

А. И. Соловьев

Ионные каналы как фармакологические мишени. Время смены парадигм классической фармакотерапии

ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», г. Киев

*То, что мы называем началом,
часто оказывается концом, и когда
что-то заканчивается, что-то
одновременно начинается.
Конец там, где начало.*
Т. Эллиот

Давно известно, что любой живой организм представляет собой сообщество различных клеток. Тело человека, например, состоит из приблизительно 100 трлн собственных клеток плюс неисчислимое множество (квадриллионы?!) бактерий, населяющих пищеварительный тракт. Клетки, являясь структурной и функциональной составляющей тканей и органов, контактируют с тканевой жидкостью, лимфой и плазмой крови и, очевидно, поэтому каждая клетка окружена (защищена) плазматической мембраной – оболочкой толщиной 7–10 нм, которая образована двойным молекулярным слоем, состоящим в основном из фосфолипидов.

В плазматическую мембрану встроено множество белковых структур. В клеточной мембране находятся рецепторы, воспринимающие внешние химические сигналы и обеспечивающие «общение» клетки с клетками-соседями, как близкими, так и далекими. Мембрану пронизывают также активные и пассивные транспортные комплексы, с помощью которых клетка обменивается веществом со своим окружением. В частности, среди них имеются так называемые ионные каналы, поры, образуемые трансмембранными белками, через которые ионы пассивно диффундируют в направлении меньшей концентрации. Обычно эти поры пропускают лишь определенные ионы, такие как калий, натрий или кальций.



Профессор А. И. Соловьев

Некоторые из ионных каналов сопряжены с собственными рецепторами.

Таким образом, в живых системах постоянно происходит сопряженный перенос вещества и информации через клеточные мембраны:

- например, растворимая в липидах (липофильная) сигнальная молекула (монооксид азота, NO) проходит через клеточную мембрану и активирует внутриклеточный «рецептор» (растворимую гуанилатциклазу), что приводит, в частности, к расслаблению сосудов и увеличению кровотока;

- сигнальная молекула (инсулин) связывается с трансмембранным рецептором и запускает цепь хорошо известных метаболических превращений;

- или, другая сигнальная молекула (ацетилхолин, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) или глутамат) взаимодействует с соответствующим рецептором, связанным с ионным каналом. Ацетилхолин, связываясь с M- или N-холинорецепторами, приводит к освобождению NO из эндотелиальных клеток (ЭК) и расслаблению подлежа-

щих гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов или же к сокращению гладких мышц, в том случае, когда медиатор действует прямо на ГМК (в случае повреждения эндотелиальной выстилки), снижению частоты сердечных сокращений, повышению секреции ряда желез и т. п.; ГАМК – является основным тормозным медиатором в нервной системе позвоночных; глутамат – обеспечивает процессы регуляции синаптической пластичности, то есть играет важную роль в обучении и запоминании/хранении информации;

- передача сигнала может также происходить через рецепторы, активирующие тот или иной внутриклеточный посредник (ангиотензин, cAMP, cGMP, IP₃, DAG:

1 этап – распознавание сигнальной молекулы рецептором;

2 этап – активизация вторичного посредника;

3 этап – модуляция активности ионного канала и/или;

4 этап – модуляция активности соответствующего фермента.

Основная проблема современной фармакотерапии заключается, прежде всего, в ее низкой эффективности, в лучшем случае (то есть при соблюдении принципов доказательной медицины) < 60 %. Несмотря на наличие огромного арсенала лекарственных препаратов, заболеваемость и смертность от основных заболеваний сердечно-сосудистой системы, например, артериальной гипертонии, постоянно растут. Пациент вынужден принимать лекарственные препараты при гипертонии или диабете пожизненно, так как при их отмене болезнь, со всей ее симптоматикой, неизбежно возвращается. По сути дела, большинство лекарственных препаратов в настоящее время играют роль своеобразных «фармакологических костылей». Забрали «костыли» и человек падает.

