

УДК 577.35+612146

© Р.Б. Струтинський, Р.А. Ровенець, О.О. Мойбенко, 2012.

МЕХАНІЗМИ КАРДІОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ ВІТЧИЗНЯНОГО АКТИВАТОРА K_{ATP} КАНАЛІВ ФЛОКАЛІНУ

Р.Б. Струтинський, Р.А. Ровенець, О.О. Мойбенко*Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, відділ загальної та молекулярної патофізіології (керівник - академік НАН України, професор, д.мед.н., О.О. Мойбенко), м.Київ.***Ключові слова:** K_{ATP} канали, флокалін, ішемія-реперфузія, механізми кардіопротекції.

Флокалін є оригінальним вітчизняним активатором АТФ-чутливих калієвих (K_{ATP}) каналів сарколемальної та мітохондріальної клітинних мембран з дуже низькою токсичністю – у 3-4 рази меншою ніж у закордонних аналогів [2, 3, 7, 10, 19]. Система K_{ATP} каналів є одним із найважливіших ендогенних механізмів кардіопротекції при гіпоксії та ішемії міокарда, особливою якою є швидка реакція на зниження енергетичного потенціалу (рівня АТФ) в кардіоміоциті, що є характерним для цих патологічних станів – найбільш поширених причин гострих порушень діяльності серця. З нашої точки зору, порушення енергозабезпечення серця і скорочувальної функції міокарда приводить до двох типів кардіопротекторних реакцій, що реалізуються за рахунок механічних та енергетичних факторів, спрямованих на збереження енергетичного потенціалу міокарда і його функції. З одного боку це відбувається за рахунок зменшення навантаження на пошкоджене, ішемізоване серце, з іншого – через зменшення енергетичних витрат. Серед останніх важливу роль відіграють саме K_{ATP} канали, які реалізують взаємозв'язок між енергетичним забезпеченням серця (рівнем АТФ), електричною та скорочувальною функцією серця (його роботою). Це наразі один з рідких прикладів взаємозв'язку між молекулярними механізмами і ендогенним захистом серця при порушенні його функції. Суть цього захисту полягає в тому, що відкривання цих каналів зміщує мембранний потенціал в сторону гіперполяризації, зменшує тривалість потенціалу дії кардіоміоцитів за рахунок прискорення рефрактерного періоду, під час якого кальцій надходить в клітину, зокрема через кальцієві канали L-типу, та відповідно, внутрішньоклітинну концентрацію кальцію, який є одним із головних вторинних посередників чисельних метаболічних реакцій і активатором багатьох ферментів [12, 20]. Цілком можливо, що гіперполяризація плазматичної мембрани може відбуватись не лише при активації K_{ATP} каналів, але і внаслідок прямого інгібування флокаліном активності високопорогових кальцієвих каналів [1, 18]. Це по-перше, повинно гальмувати метаболічні процеси в клітині і відповідно, зменшувати її потреби в кисні та призводити до економії енергетичних матеріалів, що дуже важливо в умовах дефіциту

кровопостачання серця, та зменшувати вільнорадикальні процеси; по-друге, обумовлює дилататорні реакції коронарних та інших судин, що зумовлює краще кровопостачання міокарда та зменшує постнавантаження на ішемізоване, пошкоджене серце; по-третє, попереджує розвиток перенавантаження кардіоміоцита іонами кальція, що повинно запобігати такому не бажаному наслідку цього, як контрактири міофібрил, що приводять до некротичних пошкоджень міокарда; в четвертих, активація K_{ATP} каналів мітохондріальної мембрани запобігає перенавантаженню мітохондрій Ca^{2+} , інгібує відкривання мітохондріальної пори (МРТР), попереджує процеси апоптозу та некрозу [12-14].

