизм трофотропного действия адреналина, эксплантаты ткани сердца культивировали в питательной среде содержащей адреналин  $10^{-12}$  М и пропранолол  $10^{-6}$  М (рис. 24). Индекс площади экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения. Полученные данные свидетельствуют об участии  $\beta$ -адренорецепторов в реализации трофотропного действия адреналина на рост эксплантатов ткани сердца в условиях органотипического культивирования.

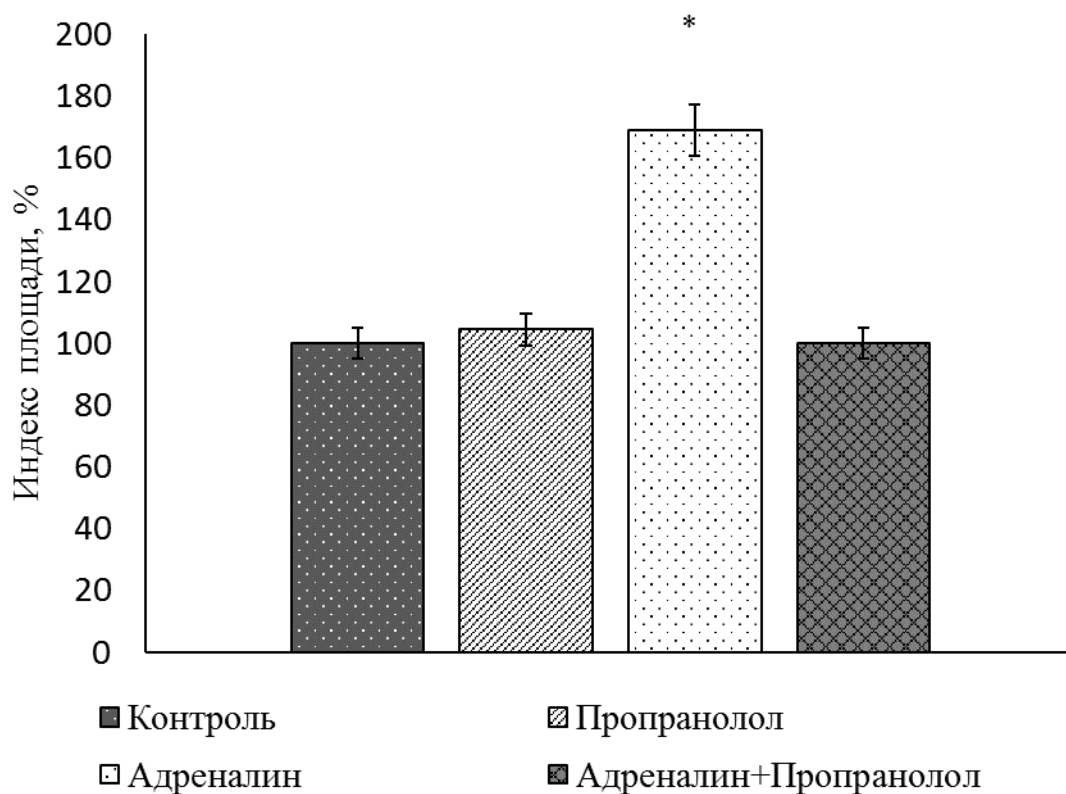


Рисунок 24. Отсутствие трофотропного эффекта адреналина ( $10^{-12}$  М) на фоне неселективного  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола ( $10^{-6}$  М) на рост эксплантатов ткани сердца. \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

Для уточнения механизма трофотропного действия адреналина в концентрации  $10^{-12}$  М была поставлена дополнительная серия экспериментов, в которых эксплантаты ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов культивировали в течение трех дней в питательной среде, содержащей адреналин ( $10^{-12}$  М) и кардиоселективный  $\beta_1$ -адреноблокатор атенолол ( $10^{-4}$  М). Предварительно в аналогичных экспериментальных условиях оценивали действие кардиоселективного  $\beta_1$ -адреноблокатора атенолола в диапазоне концентраций от  $10^{-10}$  м до  $10^{-4}$  М. Действие препарата было дозозависимым. В концентрациях  $10^{-10}$  М и  $10^{-8}$  М атенолол ингибировал процесс роста эксплантатов ткани сердца на  $20 \pm 1,8\%$  ( $n=120$ ) и  $15 \pm 16\%$  ( $n=120$ ) соответственно (рис. 25). Атенолол в концентрации  $10^{-6}$  М стимулировал рост эксплантатов ткани сердца на  $23 \pm 1,9\%$  ( $n=120$ ). При введении в питательную среду атенолола в концентрации  $10^{-4}$  М зарегистрировано достоверное стимулирующее рост эксплантатов ткани сердца

10-12-дневных куриных эмбрионов действие препарата. ИП экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на  $40 \pm 1,5\%$  ( $n=120$ ,  $p<0.05$ ) (рис. 25). Результаты проведенных экспериментов полностью совпали с ранее полученными данными (Цырлин и др., 2006). При изучении формирования трехмерной структуры в зоне роста эксплантатов ткани сердца, культивируемых в питательной среде, содержащей атенолол  $10^{-4}$  М, с использованием лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 были получены следующие данные. Измеренная с помощью методики изготовления оптических срезов с дальнейшей их реконструкцией, толщина зоны роста эксплантатов оказалась равной 50 мкм. Показатель составил  $212 \pm 3\%$  ( $n=120$ ,  $p<0.01$ ) (рис. 26). Полученные результаты свидетельствуют о том, что атенолол не только имитирует трофотропный эффект адреналина, но и превосходит его действие за счет стимуляции образования многослойной структуры.

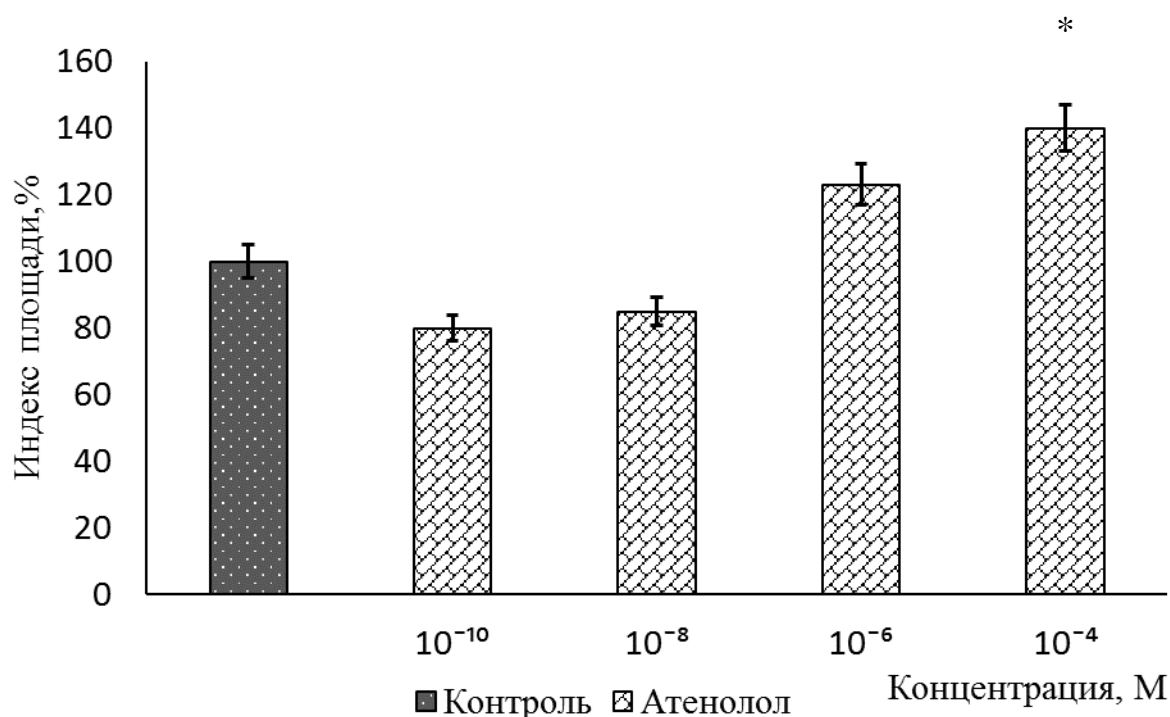


Рисунок 25. Изучение действия кардиоселективного  $\beta_1$ -адреноблокатора атенолола на рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневного куриного эмбриона, \* –  $p<0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

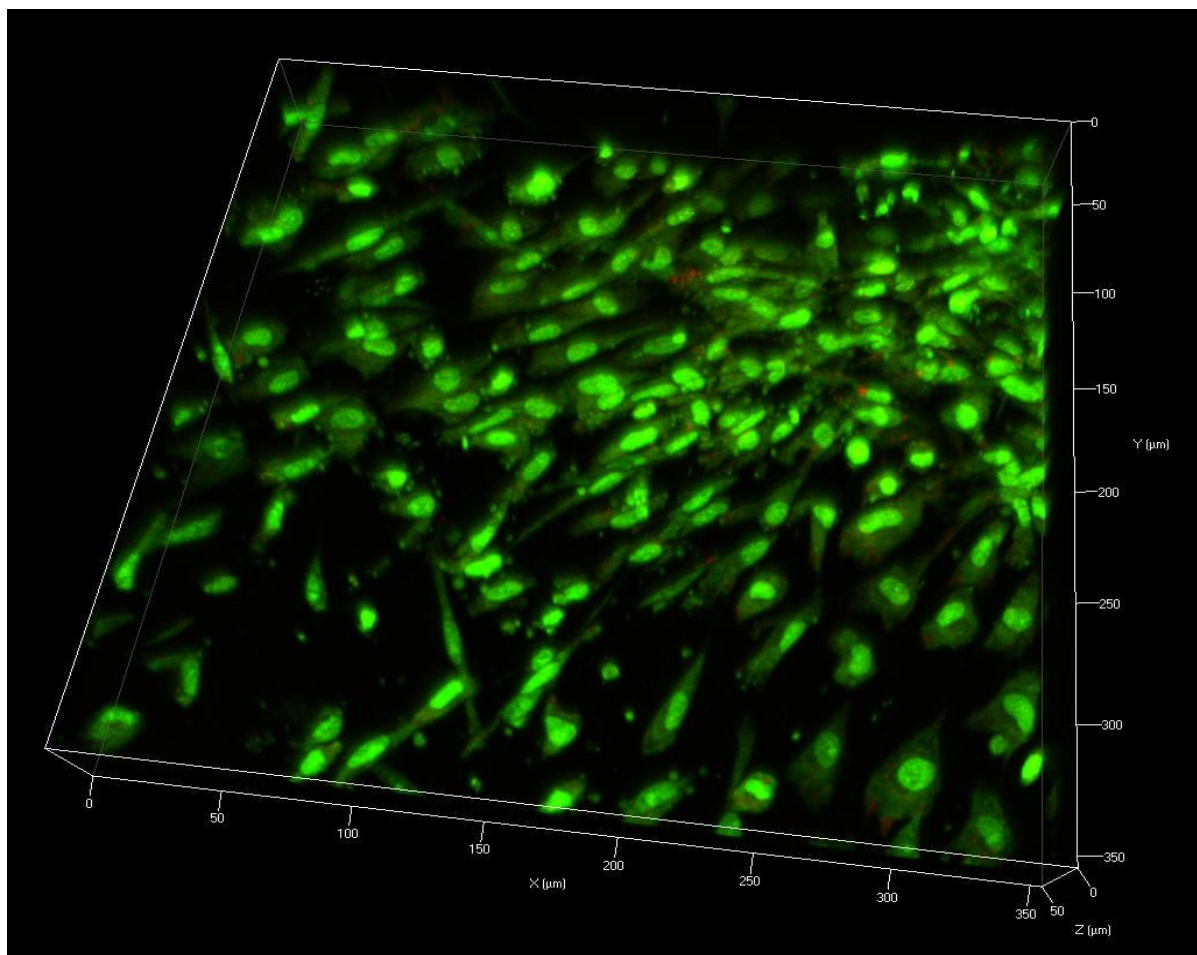


Рисунок 26. 3D-реконструкция фрагмента зоны роста эксплантата сердца (атенолол  $10^{-4}$  М). Окраска акридиновый оранжевый. Толщина зоны роста 50 мкм.

При культивировании эксплантатов ткани сердца, в питательной среде, содержащей адреналин ( $10^{-12}$  М) и атенолол ( $10^{-4}$  М) ИП экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на  $24 \pm 1,4\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ), что значительно ниже, чем стимулирующие эффекты обоих веществ, исследуемых независимо друг от друга (рис. 27). Статистический анализ не обнаружил значимых отличий между ИП эксплантатов культивируемых в питательной среде содержащей оба вещества и ИП эксплантатов культивируемых в питательной среде содержащей только атенолол ( $10^{-4}$  М). Таким образом, полученный результат свидетельствует о том, что трофотропное действие адреналина в основном реализуется за счет взаимодействия с  $\beta_1$ -адренорецепторами.

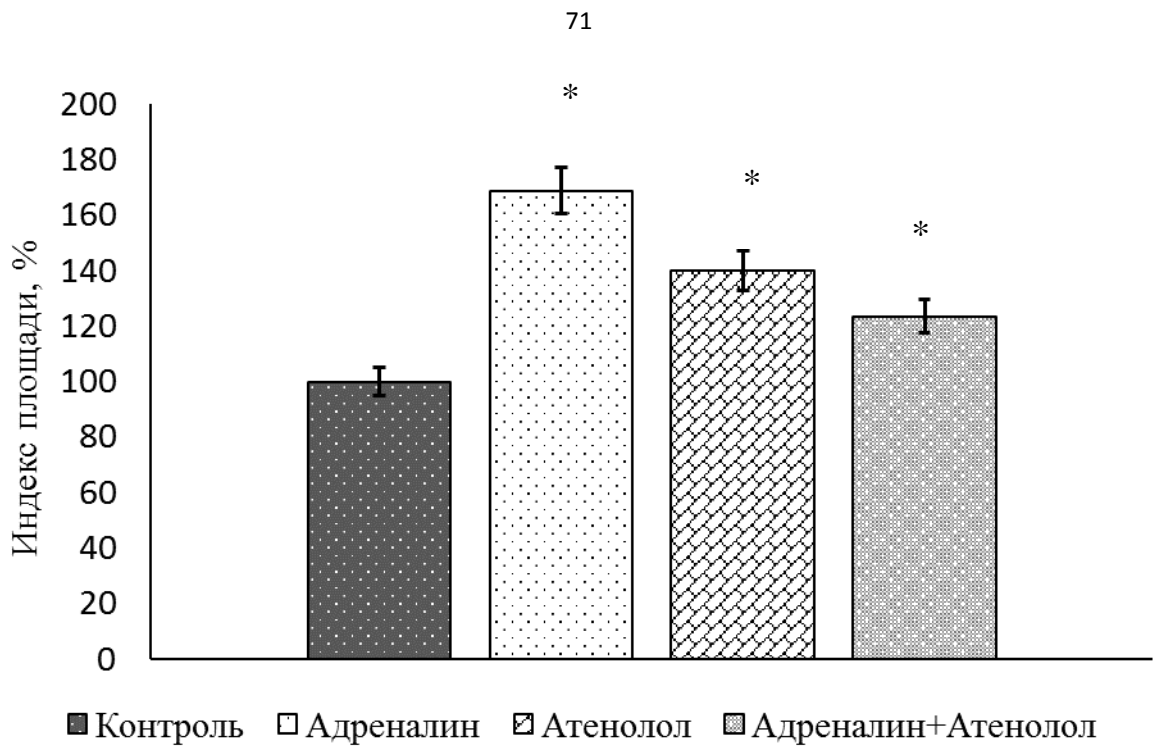


Рисунок 27. Атенолол ( $10^{-4}$  М) устраняет трофотропный эффект адреналина ( $10^{-12}$  М) в условиях органотипического культивирования ткани сердца, \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

Влияние адреналина на рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов исследовали в диапазоне концентраций от  $10^{-14}$  М до  $10^{-4}$  М (рис. 28). В диапазоне концентраций от  $10^{-14}$  М до  $10^{-6}$  М адреналин на рост эксплантатов костной ткани практически не влиял. ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения. В концентрации  $10^{-4}$  М адреналин угнетал рост эксплантатов ткани кости на  $53 \pm 1,7\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольным значением. Толщина зоны роста экспериментальных эксплантатов во всех исследуемых концентрациях не отличалась от контрольного значения.

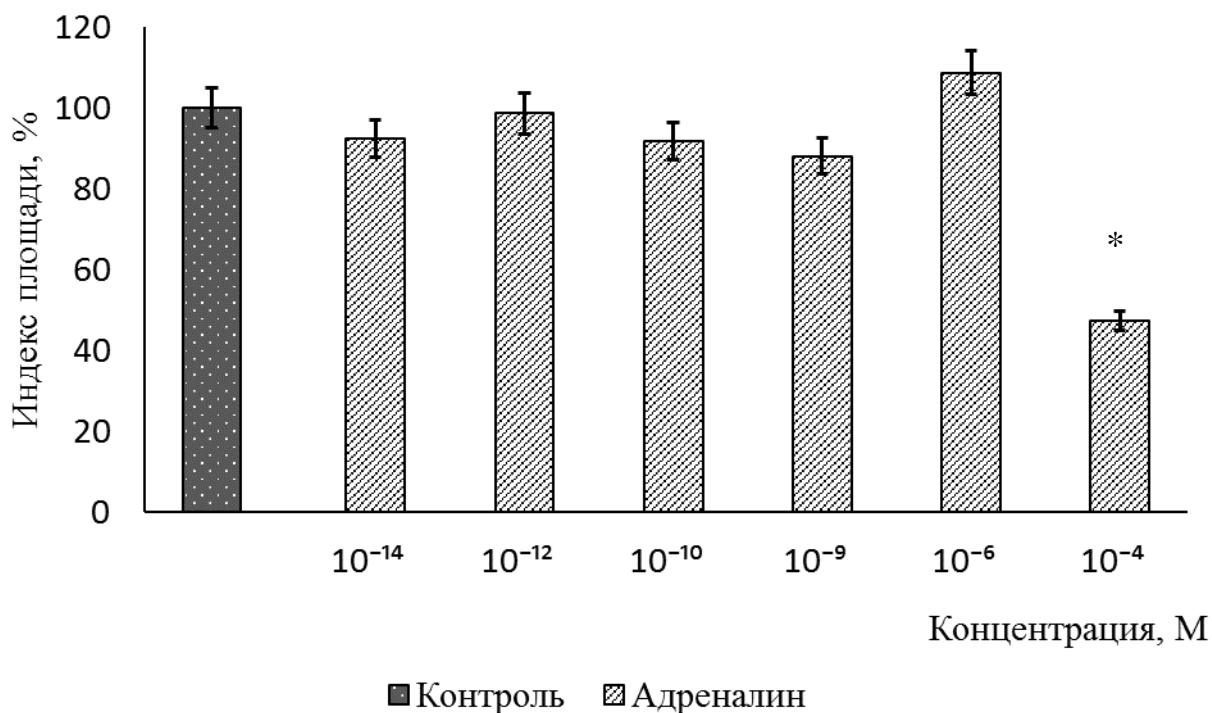


Рисунок 28. Адреналин в диапазоне концентраций от  $10^{-6}$  М до  $10^{-14}$  М не оказывает значимого влияния на рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов, \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

Для того чтобы оценить возможное участие  $\beta$ -адренорецепторов в реализации ингибирующего рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов действия адреналина ( $10^{-4}$  М), была поставлена следующая серия экспериментов. Экспериментальные эксплантаты ткани кости культивировали в питательной среде с добавлением адреналина ( $10^{-4}$  М) и неселективного  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола ( $10^{-10}$  М). Предварительно было изучено действие пропранолола на рост эксплантатов ткани кости в органотипической культуре ткани. Действие препарата в диапазоне концентраций от  $10^{-10}$  М до  $10^{-4}$  М было дозозависимым (рис. 29). В концентрации  $10^{-10}$  М пропранолол не оказывал влияния на рост экспериментальных эксплантатов ткани кости, ИП не отличался от контрольного значения. В концентрации  $10^{-8}$  М и  $10^{-6}$  М пропранолол ингибировал рост эксплантатов ткани кости на  $19 \pm 2\%$  ( $n=120$ ) и  $45 \pm 1,2\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) соответственно по сравнению с контрольным значением. В концентрации  $10^{-4}$  М пропранолол практически полностью ингибировал рост



экспериментальных эксплантатов ткани кости (рис. 29). Препарат во всех исследуемых концентрациях на изменение толщины зоны роста не влиял.