Главными, но не единственными причинами этого печального явления являются – генетический полиморфизм пациентов и отсутствие достоверной информации о надлежащем образом идентифицированных фармакологических мишенях, то есть клеточных и

субклеточных структурах, являющихся триггерами патологического процесса. Иными словами, вопреки телевизионной рекламе, лекарство далеко не всегда точно попадает в цель,

Итак, в практике здравоохранения практически отсутствуют препараты направленного/таргетного действия. Что делать? Проблему генетического полиморфизма в настоящее время можно было бы решить довольно просто (современная наука позволяет сделать это), но это потребует от государства огромных дополнительных капиталовложений в медицину. Пока это не реально.

Поэтому сосредоточим свое внимание на фармакологических мишенях. Появление таргетных препаратов станет возможным только после детального изучения механизмов взаимодействия потенциального лекарственного препарата с его потенциальной фармакологической мишенью. Но для этого мишень еще необходимо идентифицировать в процессе детального изучения патогенеза заболевания на клеточном и молекулярном уровне. Только таким образом нам удастся в будущем реализовать мечту Пауля Эрлиха о «магической пуле» и перейти к низкодозовой таргетной фармакотерапии. А пока еще мы «стреляем» в мишень, а уже потом рисуем круг, принимая место попадания за центр.

Потенциальные (далеко не все!) фармакологические мишени клетки:

- рецепторы (и связанные с ними ионные каналы);
- ионные каналы и помпы/насосы клеточных мембран;
- митохондрии (в том числе митохондриальные поры и ионные каналы митохондрий);
- сократительный аппарат мышечных клеток;
- саркоплазматический ретикулум, например, лиганд (ip₃) – управляемые кальциевые каналы ретикулума;
- ферментативные системы клетки;
- гены (например, генная терапия при артериальной гипертонии – внедрение копий генов, ответственных за вазодилатацию, или использование так называемых антисмысловых РНК для

подавления трансляции или транскрипции генов, ответственных за продукцию вазоконстрикторов).

Большая проблема заключается еще и в том, что «фармакологическая мишень» так же неисчерпаема, как «атом». Как только исследователь установит, что мишенью является, например АТФ-зависимый калиевый канал, как встанет вопрос о том, какая именно его субъединица является мишенью и т. д., и т. п.

Почему это важно и для чего необходимо точно идентифицировать молекулу-мишень? Это нужно, прежде всего, для создания «ИДЕАЛЬНОГО» лекарственного препарата («магическая пуля» Paul Ehrlich). Только в таком случае обеспечивается гарантия доставки «письма адресату» и снижение числа и выраженности побочных эффектов. Повторюсь еще раз, только таким образом, изучив взаимодействие лекарственного препарата с идентифицированной надлежащим образом молекулой-мишенью, мы сможем перейти к низкодозовой таргетной терапии.

Теперь вернемся собственно к ионным каналам. Оказывается, каналы тоже болеют.

Каналопатии – болезни, вызванные нарушением функции субъединиц ионного канала или белков, регулирующих их деятельность. Они могут быть врожденными (вследствие мутации генов, кодирующих канал) или приобретенными, как, например, в результате аутоиммунной атаки на канал или воздействия токсиканта.

Для Украины по-прежнему остается актуальной проблема воздействия на организм ионизирующей радиации. И не только, и даже не столько из-за Чернобыля, как по причине широкого распространения онкологических заболеваний. Тысячи людей в ходе лечения подвергаются воздействию радиоизотопной и лучевой терапии и погибают еще до того, как эта терапия подействует, от развивающихся осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы, которые сильно осложняют течение основного заболевания.

Сейчас мы уже твердо знаем, что одной из основных мишеней для дей-

ствия ионизирующего излучения являются сосуды и, прежде всего, их внутренняя выстилка, эндотелий. В результате воздействия ионизирующего излучения среди ликвидаторов Чернобыльской катастрофы широкое распространение получили заболевания сердечно-сосудистой системы, в частности, нарушения коронарного кровообращения и артериальная гипертензия. Ко всем бедам добавилось снижение чувствительности их сосудов к стандартным вазодилатирующим препаратам, например, нитроглицерину. Все это, вместо взятого, заставило нас взяться за изучение клеточных механизмов действия радиации на эффекторные элементы сосудистой стенки, исследовать пусковые факторы артериальной гипертензии и сосудистых дисфункций, индуцированных под воздействием ионизирующей радиации.

