

Тарасова К.В.

ВІКОВІ ЗМІНИ СПІВВІДНОШЕННЯ АДЕНІННУКЛЕОТИДІВ В МІОКАРДІ ЩУРІВ ПРИ ФАРМАКОЛОГІЧНІЙ АКТИВАЦІЇ КАТФ КАНАЛІВ

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

Резюме. В порівняльному дослідженні на дорослих і старих щурах встановлено, що показники енергетичного статусу в міокарді зазнають адаптивних вікових змін. У дорослих щурів під дією активаторів КАТФ каналів (діазоксиду і його фторовмісного аналога) відбувається збільшення цих показників, що свідчить про посилення синтезу АТФ міокардом. У старих щурів вказані показники проявили тенденцію до помірного зниження, що свідчить про мяке розєднання процесів окисного фосфорилування і характеризує дані речовини як кардіопротектори. Отже, встановлено, що напрям змін показників енергетичного статусу в міокарді в умовах фармакологічної активації КАТФ каналів залежить від віку.

Ключевые слова: активаторы КАТФ каналов, діазоксид, фторсодержащий аналог діазоксиду, уровень АТФ, АДФ, АМФ, миокард, старение.

Вступ

Виходячи з постаріння населення і великої поширеності серцево-судинних захворювань у людей похилого віку, важко перебільшити важливість розуміння вікових особливостей перебігу енергетичних процесів в міокарді. Так, зниження функції мітохондрій, згідно до вільно-радикальної та мітохондріальної теорії старіння, є передумовою зниження працездатності серця при старінні. Разом з тим, є і дані про те, що концентрація АТФ у серцях старих і дорослих щурів практично не відрізняється [3,8], тому навіть припускають, що в нормі при старінні малоімовірно, що енергетичні процеси відіграють важливу роль у розвитку функціональних змін [9].

Найважливішими метаболічними датчиками в клітинах, в тому числі в кардіоміоцитах (КМЦ), є АТФ-залежні калієві (КАТФ) канали - сарколемальні (сарк.КАТФ) і мітохондріальні (мітоКАТФ). Дані щодо їх вікових кількісних змін протирічливі [7,10], разом з тим показано вікові зміни їх чутливості до АТФ та інших регуляторів [5]. Активаторам цих каналів властиві як потенційно корисні при ішемії міокарду метаболічні ефекти (за рахунок активації мітоКАТФ каналів), так і функціональні, зокрема, вазодилататорний (за рахунок сарк.КАТФ каналів), але побічні ефекти сполук протидіють їх клінічному використанню.

В інституті органічної хімії НАН України під керівництвом проф. Л.М. Ягупольського синтезовано цілий ряд кардіотропних речовин, серед яких особливе місце посідають дві групи фторов-

місних активаторів КАТФ каналів - аналоги пінацидилу і аналоги діазоксиду. Запатентований за нашої участі (Патент на винахід № 77344 від 15.11.2006) фторовмісний аналог діазоксиду відрізняється від прототипу (класичного діазоксиду) низькою токсичністю і високою ліпофільністю. Ми припустили, що активатори КАТФ каналів можуть розглядатись в якості перспективних засобів корекції роботи серця при старінні.

Мета дослідження - порівняльне дослідження впливу діазоксиду і його фторовмісного аналогу на показники енергетичного статусу міокарду дорослих і старих щурів.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження проводили на 21 дорослих (8-9 міс.) і на 24 старих (24 місяці) білих лабораторних щурах - самцях лінії Вістар вагою, відповідно, 250-280 і 400-450 г. За 1-1,5 години до знерухомилення щурам внутрішньоочередово вводили діазоксид або його фторовмісний аналог в дозі 5 мг/кг. Щурів наркотизували тіопенталом натрію, вилучали серце і занурювали його в рідкий азот. Про метаболічні зміни в міокарді судили по вмісту в заморожених тканинах серця аденілових нуклеотидів і величини енергетичного заряду аденілової системи. Вільні аденіннуклеотиди (АТФ, АДФ, АМФ) визначали в лабораторії ЦНДЛ НМУ імені О.О.Богомольця за методом високоевольтного електрофорезу на папері з подальшою спектрофотометрією. Показники енергетичного обміну розраховували за формулами: енергетичний заряд Аткінсона $AE3 = (ATF + 1/2ADF) / (ATF + ADF + AMP)$; енергетичний потенціал:

