

О.І. Войтичук, О.О. Мойбенко, Я.М. Шуба

Модуляція збудливості кардіоміоцитів активатором аденозотрифосфатзалежних калієвих каналів флокаліном

Аденозотрифосфатзалежні калієві (K_{ATP}) канали, що активуються при зниженні відношення АТФ/АДФ, пов'язують мембранний потенціал клітин та їх збудливість з енергетичним балансом і метаболізмом. За патологічних умов гіпоксії та ішемії активація K_{ATP} -каналів плазматичної мембрани сприяє зменшенню збудливості клітин і входу кальцію, справляючи цитопротекторний ефект. У цій роботі було досліджено дію нового активатора K_{ATP} -залежних каналів – фторемісного аналога пінацидиду флокаліну на збудливість нативних культивованих неонатальних кардіоміоцитів щурів та активність рекомбінантного, кардіоспецифічного K_{ATP} -каналу в клітинах НЕК 293 зі стабільною гетерологічною експресією Kir6.2- і SUR2A-субодиниць, які його утворюють (НЕК-293_{6,2/2A}). Було виявлено, що в передсердних, шлуночкових і спонтанно скоротливих неонатальних кардіоміоцитах флокалін в концентрації 5 мкмоль/л викликає зворотну гіперполяризацію та значне зменшення тривалості потенціалу дії (ПД). У передсердних і шлуночкових епікардіальних клітинах знижуються також амплітуда та початкова швидкість наростання ПД. Флокалін значно зменшував частоту скорочень і зворотно знижував потенціал спокою спонтанно скоротливих кардіоміоцитів. У НЕК-293_{6,2/2A}-клітинах флокалін дозозалежно активував часонезалежний калієвий струм з внутрішнім випрямленням через гетерологічно експресовані K_{ATP} -канали. Концентрація половинної активації струму флокаліном становила 8,8 мкмоль/л, а крутість кривої дозозалежності вказувала на існування позитивної кооперативності при взаємодії флокаліну з K_{ATP} -каналами. Наші результати показують, що флокалін є ефективним інгібітором електричної та скоротливої активності кардіоміоцитів завдяки “відкриванню” кардіоспецифічних K_{ATP} -каналів і що ця його властивість значною мірою може лежати в основі кардіопротекції.

Ключові слова: неонатальні кардіоміоцити, клітини лінії НЕК-293, аденозотрифосфатзалежні калієві канали, потенціал спокою, потенціал дії, флокалін.

ВСТУП

Збільшення базальної калієвої провідності клітин призводить до їх гіперполяризації та пригнічення фізіологічної активності, а тому представники класу речовин, відомих під назвою “відкривачі калієвих каналів” (від англ. potassium channel openers) широко застосовуються як препарати для гальмування різноманітних клітинних функцій. Серед мішеней дії цих препаратів особливе місце займають АТФ-залежні калієві канали (K_{ATP} -канали), функціональний стан

яких регулюється співвідношенням внутрішньоклітинної концентрації ключових метаболічних лігандів – АТФ та АДФ, причому АТФ викликає закривання, а Mg^{2+} АДФ – відкриває K_{ATP} -канали, завдяки чому вони відіграють зв'язувальну роль між метаболічним станом клітин і ступенем їх фізіологічної активності [5].

Уперше на функціональному рівні калієві канали, що здатні активуватися при зниженні внутрішньоклітинної концентрації АТФ ($[ATP]_i$) до субмілімолярного рівня, були ідентифіковані в кардіоміоцитах, де їх

© О.І. Войтичук, О.О. Мойбенко, Я.М. Шуба

щільність у поверхневій мембрані є особливо значною [21]. Одразу ж після відкриття було встановлено роль цих каналів у кардіопротекції при ішемії завдяки тому, що їх активація призводить до скорочення серцевого потенціалу дії (ПД), зменшення надходження кальцію в кардіоміоцити і, як наслідок, до пригнічення їх скоротливості та споживання енергії [20]. Крім серця, K_{ATP} -канали широко представлені також у багатьох інших типах тканин з високим рівнем фізіологічної активності – клітинах підшлункової залози, гладеньких і скелетних м'язів, ендотелію кровеносних судин, центральних і периферичних нейронах, ендокринних клітинах [6, 8, 28, 31]. Відомими наслідками активації цих каналів є релаксація васкулярних гладеньких м'язів і зниження тону судин, пригнічення секреції інсуліну в-клітинами підшлункової залози, нейромедіаторів нейронами та гормонів ендокринними клітинами.

K_{ATP} -канали є гетерооктамерними білковими комплексами плазматичної мембрани, що складаються із 4 пороутворювальних субодиниць калієвих каналів внутрішнього випрямлення (Kir) і 4 регуляторних субодиниць – рецепторів сульфонілсечовини (SUR) з родини ABC (від англ. ATP-binding cassette) транспортерів [6]. Тканиноспецифічні підтипи K_{ATP} -каналів відрізняються складом субодиниць, що їх утворюють, серед яких можуть зустрічатися дві Kir-субодиниці – Kir6.1 або Kir6.2 і три SUR-субодиниці – SUR1, SUR2A, SUR2B [4]. Гетеромультимери з різним субодиничним складом характеризуються відмінними біофізичними властивостями, провідністю поодинокого каналу, регуляцією нуклеотидами та фармакологією [6, 11, 18, 25]. Так, K_{ATP} -канали кардіоміоцитів і скелетних м'язів складаються з 4 Kir6.2-субодиниць та 4 SUR2A-субодиниць [7, 15, 17], васкулярних гладеньких м'язів – з 4 Kir6.1 та 4 SUR2B, а панкреатичних в-клітин – з 4 Kir6.2 та 4 SUR1 [18, 31]. SUR-

субодиниця K_{ATP} -каналу забезпечує регуляцію його активності нуклеотиддифосфатами, інгібіторами та активаторами, тоді як Kir6-субодиниці визначають іонпровідні властивості та містять ділянку, відповідальну за блокування каналу молекулами АТФ [10].

Визнання важливої функціональної ролі K_{ATP} -каналів привернуло особливу увагу до їх фармакології. Речовини класу сульфонілсечовин, найвідомішим представником яких є глібенкламід, взаємодіючи із SUR-субодиницями блокують K_{ATP} -канали, завдяки чому вони використовуються для терапії діабету 2-го типу [22]. Представники групи хімічно різнорідних речовин – “відкривачів” K_{ATP} -каналів, які теж взаємодіють із SUR-субодиницями, здатні активувати канали незалежно від вмісту внутрішньоклітинного АТФ, а тому вони знаходять застосування як релаксанти васкулярних гладеньких м'язів та кардіопротекторів. Відкриття кардіопротекторних властивостей K_{ATP} -каналів в умовах гіпоксії та ішемії серця, а також їх гіпотензивна дія стимулювали розробку нових “відкривачів” цих каналів. Крім відомих пінацидилу та діазоксиду було синтезовано низку інших сполук: кромакалім (бензопірани), априкалім (тіоформаміди), міноксидил (піримідини) тощо [1]. Також була створена група фторвмісних аналогів пінацидилу та діазоксиду – флокалін, тіофлокалін, діазоФм та діазоФп, які виявилися менш токсичними та мали більшу тривалість дії на дослідних тваринах і препаратах цілих органів [30]. Однак дослідження безпосереднього впливу фторвмісних препаратів на електричну активність ізольованих кардіоміоцитів та основну мішень їх дії – K_{ATP} -канали практично відсутні.