Было установлено, что калиевые каналы плазматической мембраны (ГМК) и эндотелиальных клеток (ЭК) сосудов, одним из основных подтипов которых являются так называемые Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы большой проводимости ($ВК_{Ca}$), играют определяющую роль в регуляции мембранного потенциала и, следовательно, уровня изометрического напряжения ГМК в условиях действия ионизирующей радиации, то есть именно они и являются основной мишенью ее действия в сосудистой стенке. Как впрочем, и в ЭК, где $ВК_{Ca}$ опосредовано через изменение уровня поляризации мембраны способствуют входу кальция, активации NO-синтазы и выделению NO.

Облучение крыс в нефатальных дозах до 6 Gy приводит к подавлению токов через $ВК_{Ca}$ в ГМК и ЭК (методика *patch-clamp*), снижению амплитуды эндотелий-зависимого расслабления (ацетилхолиновый тест) и увеличению реакции сосудов в ответ на действие агонистов α -адренорецепторов. Подавление функции $ВК_{Ca}$ коррелирует со снижением уровня экспрессии α - и β_1 -субъединиц канала (RT-PCR анализ). Результаты синхронной регистрации силы сокращения ГМК и $[Ca^{2+}]_i$ (флуоресцентный метод) свидетельствуют об увеличении коэффициента кальциевой чувстви-

тельности миофибрилл. Все эти факторы вместе взятые приводят к значительному приросту артериального давления (АД). Отмеченное нами компенсаторное увеличение активности и экспрессии других типов калиевых каналов, K_v , K_{ATP} , является, очевидно, резервным механизмом поддержания вазодилаторного потенциала в условиях оксидативного генотоксического стресса, вызванного облучением.

siRNA-индуцированный сайленсинг генов

Открытие явления РНК-интерференции ознаменовало появление новых перспектив для таргетной терапии и дало надежду на создание принципиально новых подходов к лечению ангиопатий различного генеза и артериальной гипертензии. Появился эффективный механизм для избирательного торможения экспрессии заданного гена на стадиях его трансляции или транскрипции.

Данная технология представляет собой один из высокоспецифичных современных методов целевой генотерапии, суть которого состоит в угнетении экспрессии определенного гена на стадии трансляции или в нарушении его транскрипции (пост-транскрипционный сайленсинг). Реализация этого процесса осуществляется с помощью коротких (21–23 нуклеотида) 2-х цепочечных интерферирующих РНК (siRNA), которые имея комплементарную последовательность к молекуле-мишени мРНК, активируют соответствующие внутриклеточные системы (DICER, RISC), с помощью которых и обеспечивается селективная деградация мишени.

Введение siRNAs, таргетных к *KCNMA1 (slo1)*, то есть гену кодирующему экспрессию VK_{Ca} , приводит к снижению экспрессии и функции канала и развитию сосудистой дисфункции, сходной по своим проявлениям с радиационным поражением сосудов, что подтверждает возможность использования феномена РНК-интерференции для коррекции сосудистых нарушений, вызванных воздействием радиации.

Как уже упоминалось выше, наши исследования показали, что γ -облучение

подавляет функцию VK_{Ca} каналов, которые контролируют вход Ca^{2+} в эндотелиальные клетки и, тем самым, снижают синтез выделение NO и амплитуду эндотелий-зависимого расслабления. Подавление VK_{Ca} каналов в гладкомышечных клетках приводит к развитию деполяризации мембраны и способствует увеличению входа через L-тип кальциевых каналов. В итоге вазодилаторный потенциал сосудистой стенки снижается, а ее способность к гиперконстрикции, напротив, возрастает.

