

ДЕЙСТВИЕ ДИПИРИДАМОЛА НА ИОННЫЕ КАНАЛЫ КЛЕТОК *CHARA CORALLINA*

Б.И. Медведев¹, Е.И. Маевский¹, А.А. Катаев²

*1 Учреждение Российской академии наук Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН.*

2 Учреждение Российской академии наук Институт биофизики клетки РАН.

142290 г. Пущино, Московская область, Институтская 3, e-mail:

akataev@icb.psn.ru

Резюме. Исследован характер воздействия фармпрепарата – дипиридамола (ДПД) на функционирование ионных каналов (Ca^{2+} , K^+ , Cl^-) плазматической мембраны клеток *Chara corallina*. Показано, что ДПД блокирует Ca^{2+} - каналы *L* - типа. В присутствии ДПД замедляются кинетики активации и инактивации кальциевых каналов. Взаимодействие дипиридамола с высокоафинным центром связывания ($K_{1/2} = 12,5 \text{ мкМ}$) Ca^{2+} - каналов приводит к подавлению кальциевого тока. Коэффициент Хилла, характеризующий кооперативность взаимодействия соединений и соответствующих мишеней равен 1, что говорит об отсутствии кооперативности процесса взаимодействия ДПД с Ca^{2+} – каналом. Дипиридамол не оказывал действия на состояние калиевых и хлорных каналов и не влиял на потенциал покоя и сопротивление плазматической мембраны.

Ключевые слова: Дипиридамол, ионные каналы, плазматическая мембрана, харовые водоросли, *Chara corallina*.

ACTION OF DIPYRIDAMOLE ON ION CHANNELS OF THE *CHARA* *CORALLINA* CELL

B.I. Medvedev¹, E.I. Maevsky¹, A.A. Kataev²

*1 Institution of the Russian Academy of Sciences Institute of Theoretical and Experimental
Biophysics RAS,*

*2 Institution of the Russian Academy of Sciences Institute of Mathematical Problems of Biology
RAS,*

142290, Pushchino, Moscow Region, Institutskaya 3, e-mail: akataev@icb.psn.ru

Abstract. The nature of the effects was investigated of dipyridamole (DPD) drug on the functioning of ion channels (Ca^{2+} , K^{+} , Cl^{-}) of the plasma membrane of *Chara corallina* cells. It was shown that DPD blocks L - type Ca - channels. Presence of DPD slowed the kinetics of activation and inactivation of the calcium channels. Interaction of dipyridamole with high affinity binding sites for Ca^{2+} - channels ($K_{1/2} = 12.5 \mu\text{M}$) leads to suppression of calcium current. Hill coefficient characterizing the cooperative interaction of the compounds and their respective targets is 1, which indicates no cooperation in the interaction of DPD with the Ca^{2+} - channel. Dipyridamole had no effect on the state of the potassium and chloride channel, nor did it affect the rest potential or resistance of the plasma membrane.

Keywords: Dipyridamole, ion channels, plasma membrane, characeae algae, *Chara corallina*.

Введение. Многие процессы, связанные с действием дипиридамола (ДПД) на клеточном уровне связаны с его способностью оказывать влияние на состояние ионного транспорта клеточной мембраны [1, 4]. Дипиридамол обладает сосудорасширяющим действием, понижает сопротивление резистивных коронарных сосудов (главным образом артериол), увеличивает объемную скорость коронарного кровотока. Добавление дипиридамола к традиционной антиангинальной терапии способствует улучшению клинической картины заболевания и уменьшению функционального класса стенокардии у больных ишемической болезни сердца [2]. Механизм действия ДПД окончательно не выяснен. Полагают, что дипиридамол увеличивает содержание аденозина (нарушая его обратный захват), а также способствует повышению концентрации цАМФ вследствие ингибирования фермента фосфодиэстеразы [3]. Во многих работах для объяснения эффекта действия дипиридамола предполагают наличие его влияния на катионные и в частности на кальциевые каналы *L* типа [4].

