

Р.Б. Струтинський, А.В. Коцюруба, О.П. Нещерет, Р.А. Ровенець, О.О. Мойбенко

Зміни метаболізму в міокарді при ішемії–реперфузії та активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів

У досліджах на собаках з відтворенням експериментальної ішемії (90 хв) та реперфузії (180 хв) вивчено зміни біохімічних показників різних ділянок серця: інтактної, ризику та некрозу, при внутрішньошлунковому введенні лікарської форми (таблетки) фторвмісного активатора аденозинтрифосфат(АТФ)-чутливих калієвих ($K_{\text{АТФ}}$) каналів флокаліну в дозі 2,2 мг/кг. Досліджували біохімічні показники, що характеризують можливі механізми дії флокаліну – окисний метаболізм (пули H_2O_2 , сечової кислоти, дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду, ейкозаноїдів LTC_4 і TxB_2), біосинтез NO різними шляхами – окисним *de novo* (активність індукцйбельної та конститутивної NO -синтази і пули цитруліну) та неокисним реутилізаційним (активність нітратредуктази), пули стабільних метаболітів NO (нітрит- і нітрат-аніонів, низько- та високомолекулярних нітрозотіолів), неорганічний фосфат та інші продукти деградації АТФ і гуадинінтрифосфату (ГТФ), зміни в гемоксигеназній реакції (пули білірубину і заліза), неокисний катаболізм L -аргініну (активність аргінази і пули сечовини) і вміст вільної арахідонової кислоти. Аналіз результатів дав змогу окреслити декілька можливих кардіопротекторних механізмів флокаліну. Вони полягають в інгібуванні окисного метаболізму внаслідок обмеження генерації вільних радикалів кисню та азоту, інгібуванні гідролізу фосфоліпідів і, тим самим, утворення вільної арахідонової кислоти та патогенних в умовах ішемії міокарда ейкозаноїдів, інгібуванні деградації АТФ і ГТФ та, можливо, в стимуляції захисної гемоксигеназної реакції. Одним із важливих кардіопротекторних механізмів можна вважати пригнічення індукцйбельного *de novo* і реутилізаційного синтезу оксиду азоту та деградації аргініну аргіназою і, навпаки, збереження достатніх рівнів конститутивного *de novo* синтезу оксиду азоту. Поряд з цим збереження останнього на високому рівні та вищезгадані зміни в окисному метаболізмі, що унеможливають утворення токсичного пероксинітриту, вказують на можливість участі в кардіопротекторному ефекті флокаліну мітохондріальної транспортної пори за рахунок попередження її відкриття та, як наслідок, інгібування індукваного нею апоптозу і/чи некрозу кардіоміоцитів.

Ключові слова: аденозинтрифосфатчутливі калієві канали, флокалін, ішемія–реперфузія, окисативний стрес, нітрозативний стрес, перекисне окиснення ліпідів, *de novo* синтез NO , реутилізаційний синтез NO .

ВСТУП

Одним із найважливіших ендогенних механізмів кардіопротекції при ішемії й інфаркті міокарда є система аденозинтрифосфат-(АТФ)-чутливих калієвих ($K_{\text{АТФ}}$) каналів – сарколемальних і мітохондріальних, відкритих *Norma* [18] та *Inoue* [17]. Їх загальною характеристикою й основним механізмом

протекції є швидка реакція на зниження енергетичного потенціалу (вмісту АТФ) у кардіоміоциті – неминучий наслідок порушення кровообігу серця. При ішемії міокарда плазматичні канали відкриваються, що призводить до гіперполяризації та послідовно до скорочення потенціалу дії, тривалості його плато, зменшення входу кальцію в саркоплазму, гальмування метаболічних

© Р.Б. Струтинський, А.В. Коцюруба, О.П. Нещерет, Р.А. Ровенець, О.О. Мойбенко

процесів у клітині та відповідно до зменшення її потреби в кисні та збереженні енергоресурсів (зокрема, АТФ), що дуже важливо в умовах дефіциту кровопостачання серця [2, 6, 22]. Наслідком цього є відносне збереження та краще відновлення показників скоротливої активності міокарда ішемізованого серця, попередження розвитку констрикторних реакцій у коронарних судинах і підвищення загальнопериферичного опору в період реперфузії [7, 8, 21]. Поряд з цим активація $K_{\text{АТФ}}$ -каналів пригнічує вільнорадикальні реакції та має антиокиснювальні властивості: зменшує вміст вільних радикалів і запобігає зниженню активності ферментів антиоксидантної системи – каталази та супероксиддисмутази [20]. Цілком імовірно, що гальмування входу кальцію повинно зменшувати активність катаболітичних ферментів, що з одного боку, може попереджати деградацію фосфоліпідів мембран (мембраностабілізуювальна дія), з іншого – зменшувати утворення патогенних в умовах ішемії міокарда ейкозаноїдів, зокрема пептидолейкотриєну $C_4(LTC_4)$.

Метою нашої роботи було вивчення впливу вітчизняного фторвмісного активатора $K_{\text{АТФ}}$ -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран флокаліну на зміну біохімічних показників метаболізму в міокарді як на можливий механізм його кардіопротекторної дії при ішемії–реперфузії в експериментах *in vivo*.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 19 безпородних собаках масою від 15 до 24 кг під хлоралозо-уретановим наркозом (0,07 та 0,7 г/кг внутрішньовенно). Використано метод ретроградної катетеризації, аутоперфузії та прицільної емболізації гілки лівої коронарної артерії, який дає змогу відтворювати локальну ішемію (90 хв) і реперфузію (180 хв) міокарда без розтину грудної порожнини

та зі збереженням спонтанного дихання [8]. Тварин було поділено на три групи. До I групи ввійшли інтактні тварини (n=5). У тварин II групи (контрольна, n=7) і III групи (n=7) моделювали регіональну ішемію міокарда та наступну реперфузію. Собакам III групи за 60 хв до початку ішемії за допомогою зонда внутрішньошлунково вводили лікарську форму (таблетки) флокаліну в дозі 2,2 мг/кг. Після експерименту у тварин II і III груп вилучали шматочки міокарда трьох ділянок лівого шлуночка – інтактної, зон ризику та некрозу. Для порівняння з умовами нормоксії шматочки лівого шлуночка вирізали і у інтактних собак (I група). Їх негайно заморожували у рідкому азоті, розтирали в ступці та готували суцільні гомогенати на дистильованій воді.

У гомогенатах лівого шлуночка серця інтактних собак і різних ділянок лівого шлуночка серця собак після ішемії–реперфузії досліджували показники, що характеризують можливі біохімічні механізми кардіопротекторної дії флокаліну. Оцінювали вплив ішемії–реперфузії та флокаліну на окисний метаболізм (пули H_2O_2 , сечової кислоти, дієнових кон'югатів (ДК), малонового діальдегіду (МДА), ейкозаноїдів LTC_4 та TxB_2 , інтенсивність біосинтезу NO різними шляхами – окисним *de novo* (активність індукцибельної і конститутивної NO-синтази (iNOS), cNOS) і пули цитруліну) та неокисним реутилізаційним (активність нітратредуктази), пули стабільних метаболітів NO (нітрит- та нітрат-аніонів, низько- та високомолекулярних нітрозотіолів – НМНТ і ВМНТ відповідно), неорганічний фосфат та інші продукти деградації АТФ і ГТФ, зміни в гемоксигеназній реакції (пули білірубину та заліза), неокисний катаболізм L-аргініну (активність аргінази і пули сечовини) і вміст вільної арахідонової кислоти.

