

О.І. Войтичук, В.С. Асмолкова, Н.М. Гула, М. Оз, Я.М. Шуба

Вплив N-стеароїл- та N-олеоїлетаноламіну на потенціалзалежні натрієві канали кардіоміоцитів

До групи N-ацилетаноламінів (NAE) належать ліпіди, які здатні модулювати роботу іонних каналів плазматичної мембрани клітин без участі канабіноїдних рецепторів. Проте вплив різних представників NAE на потенціалзалежні натрієві канали (ПЗНК) у серцевій тканині прямо не показаний. У цій роботі ми дослідили модуляцію насиченим N-стеароїлетаноламіном (NSE) та одноненасиченим N-олеоїлетаноламіном (OEA) біофізичних властивостей ПЗНК плазматичної мембрани неонатальних кардіоміоцитів. NSE в діапазоні концентрацій 1–200 мкмоль/л суттєво не впливав на амплітуду вхідного натрієвого струму (I_{Na}), але зміщував криві його стаціонарної активації та інактивації на 2,4 та 10,6 мВ відповідно (при 100 мкмоль/л) у бік гіперполяризації. Кінетика активації струму під дією NSE не змінювалась, а інактивація в діапазоні потенціалів -60 – -30 мВ прискорювалась приблизно в 1,2 раза. На відміну від NSE, OEA дозозалежно блокував I_{Na} з $K_D = 11,4$ мкмоль/л $\pm 1,6$ мкмоль/л і величиною максимального блоку $30\% \pm 3\%$, а також викликав більший порівняно з NSE гіперполяризаційний зсув кривих стаціонарної активації та інактивації струму (-6,4 та -14,0 мВ відповідно при 100 мкмоль/л OEA). OEA практично не змінював кінетику активації I_{Na} , але сильніше, ніж NSE, прискорював кінетику його інактивації. Отже, обидва представники NAE впливають на потенціалзалежність активації, інактивації та кінетику I_{Na} . Водночас ці дії є більш вираженими для одноненасиченого OEA, який на додаток ще і частково пригнічував струм. Описані впливи NSE і OEA на натрієві канали можуть частково зумовлювати зниження збудливості кардіоміоцитів під дією цих ліпідів у нормі та патології.

Ключові слова: неонатальні кардіоміоцити, N-ацилетаноламіни, потенціалзалежні натрієві канали, інактивація.

ВСТУП

N-стеароїл- (NSE) та N-олеоїлетаноламін (OEA) належать до великої групи мінорних сигнальних ліпідів, яка включає ендоканабіноїди, N-ацильовані молекули етаноламіну, ейкозаноїди та жирні кислоти [1, 19]. Ці біоактивні ліпіди впливають на перебіг багатьох фізіологічних і патофізіологічних процесів, включаючи нейрональну збудливість [8], сон [6], епілепсію, нейропротекцію [6, 21], запалення та біль [3, 17], серцево-судинну модуляцію [12, 14], запліднення і проходження клітинного циклу [1, 7, 20]. У серцево-судинній системі активним амідом жирної кислоти є олеамід, який виступає ефективним вазодилататором та впливає

на структурний розвиток серцевого м'яза за допомогою інгібування зв'язків між кардіоміоцитами через щільні контакти [12]. Досить добре вивчена дія ендо- та екзоканабіноїдів у нервовій, серцево-судинній та імунній системах, яка опосередковується низкою таких специфічних до них рецепторів, як канабіноїдні CB_1 і CB_2 , ванілоїдний TRPV1, ядерні PPAR та G-білок-спряжені GPR18, GPR55 і GPR119 [1]. Найбільш досліджений представник N-ацилетаноламінів (NAE) – анандамід виявляє активність з представниками трьох груп рецепторів ($CB_{1,2}$, PPAR, TRPV1), в той час як OEA та інші представники NAE можуть по-різному впливати через деякі з

© О.І. Войтичук, В.С. Асмолкова, Н.М. Гула, М. Оз, Я.М. Шуба

них. Останні дослідження свідчать, що канабіноїди можуть діяти на низку іонотранспортних структур плазматичної мембрани клітин і без залучення вказаних рецепторів і сигнальних шляхів, які з ними пов'язані. Так, був описаний прямий вплив ендоканабіноїдів на функціональні властивості іонотропних серотонінових 5-HT₃-рецепторів, глутаматних NMDA, ГАМК_A, гліцинових та α7-нікотинінових рецепторів [16]. Подібні ефекти були виявлені також на різні типи кальцієвих, калієвих, хлорних і лігандкероаних іонних каналів, у тому числі на ванілоїдний рецептор TRPV1 [1, 16].