Мета нашої роботи – дослідити дію активатора K_{ATP} -каналів – фторвмісного аналога пінацидилу флокаліну на електричну збудливість культивованих неонатальних кардіоміоцитів з різних ділянок

серця щурів та на рекомбінантні кардіоспецифічні K_{ATP} -канали, гетерологічно експресовані в лінії ембріональних ниркових клітин людини НЕК-293.

МЕТОДИКА

Первинна культура неонатальних кардіоміоцитів. Для виділення та культивування неонатальних серцевих міоцитів щурів використовували загальноприйняту процедуру з незначними змінами [23]. Відразу після декапітації 3-добових щурів серця асептично виділяли і поміщали в модифікований розчин Тіроде при 0°C такого складу (ммоль/л): NaCl – 144, KCl – 4, MgSO_4 – 1, KH_2PO_4 – 1,2, Na_2HPO_4 – 0,43, піруват натрію – 5, HEPES – 10, глюкоза – 10, pH 7,35. Після подрібнення шматочки тканини розміром близько 1 мм^3 поміщали на 4–5 хв у фізіологічний розчин при 21°C , який прогазовували карбогеном (суміш $95\% \text{ O}_2$ та $5\% \text{ CO}_2$). Ферментативне диспергування тканини проводили у фізіологічному розчині з додаванням $0,46\text{ мг/мл}$ колагенази (Type IA, «Sigma-Aldrich», США) при 37°C легко перемішуючи та прогазовуючи карбогеном в 3 етапи по 10 хв із заміною розчину в кінці кожного етапу. Потім тканину піпетували, центрифугували при малих обертах (3000 хв^{-1}), і після видалення супернатанту переміщували в фізіологічний розчин, що містив Ca^{2+} в концентрації $0,2\text{ ммоль/л}$, яку поступово підвищували до $1,5\text{ ммоль/л}$ протягом 1 хв. Це давало змогу підготувати толерантні до кальцію клітини до перенесення в розчин з фізіологічною концентрацією кальцію. Після центрифугування при низьких обертах (3000 хв^{-1}), супернатант видаляли, клітини поміщали в середовище для культивування DMEM з додавання 10% -ї телячої сироватки та піпетували. З суспензії, яку отримали, клітини наносили із щільністю близько $2 \cdot 10^5\text{ см}^{-2}$ на покриті желатином скельця («Sigma Aldrich», США) і поміщали

в чашки Петрі із культуральним середовищем. Клітини інкубували в атмосфері газів $5\% \text{ CO}_2$ і $95\% \text{ O}_2$ при 37°C протягом 1–3 діб. Кожні 24 год культуральне середовище замінювали на свіже. Життєздатні клітини, що прикріпилися до скла, спонтанно скорочувалися через 12 год після осадження. Характер і частота скорочень кожного кардіоміоциту були різними і не залежали від активності сусідніх клітин. Серцеві клітини припиняли скорочення після видалення культурального середовища та подачі постійного потоку фізіологічного розчину. Для електрофізіологічних дослідів використовували клітини, що виявляли скоротливу активність у середовищі для культивування.

Культура ембріональних клітин нирок НЕК293. Клітини НЕК-293, що стабільно експресують гени Kir6.2 і SUR2A (клітини НЕК-293_{6.2/2A}) були нам надані професором Ендрю Тінкером (Університетський коледж Лондона, Великобританія). Клітини культивували за стандартним методом у середовищі MEM з додаванням 10% -ї фетальної телячої сироватки («Gibco», США). Середовище замінювали на свіже, і клітини розріджували кожні 3–4 доби, щоб не допустити утворення суцільного шару. Перед електрофізіологічним дослідом культуральне середовище замінювали на стандартний розчин Тіроде.

Електрофізіологічні експерименти та розчини. Досліди проводили з допомогою методу patch-clamp у конфігурації “ціла клітина” при 36°C з використанням підсилювача PC-ONE («Dagan Corp.», США), аналогово-цифрового перетворювача Digidata 1200A («Axon Instr.», США) персонального комп’ютера та програмного забезпечення pCLAMP-8 («Axon Instr.», США). Для швидкої зміни зовнішньоклітинних розчинів (близько 1 с) та прикладання речовин в умовах сталої температури використовували багатоканальну, термостабілізовану мікроперфузійну систему власної розробки. Реєструвальні скляні

мікропіпетки виготовляли за допомогою витяжки Р 97 («Sutter Instr. Co.», США) із боросилікатних капілярів із зовнішнім діаметром 1,5 мм («World Precision Instruments», США). Після заповнення внутрішнім розчином піпетки мали опір 1–3 МОм. Для обробки та аналізу записів і візуалізації результатів використовували програмне забезпечення Matlab («Mathworks Corp.», США) і Origin («OriginLab Corp.», США).

Стандартний зовнішньоклітинний розчин Тіроде, в якому проводили контрольні виміри та в який додавали досліджувані сполуки, мав такий склад (ммоль/л): NaCl – 144, KCl – 5,4, CaCl₂ – 1,8, MgCl₂ – 1,2, NaH₂PO₄ – 1, HEPES – 10, глюкоза – 10, рН 7,4. Реєструвальну мікропіпетку заповнювали штучним внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): KCl – 20, KOH – 105, глюконат калію – 15, NaCl – 15, аспарагінова кислота – 65, MgCl₂ – 1, HEPES – 10, Mg²⁺-АТФ – 4, сахароза – 5°, рН 7,2 (доводили з допомогою аспарагінової кислоти). Усі реактиви, які використовували для приготування розчинів були від фірми «Sigma-Aldrich», (США). Флокалін (отриманий у Інституті органічної хімії НАН України) [30] і глібенкламід попередньо розчиняли у диметилсульфоксиді (ДМСО) в концентрації 40 та 100 ммоль/л відповідно і додавали до розчину Тіроде в необхідній концентрації. Концентрація ДМСО у розчинах не перевищувала 0,05 %.

Обробка результатів. Показники ПД кардіоміоцитів – амплітуду, початкову швидкість наростання (ПШН) і тривалість на рівні 90 % реполяризації обчислювали згідно з процедурою, описаною в нашій попередній роботі [26]. При побудові вольт-амперних характеристик (ВАХ) струмів, їх амплітуди нормувалися до значення ємності клітинної мембрани для отримання значень густин струму.