Інтенсивність оксидативного стресу оцінювали за вмістом пероксиду водню та

продуктів вільнорадикальної ланцюгової реакції перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) як ранніх (ДК), так і пізніх (МДА) [1, 5, 13]. Концентрацію сечової кислоти та сечовини визначали в колориметричній реакції в аліквотах гомогенатів серця за допомогою реактивів фірми «Філіст-Діагностика» (Україна). Вміст ейкозаноїдів LTC₄ і TxV₂ і їх попередника – арахідонової кислоти вимірювали в спиртових екстрактах із заморожених у рідкому азоті та розтертих у порошок кусочків серця. Концентрацію арахідонової кислоти визначали методом тонкошарової хроматографії на пластинках силікагелю з наступною елюцією та спектроскопією елюатів в 1-сантиметрових кварцевих кюветах при довжині хвилі 210 нм. Ейкозаноїди – за допомогою радіоімунного методу, користуючись стандартними добірками реактивів фірми «Amersham» (Англія). Радіоактивність проб вимірювали на лічильнику фірми «Beckman» (Німеччина). Активність кальційзалежних конститутивних (cNOS=eNOS+nNOS) та кальційнезалежної iNOS оцінювали за комбінацію класичного методу [19] та сучасну його модифікацію [11], пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Останній визначали високочутливим колориметричним методом [10]. Вміст нітрит (NO₂⁻) та нітрат-аніона (NO₃⁻) – в безбілкових аліквотах гомогенатів серця в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [15] та бруциновим методом за допомогою спектрофотометрії [19]. Вміст нітрозотіолів – за Saville [16], з незалежним виявленням як пулів НМНТ, в основному нітрозоглутатіону в безбілкових аліквотах проб після гідролізу ковалентного зв'язку S-NO в молекулі нітрозоглутатіону двовалентним катіоном ртуті, так і ВМНТ – в основному нітрозильованих білків міокарда, після гідролізу аліквот цільних гомогенатів проб. Базальну аргіназну активність оцінювали [19] за

утворенням сечовини в інкубаційній суміші (1 мл), що містила L-аргінін і аліквоти проб в тріс-НСІ (“Calbiochem”) буфері (рН 8,0). Для визначення пулів сумарних продуктів деградації АТФ і ГТФ у плазмі крові спектрофотометрично вимірювали поглинання безбілкових аліквот крові при довжині хвилі 254 нм (D₂₅₄), що характеризує наявність у розчині інозину, ксантину та гіпоксантину, що здійснювали на спектрофотометрії СФ-26 ЛОМО у кварцевих односантиметрових кюветах. Вміст неорганічного фосфату, що утворюється при послідовній деградації як АТФ, так і ГТФ фіксували колориметричним методом Островського [4]. Активність деградації гемму захисним ферментом гемоксигеназою – за змінами концентрації двох продуктів його деградації: білірубину і загального заліза. Білірубін визначали методом Яндрашика з використанням стандартної добірки реактивів (АТ «Реагент», Україна). Залізо – фотометричним методом з використанням добірки реактивів фірми «Філіст-Діагностика» (Україна). Загальний білок – за методом Бредфорд з використанням барвника Cumassi G-250 (“Ferrak”, Німеччина).

Отримані результати обробляли математично методом варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Origin 7.0. Достовірність результатів визначали за критерієм t Стьюдента. Значення P<0,05 розглядали як статистично достовірні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У контрольних експериментах після ішемії-реперфузії міокарда показано, що в лівому шлуночку серця собак значно збільшується швидкість індукбельного de novo синтезу оксиду азоту (ферментом iNOS), зокрема в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу вона збільшується у 2,8, 6,7 і 18,2 раза відповідно порівняно із такою за умов нормоксії (рис. 1,а). Натомість швидкість сумарного конститутивного синтезу оксиду азоту (в

основному цитозольними ізоферментами eNOS і nNOS у мітохондріях), навпаки, після ішемії–реперфузії міокарда пригнічена, зокрема у зоні некрозу більше ніж удвічі (див. рис. 1,б). Після ішемії–реперфузії міокарда достовірно підвищується також неокисна деградація L-аргініну ферментом аргіназою (див. рис. 1,в), зокрема в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу активність аргінази збільшується порівняно з контролем у лівому шлуночку за умов нормоксії у 1,8, 4,1 та у 6,5 раза відповідно, що внаслідок обмеження пулів спільного субстрату (L-аргініну) створює умови для одночасної генерації суперок-

сиду й оксиду азоту всіма ізоферментами NOS, що у свою чергу призводить до утворення пероксинітриду та пошкоджувальної дії в кардіоміоцитах і порушення роботи серця. Після ішемії–реперфузії в лівому шлуночку активізується також реутилізаційний шлях синтезу оксиду азоту за дії різних нітрит- і нітратредуктаз. Зокрема, в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу активність НАДФ-залежної нітратредуктази збільшується порівняно з контролем за умов нормоксії у 9,4, 19,4 та у 52,7 раза відповідно (див. рис. 1,г). Водночас передішемичне активування K_{ATP} -каналів, у т.ч. мітохондріальних, за допомогою