Такі молекули ліпідної природи, як цис-9,10-октодецеаноамід, анандамід і синтетичні канабіміметики AM404 і WIN55,212-2 здатні також регулювати активність потенціалзалежних натрієвих каналів (ПЗНК) [15]. Зокрема, здатність насичених NAE (14:0, 16:0 і 18:0) пригнічувати швидкі ПЗНК була продемонстрована в диференційованих клітинах нейробластоми C1300N18, в яких ці сполуки зменшували як базальний, так і вератридинактивований транспорт натрію, що свідчило про можливість модуляції ними нейрональної збудливості без участі канабіноїдних рецепторів [11]. Висновок про наявність прямої дії анандаміду на ПЗНК центральних нейронів було зроблено на основі даних про зміну зв'язування батрахотоксину з синаптосомами мозку під впливом цього ліпиду, а також про блокування ним вератридинзалежної деполяризації та тетродотоксинчутливої пачкової активності нейронів кори головного мозку [15]. В прямих електрофізіологічних дослідженнях на нейронах задньокорінцевих гангліїв було виявлено, що анандамід блокує як тетродоксинчутливу, так і тетродоксинрезистентну компоненти загального натрієвого струму (I_{Na}) і пришвидшує кінетику їх активації та інактивації [13].

У нашій попередній роботі ми показали, що NSE і, особливо, ОЕА здатні модулювати загальну збудливість кардіоміоцитів, змінюючи показники їх потенціалу дії (ПД)

та потенціалу спокою (ПС) [22]. Одним з ефектів цих речовин було деяке зменшення амплітуди та швидкості наростання ПД, що свідчило про їх можливий вплив на деполяризувальний, ПЗНК-опосередкований I_{Na} . Оскільки прямих відомостей щодо характеру дії цих представників NAE на ПЗНК у серці не існує, в цій роботі ми дослідили модуляцію біофізичних властивостей швидкого I_{Na} неонатальних кардіоміоцитів щурів за наявності NSE й ОЕА. Наші результати свідчать, що останні впливають на потенціалзалежність активації, інактивації та кінетику I_{Na} , що може частково зумовлювати зниження збудливості кардіоміоцитів під дією цих ліпідів у нормі та патології.

МЕТОДИКА

Первинна культура неонатальних кардіоміоцитів. Для виділення та культивування неонатальних серцевих міоцитів щурів використовували загальноприйнятну процедуру з незначними змінами [18]. Серця асептично виділяли із 2–3-добових щурів відразу після декапітації та поміщали в безкальцієвий фізіологічний розчин (ФР) при 0 °С такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4, MgSO₄ – 1, KH₂PO₄ – 1,2, Na₂HPO₄ – 0,5, піруват натрію – 5, HEPES – 10, глюкоза – 10; рН 7,35. Після подрібнення шматочки тканини розміром близько 1 мм вміщували на 4–5 хв у ФР при 21 °С, який прогазовували карбогеном (суміш 95 % O₂ та 5 % CO₂). Ферментативне диспергування тканини проводили у ФР з додаванням 0,46 мг/мл колагенази (Type IA, «Sigma-Aldrich», США) при 37 °С протягом 30 хв з легким перемішуванням і прогазовуванням карбогеном. Після ферментативної обробки тканину піпетували, центрифугували при малих обертах (3000 хв⁻¹) і після видалення супернатанту вносили у ФР, що містив Ca²⁺ в концентрації 0,2 ммоль/л. Процес відмивки ферменту повторювали тричі, після чого концентрацію кальцію у ФР підвищували до 1,5 ммоль/л. Це давало змогу