РЕЗУЛЬТАТИ

Вплив флокаліну на електричну активність ізольованих кардіоміоцитів. Після встанов-

лення експериментальної patch-clamp конфігурації “ціла клітина” загальну збудливість кардіоміоцитів досліджували в режимі фіксації струму. При цьому неперервно реєстрували потенціал спокою (ПС) і ПД кардіоміоцита, які викликали деполяризуючими імпульсами струму амплітудою 400 пА, тривалістю 2 мс і частотою 0,25 Гц. Оскільки штучний внутрішньоклітинний розчин, яким заповнювалася реєструвальна patch-піпетка не містив кальцієвих хелаторів, то генерація кожного ПД супроводжувалася незначними скороченнями кардіоміоцита. Спочатку протягом 2–3 хв проводили контрольну реєстрацію електричної активності для того, щоб запобігти перехідним змінам ПС і ПД, пов’язаним із діалізом клітини штучним внутрішньоклітинним розчином, та оцінити контрольні значення ПС і показників ПД [27]. Після стабілізації показників електричної активності за контрольних умов прикладали флокалін і спостерігали за змінами активності, які він викликає, а після припинення цих змін препарат відмивали.

Дію флокаліну в концентрації 5 мкмоль/л на ПД неонатальних кардіоміоцитів з різних ділянок серця зображено на рис. 1. У шлуночкових клітинах ендокарда, епікарда та клітинах передсердя флокалін гіперполяризував ПС приблизно на 3 мВ і значно скорочував тривалість ПД. При відмивці препарату всі показники частково відновлювалися. При цьому, однак, скорочення ПД епікардальних клітин було найменш зворотним. Зміни ПС і тривалості ПД при додаванні флокаліну і після його відмивання фізіологічним розчином відбувалися найшвидше у ендокардальних шлуночкових кардіоміоцитах, а найповільніше – у передсердних кардіоміоцитах. В ендокардальних шлуночкових клітинах також спостерігалось найбільше спотворення форми ПД, яке полягало у тому, що флокалін переважно скорочував фазу плато, тоді як в інших типах клітин форма ПД змінювалася більш пропорційно його тривалості.

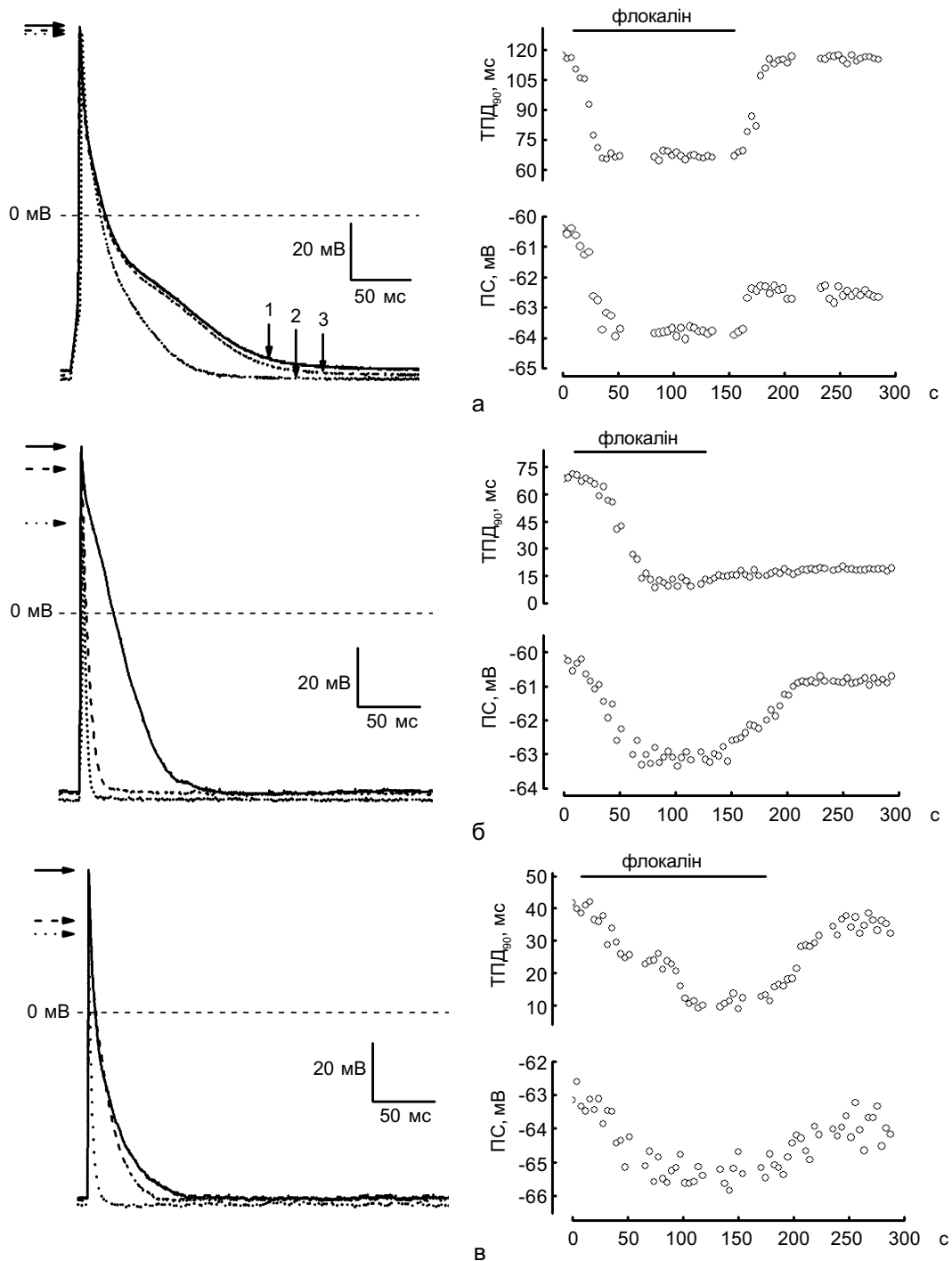


Рис. 1. Вплив флокаліну на потенціал спокою (ПС) і потенціал дії (ПД) підтипів неонатальних кардіоміоцитів. На лівих графіках наведені типові записи ПД вентрикулярних ендокардіальних (а) і епікардіальних (б) кардіоміоцитів, а також кардіоміоцитів передсердя (в) за контрольних умов (1), при аплікації 5 мкмоль/л флокаліну (2) та після відмивання флокаліну протягом 5 хв (3); амплітуди ПД за вказаних умов позначені відповідними стрілками. Справа показано динаміку тривалості ПД на рівні 90 % реполяризації (ТПД₉₀) і ПС відповідних кардіоміоцитів при прикладанні флокаліну

Введення флокаліну практично не впливало на амплітуду та ПШН ПД у шлуночкових ендокардіальних клітинах, але помітно зменшував ці показники в епікардіальних і передсердних клітинах (рис. 2). Викликані впливом флокаліну зміни амплітуди та ПШН ПД були повністю зворотними в епікардіальних міоцитах і практично незворотними в передсердних міоцитах, в яких за час відмивання препарату (близько 2 хв) вони майже не поверталися до контрольних значень. Таким чином, зворотність дії флокаліну на тривалість ПД та його амплітудні характеристики в епікардіальних і передсердних міоцитах є протилежною, що може свідчити про вплив цього препарату на декілька типів іонних каналів, які по-різному експресуються в цих клітинах.