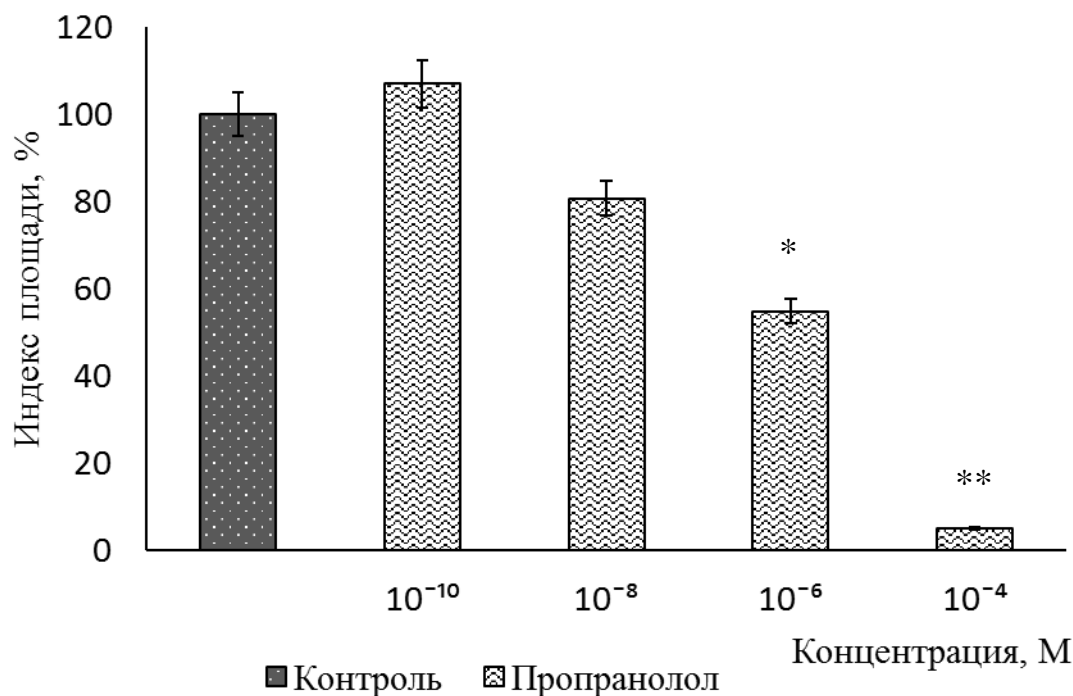


Рисунок 29. Дозозависимое действие неселективного  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола на рост эксплантатов ткани кости, \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

Культивирование экспериментальных эксплантатов ткани кости в питательной среде, содержащей адреналин в ингибирующей концентрации ( $10^{-4}$  М) и на фоне неселективного  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола показало, что добавление пропранолола нивелирует ингибирующий эффект адреналина (рис. 30). ИП экспериментальных эксплантатов составил  $86 \pm 2\%$  ( $n=120$ ) от контрольного значения. Отличие от ИП эксплантатов, культивируемых в питательной среде, содержащей один адреналин, составило  $38 \pm 1,3\%$  ( $p < 0.05$ ). Следовательно, ингибирование роста эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов адреналином происходит при участии  $\beta$ -адренорецепторов.

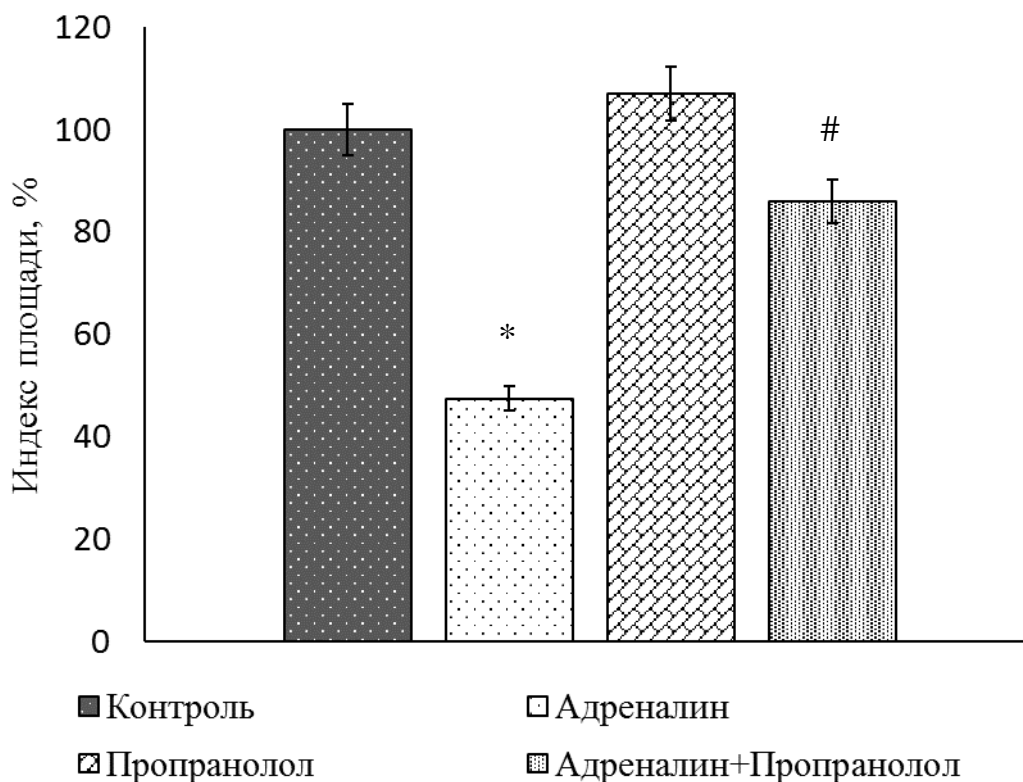


Рисунок 30. Отсутствие ингибирующего эффекта адреналина ( $10^{-4}$  М) на фоне неселективного  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола ( $10^{-10}$  М), \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля, # –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно ИП эксплантатов, культивируемых в среде в присутствии адреналина ( $10^{-4}$  М).

Для того чтобы изучить возможную связь ингибирующего действия адреналина с влиянием на  $\beta_1$ -адренорецепторы, эксплантаты ткани кости культивировали в питательной среде содержащей адреналин ( $10^{-4}$  М) в присутствии  $\beta_1$ -адреноблокатора атенолола ( $10^{-4}$  М). Предварительно, в аналогичных экспериментальных условиях, было исследовано действие атенолола на рост эксплантатов ткани кости в диапазоне концентраций от  $10^{-8}$  М до  $10^{-4}$  М (рис. 31). Ни в одной из исследуемых концентраций препарат не оказывал влияния на рост эксплантатов ткани кости. ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения. В отличие от ткани сердца, атенолол не влиял на изменение толщины зоны роста эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов.

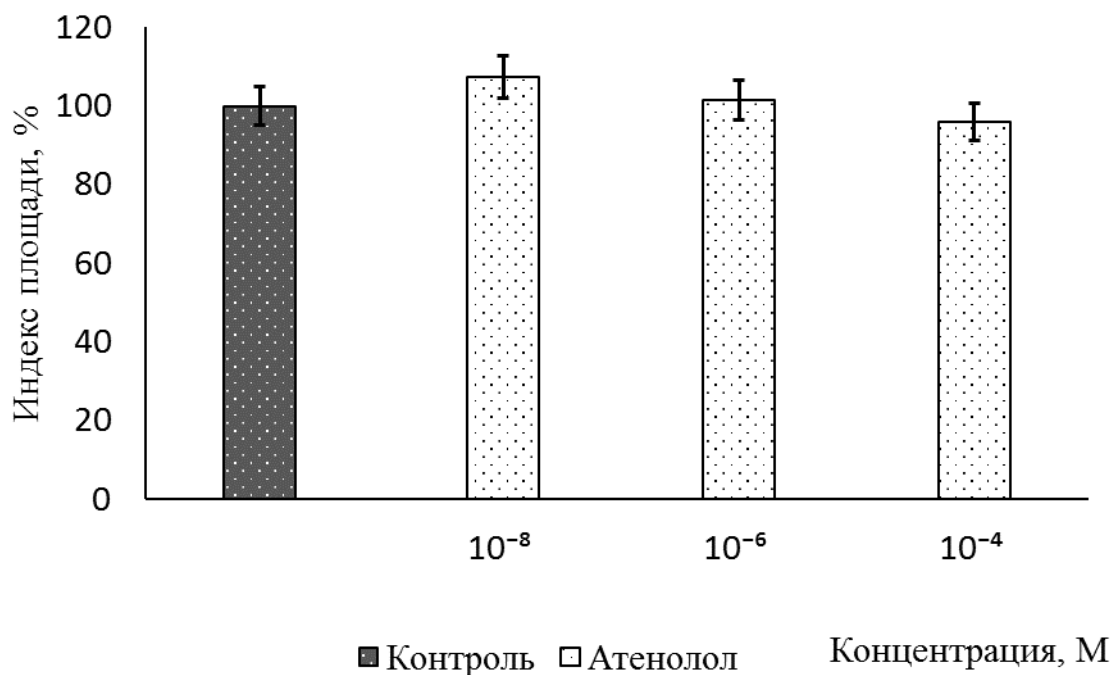


Рисунок. 31. Атенолол в диапазоне концентраций от  $10^{-4}$  до  $10^{-8}$  М на рост эксплантатов ткани кости 10-12 дневных куриных эмбрионов не влияет.

При наличии в питательной среде адреналина ( $10^{-4}$  М) и атенолола ( $10^{-4}$  М) наблюдали практически такое же ингибирование роста экспериментальных эксплантатов ткани кости, как при введении одного адреналина (рис. 32). ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $47 \pm 1,6\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ). Полученные результаты свидетельствуют о том, что  $\beta_1$ -адренорецепторы не вовлечены в реализацию ингибирующего рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов действия высоких концентраций адреналина ( $10^{-4}$  М).

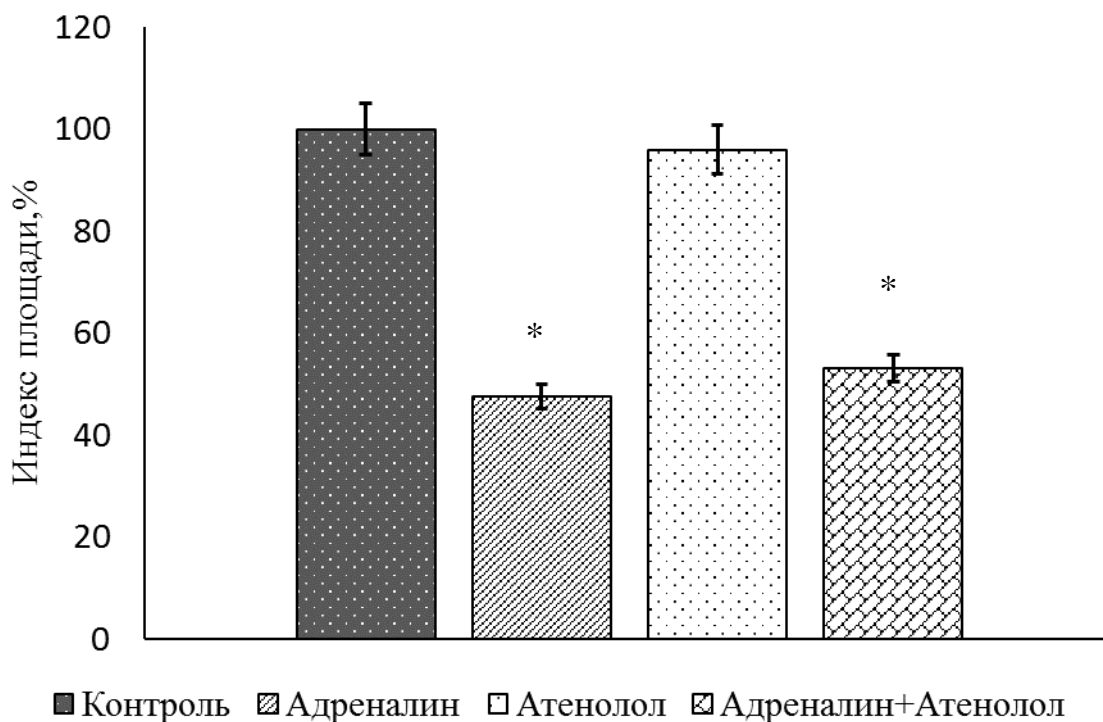


Рисунок. 32. Атенолол ( $10^{-4}$  М) не устраняет остеотоксическое действие адреналина ( $10^{-4}$  М) на рост эксплантатов ткани кости 10-12 дневных куриных эмбрионов, \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

### 3.3.2 Изучение эффектов норадреналина

Отдельная часть работы была посвящена оценке влияния норадреналина на рост эксплантатов ткани сердца. Норадреналин добавляли в питательную среду экспериментальных чашек Петри в диапазоне концентраций от  $10^{-13}$  М до  $10^{-9}$  М (рис. 33). Действие препарата было дозозависимым. В концентрации  $10^{-13}$  М и  $10^{-10}$  М норадреналин не влиял на рост клеток эксплантатов ткани сердца, ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения. Максимальный трофотропный эффект препарат проявлял в концентрации  $10^{-12}$  М. ИП экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на  $18 \pm 1\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ). Зарегистрировано ингибирующее рост эксплантатов ткани сердца действие норадреналина в концентрации  $10^{-9}$  М. ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $31 \pm 1,1\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ).

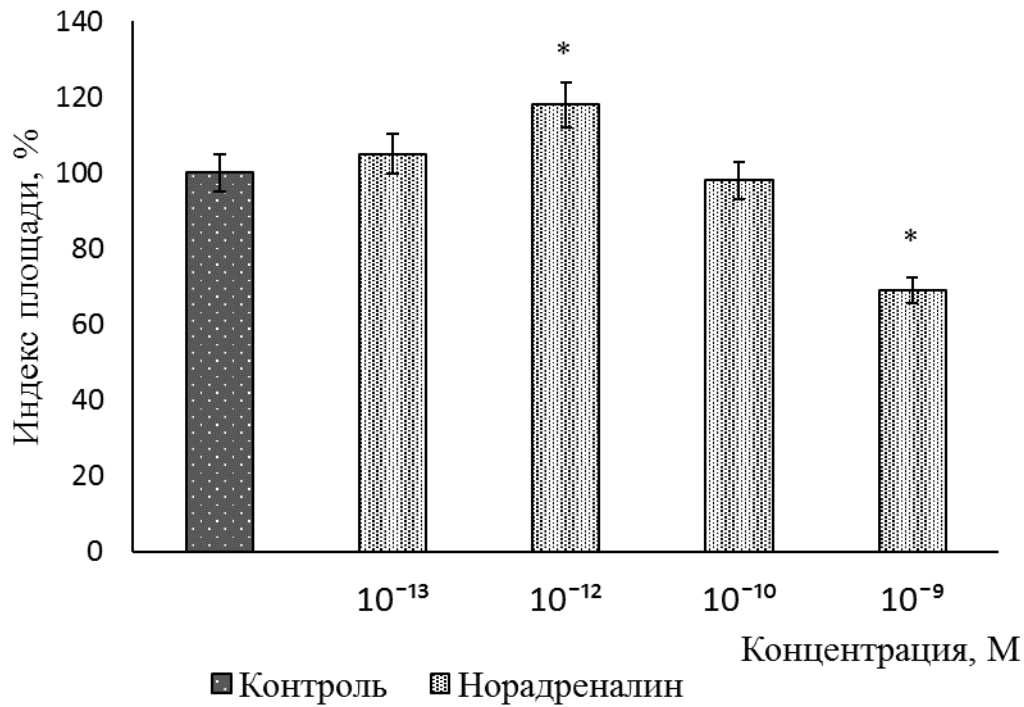


Рисунок. 33. Дозозависимое действие норадреналина на рост эксплантатов ткани сердца, \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

Для того чтобы уточнить механизм трофотропного действия норадреналина эксплантаты ткани сердца культивировали в питательной среде содержащей норадреналин ( $10^{-12}$  М) и кардиоселективный  $\beta_1$ -адреноблокатор атенолол ( $10^{-4}$  М) (рис. 34). Присутствие атенолола полностью устраняло трофотропный эффект норадреналина, ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения. Полученный результат свидетельствует о том, что в условиях органотипического культивирования ткани норадреналин стимулирует пролиферацию клеток ткани сердца через  $\beta_1$ -адренорецепторы. Результаты проведенных экспериментов совпали с данными, полученными ранее на другом объекте (Лопатина и др., 2008б).

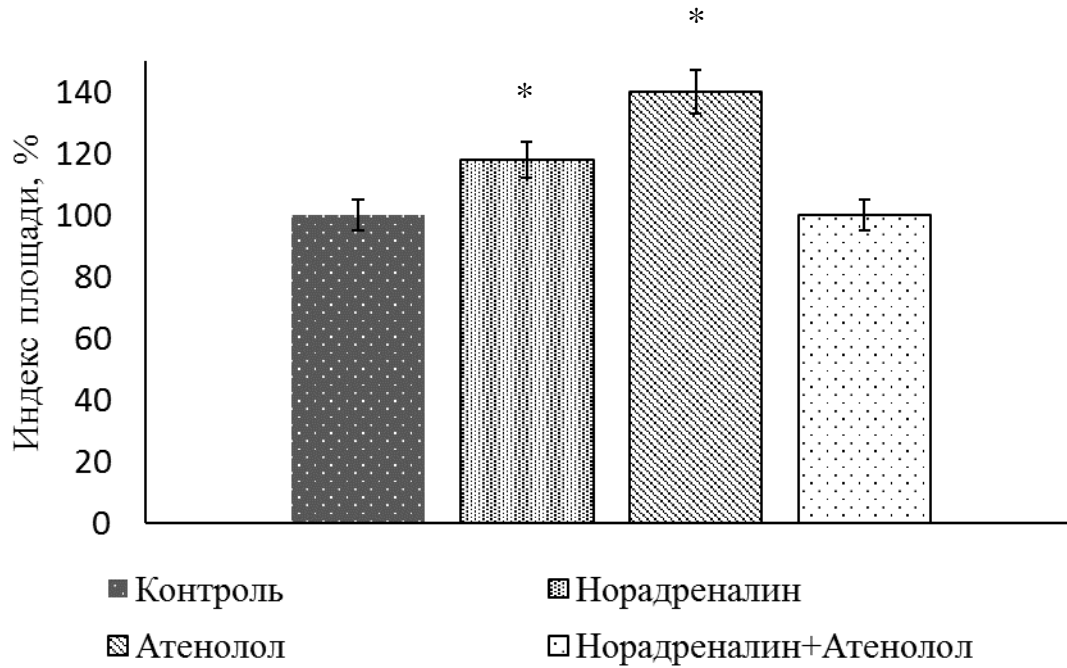


Рисунок 34. Введение атенолола ( $10^{-4}$  М) в питательную среду полностью устраняет трофотропное действие норадреналина ( $10^{-12}$  М) в условиях органотипического культивирования ткани сердца, \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

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 (рис. 35). ИП экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на  $36 \pm 1,2\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ). В концентрации  $10^{-10}$  М и  $10^{-8}$  М норадреналин на рост эксплантатов ткани кости практически не влиял. Препарат оказывал ингибирующее действие в концентрациях  $10^{-5}$  М и  $10^{-4}$  М, ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $45 \pm 2\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) и  $95 \pm 1\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.01$ ) соответственно.

