

А.Г. Портниченко, М.І. Василенко, О.О. Мойбенко

Роль калієвих каналів в ефекторних механізмах кардіопротекції при пізньому прекодиціюванні серця щурів

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ, відділ загальної та молекулярної патофізіології;
МЦ АМЕД НАНУ, лабораторія молекулярної біології

Ключові слова: гіпоксія, гіпоглікемія, адаптація

Ефекторні механізми розвитку відстроченої кардіопротекції досліджували у щурів при гіпоксичному прекодиціюванні міокарду. Моделювання ішемії-реперфузії ізольованого серця через 24 год показало, що прекодиціювання призводило до зменшення розміру інфаркту на 34%. Після індукції прекодиціювання у міокарді зростала експресія eNOS та обмежено - iNOS. Застосування блокатора K_{Ca} -каналів паксиліну частково редукувало протективні ефекти прекодиціювання, а блокатор K_{ATP} -каналів глібенкламід збільшував розмір інфаркту та кількість аритмій і відносно прекодиціюваної, і відносно контрольної групи.

Effector mechanisms of delayed cardioprotection were studied in rats after hypoxic preconditioning. In 24 h ischemia and reperfusion of isolated heart was performed, infarct size reduced by 34% in the preconditioned hearts. In these hearts, eNOS, and moderate iNOS induction was found. Paxilline, K_{Ca} -channel blocker, attenuated delayed cardioprotection. Inhibition of K_{ATP} -channels by glibenclamide increased infarct size and arrhythmias in comparison both with control and preconditioned groups.

Вважають, що різні ізоформи NOS послідовно залучаються до патофізіологічного каскаду пізнього прекодиціювання: eNOS генерує NO, який ініціює розвиток прекодиціювання на тригерному етапі, а iNOS продукує NO, який захищає проти ішемії на ефекторному етапі [1]. NO через цГМФ-залежну активацію PKG та PKCε передає сигнал на внутрішню мембрану мітохондрій, що викликає протекцію шляхом відкриття K_{ATP} -каналів [2]. При пізньому прекодиціюванні показано також PI_3 -опосередковану сигнальну дію Akt на eNOS і iNOS та можливу участь обох ізоформ фермента в активації K_{ATP} -каналів [3, 4]. Ці дані вказують на необхідність поглибленого вивчення ролі eNOS на ефекторному етапі прекодиціювання.

Нещодавно показано [5], що відкриття K_{Ca} -каналів високої провідності, локалізованих на внутрішній мембрані мітохондрій кардіоміоцитів, захищає серце від ішемічного пошкодження через деполяризацію мембрани мітохондрій та зменшення надмірного входу кальцію до цих органел. Незважаючи на подібність механізмів, ця протекція відбувається незалежно від активації K_{ATP} -каналів. Однак, на відміну від останніх роль K_{Ca} -каналів у механізмах кардіопротекції при ішемічному та реперфузійному пошкодженні серця недостатньо охарактеризована.

Метою роботи було дослідження участі ізоформ NOS, а також ролі K_{Ca} - і K_{ATP} -каналів в механізмах пізнього прекодиціювання гіпоксичного генезу.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 300-400 г. Для індукції пізнього прекодиціювання щурів піддавали впливу гіпоксичної гіпоксії (10% O_2 в азоті, 3 год) [6]. Частину щурів (n=9 для контрольної і прекодиціюваної групи) через 24 год ви-

користували для визначення експресії білків у міокарді, іншу частину (n=27) - для моделювання ішемії-реперфузії ізольованого серця. Тварин наркотизували уретаном, серце виділяли і піддавали тотальній ішемії протягом 30 хв та постішемічній реперфузії протягом 40 хв за методом Лангендорфа при спонтанному серцебитті. Для блокади K_{Ca} -каналів використовували перфузію з додаванням паксиліну в кінцевій концентрації 1 мкмоль/л (n=9), для блокади K_{ATP} -каналів - глібенкламід у кінцевій концентрації 10 мкмоль/л (n=9).

Експресію білків визначали методом імуноблотингу (Western blotting) з використанням обладнання та протоколів BioRad Labs (USA), поліклональних анти-iNOS- і анти-eNOS-антитіл та реактивів фірми Sigma (USA). Позитивну реакцію виявляли методом забарвлення 3-аміноетилкарбазолом за допомогою набору EXTRA-3 (Sigma), яке оцінювали шляхом комп'ютерної денситометрії.