На кардіоміоцитах, які виявляли спонтанну скоротливу активність, ми реєстрували нестимульовану генерацію періодичних ПД з частотою 1–2 Гц. Прикладання 5 мкмоль/л флокаліну до таких кардіоміоцитів

приводили до слабозворотного зниження їх ПС на 8–12 мВ і значного зменшення частоти генерації ПД і спонтанних скорочень (рис. 3). У середньому частота ПД і скорочень зменшувалися в 2–3 рази, хоча досліджені клітини були досить гетерогенними за цим показником. Під час дії флокаліну в частині популяції спонтанно скоротливих клітин можна було спостерігати появу деякої аритмічності скорочень, що сильніше проявлялися після відмивання речовини фізіологічним розчином. Під впливом флокаліну скорочувалася також тривалість спонтанних ПД і дещо зростали їх амплітуда та ПШН у фазі деполяризації.

Дія флокаліну на гетерологічно експресовані K_{ATP} -канали. Оскільки флокалін є фторвмісним аналогом пінацидилу – “відкривачем” K_{ATP} -каналів з найвищою специфічністю до їх серцевих і васкулярних підтипів [30] і попередні, непрямі дані свідчать, що однією з основних мішеней кардіопретекторної дії флокаліну є саме ці

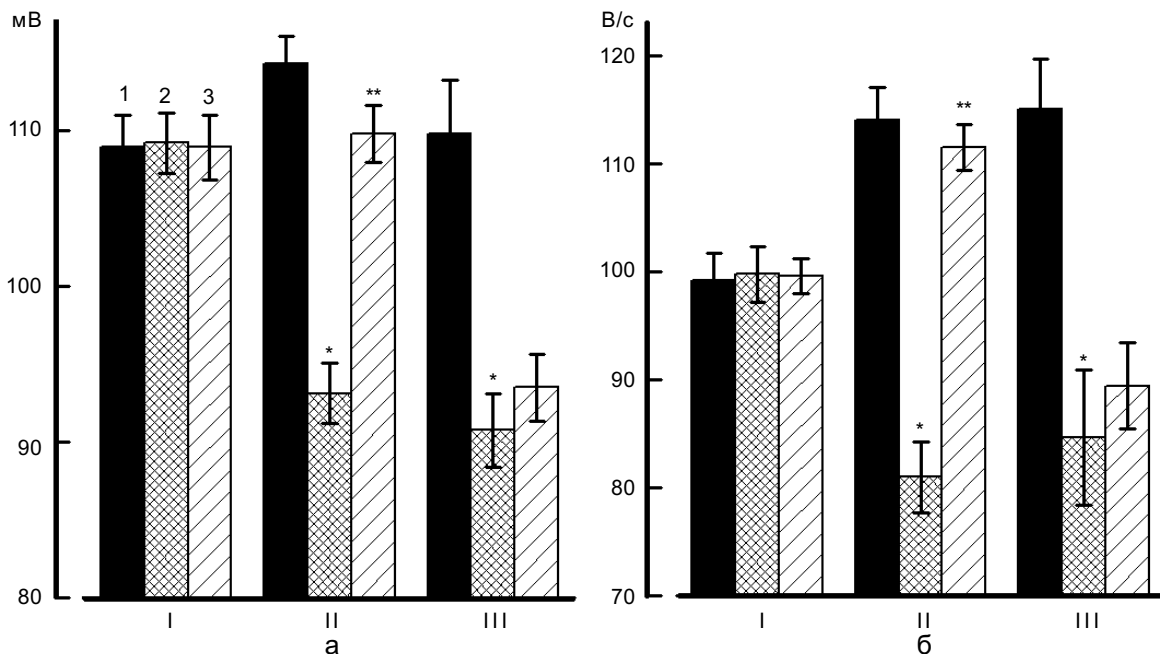


Рис. 2. Вплив флокаліну на амплітуду (а) та початкову швидкість наростання (ПШН) – б потенціалів дії (ПД) підтипів неонатальних кардіоміоцитів: 1 – контрольні умови, 2 – після прикладання 5 мкмоль/л флокаліну і 3 – після його 5-хвилинного відмивання у вентрикулярних ендокардіальних (I), і епікардіальних (II) кардіоміоцитах, а також у кардіоміоцитах передсердя (III); n = 3–4 для кожного типу кардіоміоцитів; * та ** P < 0,05 – достовірні відмінності порівняно з контролем і зі значенням за наявності 5 мкмоль/л флокаліну відповідно

канали [2], наші наступні експерименти були спрямовані на те, щоб дослідити, якою мірою описані вище ефекти флокаліну на електробудливість кардіоміоцитів можуть бути зумовлені активацією кардіоспецифічних $K_{ATФ}$ -каналів. Нативні кардіоміоцити характеризуються експресією великого різноманіття іонних каналів і відповідних їм струмів, а тому дослідження фармакологічного впливу на якийсь один із них пов'язано зі значними методичними труднощами. Для спрощення цього завдання ми використали лінію клітин НЕК-293 із стабільною експресією Kir6.2- і SUR2A-субодиниць кардіоспецифічного $K_{ATФ}$ -каналу (клітини НЕК-293_{6.2/2A}). Раніше було показано, що коекспресія цих субодиниць приводить до утворення в клітинах НЕК-293 функціонального серцевого $K_{ATФ}$ -каналу [7, 11].

Як показано на рис. 4 а,б, за наявності 4 ммоль/л внутрішньоклітинного Mg^{2+} -АТФ

НЕК-293_{6.2/2A} клітини в широкому діапазоні мембранних потенціалів (-110–90 мВ) виявляли тільки незначний, часонезалежний фоновий струм, густина якого при +60 мВ становила всього близько 10 пА/пФ. Прикладання флокаліну в концентрації 5–20 мкмоль/л призводило до розвитку в цих клітинах значного часонезалежного струму з ознаками внутрішнього випрямлення (диференційна провідність у вихідному напрямку зменшувалася) та потенціалом реверсії поблизу рівноважного калієвого потенціалу (E_K), який для наших експериментальних умов становив -83 мВ, що свідчило про його калієву природу (див. рис. 4 в,г). Активація цього струму мала дозозалежний характер, а його густина при концентрації флокаліну 20 мкмоль/л і потенціалі +60 мВ сягала 310 пА/пФ ± 30 пА/пФ. Оскільки блокатор $K_{ATФ}$ -каналів глібенкламід у концентрації 10 мкмоль/л