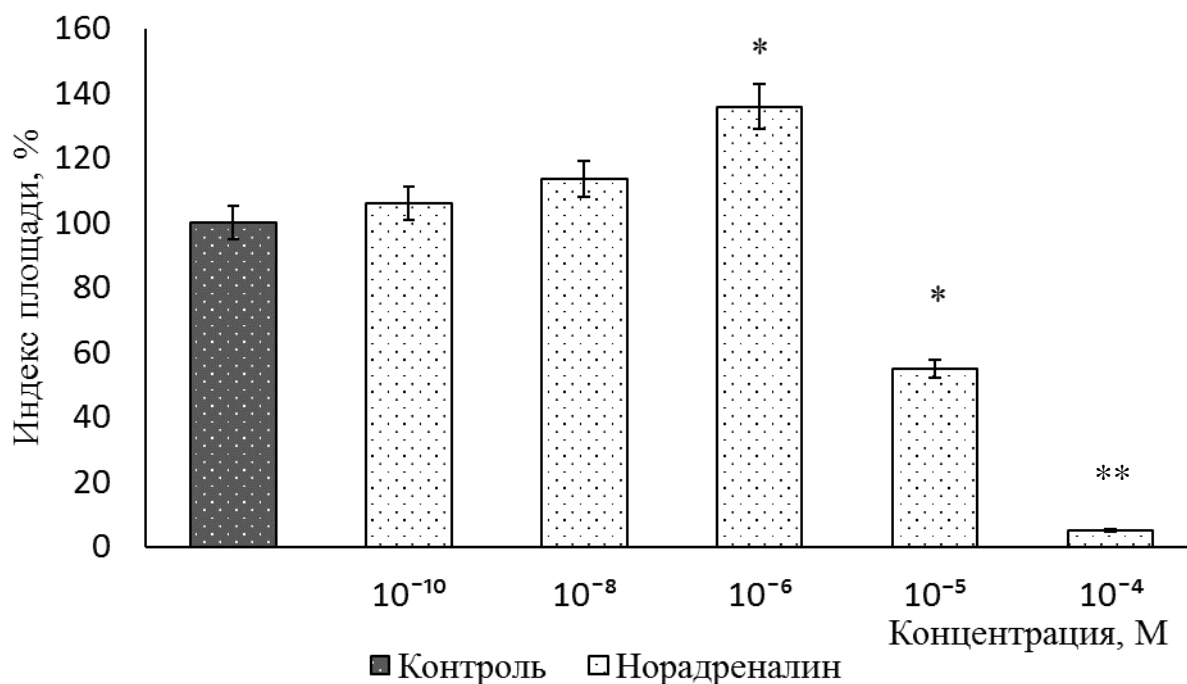


Рисунок. 35. Влияние норадреналина на рост эксплантатов ткани кости в органотипической культуре ткани, \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

Для того чтобы исследовать механизм ингибирующего действия норадреналина эксплантаты ткани кости культивировали в питательной среде, содержащей норадреналин ( $10^{-5}$  М) и  $\beta_1$ -адреноблокатор атенолол ( $10^{-4}$  М) (рис. 36). Введение атенолола ( $10^{-4}$  М) не устраняло ингибирующее действие норадреналина. ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $36 \pm 1\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) и не отличался от ИП эксплантатов, культивируемых в питательной среде содержащий только норадреналин ( $10^{-5}$  М). Следовательно, ингибирующее рост эксплантатов ткани кости действие норадреналина не зависит от его взаимодействия с  $\beta_1$ -адренорецепторами.

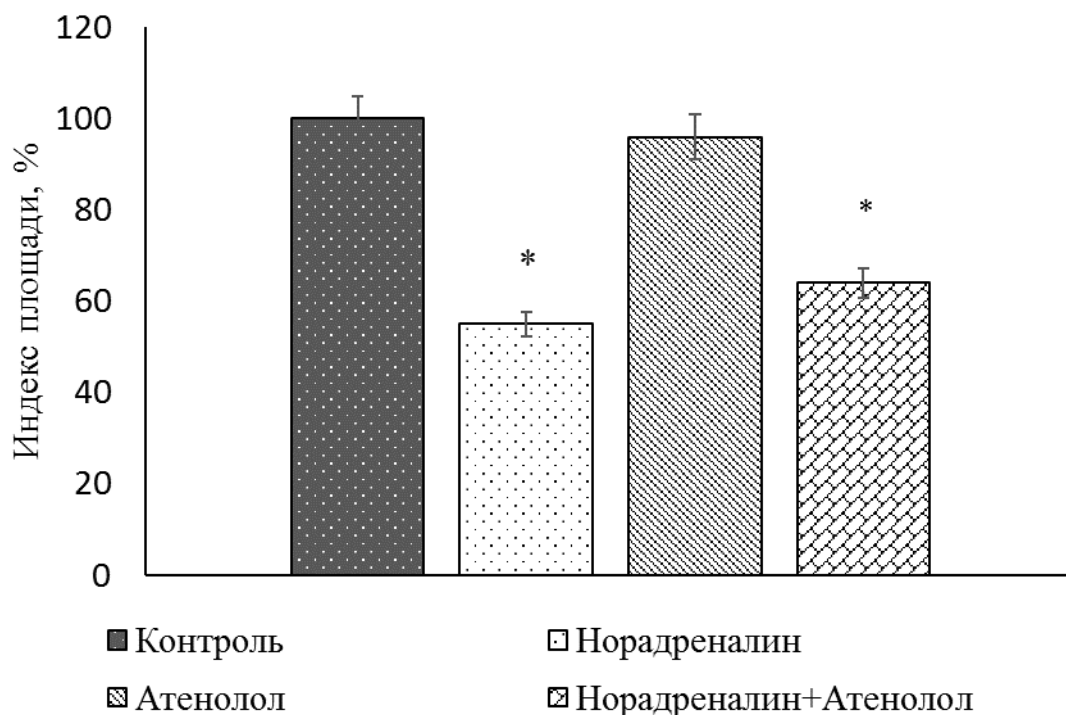


Рисунок 36. Атенолол ( $10^{-4}$  М) не устраняет ингибирующее рост эксплантатов ткани кости действие норадреналина ( $10^{-5}$  М), \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

Следующая серия экспериментов была поставлена для оценки участия  $\beta_2$ -адренорецепторов в реализации ингибирующего рост эксплантатов ткани кости действия норадреналина. Экспериментальные эксплантаты ткани кости культивировали в питательной среде содержащей норадреналин ( $10^{-5}$  М) и неселективный ингибитор  $\beta$ -адренорецепторов пропранолол ( $10^{-10}$  М) (рис. 37). Ингибирующий эффект норадреналина был нивелирован. ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $17 \pm 2\%$  ( $n=120$ ) и отличался от ИП эксплантатов ткани кости культивируемых в присутствии только норадреналина на  $28\%$  ( $p < 0.05$ ). Полученные данные позволяют предположить, что ингибирующее рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов действие норадреналина реализуется с участием  $\beta_2$ -адренорецепторов.



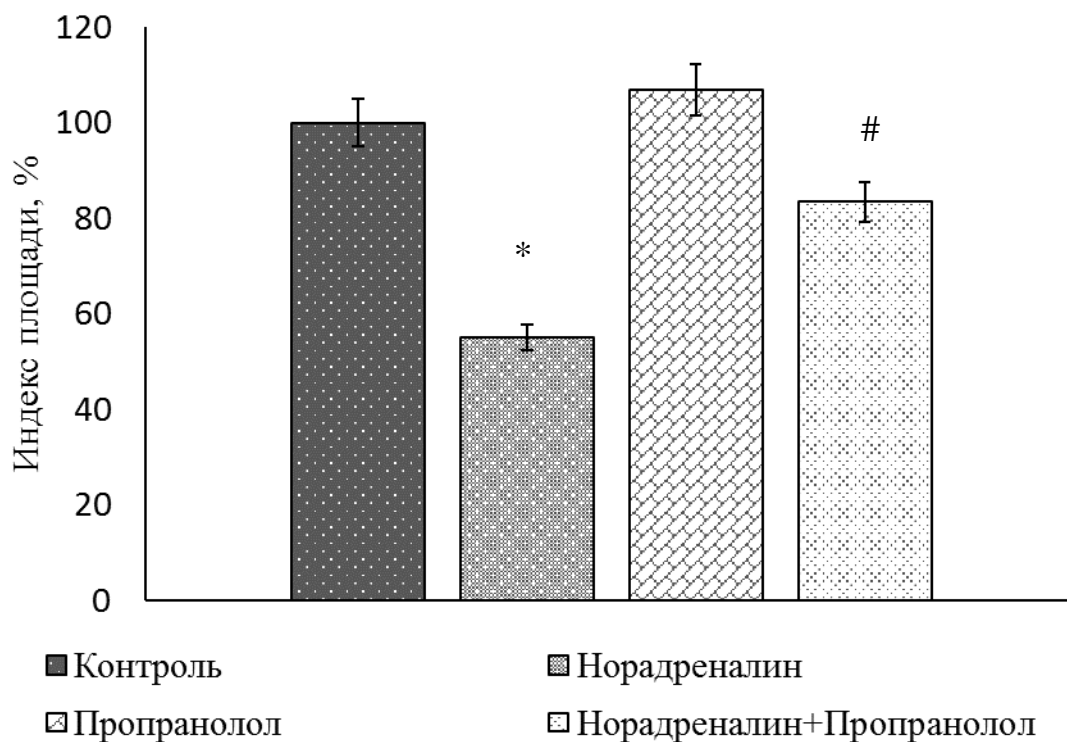


Рисунок 37. Пропранолол ( $10^{-10}$  М) устраняет ингибирующее рост эксплантатов ткани кости действие норадреналина ( $10^{-5}$  М), \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля, # –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно ИП эксплантатов, культивируемых в среде в присутствии норадреналина ( $10^{-5}$  М).

При исследовании участия  $\beta_1$ -адренорецепторов в реализации трофотропного действия норадреналина эксплантаты ткани кости культивировали в питательной среде содержащей норадреналин ( $10^{-6}$  М) и  $\beta_1$ -адреноблокатор атенолол ( $10^{-4}$  М) (рис. 38). Добавление атенолола в питательную среду не устраняло трофотропное действие норадреналина, ИП экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на  $28 \pm 1,3\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) и не отличался от ИП эксплантатов, культивируемых в питательной среде содержащей только норадреналин ( $10^{-5}$  М).

Добавление в питательную среду пропранолола ( $10^{-10}$  М) трофотропное действие норадреналина также не устраняло (рис. 39). ИП экспериментальных эксплантатов был на  $30 \pm 1,1\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) выше контрольного значения. Таким образом можно предположить что стимуляция процессов клеточного роста и пролиферации клеток зоны роста эксплантатов ткани кости при действии

норадреналина в концентрации  $10^{-6}$  М не связана с влиянием препарата на  $\beta$ -адренорецепторы.

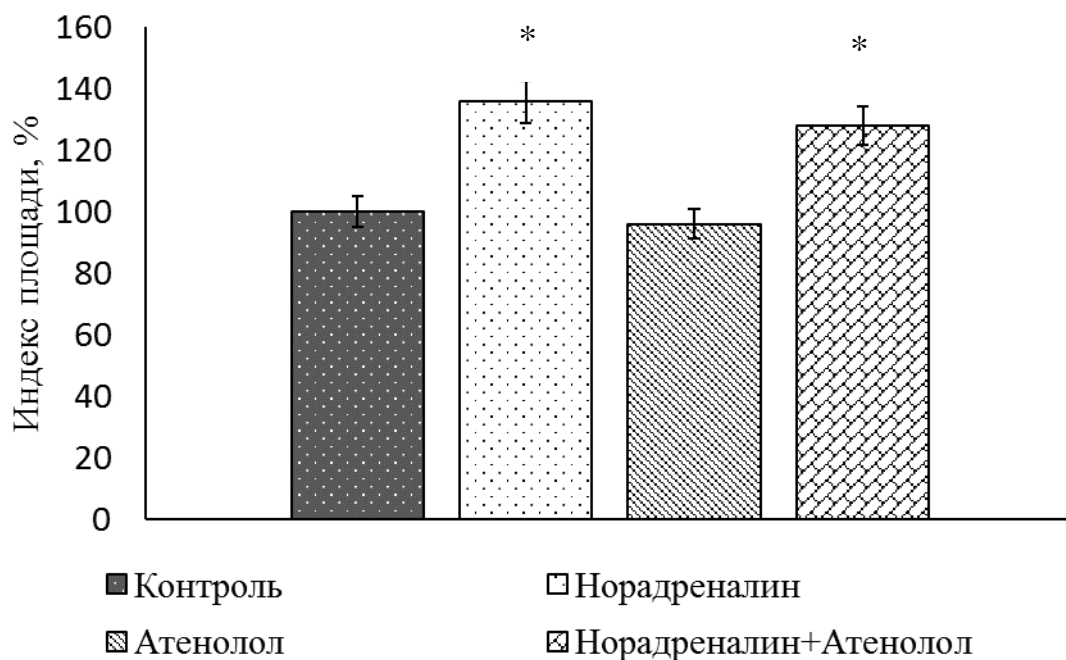


Рисунок 38. Атенолол ( $10^{-4}$  М) не устраняет трофотропный эффект норадреналина ( $10^{-5}$  М) в органотипической культуре ткани кости, \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

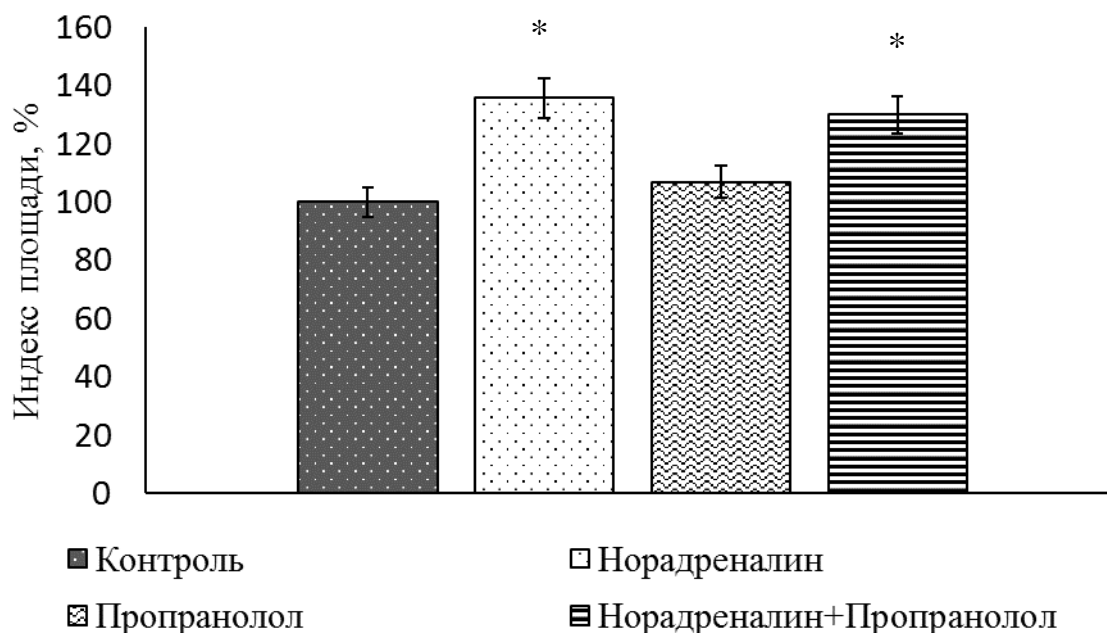


Рисунок 39. Стимулирующий рост эксплантатов ткани кости эффект норадреналина ( $10^{-6}$  М) сохраняется на фоне неселективного  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола ( $10^{-10}$  М), \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

### 3.4. Участие катехоламинов в рецептор-опосредованной модуляции трансдукторной функции $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФазы

Ранее 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. ИП был ниже контрольного значения всего на  $20 \pm 1,2\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 40), что свидетельствует о возможной рецептор-опосредованной модуляции трансдукторной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы адреналином.

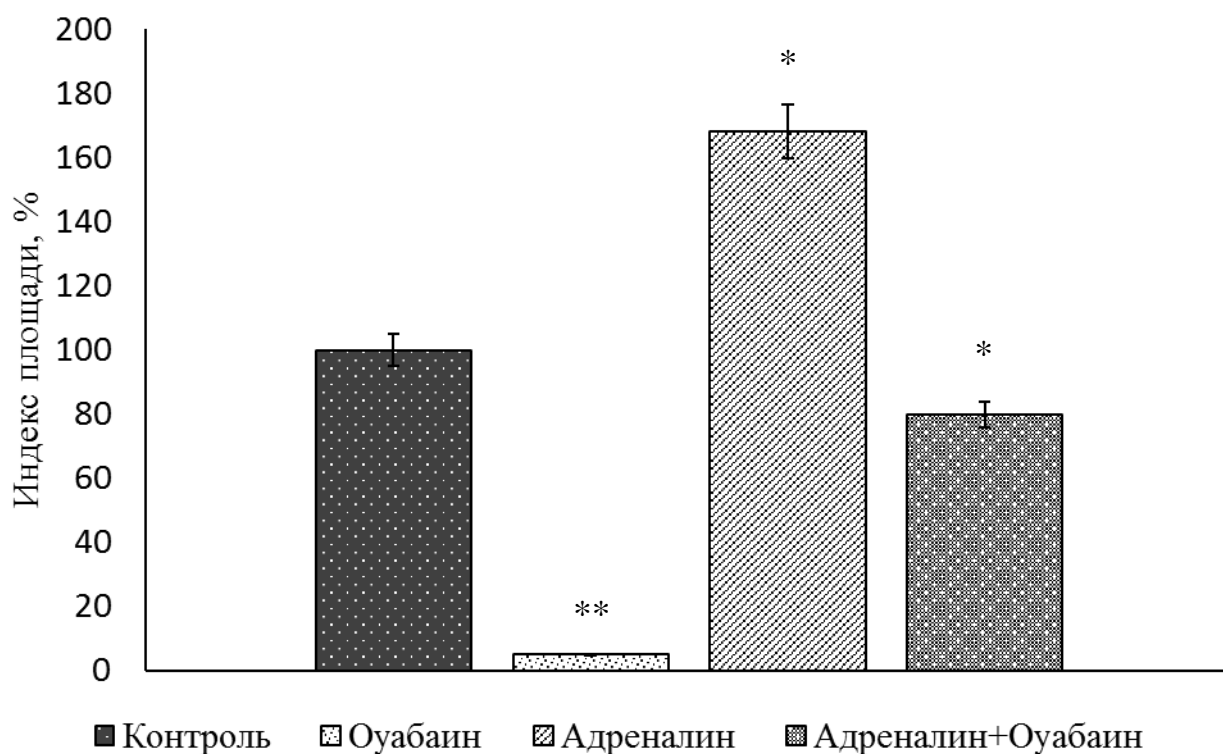


Рисунок 40. Адреналин ( $10^{-12}$  М) нивелирует ингибирующий рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов эффект оуабаина ( $10^{-8}$  М), \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

Введение в питательную среду  $\beta_1$ -адреноблокатора атенолола ( $10^{-4}$  М) ингибирующий эффект оуабаина ( $10^{-8}$  М) не устраняло. Добавление в питательную среду оуабаина ( $10^{-8}$  М) и адреналина ( $10^{-12}$  М) на фоне атенолола ( $10^{-4}$  М) так же приводило к полному угнетению роста экспериментальных

эксплантатов (рис. 41). Ингибиторный анализ доказал, что в эксплантатах ткани сердца адреналин может модулировать сигнальную функцию  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы рецептор-опосредованно через  $\beta_1$ -адренорецепторы.