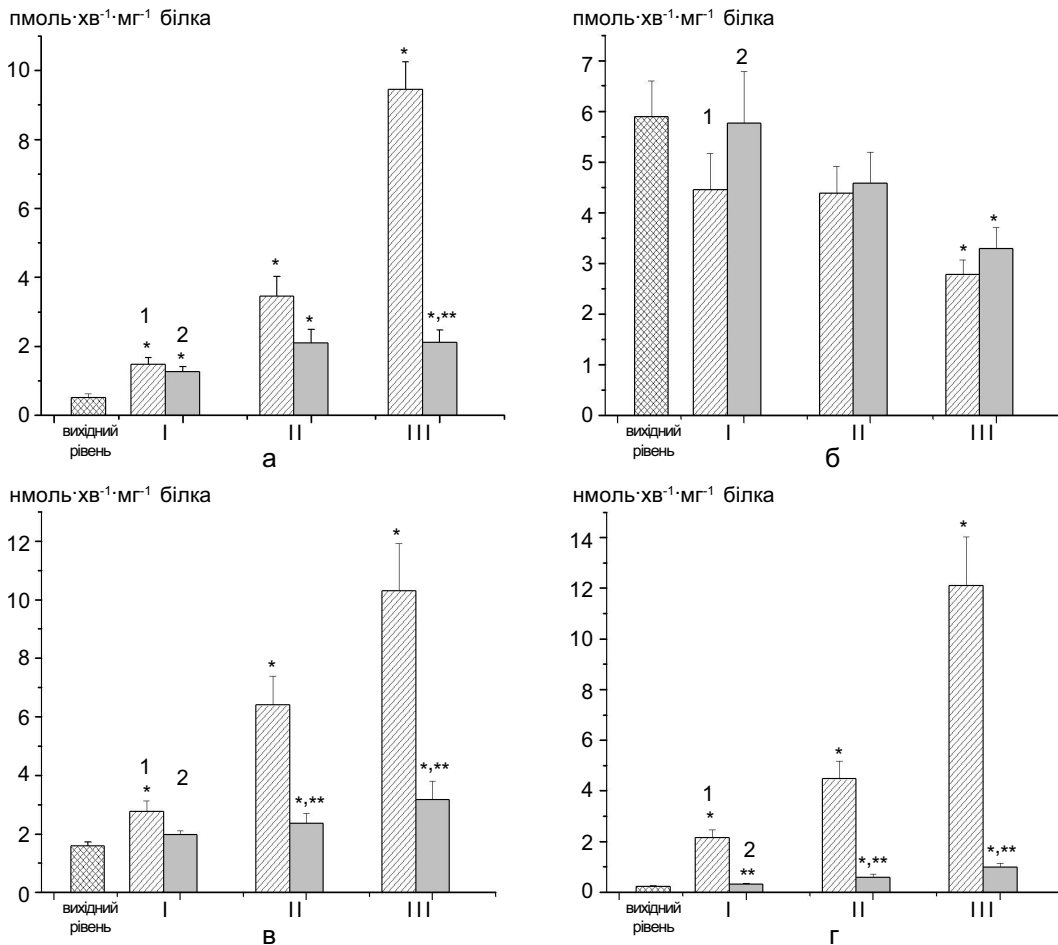


Рис. 1. Вплив флокаліну на активність ферментів індукцибельної (а), конститутивної (б) NO-синтази, аргінази (в) і нітратредуктази (г) при ішемії–реперфузії міокарда за умов нормоксії (вихідний рівень), у інтактній зоні (I), зоні ризику (II) та некрозу (III); 1 – ішемія–реперфузія, 2 – ішемія–реперфузія після введення флокаліну. * P<0,05 порівняно з вихідним рівнем, ** P<0,05 порівняно з контролем (ішемія–реперфузія)

флокаліну інгібує стимульовані ішемією–реперфузією біохімічні реакції в міокарді. Так, активність iNOS за дії флокаліну зменшується в зоні некрозу порівняно з ішемією–реперфузією без його введення (див. рис. 1,а), у 4,5 раза. Аналогічні зміни при введенні флокаліну відбуваються і з активністю таких ферментів, як аргіназа та нітратредуктаза (див. рис. 1,в,г). Активність аргінази порівняно з експериментами без введення флокаліну достовірно зменшується в зоні ризику та некрозу в 2,7 та 3,3 раза відповідно. Активність нітратредуктази зменшується в інтактній зоні, ризику та некрозу у 6,8, 7,6 та 12,4 раза відповідно. Дещо кращими при введенні флокаліну є також показники активності cNOS (див. рис. 1,б). Зокрема, в інтактній зоні та зоні некрозу вона є збільшеною порівняно з експериментами з ішемією–реперфузією без введення флокаліну на 29,4 та 18,8 % відповідно. Раніше, в аналогічних експериментах при дослідженні дії флокаліну на динаміку біохімічних показників артеріальної крові в період ішемії та реперфузії теж було показано, що під час ішемії він не тільки запобігає зменшенню активності фермента cNOS, а навіть дещо підвищує її. Водночас під час реперфузії активність цього ферменту значно збільшувалася [3].

Таким чином, один із можливих кардіопротекторних механізмів дії флокаліну може полягати в інгібуванні надлишкового індукбельного *de novo* синтезу оксиду азоту та деградації L-аргініну аргіназою, що забезпечує збереження субстрату для конститутивного *de novo* синтезу оксиду азоту. Ще одним механізмом кардіопротекторного впливу флокаліну може бути його сильна антиішемічна дія, що підтверджується значним інгібуванням реутилізаційного синтезу NO, який відбувається винятково в умовах ішемії (збереження достатньої кількості молекул кисню в міокарді, його оксигенації, знову ж таки для

збереження конститутивного синтезу NO, дуже важливого для інгібування мітохондріальної пори і, тим самим, для зменшення загибелі кардіоміоцитів).

На рис. 2 показано вплив активації K_{ATP} -каналів флокаліном на зміни вмісту в різних ділянках ішемізованого серця пулів стабільних метаболітів оксиду азоту – нітрит- та нітрат-аніонів, НМНТ і ВМНТ, які утворюються за дії пероксинітриту і є маркерами його утворення, а також цитруліну.

У контрольних експериментах показано, що в лівому шлуночку серця собак достовірно зменшується вміст нітрит-аніона (у 7,3 раза) лише в зоні некрозу, де він знижується від $514,6 \pm 39,4$ за умов нормоксії до $70,2$ пмоль/мг білка $\pm 13,5$ пмоль/мг білка (див. рис. 2,а). Введення флокаліну не тільки запобігає зменшенню цього показника, який утворюється спонтанно при окисненні оксиду азоту лише в окисненованих розчинах, а навпаки, сприяє деякому підвищенню його (див. рис. 2,а). Зокрема, в інтактній зоні він має тенденцію до збільшення порівняно з умовами нормоксії (на 79,0 %), можливо, завдяки властивості флокаліну розширювати коронарні судини серця та збільшувати приток крові, кисню та енергоресурсів до міокарда. Відмінність вмісту нітрит-аніона в різних зонах серця після ішемії–реперфузії при введенні флокаліну та без введення ще більша. При активації K_{ATP} -каналів вміст нітриту в згаданій зоні та зоні некрозу достовірно вищий (у 2,0 та у 8,6 раза відповідно). Таким чином, підвищення за дії флокаліну пулів нітрит-аніона в різних зонах лівого шлуночка серця є ще одним, додатковим до інгібування активності нітратредуктази, доказом потужної антиішемічної дії цього активатора K_{ATP} -каналів.

Цитрулін є супутнім продуктом *de novo* синтезу NO при окисненні L-аргініну за дії всіх ізоферментів NOS, а також метаболітом орнітинового та цитрулінового циклів, останній з яких активно функціонує в

кардіоміоцитах для ресинтезу L-аргініну. Синтезований у цьому циклі цитрулін використовується переважно ізоферментом iNOS для індукційного синтезу NO. В період ішемії–реперфузії в серці ми спосте-

рігали зниження пулів цитруліну (див. рис. 2,д). Це може бути зумовлено інтенсивною його утилізацією для ресинтезу аргініну, який використовується не лише для синтезу NO de novo (iNOS), але і аргіназою. 3

