

© Струтинська Н.А.

УДК: 577.35+612146

Струтинська Н.А.

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, відділ фізіології кровообігу (вул. Богомольця, 4, м. Київ, Україна, 01024)

ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВАЦІЯ АТФ - ЗАЛЕЖНИХ КАЛІЄВИХ КАНАЛІВ - ВАЖЛИВИЙ МЕХАНІЗМ РЕГУЛЯЦІЇ ЦИКЛОСПОРИН - ЧУТЛИВОЇ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ПОРИ У СЕРЦІ ЩУРІВ

Резюме. Досліджено вплив активаторів АТФ - залежних калієвих каналів ($K_{\text{АТФ}}$ -каналів) флокаліну і тіофлокаліну на чутливість мітохондріальної пори (МП) до дії її природного індуктора Ca^{2+} у серці щурів. Встановлена концентраційна залежність впливу як флокаліну, так і тіофлокаліну (10^{-7} - 10^{-4} моль/л) на величини Ca^{2+} -індукованого набухання мітохондрій у серці з напівмаксимальними ефектами інгібування $\text{IC}_{50}=50$ та $\text{IC}_{50}=2,7$ мкмоль/л відповідно та більш потужною кардіопротекторною дією останнього. Показано, що введення цих сполук у досліді *in vivo* знижує чутливість МП до дії Ca^{2+} . Отримані дані дозволили окреслити їх роль як кардіопротекторів і регуляторів утворення МП у серці, вказуючи на їх антиішемічний і антиапоптотичний ефекти.

Ключові слова: флокалін, тіофлокалін, $K_{\text{АТФ}}$ -канали, мітохондріальна пора, серце.

Вступ

АТФ - залежні калієві ($K_{\text{АТФ}}$) канали сарколемальних і мітохондріальних мембран є одним із головних ендогенних, природних механізмів кардіопротекції при гіпоксії та ішемії міокарда. Особливістю цих мембранних каналів є їх властивість відкриватися в відповідь на зниження внутрішньоклітинного рівня АТФ нижче мілімолярних рівнів, наслідком чого є запуск компенсаторних та захисних механізмів [Мойбенко та ін., 2008]. Зокрема, такі ключові природні механізми кардіопротекції, як ішемічне прекодиціювання та посткодиціювання опосередковуються активністю цих каналів [Hanley and Daut, 2005; Yang et al., 2004]. Як виявилось, відкривати $K_{\text{АТФ}}$ -канали можна і фармакологічним шляхом за допомогою їх активаторів, що отримало назву фармакологічного прекодиціювання [Wakahara et al., 2004].

Навантаження Ca^{2+} і оксидативний стрес є відомими індукторами неселективної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори (МП), яка є важливим регулятором функціонування мітохондрій як за фізіологічних, так і патологічних умов [Elrod et al., 2013; Webster, 2012]. Відкривання МП може призводити до загибелі клітин (некроз, апоптоз), а попередження її відкривання є одним із механізмів кардіопротекції, зокрема фармакологічними методами [Quindry et al., 2012; Webster, 2012]. Зовсім недавно було показано антиапоптотичні та антинекротичні ефекти нового вітчизняного активатора вищезазначених каналів флокаліну [Струтинський та ін., 2013]. Метою роботи було вивчення впливу нових вітчизняних активаторів $K_{\text{АТФ}}$ -каналів флокаліну та тіофлокаліну на кальційіндуковане відкривання МП у серці щурів.

Матеріали та методи

Досліди проведено на дорослих (6 міс., масою 220 - 250 г) щурах лінії Вістар. Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [Сагач та ін., 2004]. В експериментах *in vivo* одноразове введення щурам флокаліну чи тіофлокаліну у дозі 2 мг/кг здійснювали

за 30 хв. до декапітації тварин. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програми Origin 7.0 ("Microcall Inc.", США).