Установлено, что изменение системы регулирования концентрации ионов свободного $[Ca^{2+}]$ в клетке влияет на функции тканей легких, сокращение гладких мышц, секрецию цитокинов и активности ионных каналов плазматической мембраны. С другой стороны нарушение функционирования этих каналов может привести к патогенезу легочной функции такой как, например, отек легких. Было показано, что Ca^{2+} каналы *L*-типа присутствуют в пищеводе и в клетках сократительной системы мышц, по своим свойствам они идентичны, но плотность этих каналов относительно небольшая. [3,5,6]. Увеличение концентрации свободного кальция в цитоплазме за счет входа ионов кальция (Ca^{2+}) из внеклеточного пространства в цитоплазму через потенциал -зависимые Ca^{2+} -каналы, в частности, через кальциевые каналы *L*-типа, способны контролировать различные биологические процессы, такие как возбуждение и сокращение в клетках сосудистой и мышечной тканей [7 – 9]. Концентрация свободных ионов Ca^{2+} в цитоплазме клетки является решающим фактором, определяющим гомеостаз клетки. Они являются универсальным мессенджером в системе внутриклеточной сигнализации и эффективным регулятором метаболических процессов, тонко реагирующим на изменение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме [10]. Несмотря на широкое применение ДПД в медицинской практике, данных о действии дипиридамола на ионные каналы и клеточную мембрану недостаточно. Необходимо детально исследовать результат взаимодействия ДПД на систему ионного транспорта клетки – кальциевые, калиевые и хлорные каналы, а так же

влияние дипиридамола на электрические свойства плазматической мембраны - ее сопротивление (R_m) и потенциал покоя (V_m).

Для этих целей мы использовали удобный для электрофизиологических исследований объект - гигантские клетки пресноводной харовой водоросли *Chara corallina*. Исследования с помощью интернодальных клеток результатов взаимодействия исследуемых препаратов с биологической мембраной и ионными каналами значительно облегчает понимание характера действия вещества на клетку [11, 12].

Работа посвящена исследованию взаимодействия дипиридамола с ионными каналами возбудимой мембраны плазмалеммы клеток *Chara corallina*, в частности, с Ca^{2+} -каналами. Наличие в плазмалемме харовых водорослей K^+ , Ca^{2+} , Cl^- - каналов, практически не отличающихся по своим функциональным характеристикам от ионных каналов животных клеток дают возможность исследовать взаимодействие различных биологически активных соединений с ионными каналами на этой простой (по сравнению с животными клетками) модели [13, 14]. Результаты анализа недавно расшифрованных геномов ряда растений показали, что большинство ионных каналов, кодируемых в этих геномах, гомологичны известным каналам животных клеток [15]. В работе [16] было показано, что ионные каналы клеток растений и клеток животных по своим основным свойствам и характеристикам во многом аналогичны. Таким образом, свойства ионных каналов растений не уникальны и в перспективе клетки растений могут быть использованы в качестве тест объекта для изучения как мембранотропных эффектов различных веществ и отбора биологически активных потенциальных лекарственных препаратов, так и для скрининга уже используемых.

Состояние клеток и как следствие функционирование органов зависят от ионтранспортных систем, в частности от поведения кальциевых каналов [10, 17]. Поэтому исследованиям регуляции состояния кальциевых каналов в настоящее время уделяется большое внимание. Дипиридамола является ингибитором поглощения аденозина, а также фосфодиэстеразы cGMP, обычно используется в профилактической терапии для пациентов со стенокардией. В работе [1] было установлено влияние дипиридамола на АТФ индуцированное сокращение артериол и этот процесс был рассмотрен в зависимости от внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и было показано, что дипиридамола может выступать не только в качестве ингибитора поглощения аденозина и как ингибитор фосфодиэстеразы цГМФ, но и как блокатор кальциевых каналов в клетках гладкой мускулатуры артериол. Степень блокирования кальциевых каналов определяли по

состоянию внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Но практически нет работ, в которых напрямую на ионных каналах исследовали действие ДПД.

Материалы и методы

Клетки харовой водоросли *Chara corallina* выращивали при температуре 18 – 20° С в искусственной прудовой воде (ИПВ), содержащей (в мМ): 0.1 KCl, 1.0 NaCl, 0.1 CaCl_2