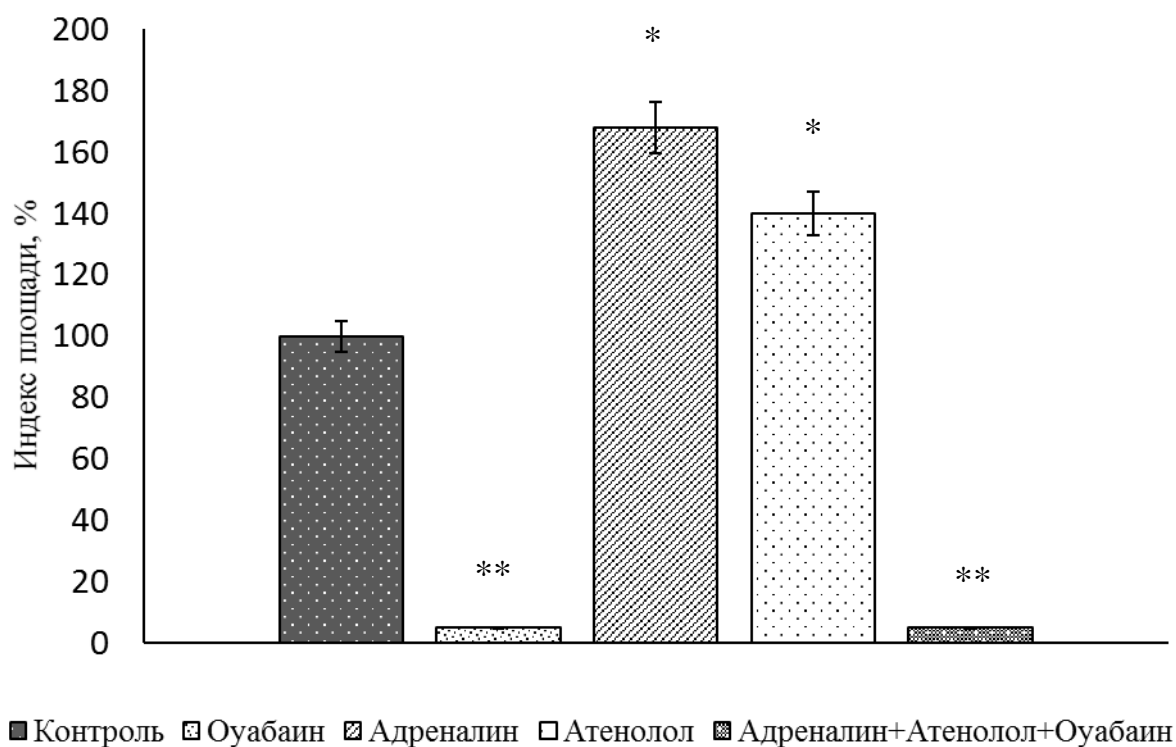


Рисунок 41. Адреналин ( $10^{-12}$  М) не устраняет ингибирующий рост эксплантатов ткани сердца эффект оуабаина ( $10^{-8}$  М) на фоне блокатора  $\beta_1$ -адренорецепторов атенолола ( $10^{-4}$  М), \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

В отличие от ткани сердца, при культивировании эксплантатов ткани кости в среде, содержащей адреналин ( $10^{-12}$  М) и оуабаин в ингибирующей концентрации ( $10^{-6}$  М) уменьшения ингибирующего эффекта оуабаина не наблюдалось (рис 42).

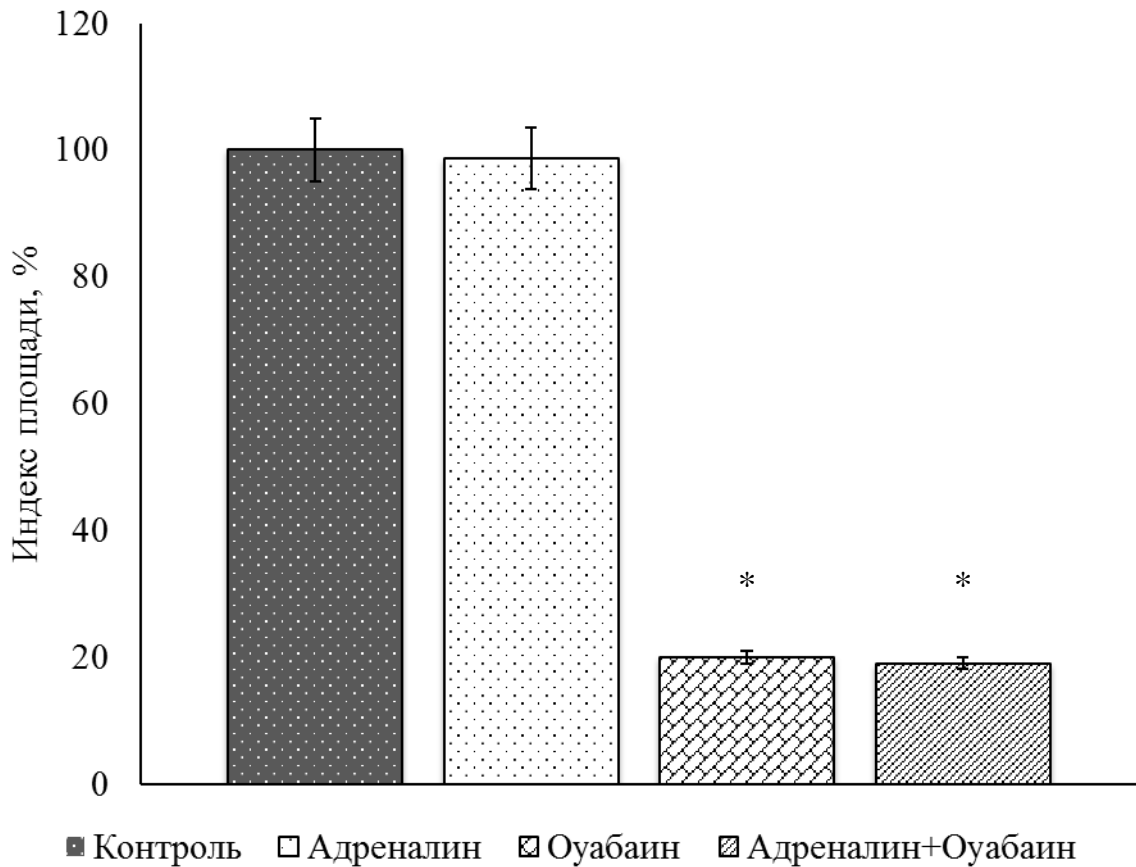


Рисунок. 42. Ингибирующее рост эксплантатов ткани кости действие оуабаина ( $10^{-6}$  М) сохраняется в присутствии в питательной среде адреналина ( $10^{-12}$  М), \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

Введение в питательную среду атенолола ( $10^{-4}$  М) или адреналина ( $10^{-12}$  М) совместно с атенололом ( $10^{-4}$  М) на фоне оуабаина ( $10^{-6}$  М) так же не устраняло ингибирующее действие оуабаина (рис. 43). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в эксплантатах ткани кости адреналин ( $10^{-12}$  М) на сигнальную функцию  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы не влияет.

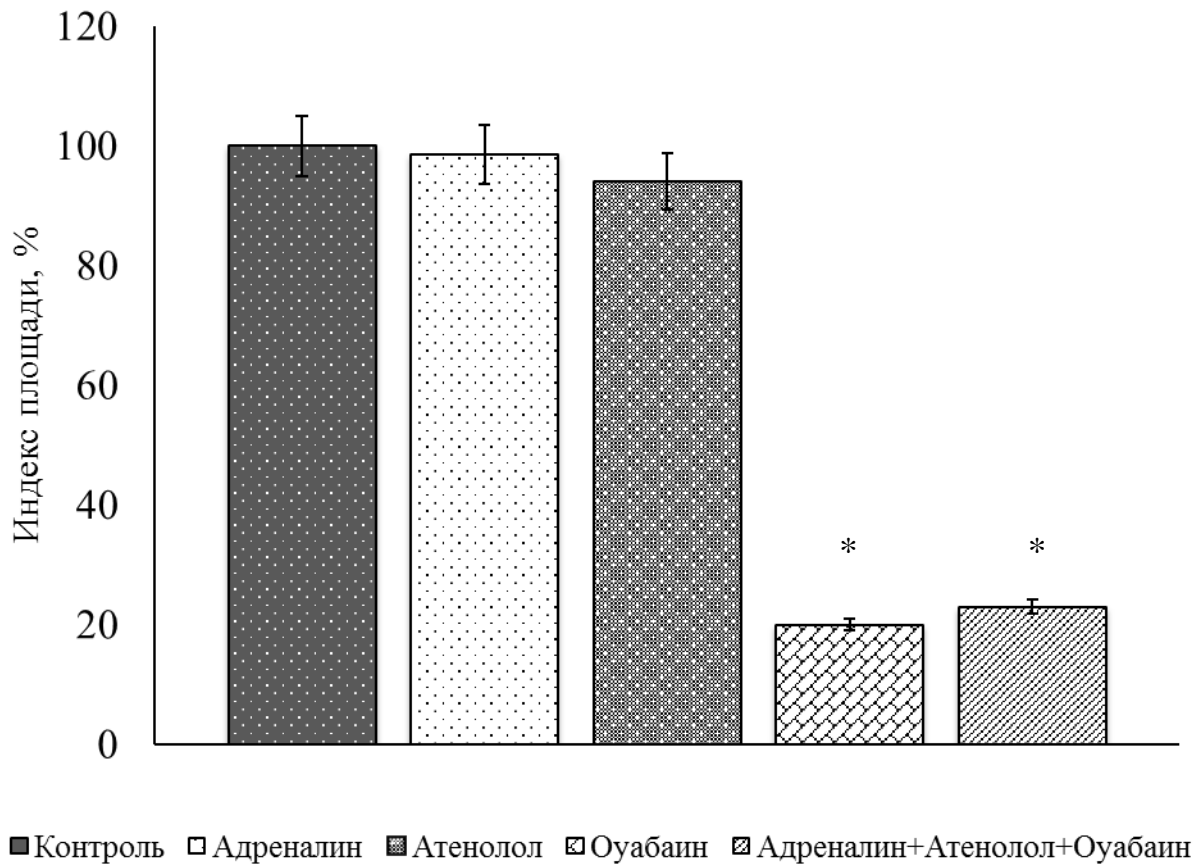


Рисунок. 43. Адrenalин не оказывает влияния на сигнальную функцию  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы клеток ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов, \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.

Норадреналин ( $10^{-12}$  М) также как и адrenalин ( $10^{-12}$  М) способен устранять блокирующее рост эксплантатов ткани сердца действие оуабаина ( $10^{-8}$  М) (рис. 44). ИП экспериментальных эксплантатов, культивируемых в питательной среде, содержащей норадреналин ( $10^{-12}$  М) и оуабаин ( $10^{-8}$  М) на  $30 \pm 1,5\%$  ( $n=120$ ,  $p < 0.05$ ) ниже контрольного значения. Введение кардиоселективного  $\beta_1$ -адреноблокатора атенолола ( $10^{-4}$  М) в питательную среду, содержащую норадреналин ( $10^{-12}$  М) и оуабаин ( $10^{-8}$  М) приводило к практически полному ингибированию роста эксплантатов ткани сердца (рис. 45). ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от ИП эксплантатов ткани сердца, культивируемых в питательной среде в присутствии оуабаина ( $10^{-8}$  М). Полученные данные свидетельствуют о том, что в ткани сердца норадреналин может модулировать трансдукторную функцию  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы рецептор-опосредованно через  $\beta_1$ -адренорецепторы.

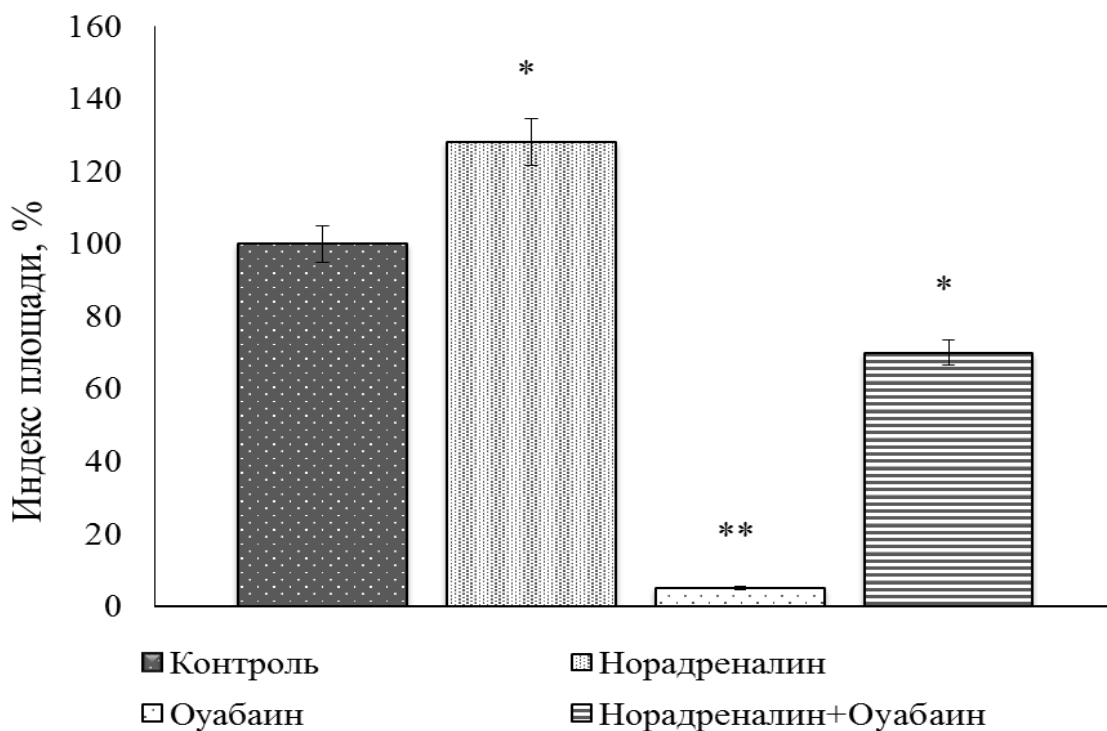


Рисунок 44. Норадреналин ( $10^{-12}$  М) устраняет ингибирующее рост эксплантатов ткани сердца действие оуабаина ( $10^{-8}$  М), \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

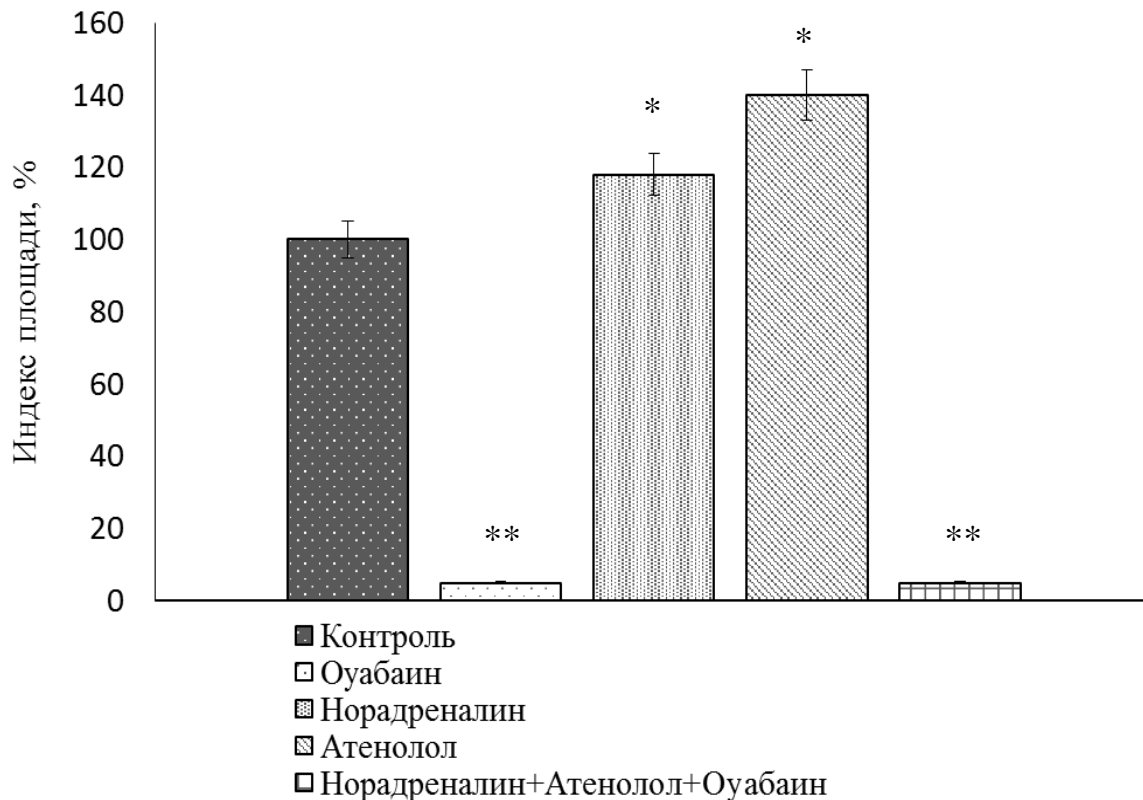


Рисунок 45. В присутствии атенолола ( $10^{-4}$  М) норадреналин ( $10^{-12}$  М) не устраняет ингибирующее рост эксплантатов ткани сердца действие оуабаина ( $10^{-8}$  М), \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , достоверные различия относительно контроля.

Так же как и в экспериментах с использованием ткани сердца, при введении норадреналина в максимальной стимулирующей рост эксплантатов ткани кости концентрации ( $10^{-6}$  М) в присутствии оубаина в ингибирующей рост эксплантатов ткани кости концентрации ( $10^{-6}$  М) наблюдалось уменьшение ингибирующего эффекта оубаина (рис. 46). ИП экспериментальных эксплантатов практически не отличался от контрольного значения, что свидетельствует о возможной модуляции сигнальной функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в ткани кости норадреналином.

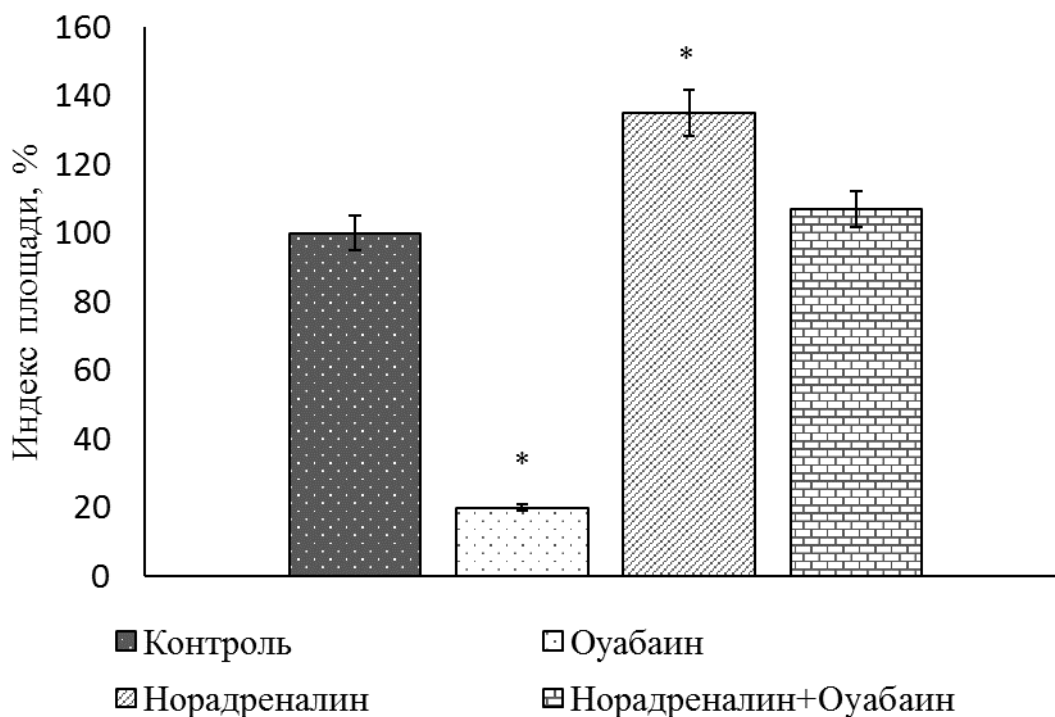


Рисунок 46. Норадреналин ( $10^{-6}$  М) нивелирует ингибирующее рост эксплантатов ткани кости действие оубаина ( $10^{-6}$  М), \* –  $p < 0.05$ , достоверные различия относительно контроля.



## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Участие  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в регуляции процесса тканевого моделирования стало активно изучаться, после того как было доказано, что связывание фермента с эндогенными кардиотоническими стероидами запускает внутриклеточные сигнальные каскады и регулирует клеточный рост и пролиферацию (Xie, 2001; Xie, Cai, 2003; Schoner, Schiener-Bobis, 2005; Лопатина и др., 2005; 2008а; 2008б). Чувствительность фермента к различным кардиотоническим стероидам зависит от вида животного, этапа его онтогенеза и субъединичного состава  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в исследуемой ткани.

В эмбриональных кардиомиоцитах желудочков крыс экспрессируется  $\alpha_1$  и  $\alpha_3$ - субъединицы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы (Lucchesi, Sweadner, 1991). Информация о субъединичном составе, физиологической роли  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и ее чувствительности к сердечным гликозидам в клетках формирующих кость ограничена (Francis et al., 2002). Применение иммуногистохимических методов окраски позволило нам доказать наличие  $\alpha_1$ - и  $\alpha_3$ - изоформ  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в клетках, формирующих зону роста контрольных и экспериментальных эксплантатов ткани сердца и кости 10-12-дневных куриных эмбрионов.

Работ по исследованию непосредственного влияния оуабаина в концентрациях, сопоставимых с эндогенными, на рост эксплантатов костной ткани до настоящего времени не было. В условиях органотипического культивирования впервые обнаружено дозозависимое, регулирующее рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов, действие оуабаина. Оуабаин ( $10^{-10}$  М) стимулировал рост эксплантатов ткани кости на 100% по сравнению с контрольным значением. Ранее в аналогичных экспериментальных условиях обнаружено, что в этой концентрации оуабаин стимулирует рост эксплантатов ткани сердца на 33% (Лопатина и др., 2005), ингибирует рост нейритов сенсорных нейронов на 50% (Пенниайнен и др. 2008) и не влияет на рост эксплантатов ткани сетчатки (Лопатина и др., 2008а).

Таким образом, действие оуабаина в концентрациях, сопоставимых с эндогенными является дозозависимым и тканеспецифичным.

В концентрации  $10^{-4}$  М оуабаин практически полностью угнетал рост эксплантатов ткани кости. Эти данные совпали с результатами работы Пеннийнен и др., 2003, в которой показано, что оуабаин  $10^{-4}$  М полностью блокирует рост нейритов сенсорных нейронов.

Установлено что в дозе  $10^{-8}$  М оуабаин на 45% ингибировал процессы клеточного роста и пролиферации ткани кости. При культивировании эксплантатов ткани сердца и сетчатки в питательной среде, содержащей оуабаин в аналогичной концентрации, зарегистрировано полное угнетение роста эксплантатов исследуемых тканей (Лопатина и др., 2005;2008а).

Дигоксин ( $10^{-6}$  М) в отличие от оуабаина, рост эксплантатов ткани кости и сердца угнетал на 69% и 61% соответственно. Стимулирующего роста эксплантатов исследуемых тканей действия препарата не обнаружено. Zulian et al. на гладкомышечных клетках артерий показал, что оуабаин (но не дигоксин) активирует Src-зависимый  $Ca^{2+}$  сигнальный путь. Было выдвинуто предположение, что оуабаин и дигоксин взаимодействуют с различными участками сайта связывания на  $\alpha$ -изоформе  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы. Необходимо отметить, что только специфическое взаимодействие, характерное для оуабаина, активирует Src-киназу и обеспечивает реализацию трансдукторной функции фермента (Zulian et al., 2013).

Рядом исследователей обнаружено уменьшение  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазной активности при нейродегенерации, эпилепсии и гипергомоцистеинемии (Streck et al., 2002, Hrnčić et al., 2010, Scherer et al., 2013). Повышение уровня гомоцистеина в плазме крови связывают с увеличением риска развития атеросклероза, сердечной недостаточности (Sundstrom and Vasan, 2005), инфаркта миокарда и заболеваний сосудов (Wang et al. 2012), развитием остеопороза (Herrmann et al., 2009) и нейродегенеративными заболеваниями (Hrnčić et al., 2010). При умеренной степени гипергомоцистеинемии наблюдается значительное уменьшение содержания  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ - изоформы  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы в клетках коры

головного мозга, в то время как количество  $\alpha_3$ -изоформы практически не меняется (Scherer et al., 2013). Точный механизм, лежащий в основе ингибирующего  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу действия гомоцистеина остается неизвестным. Исследования кинетики  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, проведенные Streck et al. на клетках гиппокампа крыс показали, что гомоцистеин ингибирует натриевую помпу, не конкурируя с АТФ (Streck et al., 2002). По-видимому, ингибирование помпы гомоцистеином происходит вследствие окисления тиоловых групп, опосредованного свободными радикалами, которые взаимодействуют с сайтом связывания АТФ (Rašić-Marković et al., 2009).

Herrmann et al. предложил 4 механизма влияния гомоцистеина на ремоделирование костной ткани: увеличение активности остеокластов, уменьшение активности остеобластов, уменьшение кровотока кости и прямое влияние молекулы гомоцистеина на костный матрикс (Vacek et al., 2013). Установлено, что гомоцистеин дозозависимо ( $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  М) стимулирует активность TRAP (маркер функции остеокластов) (Herrmann et al., 2005). Однако в другом исследовании зарегистрировано увеличение активности остеобластов человека на 25% при действии гомоцистеина (Herrmann et al., 2008). Выдвинуто предположение, что главным патологическим механизмом потери костной массы *in vivo* при высоком уровне гомоцистеина может являться дисбаланс между остеобластами и остеокластами (Herrmann et al., 2008). Данные о роли  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в гомоцистеин-индуцированном ремоделировании костной ткани до настоящего времени отсутствовали.

Впервые в условиях органотипической культуры ткани кости нами обнаружено дозозависимое ингибирование роста исследуемых эксплантатов при действии гомоцистеин тиолактона. В концентрации  $10^{-3}$  М препарат угнетал рост эксплантатов костной ткани на 58%. Данные совпали с результатами, полученными при исследовании влияния гомоцистеин тиолактона на ремоделирование ткани сердца. В концентрации  $10^{-3}$  М гомоцистеин тиолактон ингибировал рост эксплантатов ткани сердца в среднем на 60%. Введение в питательную среду гомоцистеин тиолактона в концентрациях  $8 \times 10^{-6}$  М и  $7 \times 10^{-9}$  М

угнетало рост эксплантатов ткани сердца на 33% и 13% соответственно (Lopatina et al., 2015). Используемые концентрации моделируют гомоцистеинемию различной степени тяжести в условиях *in vitro*.

При оценке участия  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в гомоцистеин-индуцированном ремоделировании ткани кости выявлено, что введение в питательную среду оуабаина в стимулирующей концентрации  $10^{-10}$  М не устраняет в полном объеме ингибирующий эффект гомоцистеин тиолактона ( $10^{-3}$  М). В аналогичных экспериментальных условиях исследовали совместное влияние гомоцистеин тиолактона ( $10^{-3}$  М) и оуабаина ( $10^{-8}$  и  $10^{-10}$  М) на рост эксплантатов ткани сердца. Добавление оуабаина ( $10^{-10}$  М) также не устраняло кардиотоксическое действие гомоцистеин тиолактона (Lopatina et al., 2015). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии связи остео- и кардиотоксического действия гомоцистеин тиолактона с ингибированием насосной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы. Связь между нейротоксическим эффектом гомоцистеин тиолактона и ингибированием натриевой помпы была описана в работах Rasić-Marković et al. Результаты исследований показывают, что значительное ингибирование активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в коре, гиппокампе и стволе мозга отчасти обуславливают эксайтотоксичность гомоцистеин тиолактона (Rasić-Marković et al., 2009).

Работы о тропных эффектах вегетативной нервной системы и ее симпатического отдела в частности появились достаточно давно (Ажипа, 1988).

Катехоламины являются основными гормонами симпатического отдела вегетативной нервной системы, участвующей в регуляции многих функций организма. Норадреналин (норэпинефрин), так же как и адреналин (эпинефрин), синтезируется в мозговом веществе надпочечников и окончаниях симпатических нервов. В отличие от адреналина, норадреналин лишен метильного остатка. Но, подобно ему, норадреналин является агонистом  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов. Сродство рецепторов к катехоламинам различно. Так сродство адренорецепторов к норадреналину убывает в ряду  $\alpha$ - $\beta_1$ - $\beta_2$ -адренорецепторы.  $\beta$ -адренорецепторы наоборот, более чувствительны к адреналину, чем к норадреналину (Ткачук,

1983). Ранняя экспрессия адренорецепторов на поверхности клеток сердца в эмбриогенезе, еще до установления синаптических контактов с нервными волокнами, указывает на участие катехоламинов в регуляции трофотропных процессов в ткани сердца.

В настоящей работе исследовали влияние адреналина и норадреналина в диапазоне концентраций от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М на рост и пролиферацию клеток зоны роста эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов. Обнаружено, что эффективная стимулирующая концентрация катехоламинов составляет  $10^{-12}$  М. ИП экспериментальных эксплантатов при добавлении в питательную среду адреналина был выше контрольного значения в среднем на 69%, при добавлении норадреналина в той же концентрации ИП экспериментальных эксплантатов превышал контрольное значение в среднем на 40%. В дозе  $10^{-9}$  М норадреналин оказывал выраженный ингибирующий рост эксплантатов ткани сердца эффект. ИП был ниже контрольного значения на 34%. Адреналин ( $10^{-9}$  М) ингибирующего роста эксплантатов ткани сердца действия не обнаружил.

Блокаторы  $\beta$ -адренорецепторов широко применяются в клинической практике.  $\beta$ -адреноблокаторы конкурентно ингибируют связывание катехоламинов с  $\beta$ -адренорецепторами. В 1962 году был синтезирован неселективный  $\beta$ -адреноблокатор, родоначальник группы  $\beta$ -адреноблокаторов – пропранолол. Именно он является препаратом сравнения для лекарственных средств, относящихся к данной группе. Некоторые адреноблокаторы обладают помимо основного  $\beta$ -адреноблокирующего действия рядом дополнительных эффектов: наличие внутренней симпатомиметической активности,  $\alpha$ -адреноблокирующего действия, мембраностабилизирующего и вазодилатирующего эффекта (Ивлева, 2003). Некоторые  $\beta$ -адреноблокаторы обладают свойствами частичных агонистов адренорецепторов (Vigholt-Sørensen et al., 1991; Arnold et al., 1993) или могут являться обратными агонистами (Varma et al., 1999). Данные свойства изучаемых соединений касаются регуляции

сократительной функции сердца. Исследования трофотропных свойств этих соединений ранее не проводились.

Пропранолол является полным антагонистом  $\beta$ -адренорецепторов и не способен их активировать или проявлять свойства обратного агониста (Azzi et al., 2001). Обнаружено, что пропранолол может активировать внеклеточную сигнал-регулируемую киназу 1/2 (ERK 1/2), запускать связанные с ней сигнальные каскады (Baker et al., 2003; Galandrin and Bouvier, 2006) и транскрипцию генов через механизмы не связанные с активацией Gs/i-белками (Azzi et al., 2003). Экспериментальные данные, полученные Patrizio et al. с использованием культуры кардиомиоцитов новорожденных мышей доказали способность пропранолола ( $25 \cdot 10^{-6}$  М) активировать экспрессию гена *Erg1* (принимającego участие в регуляции клеточного цикла и дифференцировки клеток) через  $\beta$ -адренорецепторы. Причем механизм регуляции экспрессии генов не зависит от способности пропранолола блокировать эффект катехоламинов (Patrizio et al., 2008). В условиях органотипического культивирования мы не обнаружили стимулирующее рост исследуемых тканей действие пропранолола в диапазоне концентраций от  $10^{-4}$  М до  $10^{-10}$  М.

Считается, что гидрофильный кардиоселективный  $\beta_1$ -адреноблокатор атенолол не обладает внутренней симпатомиметической активностью (цит. по Машковский, 1993). В 2006 году было обнаружено, что в высоких концентрациях атенолол стимулирует рост эксплантатов ткани сердца, сетчатки и спинальных ганглиев 10-12-дневных куриных эмбрионов, имитируя трофотропный эффект норадреналина, исследованный в аналогичных экспериментальных условиях (Цырлин и др., 2006; Пеннийнен и др., 2007; Лопатина и др., 2012). Действие атенолола было дозозависимым, но не тканеспецифичным в диапазоне концентраций от  $10^{-4}$  М до  $10^{-10}$  М (Цырлин и др., 2006; Пеннийнен и др., 2007; Лопатина и др., 2012). В аналогичных экспериментальных условиях был исследован липофильный кардиоселективный  $\beta_1$ -адреноблокатор также лишенный внутренней симпатомиметической активности – метопролол.

Метопролол ингибировал рост эксплантатов ткани сердца во всех исследованных концентрациях (Цырлин и др., 2006; Лопатина и др., 2008б).

Результаты наших экспериментов совпали с ранее полученными данными. Благодаря использованию высокотехнологичного комплекса лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 710 и аппаратно-программного комплекса для визуализации, обработки и анализа изображений ZEN\_2011 нам впервые удалось доказать, что клетки в зоне роста органной культуры формируют многомерную структуру. Использование метода реконструкции оптических срезов с оценкой параметра толщины зоны роста впервые позволило нам продемонстрировать, 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. Таким образом, было показано, что атенолол имитирует трофотропный эффект катехоламинов. Трофотропное действие атенолола в исследуемом диапазоне концентраций на рост ткани кости не обнаружено. Стимулирующее рост эксплантатов ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов влияние высоких концентраций атенолола может быть опосредовано его взаимодействием с  $\beta_1$ -адренорецепторами.

С точки зрения классических представлений адреналин является неселективным агонистом  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -адренорецепторов, активируя оба подтипа адренорецепторов с одинаковой аффинностью (Lands et al., 1967). В то время как норадреналин преимущественно активирует  $\beta_1$ -адренорецепторы, взаимодействуя с  $\beta_2$ -адренорецепторами исключительно в высоких концентрациях (Lands et al., 1967). В работе Poniske et al. описано дозозависимое увеличение синтеза белка и гипертрофии клеток кардиомиоцитов желудочков взрослых крыс при действии адреналина и норадреналина (Poniske et al., 2003). Максимальный стимулирующий эффект препаратов наблюдался в концентрации  $10^{-5}$  М. Синтез белка в кардиомиоцитах при действии норадреналина увеличивался в присутствии селективных  $\beta_1$ -адреноблокаторов (атенолол, бисопролол, CGP 20712A) и неселективных  $\beta$ -адреноблокаторов (пропранолол, карведилол и

буциндолол), но не изменялся в присутствии ICI 118.551 - антагониста  $\beta_2$ -адренорецепторов (Schafer et al., 2001; Ponicke et al., 2002). Увеличение синтеза белка в кардиомиоцитах при действии адреналина наблюдалось на фоне селективного  $\beta_1$ -адреноблокатора CGP 20712A, также как и в случае с норадреналином, однако в присутствии антагониста  $\beta_2$ -адренорецепторов ICI 118.551 зарегистрировано уменьшение стимулирующего эффекта адреналина (Ponicke et al., 2003). Увеличение синтеза белка и гипертрофии кардиомиоцитов желудочков взрослых крыс авторы связывают с активацией  $\alpha_1$ -адренорецепторов катехоламинами. Однако в экспериментах с использованием культуры кардиомиоцитов новорожденных крысят зарегистрировано увеличение синтеза белка при активации  $\beta_1$ -адренорецепторов изопреналином ( $10^{-5}$  М) (Morisco et al., 2001; Shan et al., 2007).

Эмбриональная ткань является более чувствительным объектом. В условиях органотипического культивирования ткани сердца трофотропный эффект катехоламинов наблюдался в концентрации  $10^{-12}$  М.

Ингибиторный анализ позволил нам установить, что стимулирующий кардиотрофотропный эффект адреналина ( $10^{-12}$  М) и норадреналина ( $10^{-12}$  М) реализуется через  $\beta_1$ -адренорецепторы. Наличие остаточного стимулирующего действия адреналина в присутствии кардиоселективного  $\beta_1$ -адреноблокатора атенолола и полное нивелирование трофотропного эффекта адреналина в присутствии неселективного  $\beta$ -адренолокатора пропранолола дает основание предполагать вовлеченность  $\beta_2$ -адренорецепторов в процесс ремоделирования ткани сердца адреналином.

В 1950-х годах Maassen впервые продемонстрировал участие катехоламинов в регуляции роста ткани кости. Однако количество фундаментальных исследований, раскрывающих механизм влияния катехоламинов и  $\beta$ -адреноблокаторов на процессы ремоделирования костной ткани ограничено. Наличие  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов на поверхности остеокластов и остеобластов экспериментально доказано и не подвергается сомнению. Поскольку разные клеточные линии, обычно используемые при исследовании механизмов



ремоделирования костной ткани, имеют не одинаковый состав подтипов  $\beta$ -адренорецепторов на поверхности клеток (Kellenberger et al., 1998, Aitken et al., 2009; Kondo et al., 2013), то полученные *in vivo* и *in vitro* экспериментальные данные о механизме действия катехоламинов весьма противоречивы. Исследования Suzuki et al показали дозозависимое действие адреналина на пролиферацию клеток линии остеобластов мыши MC3T3-E1 в диапазоне концентраций  $10^{-9}$  М –  $10^{-5}$  М. Максимальный стимулирующий эффект адреналин проявил в концентрации  $10^{-6}$  М –  $10^{-5}$  М. Количество клеток увеличилось на 48,4% после 48 часов инкубации (Suzuki et al., 1998). Takeuchi et al. в работе на клетках той же линии показал способность адреналина ( $10^{-7}$  М –  $10^{-5}$  М) модулировать остеокластогенез. Адреналин стимулировал выработку фактора дифференцировки остеокластов, и таким образом способствовал резорбции костной ткани (Takeuchi et al., 2001). В экспериментах *in vivo* зарегистрировано уменьшение числа остеобластов, скорости формирования кости на трабекулярных поверхностях и уровня экспрессии коллагена I типа при введении изопротеренола или других агонистов адренорецепторов. Напротив, при блокаде адренорецепторов неселективным  $\beta$ -адреноблокатором пропранололом, или в исследованиях с использованием генетически модифицированных мышей лишенных  $\beta_2$ -адренорецепторов наблюдалось увеличение числа остеобластов и массы костной ткани (Bonnet et al., 2008). При изучении мышей лишенных как  $\beta_2$ -адренорецепторов, так и  $\beta_1$ -адренорецепторов, было обнаружено значимое уменьшение формирования костной ткани (скорость формирования кости снижалась на 79% по сравнению с мышами дикого типа) (Pierroz et al., 2006). Данные свидетельствуют о том, что, по-видимому, увеличение костной массы при блокаде или отсутствии  $\beta_2$ -адренорецепторов может наблюдаться лишь при сохранности  $\beta_1$ -адренорецепторов. Хотя точный вклад  $\beta_1$ -адренорецепторов в регуляцию процессов роста костной ткани не установлен, предполагают, что активация  $\beta_1$ -адренорецепторов может стимулировать рост костной ткани опосредованно через системные влияния (Bonnet et al., 2008).