Результати. Обговорення

Результатом відкривання мітохондріальних $K_{\text{АТФ}}$ -каналів (міто $K_{\text{АТФ}}$ -каналів) є надходження іонів калію до мітохондрій, що викликає деполаризацію їх внутрішньої мембрани та одночасне пасивне надходження аніонів слабких кислот та води в матрикс мітохондрії та його набуханням. Встановлено, що флокалін і тіофлокалін викликали характерне для активації згаданих каналів помірне набухання ізольованих мітохондрій серця щурів (з максимальним рівнем за концентрації 10^{-5} та 10^{-7} моль/л відповідно), яке попереджалося специфічним інгібітором цих каналів 5-гідроксидеканоевою кислотою (5-ГД), що нам дозволило ідентифікувати нові вітчизняні фармакологічні сполуки як відкривачі міто $K_{\text{АТФ}}$ -каналів. Водночас класичний інгібітор МП циклоспорин А (10^{-5} моль/л) не впливав на їх ефекти.

Характерні криві спонтанного (контроль у безкальцієвому середовищі) та кальційіндукованого набухання мітохондрій, що відбувалося внаслідок відкривання МП у серці щурів показані на рис. 1 а. Встановлено, що в умовах преінкубації мітохондрій з флокаліном і тіофлокаліном відбувалось зменшення рівня набухання органел у серці щурів (рис. 1 а). Отже, попереднє відкривання міто $K_{\text{АТФ}}$ -каналів новими фторвмісними активаторами попереджало кальційіндуковане відкривання МП у серці тварин. Причому їх ефекти мали дозозалежний характер. Зокрема, введення у інкубаційний розчин флокаліну у концентраціях 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ і 10^{-4} моль/л зменшувало величину набухання ізольованих мітохондрій серця щурів, що було індуковане іонами кальцію на 23, 89, 50, 45 і 100 % відповідно. Додавання тіофлокаліну (10^{-6} , $5 \cdot 10^{-6}$ і 10^{-5} моль/л) пригнічувало це набухання на 20, 18, 68, 96 і 100 % відповідно. Був встановлений напівмаксимальний ефект інгібування

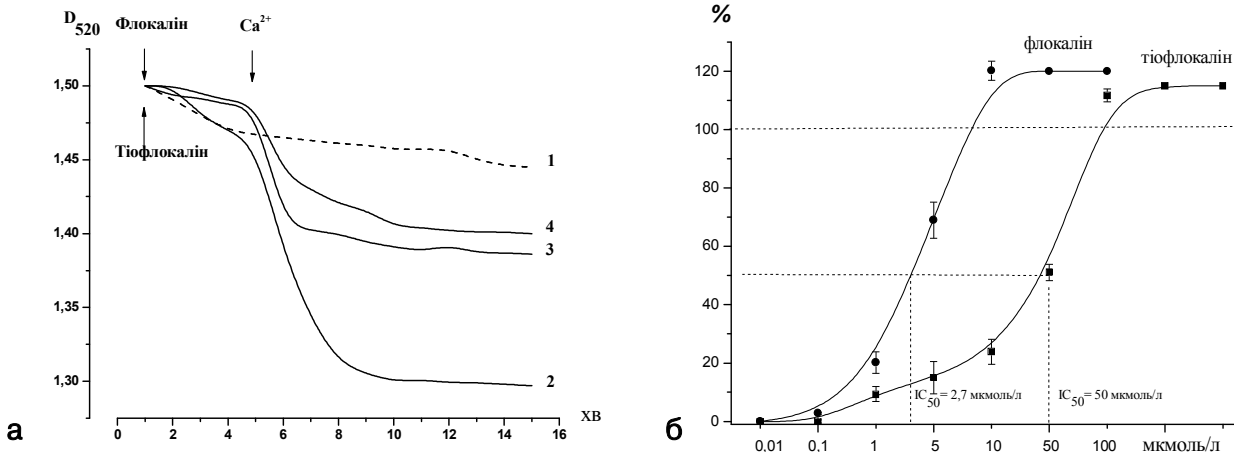


Рис. 1. Вплив попередньої активації мітоK_{АТФ}-каналів флокаліном та тіофлокаліном на Ca²⁺-індуковане набухання мітохондрій серця щурів (а) та криві доза-ефект (від 0 до 100%) (б): 1 - контроль, 2 - дія Ca²⁺ (10⁻⁴ моль/л), 3 - преінкубація з флокаліном (5 · 10⁻⁵ моль/л) та дія Ca²⁺, 4 - преінкубація з тіофлокаліном (5 · 10⁻⁶ моль/л) та дія Ca²⁺.