Эксперименты проводили на интернодальных интактных клетках *Chara corallina*. Измерение и регистрацию переходного тока при изменении потенциала на мембране проводили в режиме фиксации напряжения на рабочем участке клетки длиной 2мм по классической четырехэлектродной методике. Процедура измерения токов и процесса внутриклеточной перфузии подробно описана в работах [11-14, 18, 19]. С помощью потенциальных электродов измеряли разность напряжений на мембране V_m , и подачей прямоугольных импульсов тока величиной 0,01мкА через токовые электроды, тестировали электрическое сопротивление плазматической мембраны. В норме удельное сопротивление мембраны $R_m \sim 25 \pm 5 \text{ кОм} \cdot \text{см}^2$. Для фиксации напряжения на мембране использовали специализированный операционный усилитель Dagan 8500 (USA). В качестве управляющего и регистрирующего устройства – компьютер с платой ЦАП/АЦП Data Translation DT2801A и Lcard 1250. Для мониторинга эксперимента использовали специализированный пакет программ Bio - Quest и Pclamp 6. Обработку полученных результатов вели с помощью специализированной программы WinWCP 4.4.7 разработанной в University of Strathclyde, SigmaPlot11 и Origin8. Растворы Tris, HEPES, EGTA и сахарозы (фирма Sigma Chemical. Co), NaCl, KCl, KOH (фирма Fluka.) готовили на деионизованной воде. Использовали стандартный фармакологический препарат дипиридамола фирмы Berlin-Chemie AG (Германия), не содержащий каких-либо связующих веществ.

Результаты и обсуждение

Действие дипиридамола на кальциевые каналы. В ответ на деполяризацию плазмалеммы активируются потенциал зависимые кальциевые каналы L -типа. В ответ на входящий Ca – ток и увеличение концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме с уровня $\sim 10^{-7} - 10^{-8} \text{ М}$ до уровня $\sim 10^{-5} \text{ М}$ происходит активация хлорных каналов и регистрируется вторая хлорная компонента тока [14,18]. В результате регистрируется суммарный ток, где в условиях внешней концентрации ионов Ca^{2+} не превышающей 1 мМ кальциевая компонента тока маскируется превалирующим хлорным током [18]. Для изучения

действия дипиридамола на кальциевые каналы необходимо было разделить во времени кальциевую и хлорную компоненты тока. Для этого увеличили концентрацию ионов Ca^{2+} в наружном растворе до 20 мМ. На рис. 1 показано типичное развитие тока (кривая 1) при повышенной концентрации ионов Ca^{2+} в наружном растворе.

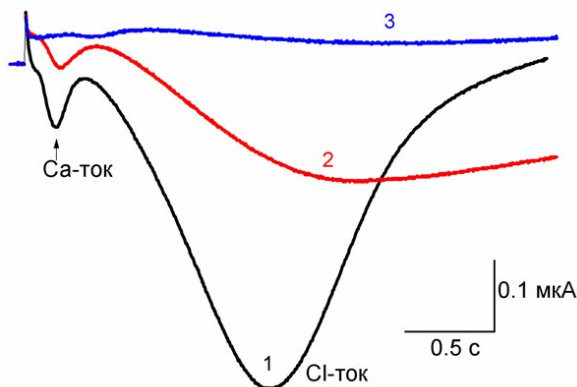


Рис. 1. Изменение амплитуды и кинетики развития переходного тока (Ca - и Cl - компоненты) в присутствии дипиридамола. Токи получены в ответ на деполяризацию мембраны с уровня $V_m = -160\text{ мВ}$ до уровня $V_c = -15\text{ мВ}$. Показаны кальциевая и хлорная компонента тока. 1 – контроль, 2 – 5 мкМ ДПД, 3 – 60 мкМ ДПД. Состав наружного раствора (в мМ:): 0.1 KCl, 1.0 NaCl, 20 CaCl_2 , 0.5 HEPES/Tris, pH 7.3.

После введения ДПД в концентрации 5 мкМ наблюдается подавление Ca – тока и уменьшение амплитуды Ca^{2+} - зависимой хлорной компоненты тока (рис. 1 кривая 2). При концентрации дипиридамола 60 мкМ блокирование кальциевой компоненты тока происходит практически полностью. При этом наблюдается уменьшение амплитуды второй компоненты - Ca^{2+} - зависимого хлорного тока до нулевой амплитуды (рис. 1 кривая 3).

Проведена серия экспериментов для выяснения зависимости развития эффекта действия ДПД на кальциевые каналы от концентрации препарата. На рис. 2 А показан результат действия дипиридамола в концентрации 2,5 и 35 мкМ на кальциевую компоненту переходного тока.