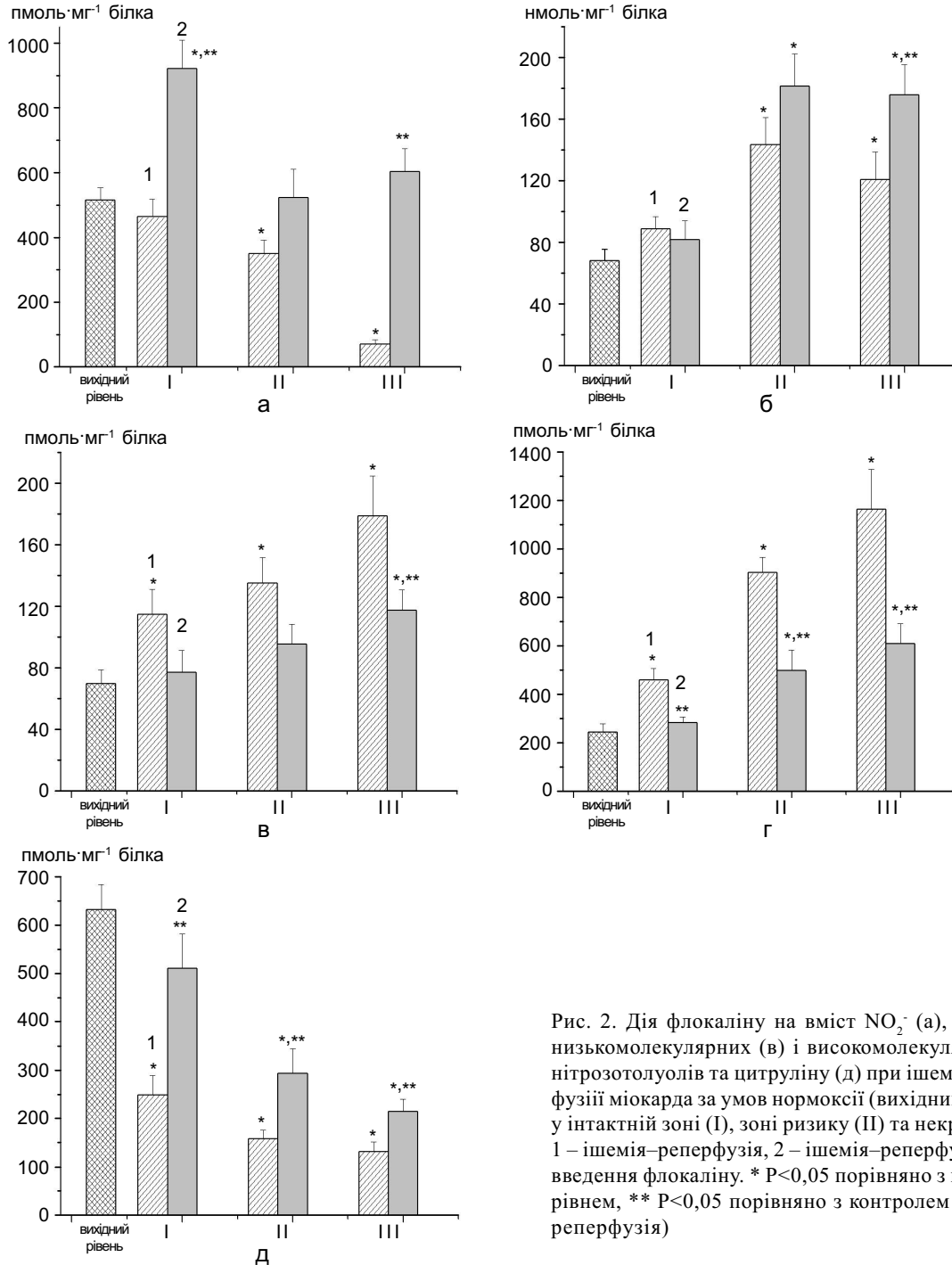


Рис. 2. Дія флокаліну на вміст NO_2^- (а), NO_3^- (б), низькомолекулярних (в) і високомолекулярних (г) нітрозотолуолів та цитрулін (д) при ішемії–реперфузії міокарда за умов нормоксії (вихідний рівень), у інтактній зоні (I), зоні ризику (II) та некрозу (III); 1 – ішемія–реперфузія, 2 – ішемія–реперфузія після введення флокаліну. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем, ** $P < 0,05$ порівняно з контролем (ішемія–реперфузія)

іншого боку, зниження вмісту цитруліну, що є природним інгібітором NOS (за механізмом зворотного зв'язку) за ішемії–реперфузії створює умови для більш інтенсивного індукцибельного синтезу NO. Флокалін запобігав значному зниженню вмісту цитруліну в міокарді (див. рис. 2,д), що корелює як із збереженням високої активності конститутивного синтезу оксиду азоту, особливо в інтактній зоні, так і зі зниженням активності аргінази, як було показано раніше (див. рис. 1,а,в).

Таким чином, активування K_{ATP} -каналів флокаліном при ішемії–реперфузії сприяє збереженню конститутивного біосинтезу NO на високому рівні, що може бути одним з механізмів його кардіопротекторної дії. А однією із вагомих протекторних функцій NO, що було синтезоване конститутивним шляхом, як відомо, є інгібування відкриття мітохондріальної пори та індукції апоптозу, в т.ч. іонами кальцію та вільними радикалами кисню [6, 14, 23].

У попередній роботі з субстанцією флокаліну [20] ми показали, що при ішемії–реперфузії в артеріальній крові при інгібуванні K_{ATP} -каналів пригнічуються вільнорадикальні реакції та підсилюються антиокиснювальні властивості крові: зменшується вміст H_2O_2 і стабілізується активність ферментів антиоксидантної системи: каталази та супероксиддисмутази. Відомо, що утворення нітрозотіолів, як НМНТ (в основному це нітрозильований глутатіон), так і ВМНТ (нітрозильовані білки) корелює з пулами пероксинітриту і, таким чином, як і вміст нітрат-аніона є маркером на інтенсивність його утворення. У різних ділянках лівого шлуночка серця після ішемії–реперфузії міокарда вміст нітрозотіолів збільшується (див. рис. 2,в,г). Зокрема, в зоні некрозу вміст НМНТ підвищувався у 2,6 раза порівняно з контролем, а ВМНТ – у 3,7 та 4,8 раза відповідно і в зоні ризику, і в зоні некрозу. Водночас при введенні флокаліну пули НМНТ і ВМНТ (див. рис. 2,в,г) мали тенденцію до зниження. Акти-

ватор K_{ATP} -каналів стабілізував рівні нітрозотіолів, можливо, внаслідок інгібування генерації пероксинітриту. Про обмеження його утворення флокаліном можуть свідчити також дещо вища (див. рис. 2,б), на відміну від експериментів без нього, концентрація нітрат-аніона, який генерується в основному неферментативно при нерадикальному розпаді пероксинітриту. Збільшення пулів нітрату при активації калієвих каналів може вказувати на те, що пероксинітрит меншою мірою розпадається на токсичні радикали – $\cdot OH$ і $\cdot NO_2$, які є ініціаторами ПОЛ, а більшою мірою на нетоксичний нітрат. Підтвердженням цьому є також зниження вмісту НМНТ і ВМНТ (див. рис. 2,в,г). Підвищення пулів нітрат-аніона є додатковим доказом інгібування флокаліном активності нітратредуктази, адже його зменшення при ішемії–реперфузії може відбуватися внаслідок інтенсивної утилізації нітрату вищезазначеним ферментом для реутилізаційного синтезу NO.

Таким чином, ці результати, як і дані щодо пригнічення утворення супероксиду, необхідного для утворення пероксинітриту, про що може свідчити зниження пулів як сечової кислоти (рис. 3,г) за дії активованої при реперфузії ксантинооксидази (нуклеотидного генератора супероксиду), так і ейкозаноїдів (рис. 4,б,в), що утворюються паралельно з супероксидом його ліпідними генераторами (ліпоксигеназою і циклооксигеназою при утворенні LTC_4 і TxB_2 відповідно), вказують на ще один можливий механізм кардіопротекторної дії флокаліну, який полягає у інгібуванні генерації супероксиду, індукцибельного *de novo* та реутилізаційного синтезу оксиду азоту, що зумовлює обмеження утворення токсичного пероксинітриту (в т.ч. активатора мітохондріальної пори і апоптозу) в кардіоміоцитах за ішемії–реперфузії.

Про обмеження як оксидативного (генерація активних форм кисню (АФК)), так і нітративного (утворення пероксинітриту) стресу за дії флокаліну можуть свідчити

також зміни вмісту стабільної активної форми кисню (H_2O_2) і продуктів неферментативного (ДК і МДА) та ферментативного (LTC_4 і TxB_2) окиснення ліпідів (див. рис. 3, 4). Пероксид водню утворюється в основному ферментативно із супероксид-аніона за дії супероксиддисмутази (СОД) і є маркером на окисний стрес, який розвивається за ішемії–реперфузії. Зокрема, в експериментах без флокаліну вміст H_2O_2 в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу збільшувався порівняно з нормоксією у 2,4; 5,2 та 7,2 рази відповідно (див. рис. 3,а), вказуючи на значне зростання генерації супероксиду, про що ми згадували раніше.