кальційіндукованого набухання мітохондрій і, як наслідок, відкриття МП, який становив 50 та 2,7 мкмоль/л для флокаліну та тіофлокаліну відповідно (рис. 1 б).

Відомо, що напівмаксимальна доза інгібування МП для пінацидилу (близький до них по структурі закордонний аналог) складає 128 мкмоль/л [Holmuhamedov et al., 1999]. Отже, нові вітчизняні активатори КАТФ-каналів значно ефективніше попереджують кальційіндуковане відкриття МП, ніж останній. Слід зауважити, що аналогічні напівмаксимальні ефекти іншого активатора цих каналів діазоксиду були близькими до ефектів флокаліну, та спостерігалися за його концентрації 65 мкмоль/л [Holmuhamedov et al., 1999]. Проте тіофлокалін попереджав відкриття МП у концентраціях на порядок нижчих, ніж діазоксид (2,7 і 50 мкмоль/л відповідно). Отримані результати свідчать про те, що тіофлокалін на порядок сильніше попереджує кальційіндуковане набухання МП, ніж флокалін та інші відомі активатори K_{АТФ}-каналів. Отже, нові фторвмісні активатори вищезазначених каналів є потужними інгібіторами відкриття МП і, таким чином, процесів апоптозу та некрозу кардіоміоцитів.

Процес пороутворення тісно пов'язаний зі зміною проникності мітохондріальних мембран, що характеризується різною їх чутливістю до дії індукторів. В експериментах *in vivo* досліджували одноразове введення щурам нових активаторів для встановлення чутливості МП до індуктора кальцію у серці (рис. 2). Так, показано, що ін'єкція як флокаліну, так і тіофлокаліну призводить до зменшення чутливості МП до Ca²⁺ (10⁻⁵-10⁻⁴ моль/л), з більш потужною кардіопротекторною дією останнього.

Відомо декілька можливих механізмів протекторної дії відкривачів K_{АТФ}-каналів мітохондріальних мембран. По-перше, їх активація викликає деполаризацію внутрішньої мембрани мітохондрій ($\Delta\Psi_m$), наслідком чого є зменшення рушійної сили для транспортування іонів

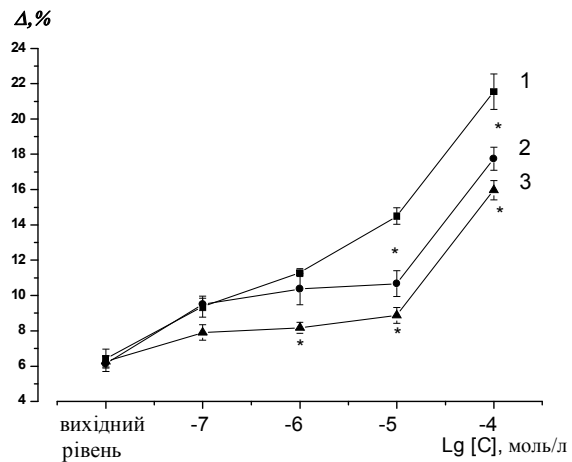


Рис. 2. Зміни чутливості мітохондріальної пори до індуктора Ca²⁺ у серці щурів за умов введення *in vivo* флокаліну і тіофлокаліну: 1 - контроль 2 - дія флокаліну (2 мг/кг), 3 - дія тіофлокаліну (2 мг/кг); * P < 0,05 порівняно з контролем.

кальцію у органели, що в свою чергу захищає мітохондріальний матрикс від їх перевантаження. З іншого боку, навантаження Ca²⁺ і оксидативний стрес є відомими індукторами МП. Згідно з альтернативною гіпотезою - активація цих каналів призводить до помірному набухання мітохондрії, що забезпечує зберігання функції міжмембранного простору та може попереджувати руйнування структури крист за ішемії. Третя гіпотеза стосовно кардіопротекторної дії одного з активаторів мітохондріальних K_{АТФ}-каналів діазоксиду припускає, що останній може модулювати продукування мітохондріями реактивних видів кисню [Cheng et al., 2010].