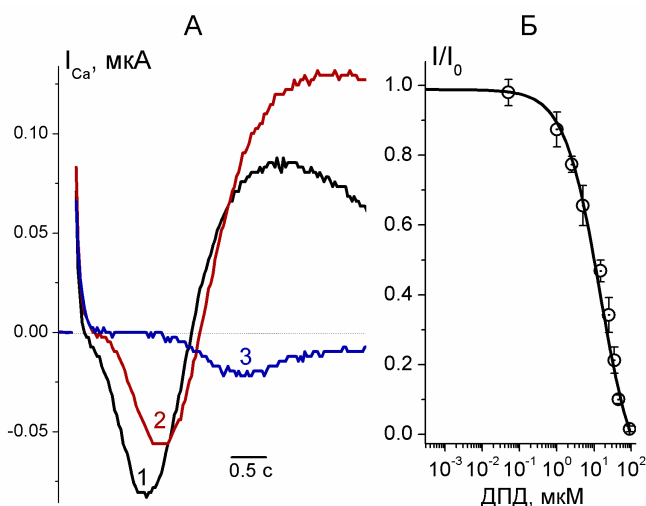


Рис. 2. А - Действие ДПД на кальциевую компоненту переходного тока. Демонстрация изменения характера развития кальциевого тока от концентрации ДПД. 1 – контроль, 2 – 2,5 мкМ ДПД, 3 – 35 мкМ – ДПД. Б - зависимость амплитуды кальциевого тока от концентрации ДПД.

Видно, что с увеличением концентрации ДПД наряду с уменьшением амплитуды Ca^{2+} -тока, идет смещение пикового значения тока в сторону увеличения времени достижения пикового значения амплитуды тока.

При этом происходит замедление кинетики активации и инактивации кальциевого тока. На рис. 2 Б. приведен график зависимости нормированной амплитуды тока (I/I_0) от концентрации ДПД. Аппроксимацию вели уравнением Хилла. Величина половинного блокирования кальциевого тока $K_{1/2} = 12,5 \pm 0,5$ мкМ. Коэффициент Хилла, характеризующий кооперативность взаимодействия соединений и соответствующих мишеней $n \approx 0,98 \pm 0.15$.

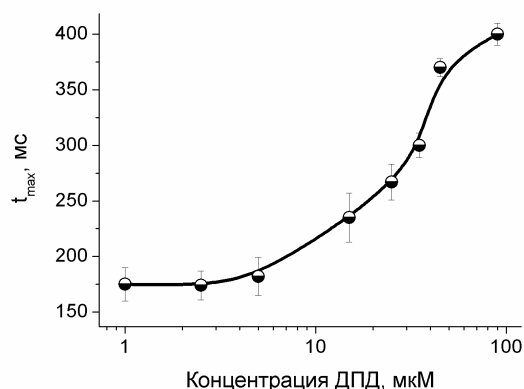


Рис. 3. Зависимость времени пикового значения кальциевого тока (t_{max}) от концентрации препарата ДПД.

Кооперативность взаимодействия ДПД с кальциевым каналом отсутствует. Наряду с уменьшением амплитуды тока, с увеличением концентрации ДПД происходит замедление достижения пикового значения кальциевого тока во времени.

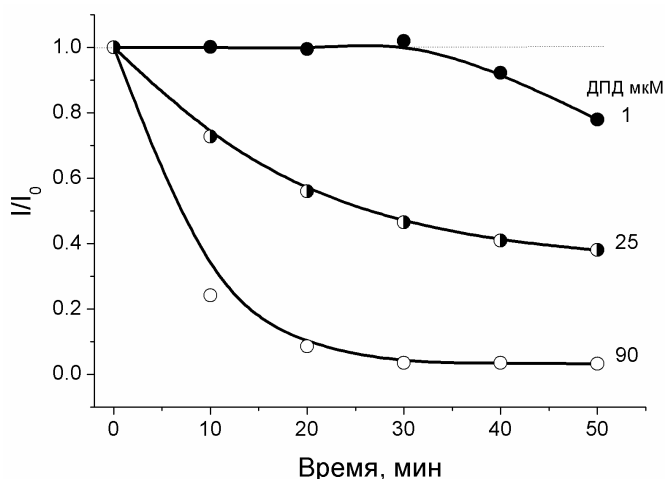


Рис. 4. Действие ДПД (out) на кальцевый канал плазмалеммы клеток *Chara corallina*. Приведены нормированные кривые зависимости кинетики развития эффекта подавления кальцевой компоненты тока от концентрации препарата ДПД (указаны на рисунке).

