

АТФ-залежні калієві канали — спільна мішень кардіопротективного впливу куркуміну і фторовмісного аналога діазоксиду в умовах оксидантного стресу



К. В. Тарасова¹, О. О. Лінник², І. М. Маньковська²,
Л. В. Братусь², В. І. Носар², І. Г. Строкіна¹, І. М. Карвацький¹

¹ Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ

² Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ

Мета роботи — вивчити функціональні показники роботи міокарда, окисного фосфорилування в мітохондріях серця і вплив на них потенційних кардіопротекторів — натуральної речовини куркуміну й синтетичної речовини (фторовмісного аналога фармакологічного препарату — активатора АТФ-залежних калієвих каналів діазоксиду) в умовах доксорубіцинової моделі оксидантного стресу.

Матеріали і методи. Кардіоміоцити виділяли зі шлуночків серця 1–2-добових щурів, у культуру додавали 0,5 мкмоль/л доксорубіцину гідрохлориду, доксорубіцин разом із 20 мкмоль куркуміну або із 40 мкмоль фторовмісного аналога діазоксиду. Реєстрували скорочення ізольованих кардіоміоцитів за допомогою системи IonOptix. Вивчали показники дихання та окисного фосфорилування в мітохондріях.

Результати та обговорення. Використання куркуміну та аналога діазоксиду на тлі дії доксорубіцину підвищувало амплітуду скорочень кардіоміоцитів із $(4,07 \pm 0,51)$ до $(6,65 \pm 0,37)$ і $(5,5 \pm 0,8)$ % відповідно та зумовлювало нормалізацію порушеної доксорубіцином ритмічності скорочень. Доксорубіцин викликав зниження дихального контролю, коефіцієнта фосфорилування та входу іонів калію в матрикс мітохондрій. Як фторовмісний аналог діазоксиду, так і куркумін на тлі дії доксорубіцину збільшували ці показники. Транспорт іонів калію в мітохондрії, що під дією доксорубіцину знизився на 27,7 %, при сумісній дії доксорубіцину та куркуміну знизився на 11,5 %, а в разі застосування інгібітора АТФ-залежних калієвих каналів на тлі дії доксорубіцину з куркуміном — на 20 % порівняно з контролем.

Висновки. Використання куркуміну та фторовмісного аналога діазоксиду підвищує амплітуду та відновлює ритмічність спонтанних скорочень кардіоміоцитів в умовах оксидантного стресу, нормалізує показники енергозабезпечення мітохондрій міокарда, і така їх властивість реалізується, зокрема, через активацію АТФ-залежних калієвих каналів.

Ключові слова: АТФ-залежні калієві канали, доксорубіцин, куркумін, фторовмісний аналог діазоксиду, ізольовані неонатальні кардіоміоцити, мітохондрії, окисне фосфорилування.

Найважливіші метаболічні датчики в клітинах, зокрема в кардіоміоцитах (КМЦ), — АТФ-залежні калієві (K_{ATP}) канали — сарколемальні та мітохондріальні. Активаторам K_{ATP} -каналів властиві неоднозначні метаболічні ефекти, що можуть лежати в основі властивостей цих сполук як потенційних кардіопротекторів.

Враховуючи той факт, що в інтактному міокарді ці канали закриті, під час дослідження дії речовин — потенційних кардіопротекторів ми вважали за доцільне використати ефективну модель оксидантного стресу. Вибір доксорубіцинової моделі зумовлений тим, що доксорубіцин пошкоджує структуру й порушує функцію ізоформ креатинкінази *in vitro*, зокрема мітохондріальну креатинкіназу [28]. При цьому саме серцева форма мітохондріальної креатинкінази чутливіша до дії доксорубіцину, що може пояснити вибіркочку токсичність цього препарату саме для тканини міокарда, а порушення функції цього ізоферменту може стати причиною дисбалансу кальцію, а отже, зумовити порушення процесів скорочення і розслаблення.

Стаття надійшла до редакції 10 лютого 2017 р.

Тарасова Катерина Вікторівна, к. мед. н., доцент
E-mail: flokalin1@gmail.com

© К. В. Тарасова, О. О. Лінник, І. М. Маньковська, Л. В. Братусь,
В. І. Носар, І. Г. Строкіна, І. М. Карвацький, 2017

Пригнічення скоротливої функції КМЦ може бути пояснено також і тим, що в неонатальних КМЦ вже через 1 год після дії доксорубіцину, подібно до ефекту кальцієвого іонофору іономіцину, значно підвищується активність кальпаїну, який стимулює деградацію тайтину [20]. Значення тайтину для забезпечення скоротливої функції КМЦ важко переоцінити, протеоліз його пружної ділянки призводить до порушення діастолічної та систолічної функції і водночас вимагає посилення синтезу нових молекул тайтину. Отже, зростають енергетичні витрати КМЦ.

За нашою гіпотезою, використання доксорубіцинової моделі в культурі клітин разом із застосуванням потенційних кардіопротекторів — куркуміну як антиоксиданта і фторовмісного аналога діазоксиду як потенційного активатора K_{ATP} -каналів — дасть змогу, з одного боку, глибше вивчити функціональні та метаболічні характеристики міокарда на тлі оксидантного стресу, а з другого — виявити можливі спільні механізми впливу кардіопротекторів з метою оптимального їх застосування для корекції серцевої діяльності.

Мета роботи — вивчити функціональні показники роботи міокарда, окисного фосфорилування в мітохондріях серця і вплив на них потенційних кардіопротекторів — натуральної речовини куркуміну й синтетичної речовини (фторовмісного аналога фармакологічного препарату — активатора АТФ-залежних калієвих каналів діазоксиду) в умовах доксорубіцинової моделі оксидантного стресу.