підготувати кальційтолерантні клітини до перенесення в розчин з фізіологічною концентрацією кальцію. Після центрифугування протягом 1 хв при низьких обертах (3000 хв^{-1}), супернатант видаляли, клітини переносили в культуральне середовище DMEM з додавання 10%-ї телячої сироватки і ще раз піпетували. З суспензії, яку отримали, клітини наносили із щільністю близько 100000 см^{-2} на скельця, покриті желатином («Sigma-Aldrich», США) і поміщені в чашки Петрі із культуральним середовищем. Клітини інкубували в атмосфері газів 5% CO_2 і 95% 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 культивування. Характер і частота скорочень кожного кардіоміоцита були різними і не залежали від активності сусідніх клітин. Для електрофізіологічних дослідів використовували клітини, які перед цим спонтанно скорочувалися.

Електрофізіологічні експерименти та розчини. Досліди проводили за 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 (за час близько 1 с) і прикладання речовин в умовах сталої температури використовували багатоканальну термостабілізовану мікроперфузійну систему власної розробки. Реєструвальні скляні мікропіпетки виготовляли за допомогою витяжки P-97 («Sutter Instr. Co.», США) з 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).

Для постійної перфузії клітин протягом електрофізіологічного дослідів використовували зовнішньоклітинний розчин Тіроде (PT) такого складу (ммоль/л): $\text{NaCl} - 144$, $\text{KCl} - 5,4$, $\text{CaCl}_2 - 1,8$, $\text{MgCl}_2 - 1,2$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 0,5$, $\text{HEPES} - 10$, глюкоза – 10; pH 7,4. Для запису натрієвих трансмембранних струмів клітину перфузували розчином зі зниженою концентрацією натрію, який містив іони цезію для усунення калієвої провідності та нікелю для блокування кальцієвих струмів, такого складу (ммоль/л): $\text{NaCl} - 35$, $\text{TEA-Cl} - 100$, $\text{CsCl} - 5$, $\text{CaCl}_2 - 0,5$, $\text{MgCl}_2 - 1$, $\text{NiCl}_2 - 1$, $\text{HEPES} - 10$, глюкоза – 10; pH 7,4. Реєструвальну піпетку заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): $\text{CsCl} - 40$, $\text{CsOH} - 85$, $\text{TEA-Cl} - 5$, аспарагінова кислота – 70, $\text{MgCl}_2 - 1$, $\text{EGTA} - 10$, $\text{HEPES} - 10$, $\text{MgATP} - 4$; pH 7,3 (доводили за допомогою аспарагінової кислоти). Всі реактиви, які використовували для приготування розчинів, були від фірми “Sigma-Aldrich” (США). NSE та ОЕА були синтезовані в Інституті біохімії ім. О.В. Паладіна НАН України (відділ біохімії ліпідів). Відповідність речовин та якість синтезу перевіряли за їх точкою плавлення, методом тонкошарової хроматографії за довжиною R_f і методом газорідинної хроматографії в порівнянні з комерційним аналогом [2]. NSE та ОЕА попередньо розчиняли у етанолі в концентрації 50 або 200 моль/л і додавали до PT для отримання необхідної концентрації речовини та обробляли ультразвуком протягом 5 хв. Концентрація етанолу у розчинах з NAE не перевищувала 0,05 %.

РЕЗУЛЬТАТИ

За наших експериментальних умов (35 ммоль/л Na^+ зовні з Cs^+ як основним внутрішньоклітинним катіоном) при деполяризації кардіоміоцита прямокутними імпульсами потенціалу наростаючої амплітуди (V_m ,

інкремент 10 мВ) від рівня підтримувального потенціалу (V_h) -90 мВ вхідний Na^+ -струм (I_{Na}) активується при -70 мВ, сягає максимального значення при -20 мВ, після чого поступово зменшувався, змінюючи свій напрям через неідеальну селективність ПЗНК, що дає змогу їм транспортувати у вихідному напрямку Cs^+ при видимому потенціалі реверсії (V_r) приблизно +60 мВ.