Водночас введення флокаліну достовірно зменшувало пули пероксиду водню в зонах ризику і некрозу серця у 2,2 та майже в 3 рази відповідно. Зниження вмісту H_2O_2 у ділянках лівого шлуночка ішемізованого серця свідчить про зменшення утворення в них супероксид-аніона та потужну антиоксидантну дію флокаліну, можливо, через активацію K_{ATP} -каналів (див. рис. 3,а). Підтвердженням цього може бути і менше зростання в різних ділянках серця порівняно з ішемією–реперфузією пулів як ДК, так і МДА продуктів ПОЛ (див. рис. 3,б,в). Зокрема, в експериментах без флокаліну вміст ДК в інтактній зоні, зоні ризику та

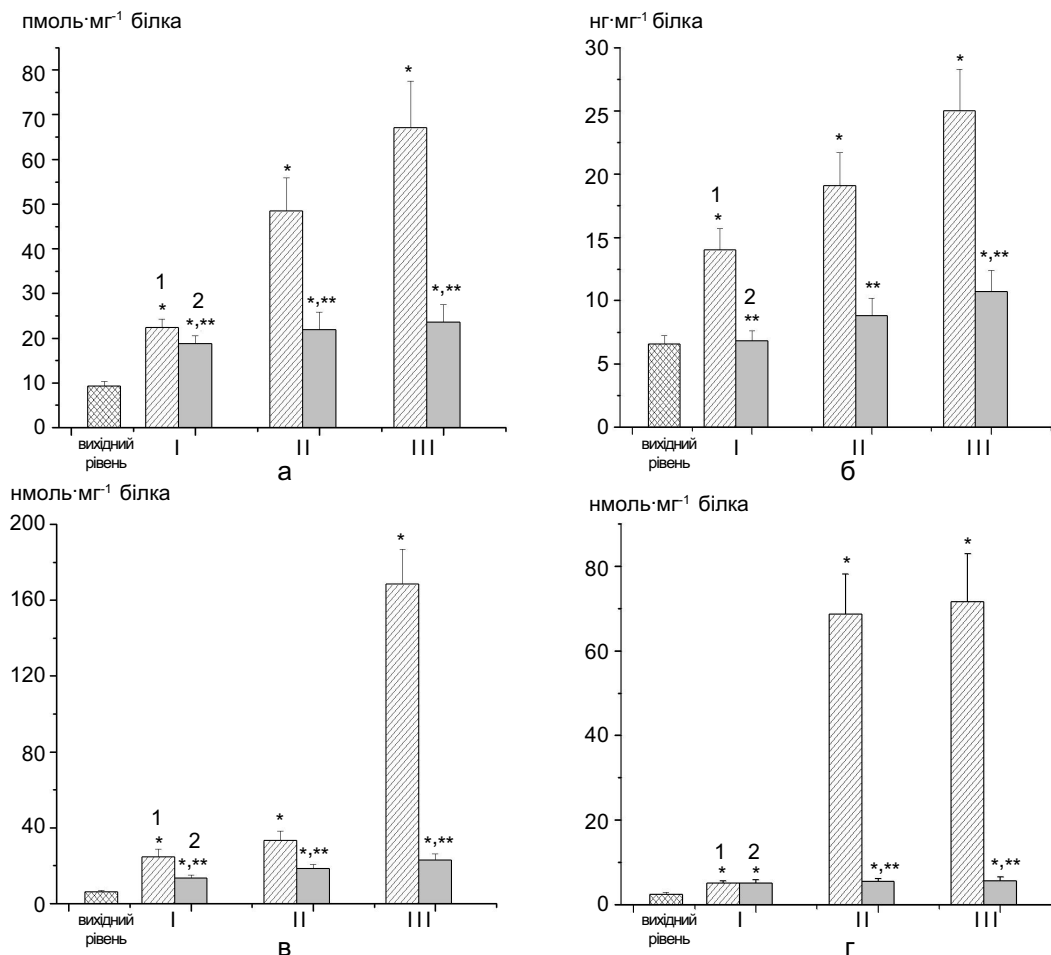


Рис. 3. Залежність вмісту H_2O_2 (а), дієнових кон'югатів (б), малонового діальдегіду (в) та сечової кислоти (г) при ішемії–реперфузії міокарда за умов нормоксії (вихідний рівень), у інтактній зоні (I), зоні ризику (II) та некрозу (III); 1 – ішемія–реперфузія, 2 – ішемія–реперфузія після введення флокаліну. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем, ** $P < 0,05$ порівняно з контролем (ішемія–реперфузія)

некрозу достовірно збільшувався порівняно з вихідним контролем (нормоксія) у 2,1, 2,9 та 3,8 рази відповідно (див. рис. 3,б). Водночас активація цих каналів попереджувала утворення ДК – зокрема, в інтактній зоні їх вміст становив ($6,8 \pm 0,8$) нг/мг білка, будучи таким же як і за нормоксії ($6,56 \pm 0,66$) нг/мг білка, тоді як без активації K_{ATP} -каналів флокаліном пули ДК у цій зоні зростали більш ніж удвічі. Аналогічні зміни відбувались і в зоні ризику та некрозу (див. рис. 3,б). ДК утворюються при неферментативному окисненні ліпідів, а зниження їх вмісту свідчить про потужну антиоксидантну дію флокаліну та інгібування утворення ініціаторів ПОЛ: $\cdot OH$ -радикала (при перетворенні H_2O_2 в реакціях Фентона і Хабер–Вайса за наявності заліза) та $\cdot OH$ і $\cdot NO_2$, що можуть утворюватися при розпаді пероксинітриту.

Подібні зміни відбувались і зі вмістом кінцевого продукту ПОЛ – МДА (див. рис. 3,в). При ішемії–реперфузії його пули в інтактній зоні та зоні ризику збільшувалися порівняно з нормоксією у 4,0 та 5,4 рази відповідно, у зоні некрозу – істотно у 27,1 рази (див. рис. 3,в). Водночас при введенні флокаліну та активації K_{ATP} -каналів значно укорочувалися вільнорадикальні ланцюги ПОЛ, про що свідчить потужне зменшення утворення МДА в протектованому міокарді порівняно з непротектованим (за ішемії–реперфузії), а саме в інтактній зоні у 2,2 рази, зоні ризику майже у 3 рази, а у зоні некрозу у 7,3 рази. Отже, флокалін може чинити не лише антиоксидантну, але і антирадикальну дію, укорочуючи (обриваючи) ланцюги реакції ПОЛ.

Флокалін чинить виражену антиоксидантну дію, інгібуючи ПОЛ зменшенням пулів не лише H_2O_2 , але, і супероксид-аніона ($O_2^{\cdot -}$), інгібуючи такі його генератори, як ксантиноксидаза (про що свідчить зниження вмісту сечової кислоти; див. рис. 3,г), ліпоксигеназа (зниження вмісту $LT C_4$; див. рис. 4,б) і циклооксигеназа (зниження вмісту TxB_2 ; див. рис. 4,в).

