

В.С. Нагібін, В.Є. Досенко, С.М. Пивовар,
О.О. Мойбенко, Л.М. Ягупольський

Фторований аналог діазоксиду попереджує апоптоз неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії – реоксигенації

В експериментах на первичній культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів крыси встановлено, що при моделюванні аноксії – реоксигенації активується процес запрограмованої клітинної смерті – апоптоз. Кількість апоптотических кліток (определялось по фрагментации ядра при окраске Hoechst 33342) при аноксії – реоксигенації збільшувалось в 2,1 рази ($P < 0,05$). Кількість живих і некротических кліток достовірно не змінювалось. Апоптоз неонатальних кардіоміоцитів при аноксії – реоксигенації передувался шляхом активації АТФ-залежних калієвих (K_{ATP}) каналів діазоксидом. Синтезований нами фторований аналог діазоксиду оказував такий же ефект – кількість апоптотических кліток зменшувалось до 3,7 %, що відповідає контрольному значенню. Примінення глібенкламіда, котрий повністю нівелював дію діазоксиду і його фторованого аналога, дозволяє утверждати, що антиапоптотический ефект указаних препаратів зв'язан з відкриттям K_{ATP} -каналів.

ВСТУП

Нині активно вивчаються механізми прекодиціонування – феномена підвищеної стійкості клітин до ішемії – реперфузії внаслідок попереднього впливу на ці клітини короткочасної гіпоксії або інших факторів. Цей феномен, описаний уперше для міокарда, найбільш ретельно досліджується саме в кардіології [3, 13, 15, 16, 17, 20, 21]. З метою отримання фармакологічних препаратів, за допомогою яких клітини серця переходять у прекодиційний стан, де вони стають менш залежними від кисневого забезпечення, проведені численні дослідження. Серед методів фармакологічного прекодиціонування особливу увагу привертають активатори АТФ-чутливих калієвих (K_{ATP}) каналів [3, 13, 16, 17, 20]. Ці канали існують на саркоплазматичній та внутрішній мембрані мітохондрій

кардіоміоцитів, де за звичайних умов знаходяться переважно у закритому стані. Активация їх відбувається в разі зменшення відношення АТФ до АДФ, тобто при гіпоксії, ішемії, порушенні окисного фосфорилування [2, 6]. Крім того, до відкриття цих каналів призводить фосфорилування їх SUR-субодиниці протеїнкіназою С (ізоформи δ і ϵ) [6]. До активації останньої в клітині призводить взаємодія G-пов'язаного рецептора аденозину зі своїм лігандом. Внаслідок цього активується фосфоліпаза С, утворюється діацилгліцерол, що й активує зазначену протеїнкіназу [13, 16]. Слід зазначити, що аденозин є одним із препаратів, що застосовують для відтворення фармакологічного прекодиціонування.

Одним із важливих механізмів ушкодження серця при ішемії та реперфузії є збільшення кількості клітин, що гинуть через апоптоз [19]. Тому терапевтичні зу-

силля необхідно спрямовувати не тільки на обмеження некротичної ділянки, але й на попередження апоптозу кардіоміоцитів. У цьому аспекті активатори $K_{ATФ}$ -каналів розглядаються як перспективні антиапоптотичні агенти [5, 10, 12, 14, 22, 23].

Мета нашої роботи – дослідити вплив активаторів $K_{ATФ}$ -каналів діазоксиду та його фторованого аналога на апоптоз кардіоміоцитів під час аноксії – реоксигенації.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на первинній культурі неонатальних кардіоміоцитів, отриманих з міокарда шлуночків дводобових шурів за допомогою ферментативного гідролізу за Reinecke та співавт. [18]. Шлуночки відокремлювали від передсердь, механічно подрібнювали ножицями. Отримані шматочки міокарда розміром 1–2 мм³ переносили у буферний сольовий розчин (рН 7,4) наступного складу (ммоль/л): НЕРЕС – 20, КСІ – 5,4, NaCl – 116,4, глюкоза – 5,5, Na₂НРО₄ – 0,4 і K₂НРО₄ – 0,4, що містив колагеназу II типу (95 ОД/мл) і панкреатин (0,6 мг/мл). Розчин попередньо оксигенували карбогеном. Після кожного з п'яти десятихвилинних циклів перетравлювання клітини збирали і відмивали від розчину ферментів за допомогою центрифугування в зазначеному буфері при 400 g протягом 1 хв. Зібрані таким чином клітини відділяли від неміокардальних елементів центрифугуванням при 900 g протягом 15 хв у градієнті перколу (54, 45 та 36 %). Кількість живих і некротичних клітин, визначена за допомогою 0,2%-го розчину трипанового синього, становила 85–95 і 5–15 % відповідно. Клітини розміщували на скельця, покриті 2%-м розчином желатину, зі щільністю 120 000 на 1 см². Культивування проводили протягом 1–2 діб у живильному середовищі такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199