Розмір інфаркту після ішемії-реперфузії ізольованого серця визначали методом забарвлення клітин 2,3,5-трифенілтетразолію хлоридом [7].

Результати та їх обговорення. При дослідженні експресії білка eNOS у міокарді інтактного серця щурів було виявлено, що рівень експресії у правому шлуночку був у 1,6 рази вищим, ніж у лівому ($P<0,05$). Після ішемії та реперфузії експресія фермента зростала в обох шлуночках у 1,2 - 1,3 рази. Відмінності між шлуночками щодо експресії iNOS були більш значимими, однак після ішемії і реперфузії експресія iNOS зростала переважно у лівому шлуночку (у 2,8 рази, $P<0,01$).

Отже, правий шлуночок має вихідний "резерв" кардіопротекції за рахунок вищого рівня експресії обох ізоформ NOS. При цьому активність eNOS може обмежуватися за механізмом зворотньої інгібіції внаслідок більшої активності iNOS. Завдяки особливостям функції iNOS, скоротлива функція правого шлуночка набуває меншої залежності від наявності кисню і Ca^{2+} , що робить його менш вразливим до ішемії. Таку особливість правого шлуночка ми розглядаємо як феномен його "природного прекодиціювання", що знаходить свій прояв у рідкості розвитку інфаркту у правому шлуночку.

В той же час, у лівому шлуночку при ішемічно-реперфузійному синдромі ми спостерігаємо несприятливу динаміку експресії ізоформ NOS: незначний приріст eNOS і набагато більш потужний - iNOS. Індукція останньої, за умов негайної потреби в поновленні серцевого кровопостачання і забезпечення скоротливої функції [8], з компенсаторного механізму на ранніх етапах серцевої катастрофи переходить

до патогенного у підгострий період інфаркту.

При гіпоксичному прекодиціюванні спостерігали обмеження несприятливого зростання експресії iNOS, після ішемії і реперфузії показники збільшувалися в лівому шлуночку лише в 1,3 рази, а у правому - взагалі мали тенденцію до зниження (Рис. 1). В той же час доішемічний рівень експресії eNOS був вищим у лівому шлуночку в 1,3 рази відносно контролю ($P < 0,05$), а після реперфузії спостерігали подальше потужне зростання показників.

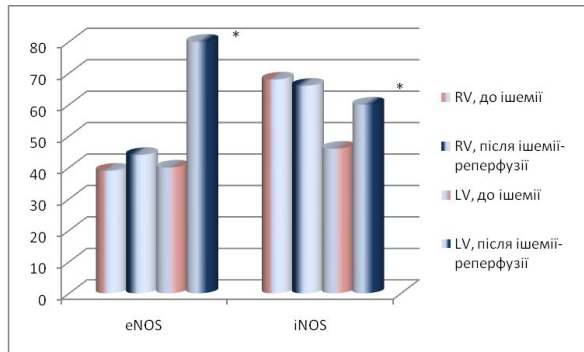


Рисунок 1. Зміни експресії eNOS та iNOS в міокарді правого (RV) і лівого (LV) шлуночків прекодиціюваного серця щурів (у.о.). * $P < 0,05$ відносно доішемічного рівня

Розмір інфаркту вірогідно зменшувався у прекодиціюваних серцях в середньому на 34% (Рис. 2), паксилін відновлював цей показник майже до рівня контролю, переважно за рахунок зростання інфаркту лівого шлуночка. Відомо, що застосування паксиліну за відсутності прекодиціювання не впливає на розмір інфаркту [9]. Очевидно, прекодиціювання призводить до значної активації цього механізму протекції. В той же час, порівняно з блокадою K_{Ca} -каналів, блокада K_{ATP} -каналів мала більш тяжкі наслідки. Спостерігали не тільки повну редукцію протективної дії прекодиціювання, але й значне зростання розміру інфаркту у співставленні з контрольною групою (Рис. 2).

Одним з найбільш виразних протективних ефектів прекодиціювання була значна редукція кількості випадків фатальних аритмій під час постішемічної реперфузії. Застосування паксиліну редукувало протективний ефект на 76%. При введенні ж глібенкламід практично 100% сердець розвивало фатальні аритмії, що значно перевищувало показники контрольної групи. Це беззаперечно свідчить про облігатну роль K_{ATP} -каналів у кардіопротекції не тільки за умов прекодиціювання, але і без його наявності.