АТФ/АДФ; індекс фосфорилування $I\Phi = \text{АТФ} / (\text{АДФ} + \text{АМФ})$; термодинамічний контроль дихання $\text{ТДК} = \text{АДФ} / \text{АМФ}$; коефіцієнт порівняння $\text{Кпор.} = (\text{АТФ} + \text{АМФ}) / \text{АДФ}$. Вірогідність результатів визначали за допомогою t-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Виявлено ряд відмінностей величини показників енергетичного статусу міокарду у дорослих і старих щурів (рис.1).

Так, в міокарді інтактних старих щурів, порівняно з дорослими, немає значної різниці вмісту АТФ, і, водночас - нижча концентрація АДФ і АМФ, що свідчить про інтенсифікацію катаболічних процесів і окисного фосфорилування [8], збільшення спряженості дихання з фосфорилуванням при старінні. На користь цього свідчить виявлений нами нижчий (в 2,5 рази порівняно з дорослими щурами) рівень АМФ в міокарді старих щурів, що також можливо трактувати як прояв збільшення з віком спряженості процесів окислення і фосфорилування. Враховуючи, що головним регуляторним фактором в енергетичному обміні є саме використання АТФ, збільшення при старінні спряженості дихання і фосфорилування (як і зростання інтенсивності гліколізу) слід трактувати як адаптивні зміни, спрямовані на збільшення енергетичного забезпечення клітин, тому що вони сприяють зростанню синтезу АТФ, незважаючи на властиву для старечого серця низьку швидкість мітохондріального дихання. Разом з тим, загальна сума аденіннуклеотидів у старих щурів вірогідно менша а співвідношення АТФ/АДФ більше ніж у дорослих,

що свідчить на користь переважання використання АТФ міокардом у дорослих щурів і зниження цього процесу - у старих.

Для більш детального порівняльного аналізу енергетичного гомеостазу в щурів різних вікових груп ми розраховували показники, що характеризують інтенсивність процесів синтезу та витрат енергії у міокарді. Звернула на себе увагу більша величина АЕЗ Аткинсона у старих щурів, що може бути як наслідком активації при старінні гліколітичного синтезу АТФ, так і вікового порушення процесів утилізації енергії. Інші показники, зокрема - індекс фосфорилування (ІФ), визначає здатність клітини синтезувати АТФ із АМФ, тобто, характеризує інтенсивність фосфорилування, водночас, коефіцієнт порівняння (Кпор) відображає співвідношення прямої та зворотної реакції перетворень АДФ, і нами не виявлено помітної різниці показника у щурів різного віку, в той час як ІФ і термодинамічний контроль дихання (ТДК) у старих щурів виявився удвічі більшим ніж у дорослих. Виходячи з того, що ТДК вказує на залежність швидкості дихання не від концентрації окремих компонентів аденілінуклеотидної системи, а від стану фосфорилування, цілком очевидно є односпрямованість вікових змін ІФ і ТДК.

Встановлено, що досліджувані сполуки – активатори КАТФ каналів (діазоксид і його фторовмісний аналог) викликали помітні зміни показників енергетичного статусу в міокарді як дорослих, так і старих щурів (табл.1).

Зокрема, в міокарді дорослих щурів відбулося підвищення частки АТФ з одночасним зниженням АДФ, що вказує на підвищення синтезу АТФ.