На рис. 3 представлен график зависимости пикового значения кальцевого тока от концентрации ДПД. При концентрации ДПД 25 мкМ замедление кинетики развития кальцевого тока замедляется вдвое. Скорость процесса нарастания степени блокирования кальцевого тока зависела от концентрации дипиридамола. На рис. 4 приведен график зависимости кинетики процесса подавления кальцевого тока в зависимости от концентрации ДПД.

Видно, что с увеличением концентрации ДПД увеличивается скорость блокирования кальцевого тока. При 25 мкМ ДПД 50% эффект подавления тока достигался через 30 минут после введения препарата на клетку, а при 90 мкМ через 6 минут.

Хлорные каналы. На рис. 1 видно, что наряду с подавлением ДПД кальцевого тока, идет уменьшение амплитуды Ca^{2+} зависимой хлорной компоненты переходного тока. Это может быть следствием уменьшения кальцевой проводимости мембраны. Для исключения влияния кальцевых каналов на характер развития хлорного тока, необходимо провести прямую активацию Cl^- — каналов, введя ионы Ca^{2+} в клетку инъекцией в цитоплазму, в обход кальцевых каналов. Тогда можно сравнить поведение хлорных каналов в контроле и в присутствии дипиридамола, и проверить предположение о наличии влияния ДПД на хлорные каналы. Для решения этой задачи были проведены эксперименты на перфузируемых изнутри клетках с удаленным тонопластом [19]. В этом режиме, активация хлорных каналов ведется путем прямого введения ионов Ca^{2+} в клетку и не зависит от состояния кальцевых каналов [13, 19]. На рис. 5А показан контрольный хлорный ток, развивающийся в ответ на введение внутрь клетки ионов Ca^{2+} в концентрации 0,2 мМ.

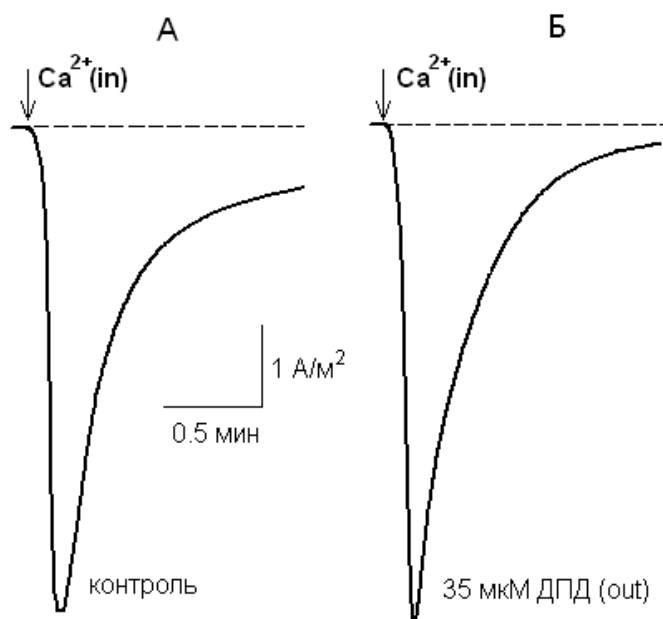


Рис. 5. Действие ДПД снаружи клеточной мембраны не оказывает влияния на Ca^{2+} - активируемые хлорные каналы. А – контроль. Б – в присутствии 35 мкМ ДПД снаружи.

На рис. 5 Б показана активация хлорных каналов, где присутствовал препарат ДПД в растворе снаружи клетки в концентрации 35 мкМ. Видно, что амплитуда и кинетика развития хлорного тока осталась без изменения, переходные токи в контроле и в присутствии препарата ДПД практически не отличаются.

Развитие Cl^- тока полученного после введения ионов Ca^{2+} внутрь клетки в контроле и аналогичная процедура активации хлорных каналов в присутствии препарата ДПД снаружи приводит к активации хлорных каналов плазмалеммы такого же характера, как и в отсутствии ДПД. Амплитуда тока и кинетика развития переходного тока в контроле и в присутствии препарата ДПД снаружи клетки остаются без изменения.