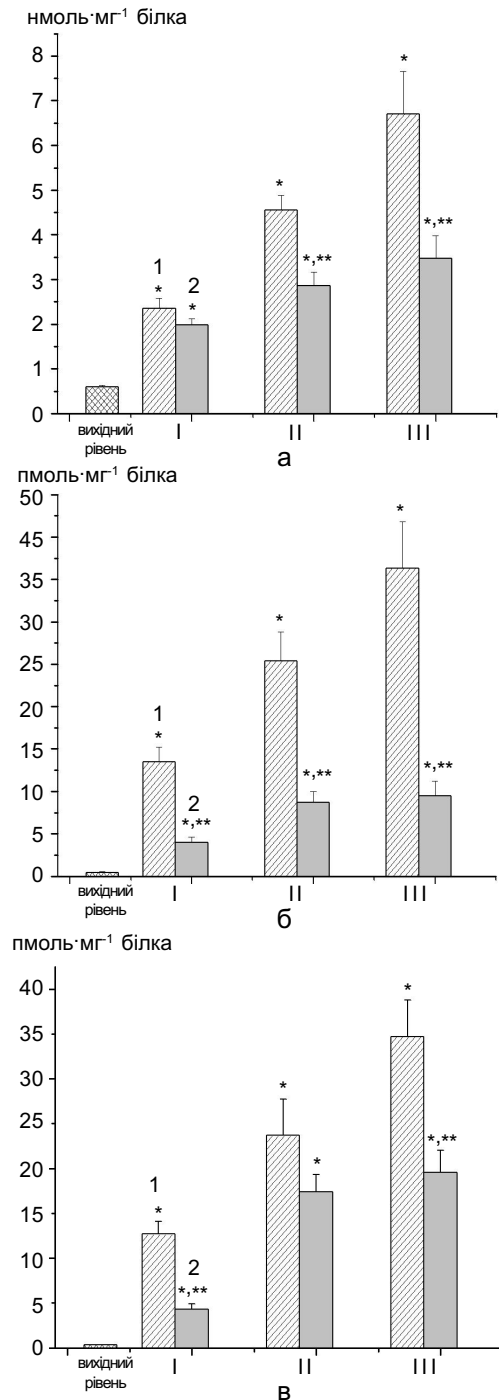


Рис. 4 Вплив флокаліну на вміст арахідонової кислоти (а), пептидолейкотриєну C_4 (б) та тромбоксану B_2 (в) при ішемії–реперфузії міокарда за умов нормоксії (вихідний рівень), у інтактній зоні (I), зоні ризику (II) та некрозу (III); 1 – ішемія–реперфузія, 2 – ішемія–реперфузія після введення флокаліну. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем, ** $P < 0,05$ порівняно з контролем (ішемія–реперфузія)

Концентрація сечової кислоти після ішемії–реперфузії порівняно з нормоксією в інтактній зоні збільшувалася у 2,1 раза, тоді як у зоні ризику та некрозу – майже у 30 разів, (див. рис. 3,г). Активування калієвих каналів флокаліном значно зменшувало утворення сечової кислоти (а, отже, і супероксиду) у зоні ризику та некрозу в 12,5 раза. При цьому її вміст залишався практично однаковим у різних ділянках ішемізованого серця (див. рис. 3,г), будучи лише приблизно удвічі вищим, ніж за умов нормоксії. Сечова кислота утворюється в ксантинооксидазній реакції, коли одночасно з нею генерується супероксид і, таким чином, вона є тестом на активність цього процесу. Він є дуже важливим з огляду на те, що за ішемії–реперфузії одночасно активується не лише синтез супероксиду, що відомо давно, але і відбувається інтенсивний синтез NO ізоферментом iNOS (див. рис. 1,а), що є передумовою для утворення пероксинітриду ($\text{NO} + \text{O}_2^- = \text{ONOO}^-$). Концентрація сечової кислоти у крові – важливий тест для встановлення пошкодження роботи серця. Як і сечовина, сечова кислота в низьких концентраціях є потентним водорозчинним антиоксидантом внаслідок зв'язування пероксинітриду і OH- та внаслідок інгібування ксантинооксидазної реакції за механізмом зворотного зв'язку. У високих концентраціях вона, є токсичною, і тому її зниження може бути тестом на нормалізацію роботи серця в процесі реперфузії після тривалої ішемії, а також одним із механізмів кардіопротекторної дії флокаліну.

За ішемії–реперфузії в міокарді значно підвищується вміст LTC₄, а саме в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу він збільшується у 31,4; 59,1 та 84,4 раза відповідно (див. рис. 4,б). Аналогічно збільшується і вміст TxV₂ – у 35,3 та 65,8 раза в інтактній зоні та зоні ризику, та майже на два порядки у зоні некрозу (див. рис. 4,в). Передішемічне активування K_{ATФ}-каналів флокаліном

значно зменшувало утворення як LTC₄, так і TxV₂. Зокрема, вміст LTC₄ у 3,4; 2,9 та 3,8 раза в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу відповідно (від 0,43 пмоль/мг білка ± 0,11 пмоль/мг білка за нормоксії до 4,0 ± 0,6; 8,7 ± 1,3 та 9,5 пмоль/мг білка ± 1,7 пмоль/мг білка), а вміст TxV₂ майже у 3 рази був меншим від контрольного (після ішемії–реперфузії без флокаліну) лише в інтактній зоні (4,3 пмоль/мг білка ± 0,6 пмоль/мг білка за кардіопротекції щодо 12,7 пмоль/мг білка ± 1,4 пмоль/мг білка без неї).

Зменшення утворення окиснених метаболітів арахідонової кислоти за дії флокаліну, можливо, відбувається не тільки через пригнічення ліпоксинази та циклооксигеназного шляхів її метаболізму, а і внаслідок зменшення пулів самої кислоти, які за допомогою активації K_{ATФ}-каналів флокаліном за ішемії–реперфузії міокарда мають тенденцію до зниження у зонах ризику та некрозу ішемізованого серця у 1,6 та 1,9 раза відповідно (див. рис. 4,а). Зменшення вмісту вільної арахідонової кислоти при активації K_{ATФ}-каналів, можливо, відбувається завдяки інгібуванню L-типу кальцієвих каналів цитоплазматичної мембрани, що супроводжується зниженням концентрації вільного кальцію у цитоплазмі та пригніченням активності кальційзалежних ферментів, зокрема фосфоліпази A₂. Властивість інгібувати високопорогові кальцієві канали була описана і для флокаліну [2].

При ішемії–реперфузії міокарда в зоні ризику та особливо некрозу значно збільшується вміст пулів сечовини (рис. 5,а). У низьких концентраціях вона є хелатором вільного заліза, тим самим проявляючи антиоксидантні властивості внаслідок інгібування генерації OH-, та інгібітором ресинтезу аргініну в цитруліновому циклі. Пряме її включення в цикл замість аспартату призводить до утворення токсичного уреїдосукцинату, який блокує цикл. При ішемії–реперфузії активність аргінази (див. рис. 1,в) і пули сечовини значно зростають,

передбачаючи можливість інтенсивного утворення уреїдосукцинату. В таких високих концентраціях сечовина може чинити кардіотоксичну дію. При фармакологічному прекодиціюванні міокарда флокаліном (активуванні K_{ATP} -каналів) вміст сечовини в різних зонах серця після ішемії–реперфузії статистично не відрізняється від такого в умовах нормоксії. Таким чином, кардіопротекторна дія активації K_{ATP} -каналів флокаліном може також полягати у інгібуванні утворення високого вмісту сечовини внаслідок зниження активності аргінази.

Відомо, що за ішемії–реперфузії в кардіоміоцитах та мітохондріях посилюється деградація гему, яка здійснюється захисним стрес-ферментом гемоксигеназою (гем = білірубін + CO + Fe). В наших дослідах про це свідчить значне збільшення як вмісту білірубіну (в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу у 7,1, 8,3 та 9 разів відповідно), так і заліза (у 4,6 і 6,3 раза у зоні ризику та некрозу). Флокалін не тільки не інгібував цей процес, але навіть його посилював (вміст білірубіну в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу порівняно з нормоксією збільшувався у 8,9; 11,3 і 17,8 раза відповідно, а заліза у зоні ризику та некрозу у 9,5 і 20,1 раза відповідно), що також може бути одним із механізмів його кардіопротекторного впливу, оскільки відомо про значну нейро- і кардіопротекторну дію двох продуктів гемоксигеназної реакції – білірубіну і CO (оксиду вуглецю). Зокрема, останній, що може генеруватись, як показують результати його копродуктів, у великих кількостях при деградації гему при фармакологічному прекодиціюванні та за допомогою флокаліну, може чинити протекторну дію при ішемії–реперфузії подібно до оксиду азоту [6, 12].