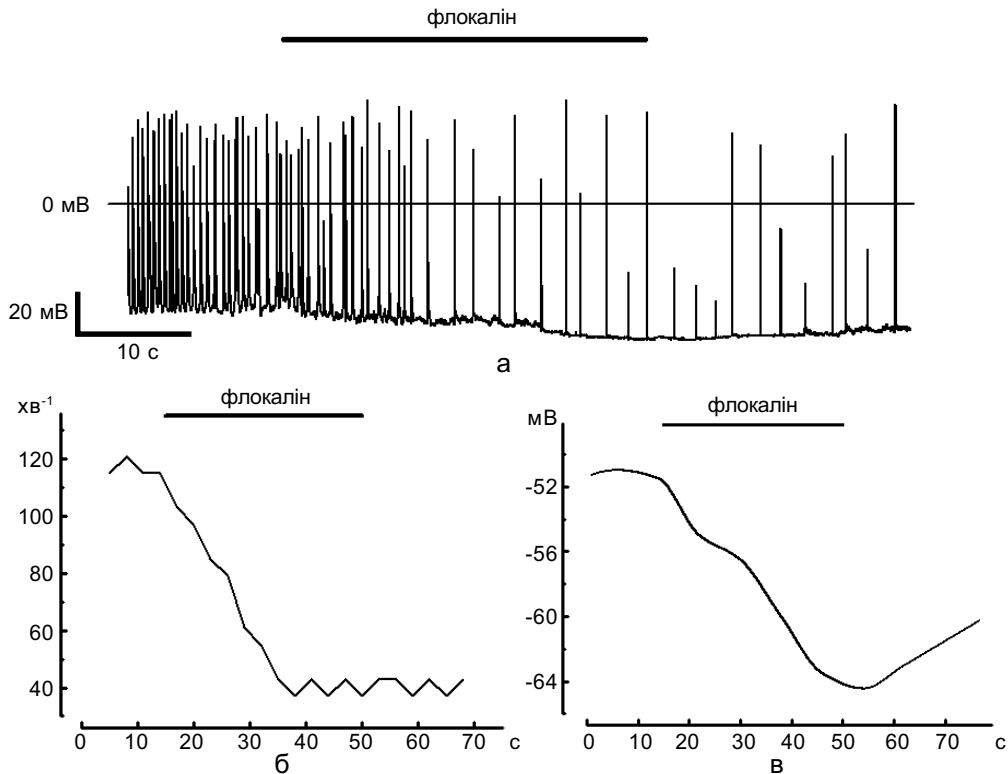


Рис. 3. Зміна характеру генерації потенціалів дії спонтанно скоротливих кардіоміоцитів під впливом флокаліну: а – приклад запису періодичної електричної активності спонтанно скоротливого кардіоміоцита та дії на неї флокаліну (5 мкмоль/л), б, в – часозалежність змін частоти скорочень (б) і потенціалу спокою (в) у відповідь на прикладання 5 мкмоль/л флокаліну для кардіоміоцита, активність якого показана на а

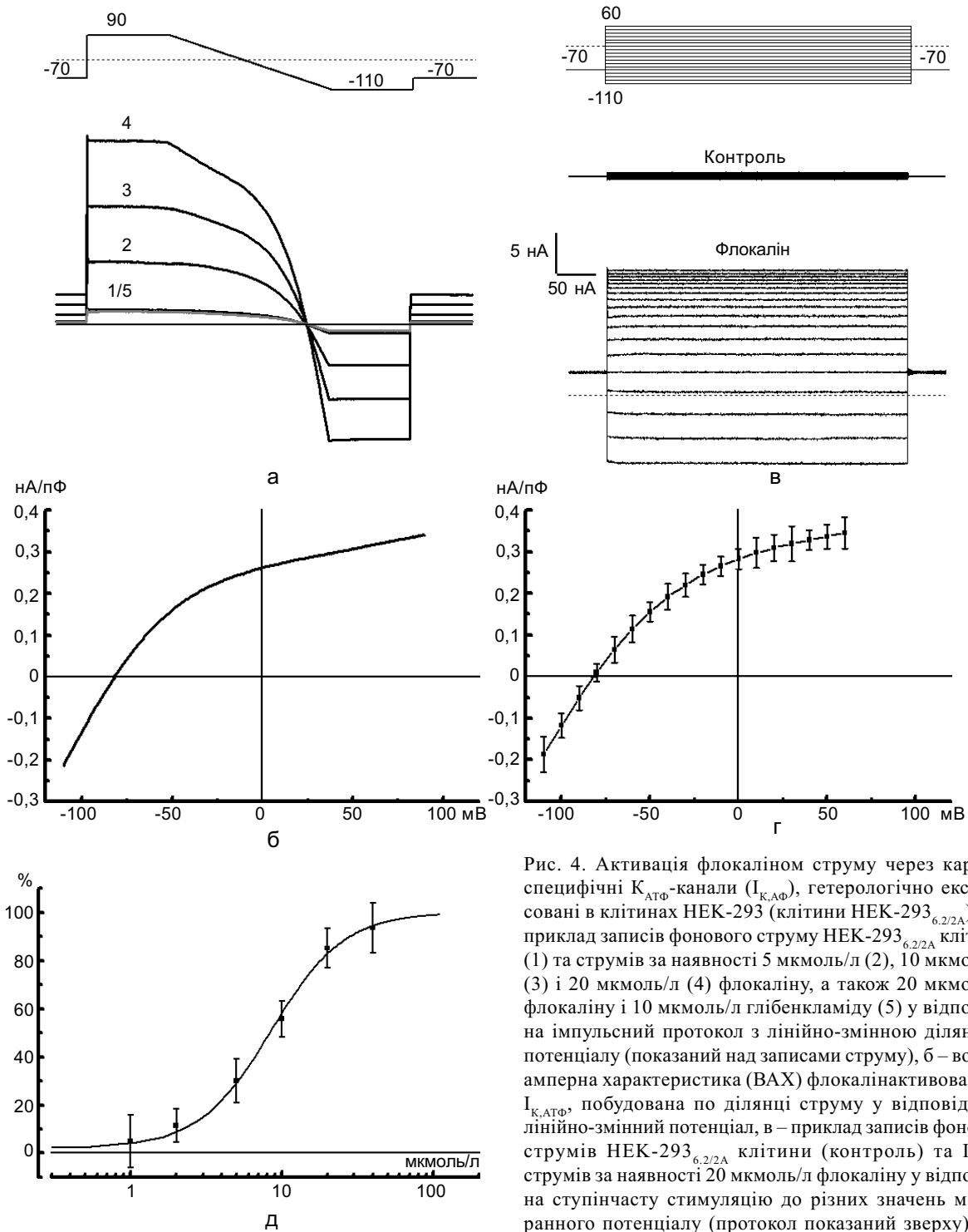


Рис. 4. Активація флокаліном струму через кардіо-специфічні $K_{ATФ}$ -канали ($I_{K,ATФ}$), гетерологічно експресовані в клітинах НЕК-293 (клітини НЕК-293_{6,2/2A}): а – приклад записів фоновому струму НЕК-293_{6,2/2A} клітини (1) та струмів за наявності 5 мкмоль/л (2), 10 мкмоль/л (3) і 20 мкмоль/л (4) флокаліну, а також 20 мкмоль/л флокаліну і 10 мкмоль/л глібенкламід (5) у відповідь на імпульсний протокол з лінійно-змінною ділянкою потенціалу (показаний над записами струму), б – вольт-амперна характеристика (ВАХ) флокалінактивованого $I_{K,ATФ}$ побудована по ділянці струму у відповідь на лінійно-змінний потенціал, в – приклад записів фонових струмів НЕК-293_{6,2/2A} клітини (контроль) та $I_{K,ATФ}$ струмів за наявності 20 мкмоль/л флокаліну у відповідь на ступінчасту стимуляцію до різних значень мембранного потенціалу (протокол показаний зверху), г – усереднена ВАХ флокалінактивованого $I_{K,ATФ}$ побудована за значеннями струму при кожному ступінчастому потенціалі, n=6, д – експериментальна дозозалежність активації $I_{K,ATФ}$ флокаліном (точки – середні значення $I_{K,ATФ}$ при +90 мВ ± стандартна похибка, n=7 для кожної концентрації) та її апроксимація функцією Хілла (неперервна крива)