Важно отметить факт увеличения экспрессии дельта-изоформы протеинкиназы C (С-киназы) в ГМК при облучении и при развитии синдрома артериальной гипертензии у крыс с генетически детерминированной гипертензией. Использование блокаторов С-киназы *in vitro* в значительной степени нормализуют функцию облученных сосудов. Учитывая связь изменений активности С-киназ с образованием реактивных форм кислорода, мы использовали также антиоксидант кверцетин, заключенный в липосомы. Показано, что липосомальный кверцетин (кверцетин, кстати, наряду с антиоксидантными свойствами обладает также и способностью тормозить активность С-киназ!), применяемый в условиях *in vitro* и *in vivo*, эффективно восстанавливает активность VK_{Ca} каналов в облученных ГМК.

В настоящее время стала известна структура генов и мРНК, которые ответственны за развитие той или иной патологии. Так, нами была установлена определяющая роль активации С-киназ при развитии артериальной гипертензии. Следовательно, заблокировав мРНК этих известных молекул-мишеней с помощью siRNA, можно повлиять на развитие заболевания.

Нами была предпринята первая попытка использовать феномен РНК-интерференции для снижения артериального давления у крыс с генетически детерминированной и индуцированной воздействием радиации гипертензией. Введение siRNA для специфического сайленсинга генов, кодирующих экспрессию С-киназ, в хвостовую вену

крыс с генетически детерминированной гипертензией способствовало восстановлению эндотелий-зависимого расслабления сосудов, увеличению амплитуды тока через Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы большой проводимости и длительному (до 10 дней) снижению артериального давления.

Другое направление исследований в области разработки таргетных препаратов связано с так называемыми Ca^{2+} -десенситайзерами, то есть соединениями, обладающими способностью прямо воздействовать на сократительный аппарат ГМК и расслаблять сосуды в отсутствие соответствующего снижения $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Установлено, что таким свойством обладают блокаторы Rho и C – киназ. Такого рода соединения оказались эффективными в эксперименте при лечении диабетических сосудистых ангиопатий, при сосудистых расстройствах, связанных с воздействием радиации и при гипертензиях различного генеза.

Взрослые мезенхимальные стволовые клетки (ВМСК) человека

Использование стволовых клеток человека для лечения сосудистой патологии у крыс является, по сути, первой в Украине, попыткой проведения их доклинических испытаний. Эти исследования важны и с фундаментальной точки зрения, так они помогают понять механизмы действия ВМСК при лечении других заболеваний. ВМСК человека были тестированы на крысах с артериальной гипертензией, индуцированной воздействием ионизирующего облу-

чения, и на крысах с генетически детерминированной гипертензией и экспериментальным диабетом. Однократное введение крысам ВМСК после облучения в количестве $16\text{--}20 \cdot 10^6$ клеток приводило к нормализации нарушенного эндотелий-зависимого расслабления сосудов, восстановлению функции Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов большой проводимости в ГМК и нормализации повышенного артериального давления. К сожалению, введение ВМСК крысам с экспериментальным стретозотоциновым диабетом практически не повлияло на функциональное состояние их сосудистого русла.

Дистанционный контроль функции потенциалзависимых ионных каналов

Использование явления плазмонного резонанса на поверхности наночастиц золота для управления ионными каналами пока еще является довольно-таки экзотическим способом контроля их функционирования и находится в стадии экспериментальной разработки. Тем не менее, нам удалось получить убедительные данные, что плазмонные наночастицы золота обладают способностью открывать калиевые каналы в плазматической мембране клеток, не вступая с ними в какого-либо рода химическое взаимодействие. Это происходит за счет взаимодействия электронного облака на поверхности наночастиц с сенсором напряжения канала, и этот эффект усиливается при облучении клетки лазером определенной длины волны за счет явления плазмонного резонанса.