При ішемії–реперфузії міокарда також значно підвищується вміст продуктів деградації пуринових нуклеотидів: АТФ і ГТФ – ксантину, гіпоксантину та інозину (речовин, що мають оптичну густина при

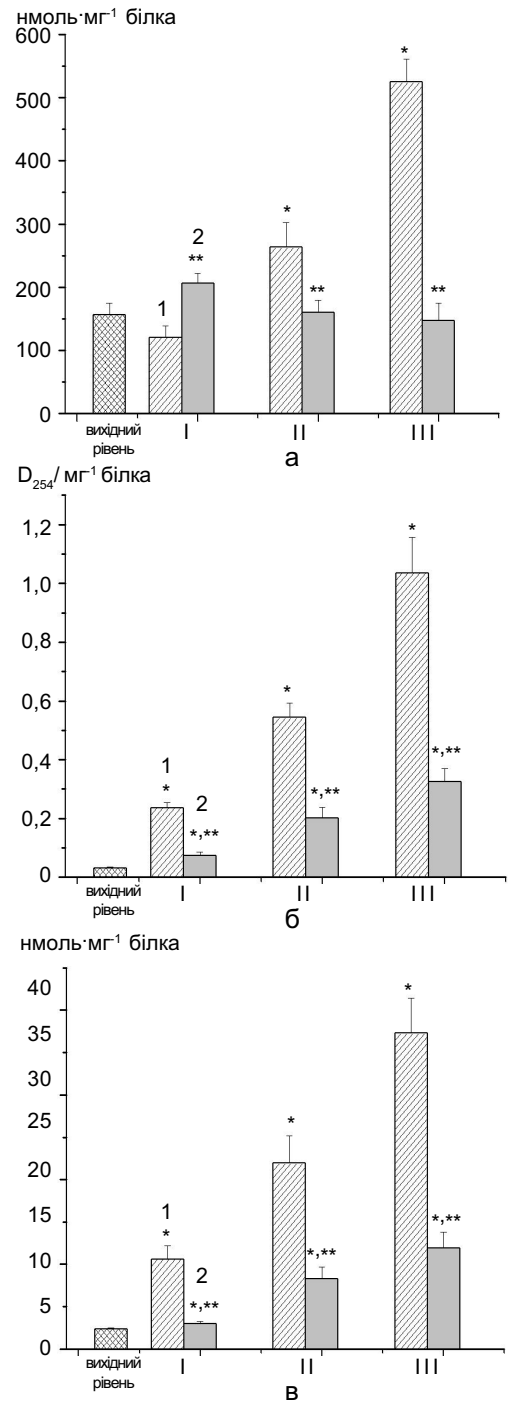


Рис. 5. Дія флокаліну на вміст сечовини (а), продуктів деградації пуринових нуклеотидів (б) та неорганічного фосфату (в) при ішемії–реперфузії міокарда за умов нормоксії (вихідний рівень), у інтактній зоні (I), зоні ризику (II) та некрозу (III); 1 – ішемія–реперфузія, 2 – ішемія–реперфузія після введення флокаліну. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем, ** $P < 0,05$ порівняно з контролем (ішемія–реперфузія)

$\lambda = 254$ нм), а саме у 7,4, 17,0 та 32,4 рази, та неорганічного фосфату – у 4,5, 9,2 та 15,7 рази в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу відповідно (див. рис. 5,б,в). Зменшення вмісту АТФ, з одного боку, погіршує роботу серця, з іншого, спричиняє, залежно від ступеня зниження його вмісту і ГТФ у мітохондріях апоптоз чи некроз кардіоміоцитів та ушкодження міокарда. Відомо, що активація $K_{\text{АТФ}}$ -каналів призводить до зменшення використання енергоресурсів клітини та до збереження запасів АТФ, що є особливо важливо перед ішемією. Введення флокаліну значно знижувало вміст продуктів деградації пуринових нуклеотидів (D_{254}) в міокарді, а саме у 3,2 рази в інтактній зоні та зоні некрозу та у 2,7 рази в зоні ризику порівняно з непротектованим контролем (ішемія–реперфузія), при цьому вміст неорганічного фосфату знижувався в цих зонах у 3,6, 2,6 та 3,1 рази (в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу відповідно) порівняно з ішемією–реперфузією без його введення (див. рис. 5,в). Отже, за фармакологічного прекодиціювання флокаліном знижувалася деградація молекул АТФ (шлях до апоптозу) і ГТФ (шлях до некрозу) в кардіоміоцитах, що може бути ще одним важливим механізмом кардіопротекторної дії флокаліну.

Таким чином, дослідження змін біохімічних показників у різних зонах серця за ішемії–реперфузії та дії флокаліну дало змогу ідентифікувати декілька можливих кардіопротекторних механізмів, що розвиваються при відкриванні $K_{\text{АТФ}}$ -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран. Вони полягають в інгібуванні окисного метаболізму внаслідок обмеження генерації АФК – супероксид-аніона, пероксиду водню та гідроксил-радикала (оксидативного стресу, в т.ч. ПОЛ); інгібуванні надлишкового індукційного і реутилізаційного синтезу оксиду азоту й утворення пероксинітриту (нітрозативного стресу, що також призводить до активації ПОЛ через вільнорадикальний розпад пероксинітриту);

інгібуванні утворення вільної арахідонової кислоти та ейкозаноїдів; інгібуванні деградації АТФ і ГТФ; та, навпаки, в стимуляції гемоксигеназної реакції. Одним із кардіопротекторних механізмів можна вважати також пригнічення деградації L-аргініну аргіназою й утворення сечовини. Дуже важливим, можливо, одним із головних механізмів кардіопротекторної дії флокаліну є стабілізація конститутивного *de novo* синтезу оксиду азоту, що разом зі зменшенням навантаження мітохондрії кальцієм попереджує відкривання мітохондріальної транспортної пори та індукваного нею некрозу та апоптозу кардіоміоцитів.

**Р.Б. Струтинский, А.В. Коцюрба,
А.П. Нещерет, Р.А. Ровенец, А.А. Мойбенко**

ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА В МИОКАРДЕ ПРИ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ И АКТИВАЦИИ АТФ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

В опытах на анестезированных собаках с воспроизведением экспериментальной ишемии (90 мин) и реперфузии (180 мин) исследовано изменения биохимических показателей в разных зонах сердца: интактной, риска и некроза, при внутрижелудочном введении лекарственной формы (таблетки) фторсодержащего активатора АТФ-чувствительных калиевых каналов флокалина в дозе 2,2 мг/кг. Исследовали биохимические показатели, которые характеризуют возможные механизмы действия флокалина – окислительный метаболизм (пулы H_2O_2 , мочево́й кислоты, диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, ейкозаноидов LTC_4 и TxB_2), биосинтез NO различными путями – окислительным *de novo* (активность индуцибельной, конститутивной NO-синтаз и пулы цитрулина) и неокислительным реутилизативным (активность нитрат-редуктазы), пулы стабильных метаболитов NO (нитрит- и нитрат-анионов, низко- и высоко-молекулярных нитрозотиолов), неорганический фосфат и другие продукты деградации АТФ и ГТФ, изменения в гемоксигеназной реакции (пулы билирубина и железа), неокислительный метаболизм L-аргинаина (активность аргиназы и пулы мочевины) и содержание свободной арахидонової кислоти. Анализ полученных данных позволил очертить несколько возможных кардиопротекторных механизмов флокалина. Они заключаются в ингибировании окислительного метаболизма за счет ограничения генерации свободных радикалов кислорода и азота, ингибировании гидролиза фосфолипидов и, тем самым, образования свободной арахидонової кислоти и патогенных в условиях ишемии