дована за значеннями струму при кожному ступінчастому потенціалі, n=6, д – експериментальна дозозалежність активації $I_{K,ATФ}$ флокаліном (точки – середні значення $I_{K,ATФ}$ при +90 мВ ± стандартна похибка, n=7 для кожної концентрації) та її апроксимація функцією Хілла (неперервна крива)

пригнічував струм, активований флокаліном (див. рис. 4,а), до значень, навіть менших від контрольних (тобто розмір струму без флокаліну), а потенціал рівесії струму збігався із E_K , то він нами був ідентифікований як такий, що пов'язаний з відкриттям у клітинах НЕК-293_{6,2/2А} гетерологічно експресованих $K_{ATФ}$ -каналів ($I_{K,ATФ}$). Той факт, що глібенкламід блокував викликаний флокаліном $I_{K,ATФ}$ у клітинах НЕК-293_{6,2/2А} до рівнів, нижчих за його фонове значення, свідчить, що незначний внесок у фоновий струм клітин НЕК-293_{6,2/2А} роблять базально активовані $K_{ATФ}$ -канали. Такі біофізичні властивості активованого флокаліном $I_{K,ATФ}$, як наявність внутрішнього випрямлення, що стає особливо помітною при деполяризаціях, вищих від -50 мВ, та положення його потенціалу реверсії добре ілюструється на прикладі ВАХ, отриманих як на основі прикладання лінійно-змінного потенціалу, так і прямокутних імпульсів до різних значень мембранного потенціалу (див. рис. 4 в,г).

Апроксимація експериментальної дозозалежності активації $I_{K,ATФ}$ флокаліном, побудованої на основі вимірювань амплітуди струму при потенціалі +90 мВ за наявності різних концентрацій препарату, функцією Хілла дала значення концентрації половинної активації струму 8,8 мкмоль/л \pm 1,9 мкмоль/л і коефіцієнта кооперативності (k) $1,8 \pm 0,5$ (див. рис. 4,д).

Таким чином, результати, отримані на клітинах НЕК-293_{6,2/2А}, свідчать, що флокалін дійсно є ефективним "відкривачем" кардіоспецифічних $K_{ATФ}$ -каналів і що ця його дія значною мірою лежить в основі його гальмівного впливу на електричну активність різних типів нативних кардіоміоцитів і, відповідно, є одним із механізмів його кардіопротекторного впливу.

ОБГОВОРЕННЯ

У цій роботі ми показали, що флокалін ефективно знижує електричну збудливість

нативних кардіоміоцитів різних типів через гіперполяризацію їх ПС і скорочення тривалості ПД і що ця дія переважно базується на його здатності "відкривати" $K_{ATФ}$ -канали. Значне зменшення тривалості ПД під дією флокаліну призводило до пригнічення як викликаних, так і спонтанних скорочень кардіоміоцитів, що відбувалося внаслідок суттєвого зниження входу Ca^{2+} . В наших експериментах флокалін у концентрації 5 мкмоль/л зменшував тривалість ПД практично так само, як і його попередник пінацидил при більших концентраціях у кардіоміоцитах морської свинки та щура [18, 29].

Такі ефекти флокаліну, як гіперполяризація ПС і скорочення тривалості ПД, які спостерігалися в усіх типах кардіоміоцитів, можна цілком пояснити збільшенням калієвої провідності внаслідок відкриття $K_{ATФ}$ -каналів. При цьому той факт, що викликана флокаліном гіперполяризація була порівняно невеликою близько 5 мВ, на тлі значного скорочення тривалості ПД, можна пояснити тим, що ПС кардіоміоцитів визначається K_{ir} -каналами із сильним внутрішнім випрямленням (перш за все $K_{ir2.1}$ [16]), які забезпечують значну калієву провідність тільки поблизу E_K , а з деполяризацією ця провідність дуже зменшується. За таких умов додаткове збільшення калієвої провідності при відкритті $K_{ATФ}$ -каналів, для яких характерним є дуже слабе внутрішнє випрямлення, мало позначається на ПС, зате виступає значним гіперполяризуючим чинником при деполяризаційних потенціалах, вищих від ПС під час генерації ПД.

Активация значної $K_{ATФ}$ -провідності не дає можливості тільки за формою ПД однозначно стверджувати чи при цьому одночасно відбуваються якісь зміни із вхідними натрієвими та кальцієвими провідностями, які беруть участь у формуванні відповідно висхідної фази (фаза 0) і фази плато (фаза 2) ПД. Однак той факт, що в шлуночкових епікардіальних і передсердних

кардіоміоцитах флокалін не тільки збільшував ПС і скорочував ПД, а і зменшував амплітуду та ПШН останнього дає змогу припустити, що він може також частково блокувати канали вхідного струму – швидкі натрієві та кальцієві L-типу. На користь можливого блокування кальцієвих каналів L-типу свідчить, зокрема те, що в шлуночкових ендокардіальних клітинах флокалін переважно усував саме фазу 2 плато ПД, залишаючи незмінними фази деполяризації та початкової швидкої реполяризації, тоді як в епікардіальних клітинах форма ПД змінювалася більш пропорційно його тривалості. Подібна «поведінка» флокаліну щодо дії на підтипи шлуночкових кардіоміоцитів споріднює його з пінацидиллом [9]. Крім того, в деяких кардіоміоцитах ефект 5 мкмоль/л флокаліну був настільки сильним, що значний стимулювальний струм у частині випадків не викликав генерацію ПД, вказуючи таким чином на можливу зміну величини внутрішньоклітинного кальцієвого сигналу, який викликає скорочення м'язового волокна. Проте випадків зупинки серця в дослідах на інтактних органах при типових концентраціях флокаліну описано не було. Зазначений факт слід враховувати при виборі оптимальної дози флокаліну як кардіопротекторного препарату. Цікаво, що непрямі дані про можливість блокування флокаліном кальцієвих каналів L-типу були отримані на гладеньких м'язах сечовода морських свинок [3].