(співвідношення DMEM/199 – 4 : 1), теляча сироватка – 15 %, Na₂CO₃ – 4,2 ммоль/л, НЕРЕС – 15 ммоль/л та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл) при 37°C у газовому середовищі – 5 % CO₂ та 95 % атмосферного повітря. Аноксію – реоксигенацію моделювали аерацією клітин безкисневою газовою сумішшю такого складу: 5 % CO₂ та 95 % Ar протягом 30 хв із наступною заміною живильного середовища та культивуванням клітин за вихідних умов протягом 60 хв. Активатор калієвих каналів діазоксид або його фторований аналог додавали у середовище за 15 хв до початку аноксії, а блокатор саркоплазматичних і мітохондріальних калієвих каналів глібенкламід – за 5 хв до застосування активаторів $K_{ATФ}$ -каналів. Досліджені речовини було використано в концентрації 100 мкмоль/л. Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин оцінювали цитологічно за допомогою забарвлення кардіоміоцитів біс-бензимідом (Hoechst 33342) і пропідіум йодидом в однаковій концентрації 8,75 мкмоль/л. Перший з них проникає через непошкоджену мембрану клітин і забарвлює ядерний хроматин, візуалізуючи таким чином живі та апоптотичні клітини (останні мають фрагментовані та пікнотичні ядра). Пропідіум йодид не спроможний проникати через плазматичну мембрану та забарвлює лише ядра клітин з пошкодженою плазмолемою, тобто некротичних.

Фторований аналог діазоксиду синтезовано в Інституті органічної хімії НАН України. Діазоксид, глібенкламід, живильні середовища, антибіотики, солі, перкол, Hoechst 33342, пропідіум йодид виготовлені фірмою “Sigma” (США).

Отримані цифрові результати обробляли математично на ПК з використанням програми Excel 2000. Вірогідність різниці середніх величин визначали за критерієм t Стьюдента та критерієм χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати свідчать про те, що при відтворенні аноксії – реоксигенації в культурі кардіоміоцитів відбуваються патологічні процеси, які спричиняють активацію некрозу та апоптозу. Якщо співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин у контролі становило 86,5; 9 та 4,5 % відповідно, то через 30 хв аноксії кількість живих клітин зменшувалася до 80 % ($P > 0,05$), некротичних, навпаки, збільшувалася до 14 % ($P > 0,05$), а