Матеріали і методи

Методика виділення й культивування ізолюваних неонатальних кардіоміоцитів щура

Неонатальні КМЦ виділяли й культивували відповідно до модифікованої методики О. Surova [25]. Шляхом первікальної дислокації щурів знерухомлювали, після чого через передній поздовжній розріз грудної клітки виймали серце та відокремлювали шлуночки з подальшим їх відмиванням (буферний розчин такого складу (у ммоль/л): N-2-гідроксисетилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота (HEPES) — 20, хлорид калію — 5,4, хлорид натрію — 116,4, глюкоза — 5,5, гідрофосфат натрію — 0,4 і гідрофосфат калію — 0,4) та подрібненням. Ферментативне розщеплення проводили в середовищі виділення, яке на основі зазначеного буфера містило колагеназу II типу (1,75 мг) та панкреатин (3 мг) на 5 мл розчину. Клітини ресуспендували в живильному середовищі культивування такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199—4:1), теляча сироватка — 8%, карбонат натрію — 4,2 ммоль/л, HEPES — 15 ммоль/л та антибіотики (стрептоміцин —

100 мкг/мл, гентаміцин — 0,05 мг/мл, пеніцилін — 100 ОД/мл). Підрахунок виділених клітин проводили з використанням світлової мікроскопії після фарбування 0,2% розчином трипанового синього. Культивування проводили протягом 2 діб у живильному середовищі зазначеного складу при 37 °С з газовим складом 5% вуглекислого газу та 95% атмосферного повітря. Після 48 год інкубації в культуру додавали 0,5 мкмоль/л доксорубіцину гідрохлориду (SigmaAldrich, США, тривалість експозиції — 2 год), або доксорубіцин у вказаній дозі разом з куркуміном (SigmaAldrich, США) у дозі 20 мкмоль, або доксорубіцин у вказаній дозі разом із фторовмісним аналогом діазоксиду (40 мкмоль, тривалість дії останнього становила 30 хв).

Методика реєстрації скорочення кардіоміоцитів

Параметри спонтанних скорочень КМЦ реєстрували, починаючи з другої доби культивування. На всіх етапах клітини спостерігали під мікроскопом Olympus CKX 41 і одночасно — на моніторі комп'ютера з використанням камери IonOptix MyoCam. Скорочення КМЦ реєстрували та аналізували за допомогою системи ION-Wizard (IonOptix), що сканує відхилення лінії краю КМЦ при його скороченні: після того як одиничний КМЦ зосереджували у вікні відео, маніпулювали окремими відеолініями зліва і справа, де контраст країв оптимальний, при цьому обидва краї КМЦ сканували. Скорочення записувалося протягом 3 хв і реєструвалося у вигляді трьох кривих, кожна з яких відображає, відповідно, відхилення правого краю, відхилення лівого краю і зміну довжини клітини під час скорочення. Аналізували відеозапис і підраховували значення відхилення краю за допомогою комп'ютера. Амплітуду спонтанних скорочень представлено у відсотках відносно довжини клітини у стані розслаблення. КМЦ, що або демонстрували занадто часті скорочення, або скорочувалися менше ніж на 5% від вихідної довжини, не досліджували. Частоту спонтанних скорочень КМЦ визначали й оцінювали за методикою D. R. Webster та співавт. [29]: кількість скорочень визначали у поодинокі розташованих клітин візуально за 60 с.

Результати обробляли за методикою G. V. Belostotskaya та співавт. [13]: усереднювали значення кожного експерименту, декількох повторів і різних експериментів з однаковими умовами проведення. Значення представлені як середнє та похибка середнього ($M \pm m$). Результати обробляли статистично з допомогою програми Excel 2000 та Origin 8.0. Статистичну значущість різниці середніх значень визначали за критерієм Стьюдента (t). Значення $p < 0,05$ вважали статистично значущим.

Використано речовини: доксорубіцину гідрохлорид (SigmaAldrich, США, 0,5 мкмоль), куркумін (SigmaAldrich, США, 20 мкмоль), фторовмісний

аналог діазоксиду (7-хлоро-3-метил-1,2,4-бензотіадазин-1,1-диоксид, 40 мкмоль), що містить у положенні 7 конденсованого гетероциклу дифторметоксильну групу замість хлору, синтезований в Інституті органічної хімії НАН України групою під керівництвом проф. Л. М. Ягупольського. Всі речовини розчиняли в диметилсульфоксиді, кінцева концентрація якого не перевищувала 0,1 %.

Методика моделювання оксидантного стресу в культурі неонатальних кардіоміоцитів

Методика описана О. О. Лінник та співавт. [4]. Після 48 год інкубації в культуру додавали низьку (0,5 мкмоль/л) дозу доксорубіцину (SigmaAldrich) [11]. Враховуючи, що доксорубіцин уже через 30 хв спричиняє вплив на скоротливу активність КМЦ, але викликає інгібування скорочень і загибель клітин після 24 год впливу [24], у цьому дослідженні тривалість дії доксорубіцину не перевищувала 2 год з метою запобігти пошкодженню клітин, що, у разі перевищення цього терміну, може бути зумовлене надходженням препарату через плазматичну мембрану клітин [22].

Методика дослідження окисного фосфорилування

В експериментах використовували 27 щурів з масою тіла 180–200 г. Доксорубіцин у дозі 4 мг/кг і куркумін у дозі 50 мг/кг вводили внутрішньоочеревинно за схемою: премедикація куркуміном тричі через добу, а потім введення куркуміну й доксорубіцину разом із паузою 6–8 год тричі через добу. Через 24 год після останньої ін'єкції тварини були декапітовані відповідно до прийнятих біоетичних норм. Фторовмісний аналог діазоксиду (40 мкмоль, тривалість експозиції 30 хв) і 5-гідроксидеканоат (5-ГДК) (10 мкмоль, тривалість експозиції на фоні куркуміну або аналога діазоксиду становила 30 хв) вводили безпосередньо в суспензію мітохондрій, які виділяли з міокарда загальноприйнятим методом диференційного центрифугування за умови зберігання нативності ізольованих органел [19]. Мітохондрії виділяли при температурі 4 °С. Середовище виділення мітохондрій містило (у ммоль/л): D-маніт — 210, сахароза — 70, етиленглікольтетраоцтова кислота (EGTA) — 2, HEPES — 10, біс(триметилсиліл)ацетамід (BSA) — 1 мг/кг (рН 7,4). Процеси дихання та окисного фосфорилування досліджували полярографічним методом із використанням закритого електрода Кларка і приладу Охуграф (Standart Охуграф System, Hansatech, Велика Британія). Функціональний стан мітохондрій досліджували методом В. Chance і G. Williams [14]. Середовище інкубації міокарда містило (у ммоль/л): хлорид калію — 120, гідрофосфат натрію — 5, HEPES — 10 (рН 7,4). Як субстрат окиснення використовували розчин сукцинату натрію концентрацією 5 ммоль/л. Інгібітором

мітохондріального ферментного комплексу I слугував ротенон (2 мкмоль/л). Дихання стимулювали внесенням у полярографічну комірку 200 мкмоль АДФ. Сукцинат натрію додавали в середовище окремо перед внесенням мітохондрій. Використовуючи одержані хроно-амперографічні криві, обчислювали параметри дихання мітохондрій (за Чансом): поглинання кисню у стані активного дихання при додаванні АДФ (в метаболічному стані 3 за Чансом; V_3), контрольованого дихання у присутності субстратів окиснення, але за відсутності АДФ (в метаболічному стані 4 за Чансом; V_4), дихальний контроль (V_3/V_4), коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О) за R. Estabrook [15]. Концентрацію білка визначали методом О. Н. Lowry [21].