Калиевые каналы. Проведена серия экспериментов по определению влияния ДПД на калиевые каналы нативной клетки. Для того, чтобы исключить вклад кальциевых и хлорных каналов, снимались мгновенные вольтамперные характеристики тока (МВАХ), длительностью 30мс (время, за которое не успевают активироваться другие типы каналов). На рис.6 показаны вольтамперные характеристики до и после введения препарата ДПД снаружи клетки при концентрациях 1 – 45 мкМ. ДПД не оказывает влияния на калиевые каналы, поскольку все МВАХ до и после аппликации ДПД снаружи клетки остаются без изменения (рис. 6).

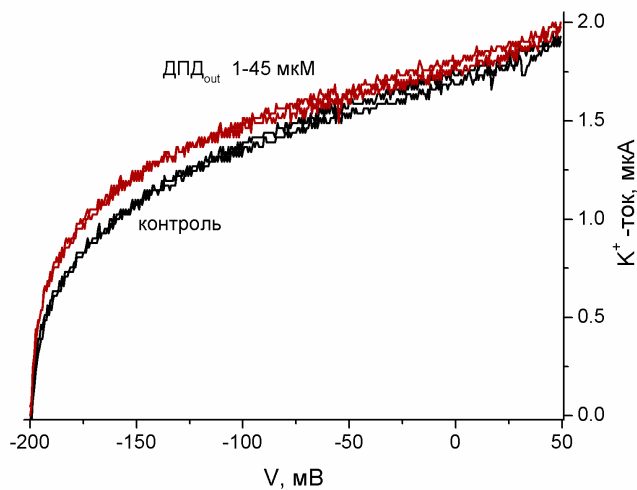


Рис. 6. Мгновенные вольтамперные характеристики (МВАХ) полученные с помощью подачи пилообразного напряжения с уровня от -160 мВ до 30 мВ в течении 30 мс. Показаны МВАХ до и после введения дипиридамола.

Действие дипиридамола (ДПД) на электрические характеристики плазматической мембраны.

Исследовалось влияние препарата ДПД на сопротивление мембраны и на уровень потенциала покоя (V_m) мембраны (рис. 7). ДПД не изменяет величину потенциала покоя мембраны и не влияет на электрическое сопротивление мембраны. В экспериментах с фиксированным напряжением на мембране, обнаружено, что ДПД не вызывает тока неспецифической утечки, т.е. не приводит к деструкции плазматической мембраны, не разрушает целостность липидного матрикса.

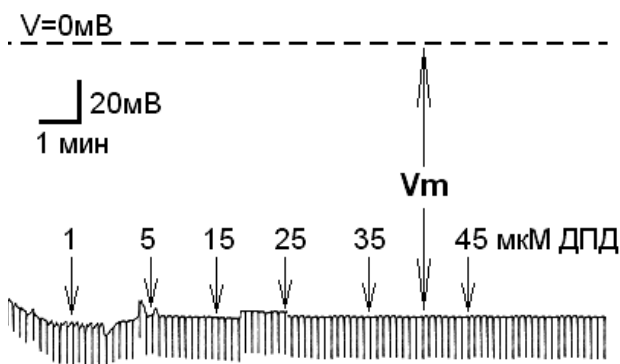


Рис. 7. Регистрация изменения потенциала покоя плазмалеммы (V_m) и сопротивления мембраны (R_m) после введения препарата ДПД в разных концентрациях (указаны на рисунке). Удельное сопротивление мембраны не меняется в присутствии ДПД. $R_m = 22 \text{ кОм} \cdot \text{см}^2$

Выводы

В присутствии препарата ДПД (при действии с наружной стороны плазматической мембраны) уменьшается амплитуда развития кальциевого тока и замедляется кинетика активации и инактивации развития Ca^{2+} - тока. Величина половинного ингибирования кальциевого тока $K_{1/2} = 12.5 \pm 0.5 \text{ мкМ}$. В исследованных концентрациях препарат эффективно действует как на входящий, так и на выходящий ток кальциевых каналов. Кооперативность взаимодействия ДПД с кальциевым каналом отсутствует ($n = 1$)

Ca^{2+} - зависимый хлорный ток, вызванный прямым введением ионов Ca^{2+} внутрь клетки, остается без изменения в присутствии препарата ДПД с наружной стороны мембраны. Препарат ДПД введенный снаружи клетки не оказывает влияния на Ca^{2+} - активируемые хлорные каналы. Препарат ДПД не влияет на K^{+} - каналы.