Прикладання NSE майже не змінювало амплітуду I_{Na} : навіть при концентраціях речовини 200 мкмоль/л амплітуда струму при $V_m = -20$ мВ зменшувалася тільки на 5 % (рис. 1,г). Водночас ОЕА викликав досить швидко (менше ніж за 1 хв) дозозалежне пригнічення максимальної амплітуди I_{Na} (рис. 2,г). У результаті апроксимації дозозалежності блокувальної дії ОЕА при потенціалі $V_m = -20$ мВ функцією Хілла були отримані значення максимального пригнічення при насичуючій концентрації речовини А, константи дисоціації K_D та коефіцієнта кооперативності p 30 %, 10,5 мкмоль/л $\pm 1,1$ мкмоль/л та 1,9 відповідно.

Порівняння пронормованих та усереднених вольт-амперних характеристик (ВАХ) I_{Na} в контролі і за наявності субмаксимальних концентрацій (100 мкмоль/л) NSE (див. рис. 1,б) та ОЕА (див. рис. 2,б) не виявило помітних змін у V_r струму, що свідчить про відсутність впливу цих речовин на селективність ПЗНК. Апроксимація висхідних гілок отриманих ВАХ функцією Голдмана–Ходжкіна–Каца, що описує “миттєву ВАХ” через відкриті канали за умов асиметричного розподілу проникаючих іонів (тобто при заданих V_r), інтерполяція “миттєвих ВАХ” в зону від’ємних потенціалів та ділення загальних ВАХ на значення “миттєвих ВАХ” при кожному значенні потенціалу дає змогу отримати залежності стаціонарної активації I_{Na} від потенціалу (див. рис. 1,в і 2,в). Їх апроксимації функціями Больцмана дали можливість визначити чи впливають NSE та ОЕА

на ключові показники стаціонарної активації – потенціал половинної активації – $V_{1/2}$ та фактор крутизни – k . Виявилось, що за контрольних умов ці показники становили: $V_{1/2} = -34,2$ мВ і $k = 8,2$ мВ. Прикладання 100 мкмоль/л NSE призводило до їх незначних, статистично недостовірних змін: гіперполяризаційного зсуву $V_{1/2}$ на 2,4 мВ (тобто до $V_{1/2} = -36,5$ мВ) і збільшенню k до 8,5 мВ. ОЕА в концентрації 100 мкмоль/л викликав суттєвіші зміни: гіперполяризаційний зсув $V_{1/2}$ на 3,0 мВ (тобто до $V_{1/2} = -37,1$ мВ) та підвищення k до 8,4 мВ, які, однак, теж не сягали порогу статистичної достовірності.

Для з’ясування того, чи впливають NSE та ОЕА на властивості інактивації ПЗНК, ми порівняли характеристики їх стаціонарної інактивації в контролі і за наявності 100 мкмоль/л кожної з речовин. Ці характеристики вимірювали за допомогою стандартного протоколу стимуляції, що складався з кондиціонуючого імпульсу змінної величини в діапазоні -100–70 мВ і тривалістю 400 мс, за яким слідував тестовий імпульс до $V_m = -20$ мВ. Для побудови самих характеристик амплітуди I_{Na} у відповідь на тестуючий імпульс нормувалися до амплітуди струму при кондиціонуючому імпульсі -100 мВ і відкладалися залежно від значення кондиціонуючого потенціалу. Отримані таким чином потенціалзалежності стаціонарної інактивації зображені на рис. 1,в і 2,в. Їх апроксимації функціями Больцмана дали змогу встановити, що за контрольних умов стаціонарна інактивація ПЗНК характеризується показниками $V_{1/2} = -78,6$ мВ і $k = 7,5$ мВ, які за наявності 100 мкмоль/л NSE змінюються до $V_{1/2} = -89,3$ мВ і $k = 7,4$ мВ, а за наявності 100 мкмоль/л ОЕА – до $V_{1/2} = -92,5$ мВ і $k = 8,4$ мВ. Таким чином, обидва представники NAE викликають зсув стаціонарної інактивації ПЗНК у бік гіперполяризації, однак з ОЕА цей зсув (14,0 мВ) був більшим, ніж з NSE 1(10,6 мВ).