Результати та обговорення

Проведено порівняльне дослідження впливу потенційного активатора K_{ATP} -каналів фторовмісного аналога діазоксиду й куркуміну на скоротливу функцію ізольованих неонатальних КМЦ, а саме на амплітуду, частоту й ритмічність притаманних цим клітинам спонтанних скорочень. Враховували, що, на відміну від дорослих КМЦ, дуже організованих і морфологічно схожих між собою, неонатальні КМЦ у процесі розвитку їх скоротливого апарату набувають різноманітних форм (рис. 1), і під час скорочення помітні зміни відбуваються по периметру клітин, що значно ускладнює вимірювання скорочень цього типу клітин порівняно з таким у дорослих КМЦ [12].

Діастолічна довжина неонатального КМЦ (відстань між краями клітини без урахування довжини відростків) становила ($24,170 \pm 1,084$) мкм, що було взято за 100 % при визначенні відсотка зменшення довжини клітини під час скорочення в різних умовах.

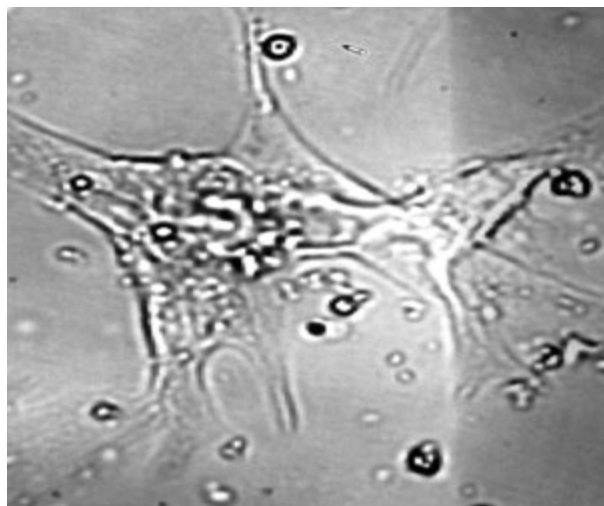


Рис. 1. Ізольований неонатальний кардіоміоцит

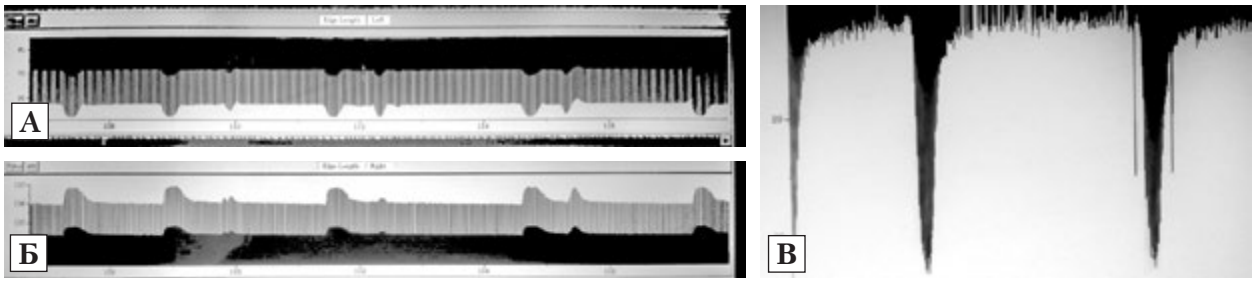


Рис. 2. Репрезентативна крива запису спонтанних скорочень ізольованого неонатального КМЦ щура в умовах оксидантного стресу: відхилення лівого (А) та правого (Б) краю; зміна довжини клітини під час скорочення (В)

У контролі ізольовані КМЦ скорочувалися ритмічно, зі сталою для окремої клітини амплітудою, під час скорочення реєстрували відхилення обох країв клітини, що свідчило про те, що в процес скорочення залучені обидва краї реєстрації (тобто вся клітина, а не її частина), у результаті чого зменшувалася відстань між краями реєстрації.

Після введення доксорубіцину порушилася скоротлива активність КМЦ, зокрема втратилася ритмічність (рис. 2) і знизилася амплітуда спонтанних скорочень (рис. 3).

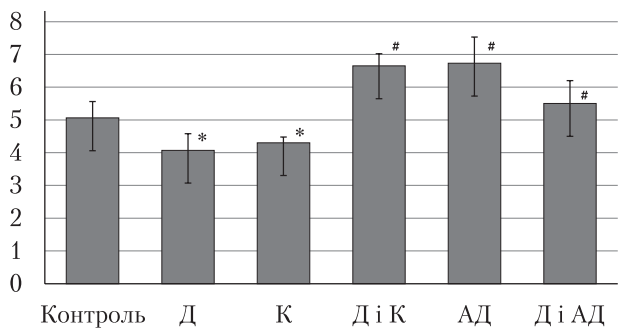
Зниження амплітуди скорочень і втрату ритмічності в цих умовах можна пояснити порушенням нормального перерозподілу іонів кальцію між депо і цитоплазмою КМЦ внаслідок зниження кількості молекул Ca^{2+} -АТФази (SERCA), а отже, і концентрації іонів кальцію в саркоплазматичному ретикулумі [27], підвищенням утворення активних форм кисню, які разом з іонами кальцію можуть сприяти активації Ca^{2+} /кальмодулін-залежної кінази II (CaMKII), що сприяє витоку іонів кальцію із саркоплазматичного ретикулума і тим самим — зниженню кальцієвої керованості КМЦ [23].

Показано, що при додаванні в розчин на фоні доксорубіцину або куркуміну, або фторовмісного аналога діазоксиду амплітуда скорочень статистично значуще перевищувала амплітуду як порівняно з доксорубіцином, так і порівняно з контролем, хоча за відсутності доксорубіцину обидві досліджувані речовини не зумовлювали значних змін амплітуди скорочень (див. рис. 3).