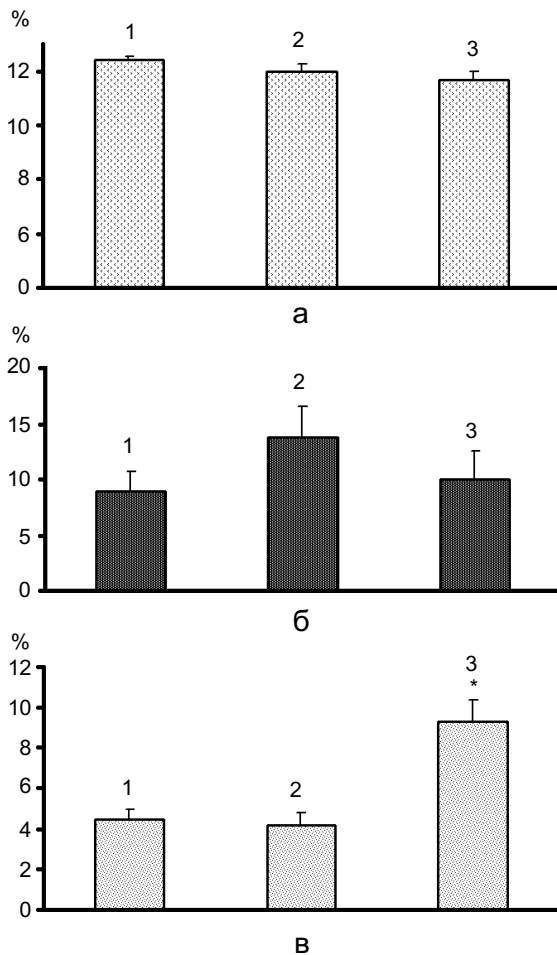


Рис. 1. Зміни кількості живих (а), некротичних (б) та апоптотичних (в) клітин при моделюванні аноксії – реоксигенації неонатальних кардіоміоцитів шурів (середні результати 5–7 дослідів).

1 – контроль, 2 – аноксія, 3 – аноксія – реоксигенація.
* $P < 0,05$ порівняно з контролем за критерієм т Стьюдента

кількість клітин, що вступили на шлях апоптозу не змінювалася (рис. 1). Проте при реоксигенації різко збільшувалася кількість саме апоптотичних клітин – вона сягала в окремих випадках 14 % (в середньому – $9,33\% \pm 1,04\%$; $P < 0,05$ відносно контролю). Кількість живих і некротичних клітин при цьому змінювалася невірогідно. Таким чином, ми підтвердили встановлений раніше факт, що саме за умов реоксигенації активується апоптоз кардіоміоцитів [19]. У окремих дослідях нами було встановлено, що подовження строку аноксії до 1 год не призводило до збільшення кількості апоптотичних клітин.

Застосування діазоксиду та його фторованого аналога дозволило деякою мірою вплинути на процес загибелі клітин при аноксії – реоксигенації (рис. 2). Так, введення діазоксиду в 2 рази зменшувало кількість клітин, що гинуть через апоптоз ($P < 0,05$ за критерієм χ^2). Для підтвердження специфічності дії препарату на K_{ATP} -канали ми використовували глібенкламід – інгібітор K_{ATP} -каналів, який повністю усував

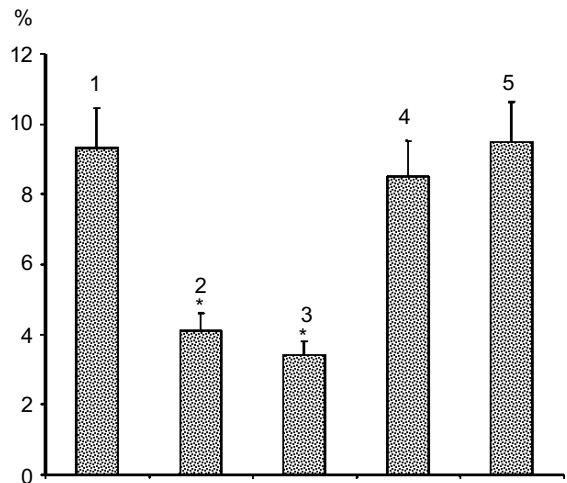


Рис. 2. Зміни кількості апоптотичних клітин при аноксії – реоксигенації: 1 – контроль, 2 – вплив діазоксиду, 3 – вплив фторованого діазоксиду (діазоксиду F), 4 – вплив глібенкламїду та діазоксиду, 5 – вплив глібенкламїду та фторованого діазоксиду (середні результати 5–7 дослідів).

* $P < 0,05$ за критерієм χ^2 порівняно з аноксією – реоксигенацією в контролі

антиапоптотичний ефект діазоксиду – кількість апоптотичних клітин не відрізнялася від такої при аноксії – реоксигенації в контролі. Фторований аналог діазоксиду виявився не менш активним фактором попередження апоптозу – кількість апоптотичних клітин після аноксії – реоксигенації зменшувалася в 2,2 раза ($P < 0,05$ за критерієм χ^2). Попереднє введення глібенкламіду пригнічувало дію фторованого аналога діазоксиду, так само, як і у випадку з діазоксидом. Слід зазначити, що вірогідних змін кількості некротичних клітин при дії активаторів K_{ATP} -каналів не відбувалося, а кількість живих збільшувалася внаслідок зменшення апоптотичних. Застосування діазоксиду, його фторованого аналога та глібенкламіду окремо, без моделювання аноксії – реоксигенації, суттєво не впливало на співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин у культурі.