В експериментах *in vivo* на анестезованих собаках показано, що доішемична активація K_{ATP} каналів за допомогою перорального введення таблеток флокаліну при експериментальній гострій ішемії-реперфузії призводить до відносного збереження скоротливої функції міокарда та суттєво зменшує розмір некротичної ділянки серця [5, 9, 17]. Зокрема, при введенні дози 2,2 мг/кг розмір зони інфаркту міокарда зменшується на 42,5% [9]. У механізмах захисту приймають участь канали сарколемальної та внутрішньої мітохондріальної мембрани кардіоміоцитів, судинних гладеньком'язових та ендотеліальних клітин [12, 20]. Швидке відкривання K_{ATP} каналів судинних клітин у відповідь на зменшення рівня високо-енергетичних фосфатів призводить до їх розширення, збільшення кровопостачання, притоку кисню та енергоресурсів до потребуючих цього тканин, та є одним із захисних механізмів при гіпоксії. Розширенню коронарних та інших судин, та попередженню реперфузійних спастичних реакцій, може сприяти позитивний вплив флокаліну на активність ферменту ендотеліальної нітрооксид синтази (eNOS). В дозах 2,2 - 3,3 мг/кг флокалін не лише запобігає суттєвому зниженню активності цього ферменту при ішемії, але навіть дещо підвищує її. Суттєве підвищення активності цього ферменту флокаліном спостерігається під час реперфузії [3, 4, 7]. Певним чином, в попередженні підвищення судинного тону під час ішемії-реперфузії міокарду флокаліном може також відігравати пригнічення утворення ейкозаноїдів – лейкотриєнів (LT_C_4) та тромбоксанів (TxV_2). Як відомо, ці ейкозаноїди мають

коронароконстрикторну та аритмогенну дію [15], і при гальмуванні їх продукції слід чекати усунення констрикторних реакцій судин серця та протидію порушенням ритму. І дійсно, одним із показників кардіопротекторної дії флокаліну слід вважати суттєве зниження рівня реперфузійних порушень ритму ішемізованого серця [5, 8, 17], що як відомо, притаманне всім активаторам K_{ATP} каналів, проте при їх використанні в невеликих дозах [11].

Зменшення флокаліном вмісту вільної арахідонової кислоти в артеріальній крові та ішемізованому міокарді може свідчити про гальмування деградації фосфоліпідів клітинних мембран, можливо в результаті пригнічення активності фосфоліпази [3, 4, 6, 7]. Це тим більш вірогідно, що одним з механізмів дії K_{ATP} каналів є зменшення входу кальцію в клітину і вірогідне зменшення активності Ca^{2+} -залежних ферментів, зокрема фосфоліпази A_2 . Ці дані, які свідчать про мембраностабілізуючу дію флокаліну збігаються з результатами електронноморфологічних досліджень, які вказують на корекцію порушень проникності мембран кардіоміоцитів в досліді з флокаліном [8]. Відомо, що ішемія-реперфузія супроводжується значними ультраструктурними порушеннями міокарда: конденсація ядерного хроматину, контрактури та лізис міофіламентів, набряк та деструкція мітохондрій, порушення цілісності сарколеми та ін. Флокалін в значній мірі попереджував ці прояви пошкодження кардіоміоцитів: сприяв збереженню цілісності сарколеми, структури внутрішньоклітинних органел та зменшенню кількості контрактур міофіламентів. Крім того, він в значній мірі попереджував деструкцію мітохондрій, що сприяє збереженню енергетичного потенціалу міокарда [8].