Обидві речовини — куркумін та аналог діазоксиду — нормалізували порушену доксорубіцином ритмічність скорочень КМЦ, що виявилось у зменшенні різниці інтервалу між окремими скороченнями, отже, виявився протиаритмічний ефект обох указаних речовин (рис. 4). Водночас за відсутності доксорубіцину обидві речовини виявили протиаритмічну дію: куркумін — виражену, аналог діазоксиду — незначну (відхилення інтервалу між скороченнями від середнього значення не перевищувало 10 %; див. рис. 4).

Отримані результати дали підстави припустити, що обидві речовини — куркумін і фторовмісний аналог діазоксиду, які викликали аналогічні функ-

Зміна довжини клітини при скороченні, %



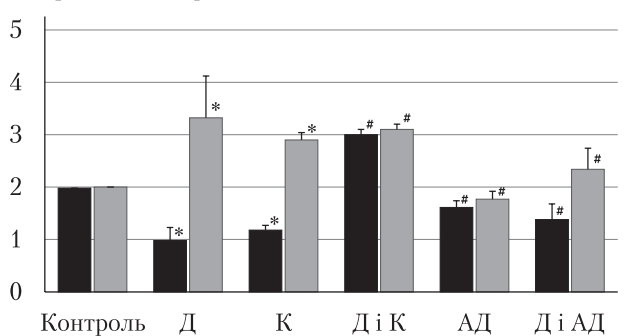
Д — доксорубіцин; К — куркумін; АД — аналог діазоксиду.

* Різниця щодо контролю статистично значуща ($p < 0,05$).

Різниця щодо доксорубіцину статистично значуща ($p < 0,05$).

Рис. 3. Зміна амплітуди спонтанних скорочень ізольованих КМЦ в різних умовах

Інтервал між скороченнями, с



Д — доксорубіцин; К — куркумін; АД — аналог діазоксиду.

* Різниця щодо контролю статистично значуща ($p < 0,05$).

Різниця щодо доксорубіцину статистично значуща ($p < 0,05$).

Рис. 4. Протиаритмічний ефект куркуміну та фторовмісного аналога діазоксиду

ціональні зміни, можуть зумовлювати схожі за величиною та аналогічні за напрямком зміни метаболічних процесів, зокрема процесів окисного фосфорилування. Більше того, було вирішено перевірити, чи мають зазначені речовини спільні механізми дії, наприклад, чи можуть спільною мішенню

їх впливу виступати АТФ-залежні калієві канали — основні метаболічні датчики клітин серця.

Ми здійснили порівняльне дослідження дії куркуміну і фторовмісного аналога діазоксиду, потенційного активатора мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів, на енергетичний метаболізм мітохондрій міокарда щурів за умов експериментального оксидантного стресу, викликаного доксорубіцином. Отримані дані, представлені в табл. 1–3, свідчать про те, що за умови дії доксорубіцину суттєво змінюються показники енергозабезпечення, пов'язані з окисненням як ФАД-

залежних (сукцинат), так і НАД-залежних субстратів (глутамат).

Відбувається різке зниження показників АДФ-стимульованого дихання: за умов субстрату окиснення сукцинату — на 42 %, глутамату — на 46 %. При цьому спостерігається зниження дихального контролю — на 45 і 50 % відповідно, зниження ефективності використання кисню (показник — зменшення АДФ/О) — на 30 і 32 % відповідно. Вхідження іонів калію в мітохондріях знизилася на 28 % при окисненні сукцинату та на 32 % — у разі використання глутамату. Отже, під впливом

Т а б л и ц я 1

**Вплив доксорубіцину і куркуміну на параметри дихання мітохондрій міокарда щурів (n = 12).
Субстрат окиснення: сукцинат натрію (5 ммоль/л)**

Параметр	Контроль	Доксорубіцин	Доксорубіцин і куркумін	Доксорубіцин, куркумін і 5-ГДК
V_3 , нмоль/(хв·мг білка)	63,70 ± 3,44	35,80 ± 2,77*	44,70 ± 2,13**	39,40 ± 2,10*
V_4 , нмоль/(хв·мг білка)	22,10 ± 2,23	23,50 ± 2,11	24,90 ± 2,18	24,50 ± 1,91
V_3/V_4	2,88 ± 0,19	1,52 ± 0,09*	1,80 ± 0,11**	1,61 ± 0,05*
АДФ/О	1,67 ± 0,12	1,14 ± 0,05*	1,28 ± 0,04**	1,19 ± 0,03*
Вхідження K^+ , мкм/(хв·мг)	52,20 ± 2,57	37,60 ± 2,20*	46,07 ± 2,05**	41,40 ± 1,87*

Статистично значуща ($p < 0,05$) різниця щодо: * контролю; * уведення доксорубіцину; * уведення доксорубіцину й куркуміну.

Т а б л и ц я 2

**Вплив доксорубіцину й аналога діазоксиду на параметри дихання мітохондрій міокарда щурів (n = 12).
Субстрат окиснення: сукцинат натрію (5 ммоль/л)**

Параметр	Контроль	Доксорубіцин	Доксорубіцин і аналог діазоксиду	Доксорубіцин, аналог діазоксиду і 5-ГДК
V_3 , нмоль/(хв·мг білка)	70,20 ± 3,13	40,70 ± 2,08*	52,60 ± 2,37 [#]	42,60 ± 1,89
V_4 , нмоль/(хв·мг білка)	22,50 ± 2,22	23,50 ± 2,0	25,00 ± 2,18	23,90 ± 1,99
V_3/V_4	3,12 ± 0,13	1,72 ± 0,11*	2,10 ± 0,12 [#]	1,78 ± 0,09
АДФ/О	1,75 ± 0,11	1,22 ± 0,10*	1,44 ± 0,09 [#]	1,25 ± 0,02
Вхідження K^+ , мкм/(хв·мг)	64,20 ± 1,88	46,30 ± 1,72*	58,30 ± 2,20 [#]	48,40 ± 1,52

Статистично значуща ($p < 0,05$) різниця щодо: * контролю; * уведення доксорубіцину.