Ступінь підвищення вмісту АТФ під дією обох речовин статистично не відрізняється, а ступінь зниження рівня АДФ більша під дією фторовмісного аналога діазоксиду. Імовірно, що речовини викликали невелике збільшення об'єму мітохондріального матриксу, що призвело до прискорення синтезу АТФ. Помірне збільшення Кпор. можна пояснити інтенсифікацією прямої реакції перетворення АДФ, що протікає з перевагою синтезу АТФ над його розпадом, що узгоджується з літературними даними, згідно яких у

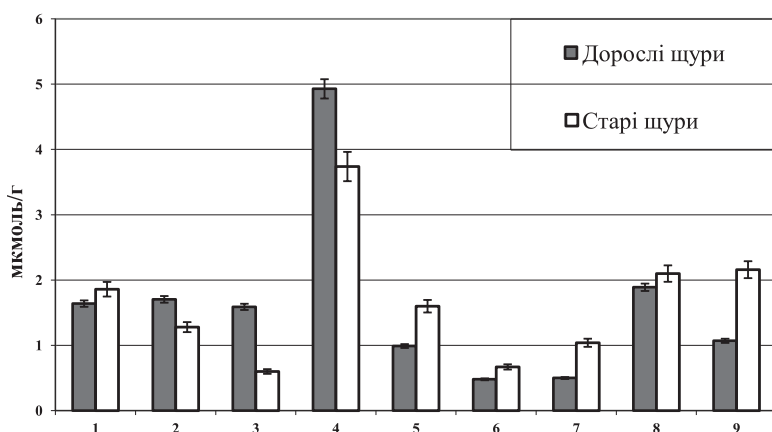


Рис. 1. Показники енергетичного обміну в міокарді щурів різного віку. 1-АТФ, 2-АДФ, 3-АМФ, 4-Сума аденіннуклеотидів, 5-співвідношення АТФ/АДФ, 6 – АЕЗ Аткинсона, 7- індекс фосфорилування (ІФ), 8- коефіцієнт порівняння (Кпор.), 9- Термодинамічний контроль (ТДК) дихання

Таблиця 1

Показники енергетичного статусу міокарду дорослих і старих щурів після введення діазоксиду і його фторовмісного аналогу

Показник	Контроль		Діазоксид		Аналог діазоксиду	
	Дорослі щури (n=7)	Старі щури (n=8)	Дорослі щури (n=7)	Старі щури (n=8)	Дорослі щури (n=7)	Старі щури (n=8)
АТФ мкмоль/г	1,64 ±0,04	1,86 ±0,079	2,03±0,1*	1,56±0,164*	1,97±0,09*	1,25±0,12*
АДФ мкмоль/г	1,705 ±0,05	1,28 ±0,064	1,54±0,04*	1,22±0,054	1,4±0,06*	1,00±0,02*
АМФ мкмоль/г	1,59 ±0,02	0,6 ±0,01	1,26±0,08*	0,77±0,036*	1,07±0,01*	0,75±0,08*
Сума мкмоль/г	4,93 ±0,08	3,74 ±0,027	4,83±0,15	3,55±0,147	4,44±0,13*	3,01±0,1*
АТФ /АДФ	0,99 ±0,017	1,6 ±0,16	1,33±0,08*	1,32±0,173*	1,41±0,05*	1,27±0,15*
АЕЗ	0,48 ±0,01	0,67 ±0,011	0,58±0,02*	0,6±0,022*	0,6±0,01*	0,58±0,03*
ІФ	0,5 ±0,01	1,04 ±0,08	0,7±0,1*	0,8±0,103*	0,8*±0,012	0,76±0,11*
Кпор.	1,89 ±0,014	2,1 ±0,192	2,1±0,02*	2,06±0,226	2,17 ±0,02	2,01±0,14
ТДК	1,07 ±0,012	2,16 ±0,113	1,2±0,1*	1,61±0,102*	1,31*±0,01	1,48±0,15*

Примітка: *статистично вірогідні зміни порівняно з контролем (p<0,05).

мітохондріях міокарду дорослих щурів діазоксид активує процеси окиснювального фосфорилування (спряженість і ефективність енергетичних реакцій) [4].

У старих щурів, на відміну від дорослих, активатори КАТФ каналів викликали помірне зниження рівня АТФ і зменшення співвідношення АТФ/АДФ (рис.2).