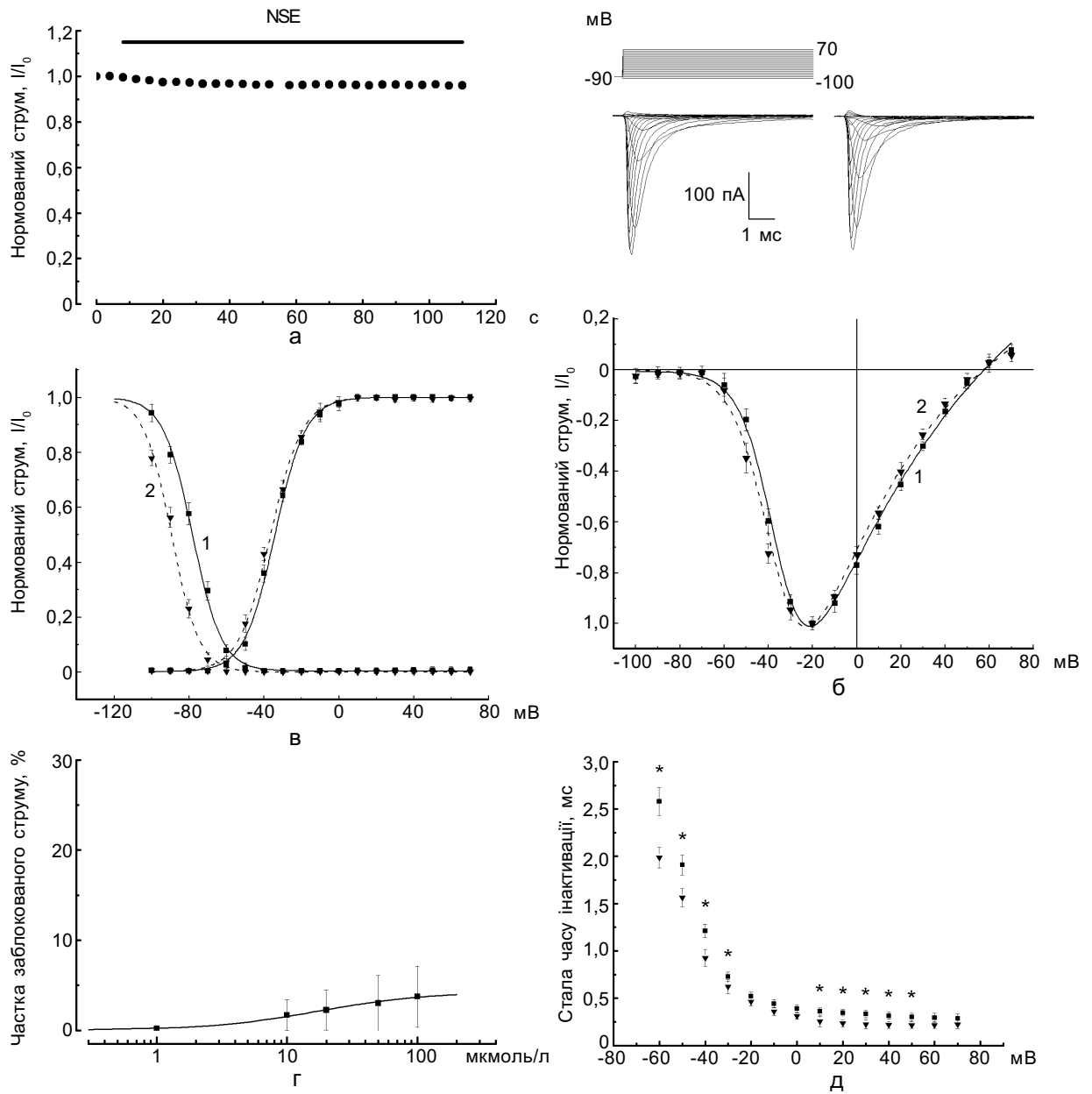


Рис. 1. Вплив N-стеарилетаноламіну (NSE) на струми через натрієві канали кардіоміоцитів: а – часозалежність змін амплітуди натрієвого струму (I_{Na}), активованого деполізаційним імпульсом потенціалу (V_t) до -20 мВ, у відповідь на прикладання 100 мкмоль/л NSE, б – вольт-амперні характеристики контрольного (I_{Na}) (1; n=10) та I_{Na} за наявності 100 мкмоль/л NSE (2; n=6); амплітуди струмів індивідуальних кардіоміоцитів при кожному V_t були нормовані на максимальне значення при $V_t = -20$ мВ та усереднені; суцільні лінії є апроксимаціями відповідних експериментальних залежностей добутком функцій Больцмана та Годмана–Ходжкіна–Каца; зверху показані типові записи струмів і протокол стимуляції до (зліва) та після прикладання 100 мкмоль/л NSE, в – криві стаціонарної активації та інактивації натрієвих струмів за контрольних умов (1; n=10) та за наявності 100 мкмоль/л NSE (2; n=6); суцільні лінії є апроксимаціями відповідних експериментальних залежностей функцією Больцмана, г – дозозалежність блокувальної дії NSE на I_{Na} при потенціалі -20 мВ (n=6), суцільна лінія є апроксимацією залежності функцією Хіла, позначення символів ті самі, що і на б, д – зміна часу інактивації I_{Na} під дією NSE (n=6), позначення символів ті самі, що і на б. * $P < 0,05$