Антиапоптотичні властивості мітохондріальних активаторів K_{ATP} -каналів уперше було описано Акао та співавт. у 2001 р. на культурі неонатальних кардіоміоцитів [5]. Застосування діазоксиду перед введенням у культуру перекису водню дозволило суттєво зменшити кількість TUNEL-позитивних (апоптотичних) клітин, транслокацію цитохрому *c* до цитоплазми, активність каспази 3 та швидкість гідролізу полі-(АДФ-рибозо-) полімерази, а також зниження $\Delta\psi$. У тому самому році опубліковано результати досліджень Хи та співавт. [24], які аналізували життєздатність клітин та рівень мітохондріального потенціалу при застосуванні діазоксиду, але відтворюючи на кардіоміоцитах власне аноксію – реоксигенацію (3 год аноксії та 2 год реоксигенації). Проте безпосереднє визначення кількості живих, некротичних та апоптотичних клітин цитофлюорометричним методом із забарвленням Hoechst 33342 і пропідіум йодидом було проведено групою японських дослідників [8] тільки у 2003 р. Важливо, що в цьому досліді

моделювалася не аноксія – реоксигенація, а оксидативний стрес (введення перекису водню). Досліджувана нами речовина не має аналогів у світі, і нами вперше встановлено антиапоптотичні властивості цього препарату. Відомо, що фторовані сполуки метаболізуються повільніше, ніж хлорвмісні (діазоксид має в своїй структурі атом хлору) [4]. За рахунок цього медичні препарати такого типу мають більш тривалий ефект, що дозволяє зменшувати і дозу препарату, і кратність його введення.

Окремо необхідно зупинитися на механізмах антиапоптотичної дії активаторів K_{ATP} -каналів. Слід зазначити, що за нормальних умов ці канали закриті та відіграють роль “рятівних шлюзів”, які відкриваються при виникненні енергодефіциту, наприклад при значному фізичному навантаженні [6]. Відкриття саркоплазматичних K_{ATP} -каналів призводить до виходу калію з цитоплазми за градієнтом концентрації, що в свою чергу спричинює гіперполяризацію мембрани та зменшує збудливість клітини. Одночасно це призводить до скорочення тривалості потенціалу дії [2, 3, 17]. При відкритті мітохондріальних K_{ATP} -каналів іони калію за градієнтом концентрації рухаються з цитоплазми до матриксу мітохондрій, що викликає незначну деполаризацію мітохондріальної мембрани (не перевищує 3–4 мВ) [6], попереджує зменшення об’єму мітохондріального матриксу, яке спостерігається при підвищеному навантаженні на дихальний ланцюг, опосередковує набухання мітохондріального матриксу (так званий swelling), призводить до зменшення захоплення мітохондріями кальцію, а також до виходу невеликої кількості іонів кальцію з мітохондрій [6, 9, 11, 17, 24]. І, нарешті, зменшення цитоплазматичної концентрації калію знов-таки призведе до гіперполяризації мембрани та скорочення тривалості потенціалу дії. Серед згаданих ефектів відкриття мітохондріальних K_{ATP} -каналів найбільші супе-