Т а б л и ц я 3

**Вплив доксорубіцину й аналога діазоксиду на параметри дихання мітохондрій міокарда щурів (n = 15).
Субстрат окиснення: глутамат натрію (5 ммоль/л)**

Параметр	Контроль	Доксорубіцин	Доксорубіцин і аналог діазоксиду	Доксорубіцин, аналог діазоксиду і 5-ГДК
V_3 , нмоль/(хв·мг білка)	62,70 ± 2,89	33,80 ± 2,11*	41,20 ± 2,0 [#]	35,40 ± 1,72
V_4 , нмоль/(хв·мг білка)	16,20 ± 1,87	17,50 ± 1,90*	17,20 ± 2,0	16,30 ± 1,44
V_3/V_4	3,87 ± 0,15	1,93 ± 0,10*	2,40 ± 0,11 [#]	2,12 ± 0,08
АДФ/О	2,68 ± 0,11	1,74 ± 0,05*	2,00 ± 0,09 [#]	1,81 ± 0,07
Вхідження K^+ , мкм/(хв·мг)	67,40 ± 2,00	45,80 ± 1,45*	54,70 ± 2,33 [#]	47,60 ± 1,72

Статистично значуща ($p < 0,05$) різниця щодо: * контролю; * уведення доксорубіцину.

доксорубіцину відбувається пригнічення енергетичного обміну, яке істотніше виявляється у випадку використання субстрату окиснення глутамату порівняно із сукцинатом. Очевидно, що доксорубіцин пригнічує роботу дихального ланцюга та синтезу АТФ як основного енергетичного субстрату.

Виходячи з того, що дія активаторів $K_{\text{АТФ}}$ -каналів спрямована, зокрема, на процеси мітохондріального енергозабезпечення, наступну серію дослідів проводили із застосуванням потенційного активатора цих каналів — фторовмісного аналога діазоксиду на тлі введення доксорубіцину. Встановлено, що при окисненні сукцинату за цих умов швидкість споживання кисню в активному стані (V_3) зростає на 29 % відносно доксорубіцину. Спряження дихання з фосфорилуванням (V_3/V_4) збільшувалося на 22 % на тлі зростання ефективності споживання кисню (АДФ/О) на 17 %. Вхідження іонів калію в мітохондріальний матрикс збільшувалося на 26 %.

За умов окиснення глутамату при використанні фторовмісного аналога діазоксиду на фоні дії доксорубіцину спостерігали зростання показників: V_3 — на 22 %, дихального контролю — на 17 %, коефіцієнта АДФ/О — на 15 %, входження іонів калію — на 19 % відносно доксорубіцину. Наведені дані свідчать про те, що за умов дії фторовмісного аналога діазоксиду на фоні доксорубіцину при окисненні обох субстратів зменшується пригнічення енергетичного обміну, активується входження іонів калію в мітохондріях серця.

Відомо, що транспортування іонів калію в матрикс мітохондрій опосередковане калієвими каналами, локалізованими на внутрішній мембрані мітохондрій [26]. Найбільш досліджені $K_{\text{АТФ}}$ -канали, відкриті в 1991 р. (Noma). АТФ-залежна калієва провідність присутня практично в усіх типах тканин, що вказує на її важливе фізіологічне значення. Потенціал-залежне входження іонів калію в матрикс та виведення цих іонів через калієво-протонний обмінник утворює мітохондріальний калієвий цикл [5, 17]. Припускають, що активація цього циклу лежить в основі цитопротективних ефектів фармакологічних активаторів $K_{\text{АТФ}}$ -каналів [6]. Серед можливих механізмів протективної дії речовин цього класу (зокрема прототипу досліджуваної нами речовини — діазоксиду) можна назвати такі: збереження споживання кисню мітохондріями, підвищення продукції АТФ, зниження накопичення іонів кальцію в мітохондріях, підвищення продукції реактивних сполук кисню, які активують протеїнкіназу С та індукцію її транслокації в мітохондріях, що запобігає апоптозу, імовірно, за рахунок підвищення експресії Bcl-2 і Bcl-XL [16, 18].

Виходячи з наведених даних літератури, ми провели дослідження з метою виявлення ролі мітохондріальних $K_{\text{АТФ}}$ -каналів у регуляції енергетичного

метаболізму мітохондрій міокарда щурів за умов дії фторовмісного аналога діазоксиду на тлі доксорубіцину із застосуванням блокатора цих каналів — 5-гідроксидеканоату (5-ГДК).

Встановлено, що введення в середовище інкубації 5-ГДК супроводжується зменшенням входження іонів калію (на 17 % при окисненні сукцинату та на 13 % — при окисненні глутамату), швидкості АДФ-стимульованого дихання (на 19 і 14 % відповідно), V_3/V_4 (на 15 і 10 % відповідно), АДФ/О (на 13 і 9,5 % відповідно) порівняно з дією фторовмісного аналога діазоксиду на тлі доксорубіцину.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що фторовмісний аналог діазоксиду усуває порушення регуляції енергозабезпечення мітохондрій міокарда щурів за умов доксорубіцинової моделі оксидантного стресу, зокрема за рахунок активації АТФ-залежних калієвих каналів.

Разом з тим існують певні розбіжності між представленими результатами, отриманими на мітохондріях серця, і результатами, отриманими за умов використання діазоксиду та його аналогів на мітохондріях печінки [2, 8]. Зокрема, активація $K_{\text{АТФ}}$ -каналу і, як наслідок, посилення входження іонів калію зумовлювали залуження матриксу і прискорювали дихання у стані 4 внаслідок активації калієвого циклу мітохондрій за відсутності деполаризації. Одночасно з роз'єднанням дихального ланцюга (зниження дихального контролю на 15–20 %) сповільнювалася швидкість дихання у стані 3, знижувалася ефективність синтезу АТФ (коефіцієнт фосфорилування) і швидкість фосфорилування. Частка фосфорилування у споживанні кисню у стані 3 зменшувалася, а частка калієвого циклу зростала, отже, відбувалося пригнічення системи синтезу АТФ унаслідок роз'єднання дихального ланцюга. Зазначені раніше дослідники встановили, що в основі цих ефектів лежить безпосереднє інгібування H^+ -АТФази мітохондрій, яке призводить до пригнічення синтезу й гідролізу АТФ і неповного перетворення доданого АДФ. Отже, роз'єднання окисного фосфорилування внаслідок активації $K_{\text{АТФ}}$ -каналів діазоксидом виявляється як на рівні дихального ланцюга (uncoupling), так і на рівні внутрішньомолекулярного роз'єднання H^+ -АТФази мітохондрій без змін мітохондріального мембранного потенціалу $\Delta\Psi_m$ (decoupling). Це дало підстави припустити, що у фізіологічних умовах пригнічення синтезу АТФ унаслідок активації $K_{\text{АТФ}}$ -каналів виступає механізмом негативного зворотного зв'язку для підтримання низької концентрації АТФ і завдяки цьому — збереження високої функціональної активності $K_{\text{АТФ}}$ -каналу.