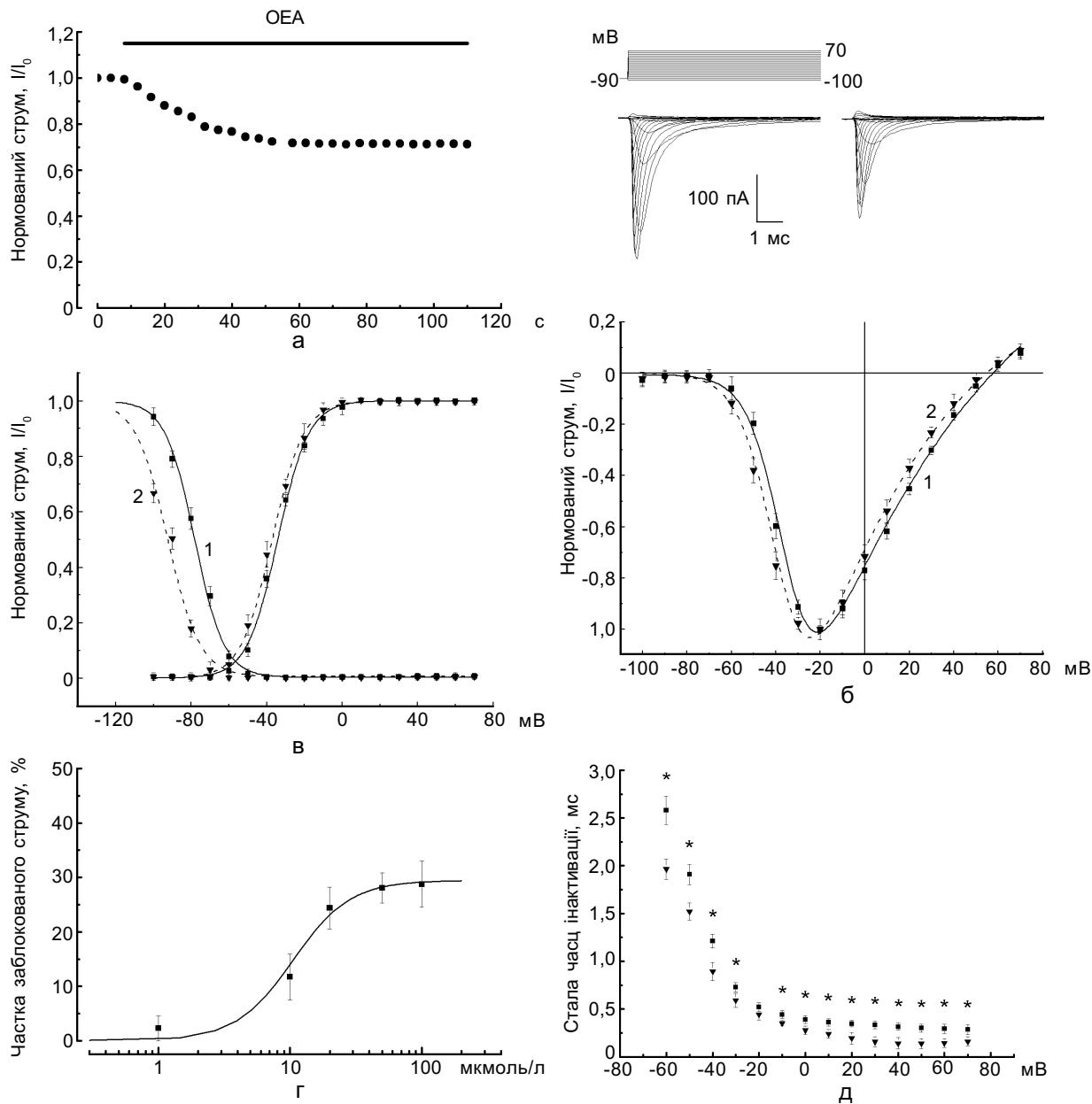


Рис. 2. Вплив N-олеїлетаноламіну (OEA) на струм через натрієві канали кардіоміоцитів: а – зміна амплітуди натрієвого струму (I_{Na}) в відповідь на тестовий імпульс потенціалу -20 мВ внаслідок прикладання 100 мкмоль/л OEA, б – вольт-амперні залежності за контрольних умов (1; $n=10$) та за наявності 100 мкмоль/л OEA (2; $n=6$); амплітуди струмів були нормовані на максимальне значення в кожному випадку; суцільні лінії є апроксимаціями відповідних експериментальних точок добутком функцій Больцмана та Годмана–Ходжкіна–Каца; зверху показані типові записи струмів та протокол стимуляції до (зліва) та після прикладання 100 мкмоль/л OEA, в – криві стаціонарної активації та інактивації натрієвих струмів за контрольних умов (1; $n=10$) та за наявності 100 мкмоль/л OEA (2; $n=6$); суцільні лінії є апроксимаціями відповідних експериментальних точок функцією Больцмана, г – дозозалежність блокуючої дії OEA на I_{Na} при потенціалі -20 мВ, суцільна лінія є апроксимацією експериментальних точок функцією Хіла ($n=6$), позначення символів ті самі, що і на б, д – зміна часу інактивації натрієвого струму під дією OEA ($n=6$), позначення символів ті самі, що і на б. * $P < 0,05$