Помірне зменшення рівня АТФ свідчить про зниження процесів окисного фосфорилування й катаболічних процесів. І діазоксид, і, більш істотно, фторовмісний аналог діазоксиду у старих щурів викликали зниження загального вмісту макроергічних сполук і енергетичного заряду, що вказує на посилення синтетичних процесів в клітинах [1], і може посилювати стійкість КМЦ при ішемії. Зниження під дією активаторів КАТФ

каналів на 12–17 % молярного співвідношення АТФ/АДФ вказує на зниження швидкості дихання мітохондрій [2], а, отже, на властивість зазначених сполук викликати слабке роз'єднання окисного фосфорилування, тим самим попереджаючи утворення в мітохондріях активних форм кисню [5]. І діазоксид, і, більш істотно – його фторовмісний аналог, викликали помітне зниження ІФ у старих щурів, що є характерним для впливу геропротектора на старе серце [3] і дозволяє розглядати дані сполуки як кардіопротектори, тому що обмеження продукції АФК сприятиме довголіттю, викликаючи вроджену адаптивну відповідь на окислювальний стрес. Отже, при старінні активація КАТФ каналів може мати важливе значення для розвитку протидії стресу і подовження життя.

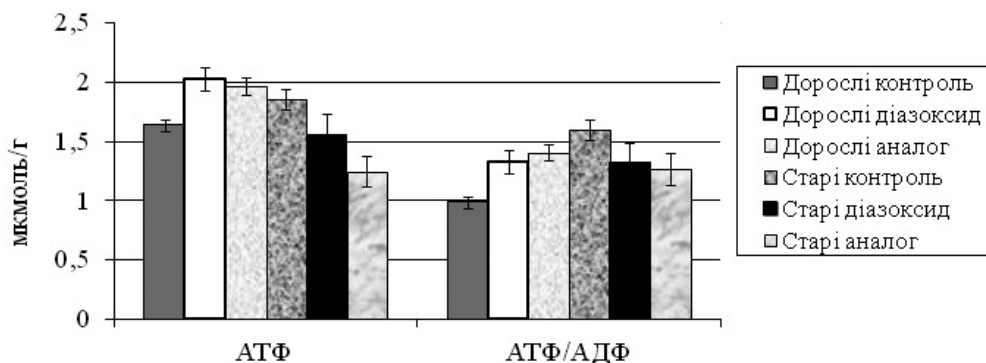


Рис. 2. Зміна співвідношення аденіннуклеотидів в міокарді дорослих і старих щурів при дії активаторів КАТФ каналів (діазоксиду та його фторовмісного аналога)

Висновки

1. Показники енергетичного статусу в міокарді зазнають адаптивних вікових змін.
2. Фармакологічна активація КАТФ каналів викликає зміни показників енергетичного статусу, спрямованість яких залежить від

віку тварин і свідчить про посилення синтезу АТФ у дорослих щурів і м'яке роз'єднання процесів окисного фосфорилування – у старих, що слід враховувати для їх можливого застосування в якості кардіопротекторів.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СООТНОШЕНИЯ АДЕНИННУКЛЕОТИДОВ В МИОКАРДЕ КРЫС ПРИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ КАТФ КАНАЛОВ

К. В. Тарасова

Резюме. В сравнительном исследовании на взрослых и старых крысах установлено, что показатели энергетического статуса в миокарде претерпевают адаптивные возрастные изменения. У взрослых крыс под действием активаторов КАТФ каналов (диазоксида и его фторсодержащего аналога) происходит увеличение данных показателей, что свидетельствует об усилении синтеза АТФ миокардом. У старых крыс указанные показатели проявили тенденцию к умеренному снижению, что свидетельствует о мягком разобщении процессов окислительного фосфорилирования и характеризует данные вещества как потенциальные кардиопротекторы. Таким образом установлено, что направление изменений показателей энергетического статуса в миокарде в условиях фармакологической активации КАТФ каналов зависит от возраста.

Ключевые слова: активаторы КАТФ каналов, диазоксид, фторсодержащий аналог диазоксида, уровень АТФ, АДФ, АМФ, миокард, старение.