Загалом той факт, що в різних типах кардіоміоцитів дія флокаліну на ті чи інші показники ПД досить відрізнялася як за своєю інтенсивністю (відсутність змін амплітуди та ПШН ПД ендокардіальних клітин порівняно з їх наявністю в епікардіальних і передсердних клітинах), так і за ступенем зворотності при відмиванні препарату (зворотність змін амплітуди та ПШН ПД епікардіальних клітин, але їх незворотність у передсердних клітинах; зворотність зменшення тривалості ПД

ендокардіальних і передсердних клітин порівняно з незворотністю такого зменшення в епікардіальних клітинах) свідчить про те, що у формуванні фаз 0 та 2 цих кардіоміоцитів можуть брати участь різні типи натрієвих та/або кальцієвих каналів, а також про те, що субодиничний склад їх K_{ATP} -каналів може відрізнятися. Дійсно, у дослідах на мишах з нокаутом SUR1 показано, що K_{ATP} -канали передсердя, але не шлуночків можуть містити в своєму складі SUR1-субодиницю, що могло б пояснити відмінності у фармакологічній регуляції K_{ATP} -каналів різних ділянок серця [12].

Проте незаперечним залишається той факт, що, як показали наші дослідження в модельній системі НЕК-293_{6.2/2A} клітин, флокалін є ефективним "відкривачем" кардіоспецифічних Kir6.2-SUR2A K_{ATP} -каналів – значення концентрації половинної активації $IC_{50} = 8,8$ мкмоль/л виявилось нижчим, ніж відповідна концентрація для попередника флокаліну пінацидилу за аналогічних умов [24]. Форма кривої концентраційної залежності активації K_{ATP} -струму та показники її апроксимації функцією Хіла свідчать про позитивну кооперативність ($k = 1,8$) взаємодії флокаліну з каналом, вказуючи на те, що для його активації необхідне зв'язування більше, ніж однієї молекули флокаліну з регуляторною SUR2A -субодиницею.

Хоч скорочення ПД і має, як вважають, кардіопротекторний вплив, оскільки при цьому зменшується вхід Ca^{2+} через високорогові канали L-типу, існують дані, які свідчать, що саме по собі воно не є необхідною умовою кардіопротекції, а позитивний вплив таких "відкривачів" K_{ATP} -каналів, як пінацидил, опосередковується їх дією на мітохондріальні K_{ATP} -канали та пов'язане з цим посилення окиснювального фосфорилування в мітохондріях і збільшення внутрішньоклітинної концентрації АТФ [14]. Аналогічно, не було знайдено достатньої

кореляції між ступенем зниження тривалості ПД і зменшенням ділянки інфаркту при дії кромакаліму та BMS-180448 [13]. Ці та інші результати свідчать, що мітохондріальні K_{ATP} -канали також беруть участь у захисті клітини при метаболічних порушеннях. Нині вважається загальноприйнятим, що сарколемальні та мітохондріальні K_{ATP} -канали є важливою ланкою кардіопротекції від пошкоджень серця при гіпоксії та ішемії [1].

Отже, флокалін є ефективним “відкривачем” рекомбінантних, кардіоспецифічних K_{ATP} -каналів, гетерологічно експресованих в ембріональних ниркових клітинах лінії HEK-293, демонструючи меншу концентрацію половинної активації, ніж пінацидил. Він також більш активний у підтипах неонатальних кардіоміоцитів, гіперполяризуючи мембрану та викликаючи зміни, які призводять до зниження входу кальцію під час ПД. Указані ефекти, безумовно, можуть мати протекторний вплив на серце за умов ішемії, гіпоксії або після значного навантаження.

О.І. Войтичук, А.А. Мойбенко, Я.М. Шуба

АКТИВАТОР АДЕНОЗИНТРИФОСФАТЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ФЛОКАЛИН РЕГУЛИРУЕТ СЕРДЕЧНО- ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ ВОЗБУДИМОСТЬ

Аденозинтрифосфатзависимые калиевые (K_{ATP}) каналы, которые активируются при снижении отношения АТФ/АДФ, связывают мембранный потенциал клетки и ее возбудимость с энергетическим балансом и метаболизмом. При патологических условиях гипоксии и ишемии активация K_{ATP} каналов плазматической мембраны способствует уменьшению возбудимости клеток и снижению входа кальция, оказывая цитопротекторный эффект. В этой работе было исследовано действие нового активатора K_{ATP} -каналов – фторсодержащего аналога пинацидила флокалина на возбудимость нативных культивированных неонатальных кардиомиоцитов крыс и активность рекомбинантного кардиоспецифического K_{ATP} -канала в клетках HEK-293 со стабильной гетерологической экспрессией Kir6.2 и SUR2A субединиц, которые его образуют (HEK-293_{6,2/2A}). Было установлено, что в предсердных, желудочковых и спонтанно сократимых

неонатальных кардиомиоцитах флокалин в концентрации 5 мкмоль/л вызывает обратимую гиперполяризацию и значительное уменьшение длительности потенциала действия (ПД). В предсердных и желудочковых эпикардальных клетках уменьшалась также амплитуда и начальная скорость нарастания ПД. Флокалин значительно уменьшал частоту сокращений и обратимо снижал потенциал покоя спонтанно сократимых кардиомиоцитов. В HEK-293_{6,2/2A}-клетках флокалин дозозависимо активировал времянезависимый калиевый ток с внутренним выпрямлением через гетерологически экспрессированные K_{ATP} -каналы. Концентрация половинной активации тока флокалином составляла 8,8 мкмоль/л, а крутизна кривой дозозависимости указывала на существование позитивной кооперативности при взаимодействии флокалина с K_{ATP} -каналами. Наши результаты показывают, что флокалин действительно является эффективным ингибитором электрической и сократительной активности кардиомиоцитов благодаря «открыванию» кардиоспецифических K_{ATP} -каналов и что это его свойство в значительной степени может лежать в основе кардиопротекции.

Ключевые слова: неонатальные кардиомиоциты, клетки линии HEK-293, аденозинтрифосфатзависимые калиевые каналы, потенциал покоя, потенциал действия, флокалин.

O.I. Voitychuk, O.O. Moibenko, Y.M. Shuba

ATP-DEPENDENT POTASSIUM CHANNEL OPENER FLOCALIN REGULATES CARDIAC EXCITABILITY

ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels activated by decrease in ATP/ADP ratio link cellular membrane potential with excitability, energy balance and metabolism. Under pathologic conditions of hypoxia and ischemia activation of plasma membrane K_{ATP} channels reduces cell excitability and decreases calcium entry producing cytoprotective effect. In the current work we studied effects of a new fluorine containing pinacidil analogue flocalin on excitability of native cultured cardiomyocytes of neonatal rats and on activity of recombinant cardiospecific K_{ATP} channel in HEK-293 cells with stable heterologous expression of forming subunits Kir6.2 and SUR2A (HEK-293_{6,2/2A}). It was found that 5 μ M flocalin induces reversible hyperpolarization and significant shortening of action potential (AP) in atrial, ventricular and spontaneously contracting neonatal cardiomyocytes. Atrial and ventricular epicardial cells showed decrease in amplitude and AP upstroke velocity. Flocalin significantly reduced contraction frequency and reversibly decreased resting diastolic potential of spontaneously contracting cardiomyocytes. In HEK-293_{6,2/2} cells flocalin dose-dependently activated time-independent K^+ current with weak inward rectification through heterogeneously expressed K_{ATP} channels. Half-maximal flocalin concentration of current activation equals 8.8 μ M and curve slope factor suggests positive cooperativity of flocalin binding to K_{ATP}

channels. Our data show that flocalin is indeed an effective inhibitor of electrical and contractile activity of cardiomyocytes due to opening of cardiospecific K_{ATP} channels and this property substantially mediates cardioprotection.