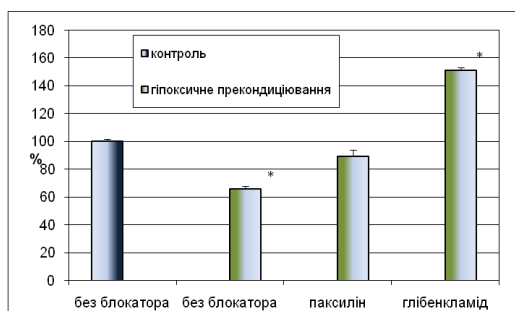


Рисунок 2. Розмір інфаркту (% по відношенню до контрольної групи) в прекодиціюваних серцях при застосуванні блокаторів K_{Ca} - та K_{ATP} -каналів. * $P < 0,05$ відносно контролю

Висновки. У розвитку відстроченої кардіопротекції, крім класичного медіаторного білка iNOS, бере участь і eNOS. Після індукції прекодиціювання посилюється синтез обох ізоформ фермента в міокарді.

При ішемії в лівому шлуночку інтактного серця виявляється недостатність функції eNOS та неможливість забезпечити необхідне зростання її експресії. Ця недостатність компенсується посиленою індукцією в міокарді iNOS, надмірна функція якої є патогенною при інфаркті. На відміну від цього, в динаміці ішемічно-реперфузійного синдрому прекодиціюваного серця відбувається швидке обмеження експресії iNOS. Натомість зростає експресія і функція eNOS, особливо в лівому шлуночку, тобто в серці створюється потужна тенденція до нормалізації співвідношення ізоформ фермента.

Ефекторний етап пізнього прекодиціювання значною мірою реалізується через активацію калієвих каналів, яка частково є NO-опосередкованою. Встановлено, що від активації K_{Ca} -каналів значною мірою залежить зменшення розміру інфаркту у лівому шлуночку та попередження фатальних аритмій. В той же час K_{ATP} -канали опосередковують кардіопротекцію в обох шлуночках серця, мають більш потужні ефекти при гіпоксичному прекодиціюванні, ніж K_{Ca} -канали, є ефекторами протекції і за відсутності прекодиціювання. Подальше дослідження цих механізмів надає перспективи для розробки патогенетичних методів кардіопротекції при інфаркті.

Література

1. Bolli R. Late phase of preconditioning // *Circ. Res.*, 2000;87:972-983.
2. Costa A.D., Garlid K.D., West I.C., Lincoln T.M., Downey J.M., Cohen M.V., Critz S.D. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria // *Circ. Res.*, 2005;97(4):329-336.
3. Wang Y., Ahmad N., Kudo M., Ashraf M. Contribution of Akt and endothelial nitric oxide synthase to diazoxide-induced late preconditioning // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004, 287: H1125-H1131.
4. Ahmad N., Wang Y., Haider K.H., Wang B., Pasha Z., Uzun O., Ashraf M. Cardiac protection by mitoKATP channels is dependent on Akt translocation from cytosol to mitochondria during late preconditioning // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 290(6):H2402-H2408.
5. Sato T., Saito T., Saegusa N., Nakaya H. Mitochondrial Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A // *Circulation.* 2005;111(2):198-203.
6. Портниченко А.Г., Василенко М.И., Портниченко В.И., Мойбенко А.А. Острая гипоксическая гипоксия как индуктор отсроченной кардиопротекции у крыс // Гипоксия, автоматизированный анализ гипоксических состояний. Сб. трудов под ред. А.З.Колчинской. Москва-Нальчик, 2005, Т.1., С.185-190.
7. An J., Varadarajan S.G., Camara A., Chen Q., Novalija E., Gross G.J., Stowe D.F. Blocking Na^{+}/H^{+} exchange reduces $[Na^{+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ load after ischemia and improves function in intact hearts // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 281: H2398-H2409.
8. Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL 2nd, Billiar TR. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase // *Circulation.* 2000;101(23):2742-2748.
9. Stowe DF, Aldakkak M, Camara AKS, Riess ML, Heinen A, Varadarajan SG, Jiang M-T. Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca^{2+} -sensitive K^{+} channel opening requires superoxide radical generation // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 290: H434-H440.