Мембраностабілізуючій дії флокаліну може сприяти його антиоксидантна дія, що полягає в інгібуванні окисного метаболізму за рахунок обмеження генерації вільних радикалів кисню та азоту - супероксид-аніону, пероксиду водню та гідроксил-радикалу (оксидативного стресу, в т.ч. процесу перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ)), інгібуванні надлишкового індуцибельного і реутилізаційного синтезу оксиду азоту і утворення пероксинітриту (нітрозативного стресу, що також приводить до активації ПОЛ внаслідок вільнорадикального розпаду пероксинітриту) [3, 4, 6, 7, 16]. Вірогідно, антиоксидантній дії флокаліну може сприяти не лише пригнічення метаболічних процесів, внаслідок зменшення внутрішньоклітинних рівнів Ca^{2+} , але і зменшення утворення LT_4 (який є одним з найбільш потужних хемоатрактантів для нейтрофілів) та попередження підвищення вмісту сечовини в ішемізованому міокарді, яка в низьких концентраціях є хелатором вільного заліза, тим самим проявляючи антиоксидантні властивості за рахунок інгібування

генерації OH^* , а в високих концентраціях, що утворюються при ішемії-реперфузії, сечовина може чинити кардіотоксичну дію [3, 4, 6, 7]. Отже, інгібування утворення високих рівнів сечовини при ішемії-реперфузії може складати ще один механізм кардіопротекторної дії флокаліну. Потужним механізмом захисту також є попередження зниження активності основних ферментів антиоксидантної системи: каталази та супероксиддисмутази [2, 16]. Запобігання збільшення утворення при ішемії-реперфузії міокарда кінцевого продукту ПОЛ – малонового діальдегіду свідчить про те, що флокалін може чинити не лише антиоксидантну, але і антирадикальну дію, укорочуючи (обриваючи) ланцюги реакції ПОЛ [2-4, 6, 7, 16].

Флокалін має потужний вплив на систему оксиду азоту та інгібує стимульовані ішемією-реперфузією біохімічні реакції в міокарді. Важливим механізмом його кардіопротекторної дії є підвищення конститутивного синтезу NO, збереження якого на високому рівні може призводити не лише до попередження констрикторних реакцій судин, але і до інгібування відкриття МРТР, зменшення апоптотичних та некротичних процесів [3, 4, 7]. Цьому може сприяти підвищення рівнів сфінгозину в ішемізованому міокарді [6]. Сфінгозин є метаболітом сфінгомієлінового сигнального каскаду, однією з функцій якого є регуляція апоптозу і виживання кардіоміоцитів, а також Ca^{2+} -незалежна активація cNOS. В мітохондріях серця сфінгозин може синтезуватися de novo, отже, підвищення його рівнів за активації K_{ATP} каналів флокаліном шляхом посилення його de novo синтезу в мітохондріях, або за рахунок активації гідролізу сфінгомієліну може бути ще одним кардіопротекторним механізмом дії флокаліну. Захисний антиішемічний вплив може полягати в інгібуванні надлишкового індуцибельного синтезу NO і деградації L-аргініну аргіназою, що забезпечує збереження субстрату (L-аргініну) для конститутивного синтезу NO. Значне інгібування флокаліном реутилізаційного синтезу NO, який має місце винятково в умовах ішемії, підтверджує його потужну антиішемічну дію [6]. Ще одним доказом якої є підвищення флокаліном пулів нітрит-аніону (вміст яких суттєво знижується при ішемії-реперфузії міокарда), який утворюється спонтанно при окисненні NO лише в оксигенованих розчинах [3, 4, 6, 7, 16].

При ішемії-реперфузії міокарда в артеріальній крові та міокарді значно зростають рівні продуктів деградації пуринових аденін- і гуанін-нуклеотидів (АТФ і ГТФ) - ксантину, гіпоксантину та інозину [3, 4, 6, 7, 16]. Суміш яких називають "мітохондріальним фактором" та вважають маркером відкриття МРТР та апоптозу. Флокалін значно знижував їх рівні та вміст неорганічного фосфату, що може свідчити про попередження відкриття МРТР та апоптозу [3, 4, 6,