На ізольованих мітохондріях печінки щура встановлено, що як класичний активатор $K_{\text{АТФ}}$ -каналів діазоксид, так і його фторовмісні аналоги пригнічують АДФ-стимульоване дихання за умов

окиснення сукцинату натрію, і така дія може бути опосередкована інгібуванням активності сукцинатдегідрогенази [8]. Ці ж автори показали, що активація $K_{\text{АТФ}}$ -каналів за допомогою вказаних активаторів зумовлює роз'єднання процесів дихання і фосфорилування, а їх інгібітор 5-ГДК теж має роз'єднувальний вплив на окисне фосфорилування, про що свідчить збільшення контрольованого дихання і зменшення дихального коефіцієнта. Отже, у вказаних дослідженнях метаболічних ефектів вітчизняних активаторів $K_{\text{АТФ}}$ -каналів об'єктом вивчення були мітохондрії печінки, де кількість і особливості функціонування $K_{\text{АТФ}}$ -каналів можуть відрізнятися від таких у міокарді, що, очевидно, і стало причиною різних ефектів активаторів $K_{\text{АТФ}}$ -каналів.

Водночас результати цього дослідження узгоджуються з даними, отриманими іншими дослідниками на мітохондріях серця, які відзначали, що введення доксорубіцину щурам призводить до зниження ефективності функціонування НАДН-убіхінон-оксидоредуктазного комплексу, зокрема його заліzosірчанних білків FeS_2 , які є важливим компонентом процесу трансформації енергії в першому пункті спряження окиснення та фосфорилування в ланцюзі транспорту електронів мітохондрій [3]. Крім того, при введенні доксорубіцину зростає відсоток дефіциту убіхінону, а також зменшується сукцинат-убіхінон-оксидоредуктазна активність у мітохондріях серця, але зниження убіхінону для комплексу II незначне.

В одній із попередніх робіт методом висковольтного електрофорезу на папері з подальшою спектрофотометрією показано, що активатор $K_{\text{АТФ}}$ -каналів діазоксид і його фторовмісний аналог викликають помітні односпрямовані зміни показників енергетичного статусу в міокарді щурів, зокрема підвищують частку АТФ з одночасним зниженням АДФ, збільшують коефіцієнт порівняння. Імовірно, що обидві вказані речовини зумовили невелике збільшення об'єму мітохондріального матриксу, що призвело до прискорення синтезу АТФ, а збільшення коефіцієнта порівняння свідчить про інтенсифікацію прямої реакції перетворення АДФ з перевагою синтезу АТФ над його розпадом [9, 10].

Враховуючи, що потенційний кардіопротектор куркумін, як і фторовмісний аналог діазоксиду, справив помітний корекційний вплив на функціональну активність ізольованих КМЦ, ми припустили, що такий ефект куркуміну може бути зумовлений його здатністю сприяти покращенню енергетичних процесів у клітинах. На підставі отриманих результатів підтверджено корисні властивості цієї речовини. Зокрема, виявлено, що після сумісного застосування доксорубіцину та куркуміну показники дихання мітохондрій міокарда при використанні як субстрату окиснення сукцинату натрію

покращувалися (а в разі використання як субстрату окиснення глутамату практично не змінювалися, тому дані не наведено) порівняно з показниками у випадку застосування лише доксорубіцину. Так, активне дихання (V_3) зросло на 25 %, дихальний контроль (V_3/V_4) як показник ступеня спряженості окиснення з фосфорилуванням підвищився на 18 %, а коефіцієнт ефективності фосфорилування — на 12 %. Отже, за напрямком метаболічні ефекти куркуміну й аналога діазоксиду збігаються, хоча ефективність впливу аналога діазоксиду переважає ефективність куркуміну.

З метою вивчення можливого механізму дії куркуміну на фоні доксорубіцину ми провели дослідження з визначенням ролі $K_{\text{АТФ}}$ -каналів у регуляції енергетичного метаболізму мітохондрій щурів. Ми виходили з того, що введення доксорубіцину викликає ушкодження внутрішньої мітохондріальної мембрани, що призводить до різкого збільшення її проникності для іонів кальцію та перевантаження КМЦ цими катіонами. Відомо також, що транспорт іонів кальцію перебуває в тісному зв'язку з енергозалежним транспортом іонів калію в мітохондріях [1].

Вивчення швидкості транспорту іонів калію показало, що за умов дії доксорубіцину входження іонів калію в мітохондріях знизилася на 27,7 %, при сумісній дії доксорубіцину та куркуміну — на 11,5 %, а при застосуванні інгібітора АТФ-залежних калієвих каналів (5-ГДК) на тлі дії доксорубіцину з куркуміном — на 20 %.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що за умов введення куркуміну відбувається активація $K_{\text{АТФ}}$ -каналів. Отже, у механізмі дії куркуміну на енергозабезпечення мітохондрій міокарда щурів за умов експериментально викликаного введенням доксорубіцином оксидантного стресу значну роль відіграє транспортування іонів калію в мітохондріальний матрикс через $K_{\text{АТФ}}$ -канали. Саме ці канали як основні метаболічні датчики клітин серця можуть виступати тією спільною мішенню впливу природної речовини куркуміну і фторовмісного аналога діазоксиду, що зумовлює вияв кардіопротективних властивостей цих речовин в умовах доксорубіцинової моделі оксидантного стресу.

Висновки

Куркумін і фторовмісний аналог діазоксиду за відсутності доксорубіцину продемонстрували проаритмічну дію на ізольовані неонатальні кардіоміоцити щура, але обидва зумовили нормалізацію порушеної доксорубіцином ритмічності спонтанних скорочень кардіоміоцитів.