В связи с вышеизложенным, исследование позволяющее изучить вклад адренорецепторов в модуляцию остеогенеза в строго контролируемых экспериментальных условиях, позволяющих исключить системные влияния со стороны организма, является актуальным.

Применение иммуногистохимических методов окраски с использованием антител к  $\beta_1$ -адренорецепторам позволило доказать наличие рецепторов данного типа на поверхности клеток, формирующих зону роста эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов.

Обнаружено ингибирующее рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов действие адреналина ( $10^{-4}$  М). Фармакологический анализ позволил установить, что данный эффект связан с действием препарата на  $\beta_2$ -адренорецепторы. Стимулирующее рост эксплантатов ткани кости действие адреналина не обнаружено.

В отличие от адреналина, норадреналин в концентрации  $10^{-6}$  М стимулировал рост эксплантатов ткани сердца на 36% по сравнению с контрольным значением. Уменьшение трофотропного эффекта норадреналина в присутствии, как атенолола, так и пропранолола не наблюдалось. Полученные результаты свидетельствуют о том, что стимулирующее рост эксплантатов ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов действие норадреналина не связано с влиянием препарата на  $\beta$ -адренорецепторы. Норадреналин угнетал рост экспериментальных эксплантатов ткани кости в концентрации  $10^{-5}$  М на 45%. Введение атенолола в питательную среду экспериментальных чашек Петри не вызывало уменьшение ингибирующего эффекта норадреналина, однако блокада обоих типов  $\beta$ -адренорецепторов пропранололом нивелировала угнетающий рост эксплантатов ткани кости эффект препарата. Таким образом, как и в случае с адреналином, ингибирующее рост эксплантатов ткани кости действие норадреналина реализуется через  $\beta_2$ -адренорецепторы.

Многочисленные данные свидетельствуют, что  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза участвует в образовании мультимолекулярного сигнального комплекса, включающего Src-киназу, рецептор эпидермального фактора роста,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник,  $\text{Ca}^{2+}$ -

каналы различного типа, фосфолипазу C, IP<sub>3</sub>-рецептор и другие рецепторные белки (Schoner, Schiener-Bobis, 2007; Reinhard et al., 2012; Aperia et al., 2016; Orlov et al., 2017). Описаны взаимодействия Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы с никотиновым холинорецептором (Krivoi et al., 2006), рецепторами дофамина (Hazelwood et al., 2008), АМРА (Zhang et al., 2009), δ-опиоидным рецептором (Deng et al., 2009). Показана модуляция функции Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы в клетках проксимальных почечных канальцев через рецептор ангиотензина II (Ketchem et al., 2016). Известно, катехоламины способны модулировать насосную функцию Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы в различных органах и тканях (Gao et al., 1992; Stimers, Dobretsov 1998; Yin et al., 2014; Amar et al., 2017), однако точный механизм передачи сигнала от адренорецепторов к Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазе не известен.

Фосфорилирование ферментов широко известный способ регуляции их активности. Связывание β<sub>1</sub>-адренорецептора с агонистом приводит к увеличению концентрации циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), и последующей активации протеинкиназы А. Фосфорилирование аминокислоты серина, локализованной между 8 и 9 трансмембранным доменах α<sub>1</sub>-субъединицы Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы, протеинкиназой А приводит к угнетению насосной функции фермента во многих тканях (Cheng et al., 1997; Wu et al., 2007; Poulsen et al., 2010). Однако фосфорилирование протеинкиназой А белка FX<sub>1</sub>YD1 в кардиомиоцитах приводит к увеличению активности Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы. Поскольку FX<sub>1</sub>YD1 снижает чувствительность Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы к ионам Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> его фосфорилирование нивелирует ингибирующий эффект белка (Despa et al., 2005) или даже стимулирует насосную функцию фермента (Pavlovic et al., 2007; Fuller et al., 2009). Не только β- но и α-адренорецепторы в некоторых тканях могут принимать участие в регуляции активности Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы. В клетках линии Caco-2 адреналин модулирует активность Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы через α<sub>2</sub>-адренорецепторы с участием сигнальных каскадов включающих Src-киназу, p38MAP-киназу, ERK и простагландин E<sub>2</sub> (El Moussawi et al., 2018). Описан механизм увеличения активности Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы в нейронах при активации α<sub>1</sub>-адренорецепторов норадреналином. Связывание норадреналина с рецептором активирует

фосфолипазу C, которая вызывает  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое дефосфорилирование фермента и увеличение его активности (Mallick et al., 2010).

В связи с вышеизложенным, возникла гипотеза о возможной рецептор-опосредованной регуляции катехоламинами не только насосной, но и сигнальной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, участвующей в регуляции клеточного роста и тканевого моделированию.

Проведенное исследование подтвердило возможность рецептор-опосредованной модуляции сигнальной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы адреналином в клетках ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов с участием  $\beta_1$ -адренорецепторов. Однако в эксплантатах ткани кости адреналин влияния на трансдукторную функцию  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы не оказывает.

Норадреналин способен участвовать в рецептор-опосредованной модуляции сигнальной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы как в клетках ткани сердца (через  $\beta_1$ -адренорецепторы), так и в клетках ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов. Возможно регуляция трансдукторной функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в клетках ткани кости норадреналином осуществляется через  $\alpha_1$ -адренорецепторы.

Доказано, что реализация функции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы как трансдуктора сигнала в эксплантатах ткани сердца 10-12-дневных куриных эмбрионов при прямой активации фермента оубаином в наномолярных концентрациях осуществляется при участии Src-киназы (Lopatina et al., 2016). Осуществляется ли рецептор-опосредованная модуляция  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы катехоламинами с участием Src-киназы или других вторичных посредников предстоит установить в дальнейшем.

## 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  $\beta_1$ -адренорецепторы,  $\alpha_1$ - и  $\alpha_3$ -изоформы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы.
4. В условиях органотипического культивирования ткани сердца показано, что трофотропный эффект катехоламинов реализуется при участии  $\beta_1$ -адренорецепторов.
5. Норадреналин, в отличие от адреналина, обнаружил остеостимулирующий эффект. Трофотропное действие норадреналина не связано с активацией  $\beta$ -адренорецепторов. Остеоингибирующий эффект катехоламинов основан на взаимодействии с  $\beta_2$ -адренорецепторами.
6. Проведенные исследования показали, что катехоламины рецептор-опосредованно модулируют трансдукторную функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы. Их действие тканеспецифично и реализуется при участии как  $\beta_1$ -, так и  $\alpha$ -адренорецепторов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АТФ- аденозинтрифосфат

ИП – индекс площади

цАМФ - циклический аденозинмонофосфат

Akt - протеинкиназа B

ATF4 - активационный транскрипционный фактор 4

ECL- экстраклеточная петля

EGFR- рецептор эпидермального фактора роста

ERK - киназа, регулируемая внеклеточными сигналами

IP<sub>3</sub> - инозитол-(3,4,5)-трифосфат

ICL -цитоплазматическая петля

МАРК - митоген-активируемая протеинкиназа

NF-κB- ядерный фактор каппа цепей В клеток

PDK - 3-фосфоинозитол-зависимая протеинкиназа

PI3K - фосфатидилинозитол-3-киназа

PINP - N- концевой пептид про-коллагена I типа

RANKL - рецептор активатора ядерного фактора каппа В

TMD - трансмембранный домен

TRAP - тартрат резистентная кислая фосфатаза

UPR – реакция несвернутых белков

VEGF - фактора роста эндотелия

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Ажипа, Я.И. О нейрогуморальных способах осуществления трофической функции нервной системы / Я.И. Ажипа // Физиология человека. – 1988. – Т. 14. – №1. – С. 3-19.
2. Аржанова, О.Н. Роль артериальной гипертензии в патогенезе гестоза и плацентарной недостаточности / О.Н. Аржанова // Журнал акушерства и женских болезней. – 2010. – Т. 59. – №1. – С. 31-35.
3. Бицадзе, В.О. Фолатдефицитные состояния в акушерской практике и проблема их коррекции / В.О. Бицадзе, Н.В. Самбулова, Н.А. Макацария, А.Л. Мищенко // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2016. – Т. 10. – №1. – С. 38-48.
4. Болотнова, Т.В. Остеопороз и сердечно-сосудистая патология: особенности сочетанного течения / Т.В. Болотнова, Н.Г. Платицына, О.Н. Кусливая // Вестник Тюменского государственного университета. Социально-экономические и правовые исследования. – 2013. – №6. – С. 166-173.
5. Бухараева, Э.А. Изменение кинетики вызванной секреции квантов медиатора как фактор модуляции синаптической передачи / Э.А. Бухараева // Автореф. докт. дисс... – Казань, 2001. – 33 с.
6. Григорьев, А.И. Трудные годы лидера физиологии / А.И. Григорьев, Н.А. Григорьян // Вестник Российской академии наук. – 2007. – Т. 77. – №5. – С. 426-433.
7. Доброхотова, Ю.Э. Преэклампсия: от истории до сегодняшнего дня / Ю.Э. Доброхотова, Л.С. Джохадзе, П.А. Кузнецов, А.П. Османова, О.В. Макаров // Проблемы репродукции. – 2015. – Т. 21. – №. 5. – С. 120-126.
8. Егорова, О.В. С микроскопом на «ты» / О.В. Егорова. СПб.: Интермедика, 2000. – 328 с.
9. Егорова, О.В. Современные методы исследования и контрастирования / О.В. Егорова // Terra medica – Лабораторная диагностика. – 2005. – №2 (7). – С. 30-32.

10. Житников, А.Я. Формирование ростковых хрящей и особенности их кальцификации в растущих длинных костях курицы (*Gallus domesticus*) / А.Я. Житников // Український морфологічний альманах. – 2012. – Т. 10. – №3. – С. 39-45.
11. Ивлева, А.Я. Различия фармакологических свойств beta-адреноблокаторов и их клиническое значение / А.Я. Ивлева // Consilium medicum. – 2003. – Т. 5. – №11. – С. 641-648.
12. Ишкараева, В.В. Изучение возможностей нейтрализации кардиотонических стероидов в терапии преэклампсии / В.В. Ишкараева, Н.Г. Солодовникова, И.Е. Зазерская, Е.В. Фролова, О.В. Фёдорова, А.Я. Багров // Артериальная гипертензия. – 2015. – Т. 21. – № 1. – С. 69-74.
13. Катцунг, Б.Г. Базисная и клиническая фармакология: в 2 томах: Учебное пособие // М., СПб.: Диалект, -2008. -1 т./под ред. Бертрама Г. Катцунга.
14. Коновалов, Ю.Б. Культура нервной ткани / Ю.Б. Коновалов, Е.И. Оленев, Ю.А. Чумасов – М.: «Медицина», 1977. – 184с
15. Крамарь, С.Б. Структурная организация сердца в онтогенезе птиц / С.Б. Крамарь // Морфология развивающегося сердца (структура, ультраструктура, метаболизм). – Днепропетровск, – 1995. – С. 93-110.
16. Кривой, И.И. Функциональные взаимодействия Na, K-АТФазы с молекулярным окружением / И.И. Кривой // Биофизика. – 2014. – Т. 59. – №5. – С. 871-882.
17. Куценко, С.А. Основы токсикологии / С.А. Куценко // Спб.: Фолиант. – 2004. – 720с.
18. Лопатина, Е.В. Исследование участия Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы в регуляции роста эксплантатов ткани сердца в органотипической культуре / Е.В. Лопатина, В.А. Пеннийнен, А.А. Зайка // Бюллетень эксперим. биологии и медицины – 2005. – Т. 140. – №8. – С. 150-153.
19. Лопатина, Е.В. Участие сердечных гликозидов в регуляции роста эксплантатов ткани сетчатки / Е.В. Лопатина, А.В.Карецкий, В.А.



- Пеннийнен, Т.В. Виноградова //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008а. – Т. 146. – №12. – С. 651-653.
- 20.Лопатина, Е.В. Фармакологическая регуляция роста кардиомиоцитов в культуре ткани / Е.В. Лопатина, Л.А. Геворкова, Э.В. Кулешова // Артериальная гипертензия – 2008б. – Т. 14. - №4. – С. 369-372.
- 21.Лопатина, Е.В. Синтетический анальгетик аноцептин: результаты доклинических и клинических исследований / Е.В. Лопатина, Ю.И. Поляков // Эфферентная терапия. – 2011. – Т. 17. – №3. – С. 79-81.
- 22.Лопатина, Е.В. Исследование влияния норадреналина и селективных  $\beta$  1-адреноблокаторов на рост эксплантатов ткани сетчатки / Е.В. Лопатина, В.А. Пеннийнен, В.А. Цырлин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153. – №1. – С. 56-58.
- 23.Лопатина, Е.В. Использование метода реконструкции оптических срезов для оценки трофотропных эффектов адреналина и атенолола. / Е.В. Лопатина, А.В. Кипенко, В.А. Пеннийнен, Н.А. Пасатецкая, В.А. Цырлин // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т.101 –№9. – С.1022–1031.
- 24.Машковский, М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. Т.1 / М.: Медицина, 1993 – 736 с.
- 25.Павлов, И.П. Полное собрание трудов. – Изд-во Академии наук СССР, 1951. – Т. 1. – 595с.
- 26.Пеннийнен, В.А. Влияние  $\beta$ -адреноблокаторов на рост нейритов спинальных ганглиев в органотипической культуре ткани / В.А. Пеннийнен, Е.В. Лопатина, В.А. Цырлин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т.143. – №5. – С. 487-489.;
- 27.Пеннийнен, В.А. Влияние ингибиторов натриевого насоса на рост нейритов сенсорных ганглиев / В.А. Пеннийнен, Е.В.Лопатина, В.А. Цырлин, Б.В. Крылов // Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. – 2008. – Т. 94. – №3. – С. 326-330.

28. Платицына, Н.Г. Проблема остеопороза у больных с сердечно-сосудистыми и бронхообструктивными заболеваниями / Н.Г. Платицына, Т.В. Болотнова, Н.С. Оконечникова, Ж.В. Куимова // Успехи геронтологии *Advances in gerontology*. – 2016. – Т. 29. – №5. – С. 764-769.
29. Плоцкий, А.Р. Роль гомоцистеина в генезе врожденных пороков развития плода / А.Р. Плоцкий // Репродуктивное здоровье в Беларуси. – 2009. – №5. – С. 58-65.
30. Самигуллин, Д.В. Особенности кинетики вызванной секреции квантов медиатора в разных отделах нервно-мышечного синапса лягушки / Д.В. Самигуллин // Автореф. канд. дисс... – Казань, 2001. – 22 с.
31. Ткачук, В.А. Введение в молекулярную эндокринологию – М.: Моск. ун-т. 1983. – 256с.
32. Федорова, О.В. Эндогенные кардиотонические стероиды: клинические перспективы / О.В. Федорова, Л.С. Коростовцева, Д.И. Шапиро, А.Я. Багров // Артериальная гипертензия. – 2008. – Т. 14. – №3. – С. 220-232.
33. Хавинсон, В.Х. Методика создания монослоя клеток на базе органотипической культуры для тестирования физиологически активных веществ / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, В.Е. Проняева, Н.И. Чалисова, Е.А. Концевая, В.О. Полякова, Т.В. Кветная, И.М. Кветной // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153. – №5. – С. 759-763.
34. Цырлин, В.А. Влияние  $\beta$ -адреноблокаторов на рост кардиомиоцитов в культуре ткани сердца / В.А. Цырлин, Е.В. Лопатина, В.А. Пеннийнен // Артериальная гипертензия. – 2006. – Т. 12. – №3. – С. 248-251.
35. Чокинэ, В.К. Серосодержащие аминокислоты в диагностике, целенаправленном поддержании и формировании здоровья / В.К. Чокинэ, С.Н. Гараева, А.В. Невоя // *Buletinul AŞM. Ştiinţele vieţii*. – 2011. – Т. 315. – №3. С. 15-35.
36. Яковлева, В.В. DIGIFAB и иммунонейтрализация кардиотонических стероидов при преэклампсии / В.В. Яковлева, Н.Г. Солодовникова, Е.В.

- Фролова, Д.С. Адэр, О.В. Федорова, И.Е. Зазерская, И.В. Емельянов, А.Я. Багров // Артериальная гипертензия. – 2011. – Т. 17. – №4. – С. 392-396.
37. Abcouwer, S.F. Response of VEGF expression to amino acid deprivation and inducers of endoplasmic reticulum stress / S.F. Abcouwer, P.L. Marjon, R.K. Loper, D.L. Vander Jagt // Investigative ophthalmology & visual science. – 2002. – V. 43. – №8. – P. 2791-2798.
38. Aitken, S.J. Beta2-adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation in vitro by direct and indirect mechanisms / S.J. Aitken, E. Landao-Bassonga, S.H. Ralston, A.I. Idris // Arch Biochem Biophys. – 2009. – Vol. 482. – P. 96–103.
39. Akisaka, T. An ultracytochemical investigation of ouabain-sensitive p-nitrophenylphosphatase in chick osteoclasts / T. Akisaka, C.V. Gay // Cell and tissue research. – 1986. – V. 244. – №1. – P. 57-62.
40. Amar, M. Noradrenergic  $\beta$ -Adrenoceptor-Mediated Intracellular Molecular Mechanism of Na–K ATPase Subunit Expression in C6 Cells / M. Amar, A. Singh, B.N. Mallick // Cellular and molecular neurobiology. – 2018. – V. 38. – №2. – P. 441-457.
41. Aperia, A. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, a new class of plasma membrane receptors / A. Aperia, E.E. Akkuratov, J.M. Fontana, H. Brismar // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2016. – V. 310. – №7. – P. C491-C495.
42. Arnold, I.R. Subtype selective regulation of coupling of rat cardiac  $\beta$  adrenoceptors to adenylate cyclase / I.R. Arnold, R. Mistry, D.B. Barnett // European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology. – 1993. – V. 245. – № 3. – P. 285-289.
43. Azizi, Z.A. Effects of hyperhomocysteinemia during the gestational period on ossification in rat embryo / Z.A. Azizi, A. Zamani, L.R. Omrani // Bone. – 2010. – V. 46. – № 5. – P. 1344-1348.
44. Azzi, M.  $\beta$ -Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors / M. Azzi, P.G. Charest, S. Angers, G. Rousseau, T. Kohout, M. Bouvier, G. Piñeyro

- //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – V. 100. – №. 20. – P. 11406-11411.
45. Bagrov, A.Y. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets / A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro, O.V. Fedorova // Pharmacol Rev. – 2009. – V. 61. – P. 9-38.
46. Baker, J.G. Agonist and inverse agonist actions of  $\beta$ -blockers at the human  $\beta$ 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling / J.G. Baker, I.P. Hall, S.J. Hill // Molecular pharmacology. – 2003. – V. 64. – №. 6. – P. 1357-1369.
47. Barker, D.J. The fetal and infant origins of adult disease / D.J. Barker // BMJ: British Medical Journal. – 1990. – V. 301. – №. 6761. – P. 1111.
48. Baron, R. Evidence for a high and specific concentration of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) ATPase in the plasma membrane of the osteoclast / R. Baron, L. Neff, C. Roy, A. Boisvert, M. Caplan // Cell. – 1986. – V. 46. – №. 2. – P. 311-320.
49. Bers, D.M. Na/K-ATPase—an integral player in the adrenergic fight-or-flight response / D.M. Bers, S. Despa // Trends in cardiovascular medicine. – 2009. – V. 19. – №. 4. – P. 111-118.
50. Bonnet, N. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis / N. Bonnet, D.D. Pierroz, S.L. Ferrari // J Musculoskelet Neuronal Interact. – 2008. – Vol. 8. – №2. – P. 94-104.
51. Brauer, P.R. Consequences of elevated homocysteine during embryonic development and possible modes of action / P.R. Brauer, B. J. Tierney // Current Pharmaceutical Design. – 2004. – V. 10. – № 22. – P. 2719-2732.
52. Buckalew, V.M. Role of endogenous digitalis-like factors in the clinical manifestations of severe preeclampsia: a systematic review / V.M. Buckalew // Clinical Science. – 2018. – V. 132. – №. 12. – P. 1215-1242.
53. Câmara, D. R. Role of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ion pump in male reproduction and embryo development / D.R. Câmara, J.P. Kastelic, J.C. Thundathil // Reproduction, Fertility and Development. – 2017. – V 29. – №. 8. – P. 1457-1467.