В исследованных концентрациях препарат ДПД не проникает через плазматическую мембрану, не вызывает ее деструкцию, не вызывает тока неспецифической утечки, не влияет на потенциал покоя и электрическое сопротивление – таким образом можно заключить, что препарат не обладает мембранотропным эффектом.

Список литературы

1. Saino T, Misaki T, Matsuura M, Shikanai T, Satoh Y. (2008) Dipyridamole inhibits intracellular calcium transients in isolated rat arteriole smooth muscle cells. Arch Histol Cytol 71:235-247.
2. Бузиашвили Ю.И., Мацкеплишвили С.Т., Асымбекова Э.У., Хапий И.Х., Бурдули Т.В., Щербакова О.С., Бувальцев В.И. (2003) Новые перспективы применения дипиридамола в лечении ишемической болезни сердца. **Российский кардиологический журнал. №4**.
3. Ashrani A, Keshavarzian A, Jacyno M, Winship D, Fields JZ. (1997) Are dipyridamole (sensitive) calcium channels present in esophageal smooth muscle? Life Sci 60:L423-L430.
4. Joiner CH, Jiang M, Claussen WJ, Roszell NJ, Yasin Z, Franco RS. (2001) Dipyridamole inhibits sickling-induced cation fluxes in sickle red blood cells. Blood. v. 97:3976-3983.

5. Rocher A, Gonzalez C, Almaraz L. (1999) Adenosine inhibits L-type Ca^{2+} current and catecholamine release in the rabbit carotid body chemoreceptor cells. Eur.J.Neurosci. 11:673-681.
6. Ford JM, Hait WN. (1993); Pharmacologic circumvention of multidrug resistance. Cytotechnology. v.12:171-212.
7. Zhang M.I.N., O'Neil R.G. An L-type Calcium Channel in Renal Epithelial Cells. (1996) J. Membrane Biol. 154, 259–266
8. Reuter H. A variety of calcium channels. (1985) Nature. vol.316. p.391.
9. Nilius B. , Hess P. , Lansman J.B. , Tsien R.W. (1985) A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. Nature. vol. 316. p.443-446.
10. Porzig H., Pharmacological modulation, of voltage-dependent calcium channels in intact cells (1990) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.. Vol.114. P. 209-262. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 1990
11. Zherelova OM, Kataev AA, Grishchenko VM, Knyazeva EL, Permyakov SE, Permyakov EA. (2009) Interaction of antitumor alpha-lactalbumin-oleic acid complexes with artificial and natural membranes. J.Bioenerg.Biomembr.; 41:229-237.
12. Drinyaev VA, Mosin VA, Kruglyak EB et al. (2001) Effect of avermectins on Ca^{2+} -dependent Cl^- currents in plasmalemma of *Chara corallina* cells. J.Membr.Biol.; 182:71-79.
13. Берестовский Г.Н., Жерелова О.М., Катаев А.А. (1987). Ионные каналы клеток харовых водорослей. Биофизика 32: с. 1011-1027.
14. Lunevsky,VZ., Berestovskii GN, Zherelova OM. & Vostrikov IY. (1983). Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. J. Membrane Biol., 72, 43-58.
15. Ward,J.M., Maser,P. & Schroeder,J.I. (2009). Plant Ion Channels: Gene Families, Physiology, and Functional Genomics Analysis. Annu. Rev. Physiol. Volume 71, Page 59-82.
16. Hedrich B., Jeromin A. (1992) A new scheme of symbiosis: ligand- and voltage-gated anion channels in plant and animals. The Royal Society philosophical transactions: Biological sciences. Series B. Calcium channels in plants.. V. 338. P. 31-38.

17. M. Hetherington, A. Graziana, C. Mazars, P. Thuleau and R. Ranjeva The Biochemistry and Pharmacology of Plasma-Membrane Calcium Channels in Plants Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 1992 338, 91-96
18. Andjus PR, Kataev AA, Alexandrov AA, Vucelic D, Berestovsky GN. D₂O-induced ion channel activation in Characeae at low ionic strength. J.Membr.Biol. 1994; 142:43-53.
19. Kataev AA, Zherelova OM, Berestovsky GN. Ca²⁺-induced activation and irreversible inactivation of chloride channels in the perfused plasmalemma of *Nitellopsis obtusa*. Gen.Physiol Biophys. 1984; 3:447-462.