Порівняння нормованих записів контрольних I_{Na} з I_{Na} за наявності 100 мкмоль/л NSE або OAE при $V_m = -20$ мВ (див. рис. 1, д і 2, д) виявило також помітне прискорення кінетики інактивації струмів під дією NAE без суттєвого впливу на кінетику активації. Апроксимація фази спаду струмів експоненційною функцією дала змогу встановити, що при $V_m = -20$ мВ постійна часу інактивації τ_i зменшується з контрольного значення $0,52 \pm 0,05$ до $0,46$ мс $\pm 0,05$ мс за наявності NSE і до $0,44 \pm 0,06$ за наявності OEA. Достовірне прискорення інактивації I_{Na} спостерігалось і при інших потенціалах в діапазоні -60 – $+40$ мВ.

ОБГОВОРЕННЯ

Як показують наші результати, NSE та OAE здатні зменшувати I_{Na} кардіоміоцитів, що значною мірою пояснює описаний нами раніше ефект зниження цими речовинами амплітуди та швидкості наростання серцевого ПД [22]. В основі зменшення лежать три дії NSE та OAE на серцеві ПЗНК: 1) їх безпосереднє неповне блокування, 2) гіперполяризаційний зсув їх стаціонарної інактивації, результатом чого є часткова інактивація каналів при потенціалі спокою та 3) деяке прискорення кінетики інактивації. Всі три дії, особливо величина безпосереднього блоку, є помітно більш вираженими для одноненасиченого OEA порівняно з насиченим NSE. Збільшення функціонального впливу NAE на канали-мішені зі збільшенням ступеня їх ненасиченості було показано раніше [16].