Keywords: neonatal cardiomyocytes, HEK-293 cells, ATP-sensitive potassium channels, resting potential, action potential, flocalin.

International Center of Molecular Physiology;

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мойбенко О.О., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка. – 2008.
2. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М. та ін. Розробка та підготовка до впровадження нового вітчизняного кардіопротекторного препарату – фторовмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів Флокалін // Наука та інновації. – 2006. – 2, № 4. – P. 114–119.
3. Янчий Р.И., Джуран Б.В., Филипов И.Б. и др. Угнетающее влияние активатора АТФ-зависимых калиевых каналов флокалина на электрическую и сократительную активность гладких мышц мочеочника морской свинки // Нейрофизиология. – 2005. – 37, № 5–6. – P. 403–409.
4. Aguilar-Bryan L., Clement J.P.t., Gonzalez G. et al. Toward understanding the assembly and structure of KATP channels // *Physiol. Rev.* – 1998. – 78, № 1. – P. 227–245.
5. Alekseev A.E., Hodgson D.M., Karger A.B. et al. ATP-sensitive K⁺ channel channel/enzyme multimer: metabolic gating in the heart // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2005. – 38, № 6. – P. 895–905.
6. Babenko A.P., Aguilar-Bryan L., Bryan J. A view of sur/KIR6.X, KATP channels // *Annu. Rev. Physiol.* – 1998. – 60, № – P. 667–687.
7. Babenko A.P., Gonzalez G., Aguilar-Bryan L. et al. Reconstituted human cardiac KATP channels: functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells // *Circulat. Res.* – 1998. – 83, № 11. – P. 1132–1143.
8. Bajgar R., Seetharaman S., Kowaltowski A.J. et al. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain // *J. Biol. Chem.* – 2001. – 276, № 36. – P. 33369–33374.
9. Billman G.E. The cardiac sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel as a novel target for anti-arrhythmic therapy // *Pharmacol. Therap.* – 2008. – 120, № 1. – P. 54–70.
10. Campbell J.D., Sansom M.S., Ashcroft F.M. Potassium channel regulation // *EMBO Rep.* – 2003. – 4, № 11. – P. 1038–1042.
11. Cui Y., Giblin J.P., Clapp L.H. et al. A mechanism for ATP-sensitive potassium channel diversity: Functional coassembly of two pore-forming subunits // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – 98, № 2. – P. 729–734.
12. Flagg T.P., Kurata H.T., Masia R. et al. Differential structure of atrial and ventricular KATP: atrial KATP channels require SUR1 // *Circulat. Res.* – 2008. – 103, № 12. – P. 1458–1465.
13. Grover G.J., D'Alonzo A.J., Parham C.S. et al. Cardioprotection with the KATP opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration // *J. Cardiovascular. Pharmacol.* – 1995. – 26, № 1. – P. 145–152.
14. Hamada K., Yamazaki J., Nagao T. Shortening of action potential duration is not prerequisite for cardiac protection by ischemic preconditioning or a KATP channel opener // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1998. – 30, № 7. – P. 1369–1379.
15. Inagaki N., Gono T., Clement J.P. et al. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels // *Neuron.* – 1996. – 16, № 5. – P. 1011–1017.
16. Ishihara K., Yan D.H., Yamamoto S. et al. Inward rectifier K(+) current under physiological cytoplasmic conditions in guinea-pig cardiac ventricular cells // *J. Physiol.* – 2002. – 540, № 3. – P. 831–841.
17. Lorenz E., Terzic A. Physical association between recombinant cardiac ATP-sensitive K⁺ channel subunits Kir6.2 and SUR2A // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 1999. – 31, № 2. – P. 425–434.
18. Moreau C., Prost A.L., Derand R. et al. SUR, ABC proteins targeted by KATP channel openers // *Ibid.* – 2005. – 38, № 6. – P. 951–963.
19. Nakayama K., Fan Z., Marumo F. et al. Interrelation between pinacidil and intracellular ATP concentrations on activation of the ATP-sensitive K⁺ current in guinea pig ventricular myocytes // *Circulat. Res.* – 1990. – 67, № 5. – P. 1124–1133.
20. Nichols C.G., Lederer W.J. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system // *Amer. J. Physiol.* – 1991. – 261, № 6 – P. H1675–1686.
21. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle // *Nature.* – 1983. – 305, № 5930. – P. 147–148.
22. Panten U., Schwanstecher M., Schwanstecher C. Sulfonylurea receptors and mechanism of sulfonylurea action // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 1996. – 104, № 1. – P. 1–9.
23. Rogers T.B., Gaa S.T., Allen I.S. Identification and characterization of functional angiotensin II receptors on cultured heart myocytes // *J. Pharmacol. Exp. Therap.* – 1986. – 236, № 2. – P. 438–444.
24. Shindo T., Yamada M., Isomoto S. et al. SUR2 subtype (A and B)-dependent differential activation of the cloned ATP-sensitive K⁺ channels by pinacidil and nicorandil // *Brit. J. Pharmacol.* – 1998. – 124, № 5. – P. 985–991.
25. Tucker S.J., Ashcroft F.M. A touching case of channel

- regulation: the ATP-sensitive K⁺ channel // Curr. Opin. Neurobiol. – 1998. – **8**, № 3. – P. 316–320.
26. Voitychuk O.I., Asmolikova V.S., Gula N.M. et al. [Regulation of the excitability of neonatal cardiomyocytes by N-stearyl- and N-oleylethanolamines] // Fiziol. Zh. – 2009. – **55**, № 3. – P. 55–66.
27. Wickenden A.D., Kaprielian R., Parker T.G. et al. Effects of development and thyroid hormone on K⁺ currents and K⁺ channel gene expression in rat ventricle // J. Physiol. – 1997. – **504** (Pt 2), № – P. 271–286.
28. Wu S.N., Li H.F., Chiang H.T. Characterization of ATP-sensitive potassium channels functionally expressed in pituitary GH3 cells // J. Membr. Biol. – 2000. – **178**, № 3. – P. 205–214.
29. Wu S.N., Wu A.Z., Sung R.J. Identification of two types of ATP-sensitive K⁺ channels in rat ventricular myocytes // Life Sci. – 2007. – **80**, № 4. – P. 378–387.
30. Yagupolskii L.M., Maletina I.I., Petko K.I. et al. New fluorine-containing hypotensive preparations // J. Fluor. Chem. – 2001. – **109**, № 1. – P. 87–94.
31. Yokoshiki H., Sunagawa M., Seki T. et al. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells // Amer. J. Physiol. – 1998. – **274**, № 1 Pt 1. – P. C25–37.

*Міжнарод. центр молекуляр. фізіології НАН України, Київ;
Ін-т фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: v_oleg@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 08.09.2009*