54. Caron, M.G. Catecholamine receptors: structure, function, and regulation / M.G. Caron, R.J. Lefkowitz // *Recent progress in hormone research.* – Academic Press, 1993. – P. 277-290.
55. Cheng, X. J. PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na (+)-K (+)-ATPase in response to beta-adrenergic hormone / X J. Cheng, G. Fisone, O. Aizman, R. Aizman, R. Levenson, P. Greengard, A. Aperia // *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* – 1997. – V. 273. – №. 3. – P. C893-C901.
56. Communal, C. Opposing effects of beta(1)-and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G-protein / C. Communal, K. Singh, D.B. Sawyer, W.S. Colucci // *Circulation.* –1999. –V.100. –P. 2210 –2212.
57. Congreve, M. Progress in structure based drug design for G protein-coupled receptors / M. Congreve, C.J. Langmead, J.S. Mason, F.H. Marshall // *Med. Chem.* – 2011. – V. 54. – P. 4283–4311.
58. Deng, H. Interactions of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and co-expressed  $\delta$ -opioid receptor / H. Deng, Z. Yang, Y. Li, G. Bao, T. Friedrich, Q. Gu, X. Shen, W. Schwarz // *Neuroscience research.* – 2009. – V. 65. – №. 3. – P. 222-227.
59. Despa, S. Phospholemman-phosphorylation mediates the  $\beta$ -adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes / S. Despa, J. Bossuyt, F. Han, K.S. Ginsburg, L.G. Jia, H. Kutchai, A.L. Tucker, D.M. Bers // *Circulation research.* – 2005. – V. 97. – №. 3. – P. 252-259.
60. Despa, S. Functional analysis of Na/K-ATPase isoform distribution in rat ventricular myocytes / S. Despa, D.M. Bers // *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* – 2007. – V.293(1). –P.321-327.
61. Despa, S. Phospholemman-mediated activation of Na/K-ATPase limits [Na]<sub>i</sub> and inotropic state during beta-adrenergic stimulation in mouse ventricular myocytes / S. Despa, A.L. Tucker, D.M. Bers // *Circulation.* – 2008. – V.117. – P.1849-1855.
62. Devic, E.  $\beta$ -adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 adrenoceptor knockout mice / E. Devic, Y. Xiang, D. Gould, B. Kobilka // *Mol Pharmacol.* – 2001. – V. 60. – P. 577-583.

63. Dvela, M. Diverse biological responses to different cardiotonic steroids / M. Dvela, H. Rosen, T. Feldmann, M. Neshet, D. Lichtstein // *Pathophysiology*. – 2007. – V. 14. – №. 3-4. – P. 159-166.
64. Dvela-Levitt, M. Reduction in maternal circulating ouabain impairs offspring growth and kidney development / M. Dvela-Levitt, H.C.B. Ami, H. Rosen, A. Ornoy, D. Hochner-Celnikier, M. Granat, D. Lichtstein // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2015. – V. 26. – №. 5. – P. 1103-1114.
65. El Moussawi, L. Epinephrine modulates Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity in Caco-2 cells via Src, p38MAPK, ERK and PGE2. / L. El Moussawi, M.1. Chakkour, S.I. Kreydiyyeh // *PLoS One*. – 2018. – V.13(2) –:e0193139
66. Eleftheriou, F. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART / F. Eleftheriou, J.D. Ahn, S. Takeda, M. Starbuck, X. Yang, X. Liu, H. Kondo, W.G. Richards, T.W. Bannan, M. Noda, K. Clement, C. Vaisse, K. Clement // *Nature*. – 2005. – V. 434. – №. 7032. – P. 514.
67. Fambrough, D.M. Multiple forms of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase in the chicken. Selective detection of the major nerve, skeletal muscle, and kidney form by a monoclonal antibody / D.M. Fambrough, E.K. Bayne // *Journal of Biological Chemistry*. – 1983. – V. 258. – №. 6. – P. 3926-3935.
68. Francis, M.J. ATPase pumps in osteoclasts and osteoblasts / M.J. Francis, R.L. Lees, E. Trujillo, P. Martín-Vasallo, J.N. Heersche, A. Mobasher // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2002. – V. 34. – №. 5. – P. 459-476.
69. Frielle, T. Structural basis of  $\beta$ -adrenergic receptor subtype specificity studied with chimeric  $\beta_1/\beta_2$ -adrenergic receptors / T. Frielle, K.W. Daniel, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1988. – V. 85. – P. 9494-9498.
70. Fuller, W. FXD1 phosphorylation in vitro and in adult rat cardiac myocytes: threonine 69 is a novel substrate for protein kinase C / W. Fuller, J. Howie, L.M. McLatchie, R.J. Weber, C.J. Hastie, K. Burness, D. Pavlovic, M.J. Shattock // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2009. – V. 296. – №. 6. – P. 1346-1355.

71. Fuller, W. Regulation of the cardiac sodium pump / W. Fuller, L.B. Tulloch, M.J. Shattock, S.C. Calaghan, J. Howie, K.J. Wypijewski // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2013. – V. 70. – №. 8. – P. 1357-1380.
72. Galandrin, S. Distinct signaling profiles of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic receptor ligands towards adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy / S. Galandrin, M. Bouvier // Molecular pharmacology. – 2006. – V. 70. – №. 5. – P. 1575-1584.
73. Gao, J. Isoprenaline,  $\text{Ca}^{2+}$  and the  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pump in guinea-pig ventricular myocytes / J. Gao, R.T. Mathias, I.S. Cohen, G.J. Baldo // The Journal of physiology. – 1992. – V. 449. – №. 1. – P. 689-704.
74. Gerritsen, T. The identification of homocystine in the urine / T. Gerritsen, J.G. Vaughn, H.A. Waisman // Biochemical and biophysical research communications. – 1962. – V. 9. – №. 6. – P. 493-496.
75. Gerstenfeld, L.C. Regulation of Avian Osteopontin Pre-and Posttranscriptional Expression in Skeletal Tissues / L.C. Gerstenfeld, T. Uporova, S. Ashkar, E. Salih, Y. Gotoh, M.D. McKee, A. Nanci, M.J. Glimcher // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1995. – V. 760. – №. 1. – P. 67-82.
76. Giannatselis, H. Ouabain stimulates a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-mediated SFK-activated signalling pathway that regulates tight junction function in the mouse blastocyst / H. Giannatselis, M. Calder, A. J. Watson // PLoS One. – 2011. – V. 6. – №. 8. – P. e23704.
77. Halleen, J.M. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase / J.M. Halleen, S. Räsänen, J.J. Salo, S.V. Reddy, G.D. Roodman, T.A. Hentunen, P.P. Lehenkari, H. Kaija, P. Vihko, H. K. Väänänen // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – V. 274. – №. 33. – P. 22907-22910.
78. Hamlyn, J.M. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma / J.M. Hamlyn, M.P. Blaustein, S. Bova, D.W. DuCharme, D.W. Harris, F. Mandel, W.R. Mathews, J.H. Ludens // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1991. – V. 88. – №. 14. – P. 6259-6263.

79. Hazelwood, L.A. Reciprocal modulation of function between the D1 and D2 dopamine receptors and the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase / L.A. Hazelwood, R.B. Free, D.M. Cabrera, M. Skinbjerg, D.R. Sibley // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283. – №. 52. – P. 36441-36453.
80. Herrmann, M. Homocysteine—a newly recognised risk factor for osteoporosis / M. Herrmann, T. Widmann, W. Herrmann // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2005a. – V. 43. – №. 10. – P. 1111-1117.
81. Herrmann, M. Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations / M. Herrmann, T. Widmann, G. Colaianni, S. Colucci, A. Zallone, W. Herrmann // *Clinical chemistry*. – 2005b. – V. 51. – №. 12. – P. 2348-2353.
82. Herrmann, M. Experimental hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats / M. Herrmann, B. Wildemann, L. Claes, S. Klohs, M. Ohnmacht, O. Taban-Shomal, U. Hübner, A. Pexa, N. Umanskaya, W. Herrmann // *Clinical chemistry*. – 2007a. – V. 53. – №. 8. – P. 1455-1461.
83. Herrmann, W. Homocysteine, brain natriuretic peptide and chronic heart failure: a critical review / W. Herrmann, M. Herrmann, J. Joseph, S.C. Tyagi // *Clinical Chemical Laboratory Medicine*. – 2007b. – V. 45. – №. 12. – P. 1633-1644.
84. Herrmann, W. Hyperhomocysteinaemia: a critical review of old and new aspects / W. Herrmann, M. Herrmann, R. Obeid // *Current drug metabolism*. – 2007c. – V. 8. – №. 1. – P. 17-31
85. Herrmann, M. Stimulation of osteoblast activity by homocysteine / M. Herrmann, N. Umanskaya, B. Wildemann, G. Colaianni, T. Widmann, A. Zallone, W. Herrmann, // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2008. – V. 12. – №. 4. – P. 1205-1210.
86. Herrmann, M. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone / M. Herrmann, A. Tami, B. Wildemann, M. Wolny, A. Wagner, H. Schorr, O. Taban-Shomal, N. Umanskaya, S. Ross, P. Garcia, U. Hübner, W. Herrmann // *Bone*. – 2009. – V. 44. – P. 467-475.



- 87.Higgins, D. Developmental changes in the sensitivity of the chick embryo ventricle to beta-adrenergic agonist during adrenergic innervation / D. Higgins, A.J. Pappano // *Circulation research*. – 1981. – V. 48. – №. 2. – P. 245-253.
- 88.Hrnčić, D. The role of nitric oxide in homocysteine thiolactone-induced seizures in adult rats / D. Hrnčić, A. Rašić-Marković, D. Krstić, D. Macut, D. Djuric, O. Stanojlović // *Cellular and molecular neurobiology*. – 2010. – Vol. 30. – №2. – P. 219-231.
- 89.Huxley, R.R. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature / R.R. Huxley, A.W. Shiell, C.M. Law // *Journal of hypertension*. – 2000. – Vol. 18. – №. 7. – P. 815-831.
- 90.Joseph, J. Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats / J. Joseph, L. Joseph, N.S. Shekhawat, S. Devi, J. Wang, R.B. Melchert, M. Hauer-Jensen, R.H. Kennedy // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2003. – V. 285. – №. 2. – P. H679-H686.
- 91.Kellenberger, S. Formoterol and isoproterenol induce c-fos gene expression in osteoblast-like cells by activating beta2-adrenergic receptors / S. Kellenberger, K. Muller, H. Richener, G. Bilbe // *Bone*. – 1998. – Vol. 22. – P. 471–478.
- 92.Ketchem, C.J. Low dose ouabain stimulates NaK ATPase  $\alpha$ 1 subunit association with angiotensin II type 1 receptor in renal proximal tubule cells / C.J. Ketchem, C.D. Conner, R.D. Murray, M. DuPlessis, E.D. Lederer, D. Wilkey, M. Merchant, S.J. Khundmiri // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2016. – Vol. 1863. – №. 11. – P. 2624-2636.
- 93.Khloponin, P.A. Fluorescence and electron-microscopic analysis of differentiation of the myocytes of the ventricles and atria of the avian heart in ontogenesis / P.A. Khloponin // *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii* – 1976. – V.71. – № 12. – P. 49-57.
- 94.Khodus, G. R. Calcium signaling triggered by ouabain protects the embryonic kidney from adverse developmental programming / G. R. Khodus, M.

- Kruusmägi, J. Li, X. L. Liu, A. Aperia // *Pediatric Nephrology*. – 2011. – Vol. 26. – №. 9. – P. 1479-1482.
95. Kikkawa, H. The role of the seventh transmembrane region in high affinity binding of a  $\beta_2$ -selective agonist TA-2005 / H. Kikkawa, I. Masafumi, T. Nagao, H. Kurose // *Molecular Pharmacology*. – 1998. – V. 53. – P. 128–134.
96. Kirby, M.L. Developing innervation of the chick heart: A histofluorescence and light microscopic study of sympathetic innervation / M.L. Kirby, J.W. McKenzie, T.A. Weidman // *The Anatomical Record*. – 1980. – Vol. 196. – №. 3. – P. 333-340.
97. Kobilka, B.K. Chimeric  $\alpha_2$ -,  $\beta_2$ -adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity / B.K. Kobilka, T.S. Kobilka, K. Daniel, J.W. Regan, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz // *Science*. – 1988. – V. 240. – P. 1310-1316.
98. Kondo, H. Beta-adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via reactive oxygen species / H. Kondo, S. Takeuchi, A. Togari // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. – 2013. – Vol. 304. – P. E507–E515.
99. Krivoi, I.I. On the functional interaction between nicotinic acetylcholine receptor and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase / I.I. Krivoi, T.M. Drabkina, V.V. Kravtsova, A.N. Vasiliev, M.J. Eaton, S.N. Skatchkov, F. Mandel // *Pflügers Archiv*. – 2006. – Vol. 452. – №. 6. – P. 756-765.
100. Krylov, B.V. Morphine decreases the voltage sensitivity of the slow sodium channels / B.V. Krylov, A.V. Derbenev, S.A. Podzorova, M.I. Liudyno, A.V. Kuz'min, N.L. Izvarina // *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni IM Sechenova*. – 1999. – Vol. 85. – №. 2. – P. 225-236.
101. Lands, A. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines / A. Lands, A. Arnold, J.P. McAuliff, F.P. Luduena, T.B. Jun // *Nature*. – 1967. – Vol. 214. – №. 5088. – P. 597.
102. Law, C.M. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature / C.M. Law, A.W. Shiell // *Journal of hypertension*. – 1996. – Vol. 14. – №. 8. – P. 935-941.

103. Levasseur, R. Bone tissue and hyperhomocysteinemia / R. Levasseur // *Joint Bone Spine*. – 2009. – Vol. 76. – №. 3. – P. 234-240.
104. Li, Y. Effects of homocysteine on cardiovascular development in early chicken embryo / Y.Li, Z. Li, X. Chen, P. Qi, S. Li // *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. –1999. – Vol. 33. – N 3. – P. 137-139.
105. Liu, J. The sodium pump and cardiotonic steroids-induced signal transduction protein kinases and calcium-signaling microdomain in regulation of transporter trafficking / J. Liu, Z. Xie // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. – 2010. – Vol. 1802. – №. 12. – P. 1237-1245.
106. Lopatina, E.V. Organotypic tissue culture investigation of homocysteine thiolactonecardiotoxic effect / E.V. Lopatina, A.V. Kipenko, V.A. Penniyaynen, N.A. Pasatetskaya, D. Djuric, B.V. Krylov // *Acta Physiologica Hungarica*. – 2015. – Vol. 102. – №2. – P. 137–142.
107. Lopatina, E.V. Modulation of the transducer function of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: new mechanism of heart remodeling / E.V. Lopatina, A.V. Kipenko, N.A. Pasatetskaya, V.A. Penniyaynen, B.V. Krylov // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 94(10). – P. 1110-1116.
108. Lucas, A. Programming by early nutrition in man / A. Lucas // *The childhood environment and adult disease*. – 1991. – Vol. 1991. – P. 38-55.
109. Lucchesi, P.A. Postnatal changes in Na, K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle. Conservation of biphasic ouabain affinity / P.A. Lucchesi, K.J. Sweadner // *Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – Vol. 266. – №. 14. – P. 9327-9331.
110. Maassen, A.P. The influence of adrenalectomy on the growth of rats / A.P. Maassen // *Arch Int Pharmacodyn Ther*. – 1952. – Vol. 88. – P. 473–481.
111. Makihira, S. Blocking of sodium and potassium ion-dependent adenosine triphosphatase- $\alpha$ 1 with ouabain and vanadate suppresses cell–cell fusion during RANKL-mediated osteoclastogenesis / S. Makihira, H. Nikawa, M. Kajiya, T. Kawai, Y. Mine, E. Kosaka, M.J. Silva, K. Tobiume, Y. Terada // *European journal of pharmacology*. – 2011. – Vol. 670. – №. 2-3. – P. 409-418.

112. Mallick, B.N. Mechanism of noradrenaline-induced stimulation of Na–K ATPase activity in the rat brain: implications on REM sleep deprivation-induced increase in brain excitability / B.N. Mallick, S. Singh, A. Singh // *Molecular and cellular biochemistry*. – 2010. – Vol. 336. – №. 1-2. – P. 3-16.
113. Manasek, F.J. Embryonic development of the heart. I. A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo / F.J. Manasek // *Journal of morphology*. – 1968. – Vol. 125. – №. 3. – P. 329-365.
114. Manejwala, F.M. Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: role of extracellular sodium and chloride and possible apical routes of their entry / F.M. Manejwala, E.J. Cragoe Jr, R.M. Schultz // *Developmental biology*. – 1989. – Vol. 133. – №. 1. – P. 210-220.
115. Marikawa, Y. Creation of trophectoderm, the first epithelium, in mouse preimplantation development / Y. Marikawa, V.B. Alarcon // *Mouse Development*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. – P. 165-184.
116. Martinsen, B.J. Reference guide to the stages of chick heart embryology / B.J. Martinsen // *Developmental dynamic*. – 2005. – Vol. 233. – P. 1217-1237.
117. Massé, P.G. Chemical and biomechanical characterization of hyperhomocysteinemic bone disease in an animal model / P.G. Massé, A.L. Boskey, I. Ziv, P. Hauschka, S. M. Donovan, D. S. Howell, D.E. Cole // *BMC musculoskeletal disorders*. – 2003. – Vol. 4. – №. 1. – P. 2.
118. McCully, K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis / K.S. McCully // *Am J Pathol* . – 1969. – Vol.56. – P.111–128.
119. McDonough, A.A. Subcellular distribution of Na pump isform subunits in mammalian cardiac myocytes / A.A. McDonough, Y. Zhang, V. Shin, J.S. Frank // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 1996. – Vol. 270. – P. 1221–1227.
120. McKusick, V.A. Homocystinuria / V.A. McKusick // *Archives of Ophthalmology*. – 1966. – Vol. 75. – №. 1. – P. 150-151.