7, 16]. Що було нами підтверджено в експериментах на суспензії мітохондрій та культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів. Показано, що флокалін дозозалежно інгібує Ca^{2+} - індуковане набухання мітохондрій (перенавантаження матриксу мітохондрій Ca^{2+} приводить до відкриття МРТР та їх набухання), з повним інгібуванням в дозі 0,1 ммоль/л. Зменшення рівня АТФ, з одного боку, погіршує роботу серця, з іншого, спричиняє, в залежності від ступеня деградації АТФ і ГТФ в мітохондріях, апоптоз чи некроз кардіоміоцитів та ушкодження міокарду. В експериментах з аноксію-реоксигенацією в культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів нами показано, що флокалін (5 мкмоль/л) спричиняє зсув співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин в сторону живих, пригнічуючи некроз, та практично повністю запобігає апоптозу. Суттєве зниження рівнів неорганічного фосфату та сечової кислоти (кінцевих продуктів деградації пуринових нуклеотидів) за дії флокаліну під час ішемії-реперфузії може свідчити про запобігання повної деградації АТФ, а отже, і утворення як супероксид-аніону за дії ксантиноксидази, так і пероксинітриту при взаємодії су пероксиду з NO [3, 4, 6, 7, 16]. Варто зазначити, що при повній деградації втрачається можливість ресинтезу пуринових нуклеотидів – як АТФ, так і ГТФ. Таким чином, флокалін, інгібуючи ксантиноксидазу, не лише запобігає утворенню супероксиду, але і запобігає втраті пуринових основ (гіпоксантину і ксантину) для ресинтезу пуринових нуклеотидів. Отже, відкриття $\text{K}_{\text{АТФ}}$ каналів флокаліном при ішемії-реперфузії знижує деградацію АТФ і ГТФ, інгібує відкриття МРТР, процеси апоптозу та некрозу, що є ще одним важливим механізмом його кардіопротекторної дії.

Таким чином, кардіопротекторні механізми флокаліну при ішемії-реперфузії міокарда полягають в: помірному зниженні артеріального тиску, що послаблює навантаження на уражене серце і сприяє збереженню серцевого викиду в перші години ішемії, та попередженні реперфузійного підвищення загально-периферичного опору та опору коронарних судин серця; суттєвому зменшенні кількості порушень ритму серця та відносному збереженні показників швидкості міокарда в період реперфузії; інгібуванні окисного метаболізму за рахунок обмеження генерації вільних радикалів кисню та азоту - супероксид-аніону, пероксиду водню та гідроксил-радикалу (оксидативного стресу, в т.ч. процесу ПОЛ); інгібуванні надлишкового індукційного і реутилізаційного синтезу оксиду азоту і утворення пероксинітриту (нітрозативного стресу, що також приводить до активації ПОЛ внаслідок вільнорадикального розпаду пероксинітриту); попередженні зниження активності ферментів антиоксидантної системи: каталази та супероксиддисмутази; інгібуванні гідролізу