речки викликає swelling. За даними одних авторів, він сприяє кращій просторовій орієнтації ферментів дихального ланцюга та інтенсифікації окисного фосфорилування, на думку інших – призводить до роз'єднання дихального ланцюга та генерації вільних радикалів кисню. Останні, певною мірою, і можуть опосередковувати введення клітини в прекодиційний стан. Крім того, помірне збільшення концентрації іонів кальцію в цитоплазмі при відкритті мітохондріальних K_{ATP} -каналів також вважається одним із факторів прекодиціонування. Не можна не згадати і про так звану мітохондріальну пору, бо саме з її утворенням пов'язують вихід з мітохондрій до цитоплазми великої кількості різноманітних проапоптотичних факторів. Найбільш вагомим чинником відкриття мітохондріальної пори є зниження $\Delta\psi$, котре виникає при порушенні ефективності електронно-транспортної системи мітохондрій, що безпосередньо пов'язано зі зменшення концентрації АТФ. Не виключено, що відкриття K_{ATP} -каналів, яке відбувається при цьому, попереджує утворення мітохондріальної пори. Крім перелічених, можливо, існують інші механізми, що забезпечують попередження апоптозу при застосуванні активаторів K_{ATP} -каналів.

Проте в останні роки з'явилися дані про те, що діазоксид може викликати прекодиційний стан не внаслідок активації K_{ATP} -каналів, а безпосередньо взаємодіючи з певними ферментами дихального ланцюга. Доведено, що діазоксид пригнічує активність сукцинатдегідрогенази (комплекс II), тобто є роз'єднувачем дихального ланцюга. Це призводить до збільшення утворення вільних радикалів кисню та зменшення синтезу АТФ. Однак за результатами нашого дослідження антиапоптотичний ефект діазоксиду повністю нівелювався введенням глібенкламиду, тобто був опосередкований саме відкриттям K_{ATP} -каналів. Слід зазначити, що в наших дослідах діазоксид застосовувався за 15 хв до початку

аноксії – реоксигенації, тобто на момент початку аноксії калієві канали вже були запобіжно відкриті, що і зумовлювало ранню прекодицію. Здатність діазоксиду викликати віддалену прекодицію, можливо, пов'язана з його впливом на клітину як через K_{ATP} -канали, так і безпосередньо – внаслідок роз'єднання дихального ланцюга.

ВИСНОВКИ

1. Аноксія – реоксигенація неонатальних кардіоміоцитів призводить до активації апоптотичної загибелі клітин.
2. Діазоксид та його фторований аналог попереджують апоптоз кардіоміоцитів, спричинений аноксією – реоксигенацією.
3. Антиапоптотичний ефект діазоксиду пов'язаний з відкриттям K_{ATP} -каналів.

Автори статті висловлюють щире подяку старшому науковому співробітнику Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця Н. В. Макогон за методичну допомогу та цінні поради.

Nagibin V.S., V.E. Dossenko., Pivovar S.N., Moibenko A.A., Yagupolskiy L.N.