1. Soloviev A. The contractile apparatus in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats possess increased calcium sensitivity: the possible role of protein kinase C. / Soloviev A., Bershstein S. // J. of Hypertens. – 1992, – V. 10, – p. 131–136.
2. Soloviev A. Evidence for decrease in myofilament responsiveness to Ca^{2+} during hypoxia in spontaneously active vascular smooth muscle in rats / Soloviev A., Bazilyuk O. // *Experim. Physiol.* – 1993, – V. 18, – P. 395–402.
3. Evidence for the involvement of protein kinase C in depression of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats / Soloviev A., Parshikov A., Stefanov A. [et al.] // *J. Vasc. Res.* – 1998. – V. 35. – P. 325–331.
4. Depression of endothelium-dependent relaxation despite normal release of nitric oxide in the aorta of spontaneously hypertensive rats: possible role of protein kinase C. / Soloviev A., Tishkin S., Parshikov A. [et al.] // *Endothelium-Derived Hyperpolarizations*. Ed. P. Vanhoutte. – Harwood Academic Publishers, 1999. – P. 289–296.
5. Ionizing radiation alters myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: potential role for protein kinase C / Soloviev A., Tishkin S., Zelensky S. [et al.] // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* – 2005. – V. 289. – R755–R762, 205.

6. Functional and molecular consequences of ionizing irradiation on large conductance Ca^{2+} – activated K^+ channels in rat aortic smooth muscle cells / Soloviev A, Tishkin S., Ivanova I. [et. al.] // *Life Sciences*. – 2009. V. 84. – P. 164–171.
7. Quercetin-filled phosphatidylcholine liposomes restore abnormalities in rat thoracic aorta BK_{Ca} channel function following ionizing irradiation / Soloviev A.[et al.] // *Acta Physiol. Sinica*. – 2009. – V. 61 (3). – P. 201–210.
8. Electrophysiological and contractile evidence the ability of human mesenchymal stromal stem cells to correct vascular malfunction in rats after ionizing irradiation / Soloviev A., Prudnikov I., Tsyvkin V. [et al.] // *The J. of Physiol. Sci. (Japan)*. – V. 60, № 2. – P. 161–172.
9. Protein kinase C-dependent inhibition of BKCa current in rat aorta smooth muscle cells following γ -irradiation / Kizub I., Pavlova A., Ivanova I., Soloviev A. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – V. 86. – P. 291–299.
10. Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats / Kizub I., Pavlova A., Johnson, Soloviev A, Zholos A. // *Br. J. Pharmacol.* – 2010. – V. 159. – P. 1724–1731.
11. Electrophysiological and contractile evidence the ability of human mesenchymal stromal stem cells to correct vascular malfunction in rats after ionizing irradiation / Soloviev A. [et al.] // *The J. of Physiol. Sci. (Japan)*. – 2010. – 60, № 2. – P. 161–172.
12. Protein kinase C-dependent inhibition of BKCa current in rat aorta smooth muscle cells following γ -irradiation / Kizub I., Pavlova O., Ivanova I., Soloviev A. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – V. 86. – P. 291–299.
13. The BKCa channels deficiency as a possible reason for radiation-induced vascular hypercontractility / Kyrychenko S., Tishkin S., Dosenko V.[et al.] // *Vasc. Pharmacol.* – 2012. – V. 56. – P. 142–149.
14. Soloviev A. Selective glycolysis blockade in guinea pig pulmonary artery and aorta reverses contractile and electrical responses to acute hypoxia / Soloviev A., Bondarenko A., Kizub I. // *Vasc. Pharmacol.* – 2012. – V. 57. – P. 119–123.
15. *Ivanova I.* Endothelium-derived hyperpolarizing factor as a reserve defense mechanism of the vascular control under ionizing radiation impact. *Intern / I. Ivanova, O. Kislova, A. Soloviev // J. of Physiol. Pathophysiol.* – 2012. – V. 3(2). – P. 161–173.
16. Evidence for the role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction / I. Strielkov, I. Kizub, A. Khromov, A. Soloviev // *Vasc. Pharmacol.* – 2013. – V. 58. – P. 292–298.
17. Gap junctions supports the sustained phase of hypoxic pulmonary vasoconstriction by facilitating calcium sensitization / Kizub, I. Strielkov, Y. Shaifta [et al.] // *J. Ward. Cardiovasc. Res.* – 2013. – V. 99. – P. 401–411.
18. Correction of vascular hypercontractility in spontaneously hypertensive rats using shRNAs-induced delta protein kinase C gene silencing / T. Novokhatska, S. Tishkin, V. Dosenko [et al.] // *Eur J. Pharmacol.* – 2013. – V. 718, issues 1–3. – P. 401–407.