фосфоліпідів (мембраностабілізуюча дія) і, тим самим, утворення вільної арахідонової кислоти та патогенних в умовах ішемії міокарда ейкозаноїдів (LTC_4 та TxB_2); пригніченні деградації L-аргініну аргіназою і утворення сечовини, підвищенні конститутивного синтезу NO (чому може сприяти підвищення рівнів сфінгозину (Ca^{2+} -незалежна активація cNOS)) та інгібуванні деградації АТФ і ГТФ. Вищезгадані зміни призводять до інгібування відкриття МРТР, зменшення апоптотичних та некротичних процесів, сприяють збереженню цілісності сарколеми, структури внутрішньоклітинних органел та зменшенню кількості контрактур міофіламентів, в значній мірі попереджують деструкцію мітохондрій, що сприяє збереженню енергетичного потенціалу міокарда.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Ю.Л., Войтичук О.И., Шуба Я.М. Возможные механизмы кардиопротекторных эффектов активации $\text{K}_{\text{АТФ}}$ каналов при ишемии-реперфузии миокарда // Бюлетень ХХ – читань ім. В.В. Підвисоцького, 26-27 травня 2011 р., Одеса, С.135-136.
2. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А. Розробка та підготовка до впровадження нового вітчизняного кардіопротекторного препарату - фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів Флокалін // Наука та інновації. - 2006. - Т.2, №4. - С.77-82.
3. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А., Шаламай А.С. Організація промислового виготовлення препарату Флокалін - нового вітчизняного міотропного спазмолітика і кардіопротектора // Наука та інновації. - 2009. - Т.5, №1. - С.80-84.
4. Струтинський Р.Б. Основні кардіопротекторні ефекти нового вітчизняного фторвмісного активатора $\text{K}_{\text{АТФ}}$ каналів – препарату Флокалін // Медична гідрологія і реабілітація. - 2009. - Т.7, №4. - С.4-12.
5. Струтинський Р.Б. Кардіопротекторні ефекти лікарської форми фторвмісного активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну // Фіз. журн. – 2009. – Т.55, №4. - С.83-90
6. Струтинський Р.Б., Коцюрuba А.В., Нещерет О.П., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Зміни метаболізму в міокарді при ішемії-реперфузії та активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів // Фіз. журн. – 2012. – Т.58, №1 – С.13-26
7. Струтинський Р., Мохорт М., Ягупольський Л., Мойбенко О. Флокалін - новий вітчизняний кардіопротектор // Вісник фармакології та фармацевтики. – 2010. – №3. - С.44-56
8. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну: відносна роль активації сарколемальних

та мітохондріальних аденозинтрифосфатзалежних калієвих K_{ATP} каналів // Фіз. журн. – 2008. – Т.54, №6. – С.15-23

9. 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 // Фіз. журн. – 2011. – Т.57, №1. – С. 55-65.

10. Патент України на корисну модель № 59490 А 61 К 31/00. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Ю.Л. „Спосіб зменшення розміру некротичного ушкодження міокарда при експериментальній ішемії-реперфузії міокарда”. № у 2011 02188; Заяв. 24.02.2011; Опубл. 10.05.2011.- Промислова власність.- 2011.- Бюл. №9.

11. Flagg T.P., Nichols C.G. Sarcolemmal K_{ATP} channels: what do we really know? // J Molec and Cell Cardiology.- 2005.- Vol.39.- P.61-70.

12. Gross G.J., Fryer R.M. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and myocardial preconditioning // Circ Res.- 1999.- Vol.84, №9.- P.973-979.

13. Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection // Cardiovasc Res.- 2004.- Vol.61.- P.372-385.

14. Hanley PJ, Daut J. $K(ATP)$ channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial $K(ATP)$ channels and an overview of alternative mechanisms. // J Mol Cell Cardiol.– 2005.– Vol.1.– P.17-50.

15. Juan H, Peskar BA, Simmet T. Effect of exogenous 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid on cardiac anaphylaxis // Br J Pharmacol.- 1987.- Vol. 90, №2.- P.315-325.

16. 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 Phys Pathophys. – 2010.-V.1, №4.-P.305-313.

17. Strutynskiy RB, Neshcheret AP, Tumanovska LV, Rovenets RA, Moibenko AA Cardioprotective effects of flocalin in *in vivo* experiments: influence of the hemodynamic and on the damage of myocardium under ischemia-reperfusion // Int J Phys Pathophys.- 2010.-V.1, №3.-C. 211-218.

18. Voitychuk O.I., Strutynskiy R.B., Shuba Y.M. Effects of ATP-dependen potassium channel activator flocalin include sodium and calcium channels inhibition in cardiomyocytes // The Biophysical Society 55th Annual Meeting in Baltimore, Maryland, March 5-9, 2011.

19. 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.- V.162.- №3.-P.701-711.

20. Yokoshiki H., Sunagawa M., Seki T., Sperelakis N. ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 1998.– Vol. 274.– P. 25-37.