Куркумін і фторовмісний аналог діазоксиду за відсутності доксорубіцину не викликають значних змін амплітуди спонтанних скорочень ізольованих

неонатальних кардіоміоцитів щура й водночас на тлі дії доксорубіцину підвищують цей показник як порівняно з доксорубіцином, так і порівняно з контролем.

Куркумін і фторовмісний аналог діазоксиду нормалізують показники енергозабезпечення мітохондрій міокарда щурів за умов доксорубіци-

нової моделі оксидантного стресу, і така їх властивість пригнічується при блокаді АТФ-залежних калієвих каналів.

Спільною мішенню впливу куркуміну і фторовмісного аналога діазоксиду можуть виступати АТФ-залежні калієві канали — основні метаболічні датчики клітин серця.

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: концепція дослідження — К. Т.; збір матеріалу — К. Т., О. Л., І. С.; опрацювання джерел — І. С.; проведення досліджень — К. Т., О. Л., Л. Б., В. Н.; дослідження на ізольованих кардіоміоцитах — І. К.; аналіз результатів — К. Т., О. Л., В. Н.; науковий консультант — І. М.; написання і редактування тексту — К. Т., О. Л.

Література

- Акопова О. В., Носарь В. И., Маньковская И. Н. и др. Аккумуляция кальция в митохондриях печени крыс в условиях активации АТФ-зависимого K⁺-канала // Биохимия. — 2008. — Т. 73. — С. 1429–1437.
- Акопова О. В., Носарь В. И., Колчинская Л. И. и др. Влияние АТФ-зависимого входа K⁺ на систему окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс // Матер. XIX-го з'їзду Укр. фізіол. тов. ім. П. Г. Костюка з міжнарод. участю, присв. 90-річчю від дня народ. акад. П. Г. Костюка; Фізіол. журн. — 2014. — Т. 60. — С. 5.
- Бурлака А. П., Кучменко О. Б., Іанусевич І. І. та ін. Протекторний вплив активації біосинтезу убіхінону на функціонування ланцюга транспорту електронів митохондрий клітин органів щурів при введенні доксорубіцину // Доповіді НАН України. — 2012. — № 1. — С. 180–186.
- Лінник О. О., Древицька Т. І., Чорний С. А. та ін. Вплив доксорубіцину на культуру ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щурів // Вісник Вінницького НМУ. — 2014. — Т. 18. — С. 383–387.
- Миронова Г. Д., Качаева Е. В., Копылов А. Т. и др. Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал. I. Структура канала, механизмы его функционирования и регуляции // Вестн. Рос. акад. мед. наук. — 2007. — № 2. — С. 34–43.
- Миронова Г. Д., Качаева Е. В., Крылова И. Б. и др. Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал. II. Роль канала в защите сердца от ишемии // Вестн. Рос. акад. мед. наук. — 2007. — № 2. — С. 44–50.
- Нагорна О. О. Експериментальне обґрунтування доцільності застосування нікотинамідів для попередження кардіоміопатії доксорубіцинового генезу: Дис. ... канд. мед. наук. — К., 2006. — 162 с.
- Пивовар С. М., Коржов В. І., Струтинський Р. Б. та ін. Вплив фторовмісних активаторів митохондриальних аденозинтрифосфат чутливих калієвих каналів на окисне фосфорилування // Фізіол. журн. — 2006. — Т. 52. — С. 25–33.
- Тарасова К. В. Вікові зміни співвідношення аденіннуклеотидів в міокарді щурів при фармакологічній активації КАТФ каналів // Наук. вісник НМУ ім. О. О. Богомольця. — 2013. — № 4. — С. 22–26.
- Тарасова К. В., Французова С. Б. Вікові особливості енергетичного забезпечення міокарда: вплив активаторів КАТФ каналів // Проблеми старення и долголетия. — 2013. — Т. 22. — С. 273–290.
- Altieri P., Spallarossa P., Barisione C. et al. Inhibition of doxorubicin-induced senescence by PRAR δ activation agonists in cardiac muscle cells: cooperation between PRAR δ and Bel6 // PLoS One. — 2012. — Vol. 7. — P. e46126.
- Bazan C., Torres D., Barba T. et al. Contractility assessment in enzymatically isolated cardiomyocytes // Biophys. Rev. — 2012. — Vol. 4. — P. 231–243.
- Belostotskaya G. B., Darashina I. V., Golovanova T. A. et al. The estimation of freshly isolated rat cardiomyocytes functional state under oxidative stress // Regional Haemodyn. Microcircul. — 2008. — Vol. 7. — P. 85–92.
- Chance B., Williams G. The respiratory chain and oxidative phosphorylation // Adv. Enzymol. — 1956. — Vol. 17. — P. 65–134.
- Estabrook R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O₂ ratios // Methods Enzymol. — 1967. — Vol. 10. — P. 41–47.
- Eliseev R. A., Vanwinkle B., Rosier R. N. et al. Diazoxide-mediated preconditioning against apoptosis involves activation of cAMP-response element-binding protein (CREB) and NF κ B // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279. — P. 46748–46754.
- Garlid K. D., Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K⁺ cycle // Biochim. Biophys. Acta. — 2003. — Vol. 1606. — P. 23–41.
- González G., Zaldivar D., Carrillo E. et al. Pharmacological preconditioning by diazoxide downregulates cardiac L-type Ca²⁺ channels // Br. J. Pharmacol. — 2010. — Vol. 161. — P. 1172–1185.
- Kondrashova M. N., Fedotcheva N. I., Saakyan I. R. et al. Preservation of native properties of mitochondria in rat liver homogenate // Mitochondrion. — 2001. — Vol. 1. — P. 249–267.
- Lim C. C., Zuppinger C., Guo X. et al. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279. — P. 8290–8299.
- Lowry O., Rosebrough N., Fazz A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
- Menna P., Salvatorelli E., Minotti G. Doxorubicin degradation in cardiomyocytes // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2007. — Vol. 322. — P. 408–419.
- Sag C. M., Köhler A. C., Anderson M. F. et al. CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes // J. Mol. Cell. Cardiol. — 2011. — Vol. 51. — P. 749–759.
- Sirenko O., Crittenden C., Cromwell E. F. Assessing cardiac toxicity using stem cell-derived cardiomyocytes // Drug Discov. Devel. — 2013. — Vol. 16. — P. 12–25.
- Surova O., Nagibin V., Tumanovskaya L. et al. Effect of a low dose of proteasome inhibitor on cell death and gene expression in neonatal rat cardiomyocyte cultures exposed to anoxia-reoxygenation // Exp. Clin. Cardiol. — 2009. — Vol. 14. — P. 57–61.
- Szewczyk A., Kajma A., Malinska D. et al. Pharmacology of mitochondrial potassium channels: dark side of the field // FEBS Lett. — 2010. — Vol. 584. — P. 2063–2069.
- Timolati F., Ott D., Pentassuglia L. et al. Neuregulin-1 beta attenuates doxorubicin-induced alterations of excitation-contraction coupling and reduces oxidative stress in adult rat cardiomyocytes // J. Mol. Cell. Cardiol. — 2006. — Vol. 41. — P. 845–854.
- Tokarska-Schlattner M., Wallimann T., Schlattner U. Multiple interference of anthracyclines with mitochondrial creatine kinases: preferential damage of the cardiac isoenzyme and its implications for drug cardiotoxicity // Mol. Pharmacol. — 2002. — Vol. 61. — P. 516–523.
- Webster D. R., Patrick D. L. Beating rate of isolated neonatal cardiomyocytes is regulated by the stable microtubule subset // Am. J. Physiol. Heart. — 2000. — Vol. 278. — P. H1653–H1661.