FLUORINE-CONTAINING ANALOG OF DIASOZIDE PREVENTED OF NEONATAL CARDIOMYOCYTES APOPTOSIS DURING ANOXIA-REOXYGENATION

In experiments on the primary culture of isolated neonatal rat cardiomyocytes it was established that anoxia-reoxygenation activated the process of programmed cell death, apoptosis. The amount of apoptotic cells (defined by fragmentation of a nucleus with Hoechst 33342 staining) during anoxia-reoxygenation was increased in 2.1 fold ($P < 0.05$). The amount of living and necrotic cells was not changed significantly. Apoptosis of neonatal cardiomyocytes during anoxia-reoxygenation was prevented by activation of ATP-dependent potassium (K_{ATP}) channels with diazoxide. Synthesized by us the fluorine-containing analogue of diazoxide had the similar effect: the amount of apoptotic cells was decreased to 3.7% that was similar to control meaning. Application of glybenclamide, which completely abrogated the action of diazoxide and its fluorine-containing analogue, allows us to assert that antiapoptotic effect of the substances mentioned above depends on K_{ATP} channels opening.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Попередження постреперфузійних порушень функції серця та неефективного використання кисню за допомогою інгібіторів відкриття мітохондріальної пори // *Фізіол. журн.* – 2002. – **48**. – № 6. – С.3–8.
2. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М. Дослідження вазомоторних ефектів нових фторвмісних синтетичних активаторів АТФ-залежних калієвих каналів // *Там само.* – 2000. – **46**, № 4. – С.17–23.
3. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М. та ін. Дослідження кардіопротекторних ефектів нового фтормісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів // *Там само.* – 2001. – **47**, № 2. – С.16–23.
4. Ягупольський Л.М., Петко К.І., Малютіна І.І. Фторвмісні модулятори кальцієвих та калієвих каналів. – У кн.: *Матеріали наук. сесії відділення НАН України, присвяченої 80-річчю НАН України (9–11 чер. 1998 р.)*. – Харків: Основа, 1998. – С.250–254.
5. Akao M., Ohler A., O'Rourke B., Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells // *Circulat. Res.* – 2001. – **88**, № 12. – P.126–1275.
6. Garlid D.K. Opening mitochondrial K_{ATP} in the heart – what happens, and what does not happen // *Basic Res. Cardiol.* – 2000. – № 95. – P.275–279.
7. Hanley P.J., Mickel M., Loffler M. et al. K_{ATP} channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart // *J. Physiol.* – 2002. – **542**, № 3. – P.735–741.
8. Ichinose M., Yonemochi H., Sato T., Saikawa T. Diazoxide triggers cardioprotection against apoptosis induced by oxidative stress // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* – 2003. – **284**, № 6. – H.2235–2241.
9. Korper S., Nolte F., Rojewski M.T. et al. The K^+ channel openers diazoxide and NS1619 induce depolarization of mitochondria and have differential effects on cell Ca^{2+} in CD34+ cell line KG-1a // *Exp. Hematol.* – 2003. – **31**, № 9. – P.815–823.
10. Lauritzen I., De Weille J.R., Lazdunski M. The potassium channel opener (-)-cromakalim prevents glutamate-induced cell death in hippocampal neurons // *J. Neurochem.* – 1997. – **69**, № 4. – P.1570–1579.
11. Lesnefsky E.J., Moghaddas S., Tandler B. et al. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging and heart failure // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2001. – **33**. – P.1065–1089.
12. Liu D., Lu C., Wan R. et al. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2002. – **22**, №4. – P.431–443.
13. Liu H., Zhang H.Y., Zhu X. et al. Preconditioning blocks cardiocyte apoptosis: role of $K(ATP)$ channels and PKC-epsilon // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* – 2002. – **282**, № 4. – H.1380–1386.
14. McCully J.D., Wakiyama H., Cowan D.B. et al. Diazoxide amelioration of myocardial injury and mitochondrial damage during cardiac surgery // *Ann. Thorac. Surg.* – 2002. – **74**, № 6. – P.2138–2145.
15. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // *Circulation.* – 1986. – **74**. – P.1124–1136.
16. Okubo S., Tanabe Y., Fujioka N. et al. Differential activation of protein kinase C between ischemic and pharmacological preconditioning in the rabbit heart // *Japn. J. Physiol.* – 2003. – **53**, № 3. – P.173–180.
17. O'Rourke B. Myocardial K_{ATP} channels in preconditioning // *Circulat. Res.* – 2000. – № 87. – P.845–855.
18. Reinecke H., Zhang M., Bartosek T., Charles E.M. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts // *Circulation.* – 1999. – **100**. – № 2. – P.193–202.
19. Scarabelli T.M., Stephanou A., Pasini E. et al. Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury // *Circulat. Res.* – 2003. – **90**. – P.745–748.
20. Shake J.G., Peck E.A., Marban E. et al. Pharmacologically induced preconditioning with diazoxide: a novel approach to brain protection // *Ann. Thorac. Surg.* – 2001. – **72**, № 6. – P.1849–1854.
21. Takashi E., Wang Y., Ashraf M. Activation of mitochondrial $K(ATP)$ channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway // *Circulat. Res.* – 1999. – **85**, № 12. – P.1146–1153.
22. Teshima Y., Akao M., Li R.A. et al. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress // *Stroke.* – 2003. – **34**, № 7. – P.1796–1802.
23. Wakiyama H., Cowan D.B., Toyoda Y. et al. Selective opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during surgically induced myocardial ischemia decreases necrosis and apoptosis // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2002. – **21**, № 3. – P.424–433.
24. Xu M., Wang Y., Ayub A., Ashraf M. Mitochondrial $K(ATP)$ channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* – 2001. – **281**, № 3. – H.1295–1303.

In-t фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 3.11.2003