Отже, у цій роботі ми розглянули один із механізмів дії нових вітчизняних фторвмісних сполук. Індукція характерного для активації КАТФ-каналів помірного набухання ізольованих мітохондрій серця та його попередження специфічним інгібітором саме K_{АТФ}-каналів

мітохондріальної мембрани - 5-ГД дало змогу ідентифікувати флокалін та тіофлокалін як фармакологічні відкривачі цих каналів. В експериментах з кальційіндукованим набуханням мітохондрій показано, що активація калійселективної проникності у внутрішній мембрані мітохондрій даними активаторами призводить до дозозалежного інгібування відкривання МП у серці з більш потужною кардіопротекторною дією тіофлокаліна.

Таким чином, отримані дані щодо пригнічення відкривання МП, потужні кардіопротекторні властивості та виключно низька токсичність [Мойбенко та ін., 2008, 2009] дозволяє вважати нові вітчизняні фторвмісні активатори K_{ATP} -каналів флокалін та тіофлокалін перспективними для застосування в клінічній практиці.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. У досліджах *in vitro* на мітохондріях, ізольованих із тканини серця щурів, вперше показано, що нові вітчизняні фторвмісні сполуки флокалін та тіофлокалін є

фармакологічними відкривачами K_{ATP} -каналів внутрішньої мітохондріальної мембрани.

2. Встановлена концентраційна залежність їх впливу (10^{-7} - 10^{-4} моль/л) на величини кальційіндукованого набухання мітохондрій у серці з напівмаксимальними ефектами інгібування $IC_{50}=50$ та $IC_{50}=2,7$ мкмоль/л для флокаліну та тіофлокаліну відповідно, та більш потужною кардіопротекторною дією останнього.

3. Вперше показано, що у досліджах *in vivo* їх введення знижує чутливість мітохондріальної транспортної пори до дії Ca^{2+} , що за умов ішемії може бути потужним кардіопротекторним механізмом.

Зважаючи на те, що система K_{ATP} -каналів є одним із найважливіших ендогенних механізмів кардіопротекції та значно меншу токсичність флокаліну та тіофлокаліну (у 3 - 4 рази) порівняно з закордонними препаратами такого типу, та їх потужну кардіопротекторну дію, вважаємо за доцільне подальше дослідження властивостей нових вітчизняних оригінальних сполук з метою створення новітніх лікарських засобів.

Список літератури

- Вплив флокаліну на розвиток апоптозу та некрозу при аноксії-реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів / Р. Б. Струтинський, В. С. Нагібін, Н. А. Струтинська [та ін.] // Фізіол. журн. - 2013. - Т. 59, № 3. - С. 3-9.
- Мойбенко А. А. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / Мойбенко А. А., Досенко В. Е., Пархоменко А. Н. - Київ : Наук. думка, 2008. - 518 с.
- Організація заводського виготовлення препарату Флокалін - нового вітчизняного міотропного спазмолітика і кардіопротектора / О. О. Мойбенко, Р. Б. Струтинський, Л. М. Ягупольський [та ін.] // Наука та інновації. - 2009. - Т. 5, № 1. - С. 80 - 84.
- Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці щурів / В. Ф. Сагач, Г. Л. Вавілова, Н. А. Струтинська [та ін.] // Фізіол. журн. - 2004. - Т. 50, № 2. - С. 49 - 63.
- Cheng Y. Interaction of mitochondrial potassium channels with the permeability transition pore / Cheng Y., Debska-Vielhaber G., Siemen D. // FEBS Lett. - 2010. - Vol. 584, № 10 - P. 2005 - 2012.
- Difference in the cardioprotective mechanisms between Ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning by diazoxide in rat hearts / N. Wakahara, H. Katoh, Y. Yaguchi [et al.] // Circulation. - 2004. - Vol. 68. - P. 156 - 162.
- Elrod J. W. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore / Elrod J. W., Molkenin J. D. // Ibid. - 2013 - Vol. 77, № 5 - P. 1111 - 1122.
- Hanley P. J. (ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms / P.J. Hanley, J. K. Daut // J. Mol. Cell. Cardiol. - 2005. - Vol. 39, № 1. - P. 17-50.
- Holmuhamedov E. L. ATP-sensitive K^{+} channel openers prevent Ca^{2+} overload in rat cardiac mitochondria / E. L. Holmuhamedov, L. Wang, A. Terzic // J. Physiol. (London). - 1999. - Vol. 519, № 2. - P. 347 - 360.
- Ischemia reperfusion injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis / Quindry J. C., Miller L., McGinnis G. [et al.] // J. Appl. Physiol. - 2012. - Vol. 113, № 3. - P. 498 - 506.
- Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways / X. M. Yang, J. B. Proctor, L. Cui [et al.] // J. Amer. Coll Cardiol. - 2004. - Vol. 44, № 5. - P. 1103 - 1110.
- Webster K. A. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species / Webster K. A. // Future Cardiol. - 2012. - Vol. 8, № 6. - P. 863 - 884.