AGE-RELATED CHANGES IN THE RATIO OF ADENINNUCLEOTIDES IN RAT MYOCARDIUM DURING PHARMACOLOGICAL ACTIVATION OF KATP CHANNELS

K. V. Tarasova

Abstract. Under the comparative study of myocardial metabolism indicators of adult and aged rats the adaptive changes during ageing were shown. The increase of mentioned indicators in adult rats under the influence of KATP channels activators (diazoxide and its fluorine contained analogue) testifies of myocardium ATP synthesis intensification. The moderate reduction tendency of above mentioned indicators in aged rats testifies about gentle disjoining of oxidative phosphorylation processes and characterizes these compounds as potential cardioprotectors. So the trend of myocardium energy status indicators changes under KATP channels pharmacological activation depends upon the age.

Key words: the activators of KATP channels, diazoxide, the fluorine-containing analog of diazoxide, level of ATP, ADP, AMP, myocardium, aging.

Список використаної літератури

1. Клинова С.Н. Динамика адениловых нуклеотидов в раннем периоде инфаркта миокарда и при его коррекции клеточной трансплантацией / С.Н. Клинова, С.Л. Богородская, Т.Е.Курильская, Ю.И.Пивоваров, Б.К.Бадурев, И.Н.Гутник, А.В. Рохин, Д.Ф.Кушнарев// Сиб.мед.журн. – 2009. – № 3. – С.38-41.
2. Лук'янчук В.Д. Стан енергетичного гомеостазу у щурів при застосуванні потенційного церебропротектора – ОК-3в умовах закритої черепно-мозкової травми / В.Д.Лук'янчук, А.А.Висоцький, І.І.Сейфуліна // Фармакол. та лік. Токсикол.– 2009. – № 3(10). – С.20-27.
3. Орлова О.А., Лазарчук О.О. Вплив парафармацевтика «Він-Віта» на стан енергетичного обміну в дорослих щурів // Укр.мед.альманах. – 2009. – Т.12, №5. – С.124-128.
4. Ткаченко Г.М. Вплив функціонального стану АТФ-залежних калієвих каналів на процеси енергозабезпечення печінки і міокарда у щурів із різною резистентністю до гіпоксії: дис... канд. біол. наук: 03.00.13 / Київський національний ун-т ім. Тараса Шевченка. - К., 2005.
5. Шигаева М.И. Функционирование митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала при различных физиологических и патологических состояниях. – 2010. – Дисс. канд.биол.наук. Пушкино. 03.01.02 Биофизика 110 с.

6. Bak M.I. Interaction of hypoxia and aging in the heart: analysis of high energy phosphate content / M.I. Bak, J.Y. Wei, J.S. Ingwall // *J. Mol. Cell. Cardiol.* –1998. – Vol.30, №3). – P.661-672.
7. Bao L. Alterations in ventricular K(ATP) channel properties during aging/ L.Bao, E.Taskin, M.Foster, B.Ray, R.Rosario, R.Ananthkrishnan, S.E.Howlett, A.M.Schmidt, R.Ramasamy, W.A.Coetzee // *Aging Cell.* – 2013.– Vol.12, №1.– P.167-176.
8. Drew B. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart / B. Drew, S. Phaneuf, A.Dirks, C.Selman, R.Gredilla, A. Lezza, G.Barja, C.Leeuwenburgh // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* –2003. – Vol.284, №2. – P.R474-480.
9. Hollingsworth K.G. Left ventricular torsion, energetics, and diastolic function in normal human aging / K.G.Hollingsworth, A.M.Blamire, B.D.Keavney, G.A. Macgowan // *Am.J.Physiol. Heart.Circ. Physiol.* – 2012 – Vol.302, №4. –P.H885-892
10. Sudhir R. Ageing-induced decline in physical endurance in mice is associated with decrease in cardiac SUR2A and increase in cardiac susceptibility to metabolic stress: therapeutic prospects for up-regulation of SUR2A / R.Sudhir, A.Sukhodub, Du Q, S. Jovanovi , A.Jovanovi // *Biogerontology.* –2011. – P.147-155.