121. Ming, Z. Distinct  $\beta$ -adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance / Z. Ming, H. Qi-De, X. Rui-Ping // *Acta Physiologica Sinica*. – 2004. – Vol. 56(1). – P. 1-15.
122. Minkin, C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function / C. Minkin // *Calcified tissue international*. – 1982. – Vol. 34. – №. 1. – P. 285-290.
123. Mobasher, A.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions / A. Mobasher, J. Avila, I. Cózar-Castellano, M.D. Brownleader, M. Trevan, M.J. Francis, J.F. Lamb, P. Martín-Vasallo // *Biosci Rep*. – 2000. – Vol. 20(2). – P.51-91.
124. Morisco, C. The Akt-glycogen synthase kinase  $3\beta$  pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes / C. Morisco, D. Zebrowski, G. Condorelli, P. Tsichlis, S. F. Vatner, J. Sadoshima // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – №. 19. – P. 14466-14475.
125. Morisco, C.  $\beta$ -adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the  $\beta_1$ -subtype in the rat heart / C. Morisco, D.C. Zebrowski, D.E. Vatner, S. F. Vatner, J. Sadoshima // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2001. – Vol. 33. – №. 3. – P. 561-573.
126. O'Connell, T.D. Cardiac  $\alpha_1$ -adrenergic receptors: novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance / T.D. O'Connell B.C. Jensen, A.J. Baker, P.C. Simpson // *Pharmacological reviews*. – 2014. – Vol. 66. – №. 1. – P. 308-333.
127. Orlov, S.  $\text{Na}^+$  i,  $\text{K}^+$  i-Dependent and-Independent Signaling Triggered by Cardiotonic Steroids: Facts and Artifacts / S. Orlov, E. Klimanova, A. Tverskoi, E. Vladychenskaya, L. Smolyaninova, O. Lopina // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22. – №. 4. – P. 635.
128. Patrizio, M. Propranolol promotes Egr1 gene expression in cardiomyocytes via  $\beta$ -adrenoceptors / M. Patrizio, M. Musumeci, T. Stati, K. Fecchi, E. Mattei, L.

- Catalano, G. Marano // *European journal of pharmacology*. – 2008. – Vol. 587. – №. 1-3. – P. 85-89.
129. Pavlovic, D. The intracellular region of FXVD1 is sufficient to regulate cardiac Na/K ATPase / D. Pavlovic, W. Fuller, M.J. Shattock // *The FASEB Journal*. – 2007. – Vol. 21. – №. 7. – P. 1539-1546.
130. Pennisi, D.J. Epicardium is required for the full rate of myocyte proliferation and levels of expression of myocyte mitogenic factors FGF2 and its receptor, FGFR-1, but not for transmural myocardial patterning in the embryonic chick heart / D.J. Pennisi, V.L.T. Ballard, T. Mikawa // *Developmental Dynamic*. – 2003. – Vol. 228. – P. 161–172.
131. Perła-Kaján, J. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans / J. Perła-Kaján, T. Twardowski, H. Jakubowski // *Amino acids*. – 2007. – Vol. 32. – №. 4. – P. 561-572.
132. Pierre, S.V. The Na, K-ATPase receptor complex / S.V. Pierre, Z. Xie // *Cell biochemistry and biophysics*. – 2006. – Vol. 46. – №. 3. – P. 303-315.
133. Pierroz, D.D. Low cortical bone mass in mice lacking beta 1 and beta 2 adrenergic receptors is associated with low bone formation and circulating IGF-1 / D.D. Pierroz, P. Baldock, M.L. Bouxsein, S.L. Ferrari // *J Bone Miner Res*. – 2006. – Vol. 21. – P. S277.
134. Pönicke, K. Differential effects of bucindolol and carvedilol on noradrenaline-induced hypertrophic response in ventricular cardiomyocytes of adult rats / K. Pönicke, I. Heinroth-Hoffmann, O.E. Brodde // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2002. – Vol. 301. – №. 1. – P. 71-76.
135. Pönicke, K. Role of  $\beta$  1-and  $\beta$  2-adrenoceptors in hypertrophic and apoptotic effects of noradrenaline and adrenaline in adult rat ventricular cardiomyocytes / K. Pönicke, I. Heinroth-Hoffmann, O.E. Brodde // *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. – 2003. – Vol. 367. – №. 6. – P. 592-599.

136. Poulsen, H. Phosphorylation of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and the H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase / H. Poulsen, P. Morth, J. Egebjerg, P. Nissen // FEBS letters. – 2010. – Vol. 584. – №. 12. – P. 2589-2595.
137. Rašić-Marković, A. The activity of erythrocyte and brain Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup>-ATPases in rats subjected to acute homocysteine and homocysteine thiolactone administration / A. Rašić-Marković, O. Stanojlović, D. Hrnčić // Molecular and cellular biochemistry. – 2009. – Vol. 327. – №. 1-2. – P. 39-45.
138. Raymond, J.R. Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes / J.R. Raymond, M. Hnatowich, R.J. Lefkowitz, M.G. Caron // Hypertension. – 1990. – Vol.15. – № 2. – P. 119-131.
139. Reinhard, L. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase as a docking station: protein–protein complexes of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase / L. Reinhard, H. Tidow, M. J. Clausen, P. Nissen // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2012. – Vol. 70. – №. 2. – P. 205-222.
140. Robert, K. Expression of the cystathionine β synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain / K. Robert, F. Vialard, E. Thiery, K. Toyama, P.M. Sinet, N. Janel, J. London // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. – 2003. – Vol. 51. – №. 3. – P. 363-371.
141. Robert, K. Cystathionine β synthase deficiency affects mouse endochondral ossification / K. Robert, N. Maurin, C. Vayssettes, N. Siauve, N. Janel // The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology. – 2005. – Vol. 282. – №. 1. – P. 1-7.
142. Rosenquist, T.H. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid / T.H. Rosenquist, S.A. Ratashak, J. Selhub // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1996. – Vol. 93. – №. 26. – P. 15227-15232.
143. Rumyantsev, P.P. Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration / P. P. Rumyantsev // International review of cytology. – Academic Press, 1977. – Vol. 51. – P. 187-273.

144. Rybin, V.O. Developmental changes in  $\beta$ 2-adrenergic receptor signaling in ventricular myocytes: the role of Gi proteins and caveolae microdomains / V.O. Rybin, E. Pak, S. Alcott, S. F. Steinberg // *Mol Pharmacol.* – 2003. – Vol. 63. – P. 1338-1348.
145. Schaefers, R.F. Adrenoreceptors mediating the cardiovascular and metabolic effects of alpha-methylnoradrenaline in man / R.F. Schaefers, J. Nuernberger, B. Nerrmann // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1999. – Vol.289: – P.918-925.
146. Schäfer, M. Hypertrophic effect of selective  $\beta$ 1-adrenoceptor stimulation on ventricular cardiomyocytes from adult rat / M. Schäfer, K. Frischkopf, G. Taimor, H. M. Piper, K. D. Schlüter // *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* – 2000. – Vol. 279. – №. 2. – P. 495-503.
147. Schäfer, M. Beta-adrenoceptor stimulation attenuates the hypertrophic effect of alpha-adrenoceptor stimulation in adult rat ventricular cardiomyocytes / M. Schäfer, K. Pönicke, I. Heinroth-Hoffmann, O.E. Brodde, H.M. Piper, K.D. Schlüter // *Journal of the American College of Cardiology.* – 2001. – Vol. 37. – №. 1. – P. 300-307.
148. Scherer, E.B.S. Mild hyperhomocysteinemia reduces the activity and immunocontent, but does not alter the gene expression, of catalytic  $\alpha$  subunits of cerebral Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase / E.B.S. Scherer, S.O. Loureiro, F.C. Vuaden, F. Schmitz, J. Kolling, C. Siebert, L.E.B. Savio, B.M. Schweinberger, M.R. Bogo, C.D. Bonan, A.T. Wyse // *Molecular and cellular biochemistry.* – 2013. – Vol. 378. – №. 1-2. – P. 91-97.
149. Schoner, W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones / W. Schoner // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – №. 269. – P. 2440–2448.
150. Schoner, W. Endogenous cardiac glycosides: hormones using the sodium pump as signal transducer / W. Schoner, G. Scheiner-Bobis // *Semin Nephrol.* – 2005. – Vol. 25. – №. 5. – P. 343-351.
151. Schoner, W. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth / W. Schoner, G. Scheiner-Bobis



- // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2007. – Vol. 293. – P.509-536.
152. Shan, D.  $\kappa$ -opioid receptor stimulation inhibits cardiac hypertrophy induced by  $\beta$ 1-adrenoceptor stimulation in the rat / D. Shan, H. Wang, Y. Su, Y. Jing, T. M. Wong // European journal of pharmacology. – 2007. – Vol. 555. – №. 2-3. – P. 100-105.
153. Shcherbakova, O.G. Organization of  $\beta$ -adrenoceptor signaling compartments by sympathetic innervation of cardiac myocytes / O.G. Shcherbakova, C.M. Hurt, Y. Xiang, M.L. Dell'Acqua, Q. Zhang, R.W. Tsien, B.K. Kobilka // The Journal of Cell Biology. – 2007. – Vol. 176. – №.4. – P. 521-533.
154. Siggelkow, H. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation / H. Siggelkow, K. Rebenstorff, W. Kurre, C. Niedhart, I. Engel, H. Schulz, M.J. Atkinson, M. Hufner // Journal of cellular biochemistry. – 1999. – Vol. 75. – №. 1. – P. 22-35.
155. Silverman, B. Serine 68 phosphorylation of phospholemman: acute isoform-specific activation of cardiac Na/K ATPase / B. Silverman, W. Fuller, P. Eaton, J. Deng, J.R. Moorman, J.Y. Cheung, A.F. James, M.J. Shattock // Cardiovasc Res. – 2005. – Vol.65. – P.93–103.
156. Sipkens, J.A. Homocysteine affects cardiomyocyte viability:concentration-dependent effects on reversible flip-flop,apoptosis and necrosis / J.A. Sipkens, P.A. Krijnen, C. Meischl, S.A. Cillessen, Y. M. Smulders, D.E. Smith, C.P.E. Giroth, M.D. Spreeuwenberg, R.J.P. Musters, A. Muller, C. Jakobs, D. Roos, C.D.A. Stehouwer, J.A. Rauwerda, V.W.M. van Hinsbergh, H.W.M. Niessen // Apoptosis. – 2007. – Vol. 12. – P. 1407-1418.
157. Steed, M.M. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia / M.M. Steed, S.C. Tyagi // Antioxidants and redox signaling. – 2011. – Vol. 15. – №. 7. – P. 1927-1943.

158. Stimers, J.R. Adrenergic stimulation of Na/K pump current in adult rat cardiac myocytes in short-term culture / J. R. Stimers, M. Dobretsov // *The Journal of membrane biology*. – 1998. – Vol. 163. – №. 3. – P. 205-216.
159. Streck, E.L. Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria / E.L. Streck, A.I. Zugno, B. Tagliari, C.M. Wannmacher, M. Wajner, A.T. Wyse // *Metabolic brain disease*. – 2002. – Vol. 17. – №. 2. – P. 83-91.
160. Sundström, J. Homocysteine and heart failure: a review of investigations from the Framingham Heart Study / J. Sundström, R.S. Vasan // *Clinical Chemical Laboratory Medicine*. – 2005. – Vol. 43. – №. 10. – P. 987-992.
161. Suzuki, A. Catecholamines stimulate the proliferation and alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 osteoblast-like cells / A. Suzuki, G. Palmer, J.P. Bonjour, J.Caverzasio // *Bone*. – 1998. – Vol. 23, №3. –P. 197-203.
162. Takeuchi, T. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells / T. Takeuchi, T. Tsuboi, M. Arai, A. Togari // *Biochem Pharmacol*. – 2001. – Vol. 61. – P. 579-86.
163. Thaler, R. Homocysteine suppresses the expression of the collagen cross-linker lysyl oxidase involving IL-6, Fli1, and epigenetic DNA methylation / R. Thaler, M. Agsten, S. Spitzer, E.P. Paschalis, H. Karlic, K. Klaushofer, F. Varga // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – №. 7. – P. 5578-5588.
164. Tian, J. Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase forms a functional signaling complex / J. Tian, T. Cai, Z. Yuan, H. Wang, L. Liu, M. Haas, E. Maksimova, X.Y. Huang, Z.J. Xie // *Molecular biology of the cell*. – 2006. – Vol. 17. – №. 1. – P. 317-326.
165. Tilley, D.G. G protein-dependent and –independent signaling pathways and their impact on cardiac function / D.G. Tilley // *Circ Res*. – 2011. – Vol. 109(2) – P. 217-230.
166. Togari, A. Pharmacological topics of bone metabolism: the physiological function of the sympathetic nervous system in modulating bone resorption / A.

- Togari, M. Arai // *Journal of pharmacological sciences*. – 2008. – Vol. 106. – №. 4. – P. 542-546.
167. Vaananen, H.K. The cell biology of osteoclast function / H.K. Vaananen, H. Zhao, M. Mulari, J. M. Halleen, // *Journal of cell science*. – 2000. – Vol. 113. – №. 3. – P. 377-381.
168. Vanni, S. Observation of “Ionic Lock” formation in molecular dynamics simulations of wild-type  $\beta 1$  and  $\beta 2$  adrenergic receptors / S. Vanni, M. Neri, I. Tavernelli, U. Rothlisberger // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – P. 4789–4797.
169. Varenna, M. The association between osteoporosis and hypertension: the role of a low dairy intake / M. Varenna, M. Manara, L. Galli, L. Binelli, F. Zucchi, L. Sinigaglia // *Calcified tissue international*. – 2013. – Vol. 93. – №. 1. – P. 86-92.
170. Varma, D.R. Inverse agonist activities of  $\beta$ -adrenoceptor antagonists in rat myocardium / D.R. Varma, H. Shen, X.F. Deng, K.G. Peri, S. Chemtob, S. Mulay // *British journal of pharmacology*. – 1999. – Vol. 127. – №. 4. – P. 895-902.
171. Vigholt-Sørensen, E. Comparative effects of beta-adrenoceptor partial agonists on isolated rat atrium / E. Vigholt-Sørensen, L. Påby, S.E. Halliday, H.M. Snow // *Pharmacology & toxicology*. – 1991. – Vol. 69. – №. 5. – P. 351-354.
172. Violette, M.I.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase regulates tight junction formation and function during mouse preimplantation development / M.I. Violette, P. Madan, A.J. Watson // *Developmental biology*. – 2006. – Vol. 289. – №. 2. – P. 406-419.
173. Wang, J.F. Phospholemman and  $\beta$ -adrenergic stimulation in the heart / J.F. Wang, E. Gao, J. Song, X.Q. Zhang, J. Li, W.J. Koch, A.L. Tucker, K.D. Philipson, T.O. Chan, A.M. Feldman, J.Y. Cheung // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2010. – Vol.298 (3). – P.H807-815.
174. Wang, X. Homocysteine induces cardiomyocyte dysfunction and apoptosis through p38 MAPK-mediated increase in oxidant stress / X. Wang, L. Cui, J.

- Joseph, B. Jiang, D. Pimental, D.E. Handy, R. Liao, J. Loscalzo // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2012. – Vol. 52. – №. 3. – P. 753-760.
175. Watanabe, M. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e) inemia / M. Watanabe, J. Osada, Y. Aratani, K. Kluckman, R. Reddick, M.R. Malinow, N. Maeda // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – Vol. 92. – №. 5. – P. 1585-1589.
176. Watson, A.J. The cell biology of blastocyst development / A.J. Watson // *Molecular reproduction and development*. – 1992. – Vol. 33. – №. 4. – P. 492-504.
177. White, S. L. Is low birth weight an antecedent of CKD in later life? A systematic review of observational studies / S.L. White, V. Perkovic, A. Cass, C.L. Chang, N.R. Poulter, T. Spector, L. Haysom, J.C. Craig, I.A. Salmi, S.J. Chadban, R.R. Huxley // *American Journal of Kidney Diseases*. – 2009. – Vol. 54. – №. 2. – P. 248-261.
178. Wiley, L.M. Cavitation in the mouse preimplantation embryo: NaK-ATPase and the origin of nascent blastocoele fluid / L.M. Wiley // *Developmental biology*. – 1984. – Vol. 105. – №. 2. – P. 330-342.
179. Wu, J. Cell signaling associated with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: activation of phosphatidylinositide 3-kinase IA/Akt by ouabain is independent of Src / J. Wu, E.E. Akkuratov, Y. Bai, C.M. Gaskill, A. Askari, L. Liu // *Biochemistry*. – 2013. – Vol. 52. – №. 50. – P. 9059-9067.
180. Wu, Z. Q. Involvement of dopamine system in regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the striatum upon activation of opioid receptors by morphine / Z.Q. Wu, J. Chen, Z.Q. Chi, J.G. Liu // *Molecular pharmacology*. – 2007. – Vol. 71. – №. 2. – P. 519-530.
181. Xiang, Y.K. Compartmentalization of beta-adrenergic signals in cardiomyocytes / Y.K. Xiang // *Circ Res*. – 2011. – Vol. 109 (2). – P. 231-244.
182. Xie, Z. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function / Z. Xie, T. Cai // *Mol Interv*. – 2003. – Vol. 3(3). – P. 157-168

183. Xie, Z. Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes / Z. Xie, P. Kometiani, J. Liu, J. Li, J.I. Shapiro, A. Askari // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – №. 27. – P. 19323-19328.
184. Xie, Z. Ouabain interaction with cardiac Na/K-ATPase reveals that the enzyme can act as a pump and as a signal transducer / Z. Xie // *Cell Mol Biol*. – 2001. – Vol. 47(2). – P.383-390.
185. Xie, Z. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction / Z. Xie // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 986. – №. 1. – P. 497-503.
186. Xie, Z. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer / Z. Xie, A. Askari // *Eur. J. Biochem*. – 2002. – Vol. 269. – P. 2434-2439.
187. Yang, S. Association between hypertension and fragility fracture: a longitudinal study / S. Yang, N.D. Nguyen, J.R. Center, J.A. Eisman, T.V. Nguyen // *Osteoporosis International*. – 2014. – Vol. 25. – №. 1. – P. 97-103.
188. Yin, J. Mechanisms of isoform-specific Na/K pump regulation by short-and long-term adrenergic activation in rat ventricular myocytes / J. Yin, H.C. Guo, D. Yu, H.C. Wang, J.X. Li, Y.L. Wang // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2014. – Vol. 33. – №. 6. – P. 1681-1697.
189. Zakharova, I.O. Effects of oxidative stress inducers, neurotoxins, and ganglioside GM1 on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in PC12 and brain synaptosomes / I.O. Zakharova, T.V. Sokolova, V.V. Furaev, M.P. Rychkova, N.F. Avrova // *Zhurnal evoliutsionnoi biokhimii i fiziologii*. – 2006. – Vol. 43. – №. 2. – P. 148-154.
190. Zaugg, M. Cellular mechanisms in sympatho-modulation of the heart / M. Zaugg, M.C. Schaub // *British Journal of Anaesthesia*. – 2004. – Vol. 93 (1). – P. 34-52.
191. Zaugg, M.  $\beta$ -Adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes / M. Zaugg, W. Xu, E. Lucchinetti, S.A. Shafiq, N.Z. Jamali, M.A.Q. Siddiqui // *Circulation*. – 2000. – Vol. 102. – P. 344–350.

192. Zhang, D. Na, K-ATPase activity regulates AMPA receptor turnover through proteasome-mediated proteolysis / D. Zhang, Q. Hou, M. Wang, A. Lin, L. Jarzylo, A. Navis, A. Raissi, F. Liu, H.Y. Man // *Journal of Neuroscience*. – 2009. – Vol. 29. – №. 14. – P. 4498-4511.
193. Zivkovic, V. Effects of DL-homocysteine thiolactone on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in the isolated rat heart: the role of different gasotransmitters / V. Zivkovic, V. Jakovljevic, O. Pechanova, I. Srejavic, J. Joksimovic, D. Selakovic, N. Barudzic, D.M. Djuric // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – P.1-9.
194. Zulian, A. Activation of c-SRC underlies the differential effects of ouabain and digoxin on Ca<sup>2+</sup> signaling in arterial smooth muscle cells / A. Zulian, C.I. Linde, M.V. Pulina, S.G. Baryshnikov, I. Papparella, J.M. Hamlyn, V.A. Golovina // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2013. – Vol. 304. – №. 4. – P. 324-333.