Струтинская Н.А.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ АТФ - ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ - ВАЖНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ЦИКЛОСПОРИН - ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ В СЕРДЦЕ КРЫС

Резюме. Исследовано влияние активаторов АТФ - зависимых калиевых каналов (K_{ATP} -каналов) флокалина и тиофлокалина на чувствительность митохондриальной поры (МП) к действию естественного индуктора Ca^{2+} в сердце крыс. Установлена концентрационная зависимость влияния как флокалина, так и тиофлокалина (10^{-7} - 10^{-4} моль/л) на величины Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий в сердце с полумаксимальными эффектами ингибирования $IC_{50} = 50$ и $IC_{50}=2,7$ мкмоль/л соответственно и более мощным кардиопротекторным действием последнего. Показано, что введение этих соединений в опытах *in vivo* снижает чувствительность МП к действию Ca^{2+} . Полученные результаты позволили определить их роль как кардиопротекторов и регуляторов образования МП в сердце, указывая на антиишемический и антиапоптотический эффекты.

Ключевые слова: флокалин, тиофлокалин, K_{ATP} -каналы, митохондриальная пора, сердце.

Strutynska N.A.

PHARMACOLOGICAL ACTIVATION OF ATP - DEPENDENT POTASSIUM CHANNELS IS AN IMPORTANT MECHANISM OF REGULATION OF CYCLOSPORINE - SENSITIVE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORES OPENING IN RAT HEARTS

Summary. The effects of openers of ATP-dependent potassium channels (KATP-channels), flocalin and tioflocalin, on the sensitivity

mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening to the its natural inductor Ca^{2+} in rat hearts were studied. We found that concentration-dependent inhibition effects (10^{-7} to 10^{-4} M) of flocalin (with $IC_{50}=50 \mu M$) and tioflocalin (with $IC_{50}=2,7 \mu M$) on Ca^{2+} -induced mitochondrial swelling (MPTP opening) in the heart characterized more powerful cardioprotective action of the latter. It was shown that the administration of these compounds in experiments in vivo decreased the sensitivity of the MPTP opening to Ca^{2+} . The results obtained allowed to characterized its role as cardioprotectors and regulators of the MPTP formation in the heart, indicated their anti-ischemic and anti-apoptotic.

Key words: flocalin, tioflocalin, K_{ATP} -channels, mitochondrial pore, heart, rats.

Стаття надійшла до редакції 21.05.2014 р.

Струтинська Наталія Андріївна - к. біол. н., ст. наук. співроб. відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України; +38 044 256-24-96, +38 097 691-75-37; na-strutynska@biph.kiev.ua

© Сухомлин А.А., Непорада К.С., Берегова Т.В.