миокарда эйкозаноидов, ингибировании деградации АТФ и ГТФ и, возможно, в стимуляции защитной гемоксигеназной реакции. Одним из важных кардиопротекторных механизмов можно считать угнетение индуцибельного *de novo* и реутилизативного синтеза оксида азота и деградации аргинина аргиназой и, напротив, в сохранении конститутивного *de novo* синтеза оксида азота. Сохранение последнего на высоком уровне и вышеупомянутые изменения в окислительном метаболизме, предотвращающие образование токсического пероксинитрита, указывают на возможность участия в кардиопротекторном эффекте флокалина митохондриальной транспортной поры за счет предупреждения ее открытия и, как следствие, ингибирование индуцируемого ею апоптоза и/или некроза кардиомиоцитов.

Ключевые слова: аденозинтрифосфатчувствительные калиевые каналы, флокалин, ишемия–реперфузия, оксидативный стресс, нитрозативный стресс, перекисное окисление липидов, *de novo* синтез NO, реутилизационный синтез NO.

**R.B. Strutynskiy, A.V. Kotsuruba,
A.P. Neshcheret, R.A. Rovenets, A.A. Moibenko**

THE CHANGES OF METABOLISM IN MYOCARDIUM AT ISCHEMIA- REPERFUSION AND ACTIVATING OF THE ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS

In experiments on the anaesthetized dogs with modeling of experimental ischemia (90 min) and reperfusion (180 min) it was investigated the changes of biochemical processes in the different areas of heart (intact, risk and necrotic zone) during intragastric introduction of medicinal form (tablets) of flocalin (the fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium channels) in a dose 2,2 mg/kg. The data analysis allowed to define a few possible cardioprotective mechanisms of flocalin action at ischemia-reperfusion conditions: the preservation of sufficient levels of *de novo* (by cNOS) NO synthesis, an inhibition of *de novo* (by iNOS) and salvage (by NADH-dependent nitratoreductase) NO synthesis, an inhibition of L-arginine degradation by arginase, an inhibition of oxidizing metabolism due to limitation of ROS and RNS generation, inhibition of free arachidonic acid and eicosanoids synthesis, inhibition of ATP and GTP degradations and, possibly, stimulation of protective haem degradation. These changes may prevent formation of toxic peroxynitrite and suggest the possibility of participating in flocalin-mediated cardioprotective effects of warning a mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening and inhibition of apoptosis and/or necrosis of cardiomyocytes induced by it.

Key words: K_{ATP} channels, flocalin, ischemia-reperfusion, oxidative stress, nitrozative stress, lipid peroxidation, *de novo* synthesis of NO, salvage synthesis of NO

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лаб. дело. – 1988. – №2. – С. 60–64.
2. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Ю.Л., Войтичук О.И., Шуба Я.М. Возможные механизмы кардиопротекторных эффектов активации K_{ATP} -каналов при ишемии–реперфузии миокарда // Бюл. ХХ-читань ім. В.В. Підвисоцького (26–27 трав. 2011). – Одеса, 2011. – С. 135–136.
3. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А., Шаламай А.С. Організація заводського виготовлення препарату Флокалін – нового вітчизняного міотропного спазмолітика і кардіопротектора // Наука та інновації. – 2009. – 5, №1. – С. 80–84.
4. Покровский А.А. Биохимические методы исследования в клинике – М.: Медицина, 1969. – 437 с.
5. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. – В кн.: Совр. методы в биохимии / Под ред. Ореховича В.Н. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–67.
6. Струтинський Р.Б., Пивовар С.Н., Мойбенко А.А. АТФ–зависимые калиевые каналы и их роль как центрального звена кардиопротекции при ишемии–реперфузии миокарда. – В кн.: Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка, 2008. – С. 206–252.
7. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну: відносна роль активації сарколемальних та митохондріальних аденозинтрифосфатзалежних калієвих K_{ATP} -каналів // Фізіол. журн. – 2008. – 54, №6. – С. 15–23.
8. Струтинський Р.Б., Ровенець Р.А., Нещерет О.П., Тумановська Л.В., Бойчук Т.М., Джуран Б.В., Мойбенко О.О. Вплив лікарської форми флокаліну на перебіг ішемії–реперфузії міокарда // Там само. – 2011. – 57, №1. – С. 55–65.
9. Шугалей В.С., Козина А.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду // Физиол. журн. СССР. – 1977, № 8. – С. 1199–1202
10. Boyde T.R., Rahmatullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime // Anal. Biochem. – 1980. – 107, № 2. – P. 424–431.
11. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J. Increased activity and expression of Ca^{2+} -dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277, № 5. – P. 797–804.
12. Coceani F. Carbon monoxide in vasoregulation: The promise and the challenge // Circulat. Res. – 2000. – 86, №12. – P. 1184–1186.

13. Conte D., Narindrasorasa K.S., Sarkar B. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage // *Eur. J. Biochem.* – 1996. – **271**, №9. – P. 5125–5130.
14. Das A., Smolenski A., Lohmann SM, Kukreja RC. Cyclic GMP-dependent protein kinase I α attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in adult cardiomyocyte // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, №50. – P. 38644–38652.
15. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.* – 1982. – **126**, № 1. – P.131–138.
16. Gerdel D., Cederbaum A.J. Inhibition of the catalytic activity of alkoholdehydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc // *Biochemistry.* – 1996. – **35**, № 50. – P. 16186–16194.
17. Inoue I., Nagase H., Kishi K., Higuti T. ATP-sensitive K^+ channels in the mitochondrial inner membrane // *Nature.* – 1991. – **352**, №6332. – P. 244–247.
18. Noma A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle // *Ibid.* – 1983. – **305**, №5930. – P. 147–148.
19. Salter M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric oxide syntases // *FEBS Lett.* – 1991. – **291**, № 1. – P. 145–149.
20. Strutynskiy R.B., Kotsuruba A.V., Neshcheret A.P., Shysh A.N., Rovenets R.A., Moibenko A.A. Cardioprotective effects of ATP-sensitive potassium channels activation in experiments in vivo: influence on biochemical parameters of blood following ischemia-reperfusion of myocardium // *Int. J. Physiol. Pathophysiol.* – 2010. – **1**, №4. – P. 305–313.
21. Strutynskiy R.B., Neshcheret A.P., Tumanovska L.V., Rovenets R.A., Moibenko A.A. Cardioprotective effects of flocalin in *in vivo* experiments: influence of the hemodynamic and on the damage of myocardium under ischemia-reperfusion // *Ibid.* – №3. – C. 211–218.
22. Voitychuk O.I., Strutynskiy R.B., Yagupolskii L.M., Tinker A., Moibenko O.O., Shuba Y.M. Sarcolemmal cardiac KATP channels as a target for the cardioprotective effects of the fluorine-containing pinacidil analogue flocalin // *Brit. J. Pharmacol.* – 2011.– **162**, №3. – P. 701–711.
23. West M., Rokosh G., Clark D. Nitric oxide prevent mitochondrial permeability transition during ischemic-reperfusion: implication for the cardioprotective effects of late preconditioning // *Circulation.* – 2004. – 110. – P.III236.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
E-mail: ruslans@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 26.04.2011*