АТФ-зависимые калиевые каналы — общая мишень кардиопротекторного влияния куркумина и фторсодержащего аналога диазоксида в условиях оксидантного стресса

Е. В. Тарасова¹, О. А. Линник², И. Н. Маньковская², Л. В. Братусь²,
В. И. Носарь², И. Г. Строкина¹, И. Н. Карвацкий¹

¹Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев

²Институт физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины, Киев

Цель работы — изучить функциональные показатели работы миокарда, окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца и влияние на них потенциальных кардиопротекторов — натурального вещества куркумина и синтетического вещества (фторсодержащего аналога фармакологического препарата — активатора АТФ-зависимых калиевых каналов диазоксида) в условиях доксорубициновой модели оксидантного стресса.

Материалы и методы. Кардиомиоциты выделяли из желудочков сердца 1–2-дневных крыс, в культуру добавляли 0,5 мкмоль/л доксорубина гидрохлорида, доксорубин с 20 мкмоль куркумина или с 40 мкмоль фторсодержащего аналога диазоксида. Регистрировали сокращения изолированных кардиомиоцитов при помощи системы IonOptix. Изучали показатели дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Результаты и обсуждение. Использование куркумина и аналога диазоксида на фоне действия доксорубина увеличивало амплитуду сокращений кардиомиоцитов с $(4,07 \pm 0,51)$ до $(6,65 \pm 0,37)$ и $(5,5 \pm 0,8)$ %, вызывало нормализацию нарушенной доксорубицином ритмичности сокращений. Доксорубин вызывал снижение дыхательного контроля, коэффициента фосфорилирования и входа ионов калия в матрикс митохондрий. И фторсодержащий аналог диазоксида, и куркумин на фоне действия доксорубина увеличивали эти показатели. Транспорт ионов калия в митохондрии, сниженный доксорубицином на 27,7 %, при совместном действии доксорубина и куркумина уменьшился на 11,5 %, а при использовании ингибитора АТФ-зависимых калиевых каналов на фоне действия доксорубина с куркумином — на 20 % по сравнению с контролем.

Выводы. Использование куркумина и фторсодержащего аналога диазоксида увеличивает амплитуду и восстанавливает ритмичность спонтанных сокращений кардиомиоцитов в условиях оксидантного стресса, нормализует показатели энергообеспечения митохондрий миокарда, и такое их свойство реализуется, в частности, за счет активации АТФ-зависимых калиевых каналов.

Ключевые слова: АТФ-зависимые калиевые каналы, доксорубин, куркумин, фторсодержащий аналог диазоксида, изолированные неонатальные кардиомиоциты, митохондрии, окислительное фосфорилирование.

ATP-dependent potassium channels as total target of cardioprotective effect of curcumin and fluorinated analogue of diazoxide in oxidative stress conditions

К. В. Tarasova¹, О. О. Lynnyk², I. M. Mankovska², L. V. Bratus²,
V. I. Nosar², I. G. Strokin¹, I. M. Karvatsky¹

¹О. О. Bogomolets National Medical University, Kyiv

²О. О. Bogomolets Institute of Physiology of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

The aim — to study the functional performance of the myocardium, oxidative phosphorylation in the mitochondria of the heart and the effects produced on them by potential cardioprotectors — natural substance of curcumin and synthetic substance (fluorine-containing analog of pharmacological preparation — activator of ATP-dependent potassium channels of diazoxide) in doxorubicin model of oxidative stress.

Materials and methods. Cardiomyocytes were isolated from the ventricles of heart of 1–2-day-old neonatal rats. 0.5 $\mu\text{M/L}$ of doxorubicin hydrochloride were added into the culture along with 20 μM of curcumin or with 40 μM of fluorine-containing analogue of diazoxide. Isolated cardiomyocytes contractions were recorded with the use of IonOptix system. Respiration and oxidative phosphorylation in mitochondria were studied.

Results and discussion. The use of curcumin and analogue of diazoxide at the background of doxorubicin increased the amplitude of cardiomyocytes contraction from (4.07 ± 0.51) to (6.65 ± 0.37) and (5.5 ± 0.8) % and caused the normalization of contractions rhythmicity which was previously violated by doxorubicin. Doxorubicin caused the decrease of respiratory control, coefficient of phosphorylation and potassium ions entrance into the mitochondria matrix. Both fluorinated analog of diazoxide and curcumin on the background of doxorubicin increased these figures. Potassium ions transport into mitochondria was decreased by 27.7 % under doxorubicin action, by 11.5 % under the common action of doxorubicin and curcumin, by 20 % under the inhibitor of ATP-dependent potassium channels against the background of combination of doxorubicin and curcumin.

Conclusions. The use of curcumin and fluorine-containing analogue of diazoxide increases the amplitude and restores the rhythmicity of spontaneous cardiomyocyte contractions in oxidative stress conditions, normalizes the parameters of energy supply in myocardium mitochondria. This property of theirs is realized, in particular, through the activation of ATP-dependent potassium channels.

Key words: ATP-dependent potassium channels, doxorubicin, curcumin, fluorine-containing analogue of diazoxide, isolated neonatal cardiomyocytes, mitochondria, oxidative phosphorylation.