УДК: [616.316.4:615.35] - 092.9 - 085.33

Сухомлин А.А.¹, Непорада К.С.¹, Берегова Т.В.²

¹ВДНЗ України "Українська медична стоматологічна академія", кафедра медичної, біоорганічної та біологічної хімії (вул. Шевченка, 23, м. Полтава, Україна, 36011), ²Київський національний університет імені Тараса Шевченка (вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601)

КОРЕКЦІЯ МЕЛАНІНОМ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ТА ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ В СЛИННИХ ЗАЛОЗАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГІПЕРГАСТРИНЕМІЇ

Резюме. Експерименти виконані на 35 білих щурах-самцях. За умов тривалої омепразол-індукованої гіпергастринемії відбувається інтенсифікація вільнорадикальних процесів та розвиток протеїназно-інгібіторного дисбалансу за декомпенсаторним типом у слинних залозах щурів. Експериментальна корекція меланіном сприяє нормалізації патологічних змін в тканинах слинних залоз щурів на тлі довготривалого введення інгібітора протонної помпи, про що свідчить пригнічення вільнорадикального окиснення, підвищення активності ферментних антиоксидантних систем та нормалізація протеїназно-інгібіторного балансу.

Ключові слова: слинні залози, меланін, омепразол, гіпергастринемія, протеоліз, оксидативний стрес.

Вступ

На теперішній час захворювання травного тракту посідають третє місце в загальній структурі захворюваності і їх розповсюдженість постійно зростає. Для лікування кислотозалежних захворювань широко застосовуються антисекреторні засоби, зокрема, інгібітори протонної помпи (ІПП): омепразол, лансопрозол та інші, які знижують шлункову секрецію, що призводить до розвитку гіпергастринемії [Olbe, Cederberg et al 1989]. Механізм розвитку гіпергастринемії, перш за все, полягає в довготривалому застосуванні ІПП, які шляхом пригнічення H^+/K^+ -АТФази призводять до гіпоацидитету, що стимулює G-клітини антрального відділу шлунку секретувати гастрин.

Меланіни відносяться до одного з класів конденсованих фенольних сполук, які утворюються в результаті ферментативного окиснення, аутоокиснення і поліконденсації багатьох простих фенольних попередників. Однією з форм меланінів в біологічних тканинах є еумеланін, коричнево-чорний полімер дигідроксиіндола, дигідроксиіндолкарбоксилітової кислоти та їх відновленої форми. Збільшення синтезу меланіну стимулюється пошкодженням ДНК ультрафіолетовим випромінюванням [Борщевская, Васильева, 1999].

Меланін володіє вираженою цитопротекторною дією на слизову оболонку шлунка щурів, знижуючи активність процесів перекисного окиснення ліпідів та збільшує активність ферментів антиоксидантної системи [Савицький, 2002].

Метою дослідження було вивчення впливу меланіну на патологічні зміни в слинних залозах щурів в умовах омепразол-індукованої гіпергастринемії.

Матеріали та методи

Експерименти виконані на 35 білих щурах-самцях, вагою 180 - 220 г з дотриманням рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень згідно з Європейською конвенцією. Дослідним тваринам протягом 28 днів внутрішньоочеревинно вводили омепразол ("Sigma", США) дозою 14 мг/кг, меланін ("Sigma", США) (5 мг/кг маси тіла перорально) окремо та в поєднанні. Контрольним щурам протягом 28 днів внутрішньоочеревинно вводили 0,2 мл води для ін'єкцій. По завершенню експерименту щурам вранці натщесерце проводили евтаназію під уретановим наркозом (50 мг/кг маси тіла внутрішньоочеревинно) шляхом кровопускання та збирали кров для визначення вмісту гастрину радіоімунологічним методом за допомогою аналітичного набору "MP Biomedicals, LLC" (USA). Об'єктами дослідження були піднижньощелепні слинні залози, в гомогенаті яких визначали активність каталази [КФ 1.11.1.6] [Королюк и др., 1988], супероксиддисмутази [КФ 1.15.1.1] (СОД) [Кайдашев, 2003], ТБК-реактивності [Стальная, Гаришвили, 1977], загальну протеолітичну активність [Уголев, Иезуитова, 1969] та загальну антириптичну активність [Веремеенко и др. 1988]. Отри-