ПЗНК плазматичної мембрани непейсмейкерних кардіоміоцитів майже виключно представлені їх тетродоксинрезистентною $Na_v1,5$ -ізоформою (ген *SCN5A*). Тому зміну біофізичних властивостей натрієвих струмів, описаних у нашій роботі, можна віднести до впливу NSE саме на $Na_v1,5$ -канали.

NSE і OEA дещо гіперполяризують

потенціалзалежність стаціонарної активації натрієвих каналів. Цей ефект не опосередкований зміною поверхневого заряду, оскільки експериментальні умови передбачають вбудовування ліпиду в зовнішню частину ліпідного бішару. Поява додаткового незначного позитивного примембранного заряду означала би зміщення потенціалзалежності в бік додатних потенціалів. Хоч імовірним є і механізм накопичення NAE з внутрішнього боку мембрани внаслідок неспецифічного чи з участю специфічних фліпаз переходу із зовнішнього боку [23]. Подібне зміщення активаційної кривої спостерігалось при дії синтетичного аналога анандаміду WIN55,212-2 на натрієві канали нейронів тригемінальних гангліїв [10], але не в разі блокування анандамідом тетродоксинрезистентних натрієвих каналів (найімовірніше $Na_v1,8$) нейронів задньокорінцевих гангліїв щурів [13]. Наші досліди не виявили достовірної зміни в часі активації струму під впливом NSE і OEA, можливо, через недостатню швидкість оцифровування сигналу. В згаданій роботі з блокування анандамідом ПЗНК нейронів задньокорінцевих гангліїв щурів [13], проте, було виявлено зменшення часу їх активації за подібних експериментальних умов.

Обидва представники NAE модулювали інактиваційні властивості натрієвих каналів, зміщуючи криву стаціонарної інактивації в бік негативних потенціалів і прискорюючи час спаду струму. Подібні ефекти спостерігалися в роботах з безпосереднього блокування анандамідом натрієвих і низькопорогових кальцієвих каналів [5, 13]. Втрата ефекту внаслідок блокування транспортуючих систем для анандаміду змусила зробити висновок, що він безпосередньо модулює кальцієві канали переважно з внутрішнього боку плазматичної мембрани [4]. Існування як порівняно специфічних для окремих представників NAE (анандаміду і N-пальмітоїлетаноламіну), так і неспецифічних транспортерів

указує на можливість подібної поведінки і для інших представників NAE, зокрема NSE і ОЕА, хоча встановлення цього факту вимагає прямих експериментів.

Інгібування натрієвого струму, як правило, відбувалося менше ніж через 4 с після прикладання обох NAE та розвивалося поступово, а їх стаціонарний ефект спостерігався приблизно через 1 хв. Наші експерименти поки не дають змоги встановити можливий механізм блокування – безпосереднє зв'язування з білковим комплексом натрієвого каналу, через G-білокспряжені мембранні рецептори, або внаслідок вбудовування NAE в мембрану та пов'язану з цим зміну її в'язкості, поверхневого натягу та локальної мікрокривизни. Зміщення потенціалзалежностей активації та інактивації в бік від'ємних потенціалів може пояснюватися впливом досліджуваних ліпідів на рух сенсорів потенціалу ПЗНК, яке також може зумовлюватися кожним з цих механізмів.

Відомо, що блокування NAE кальцієвих каналів Т-типу залежить від ненасиченості та є найбільшим для арахідоноїлетаноламіну (20:4) і докозагексаноїлетаноламіну (22:6). Крім того, було показано, що структурний аналог ОЕА олеамід безпосередньо інгібує ПЗНК клітин нейробластоми N1E115, викликаючи подібні зміни потенціалзалежності інактивації та синаптосомах мозку мишей [12]. Ці факти свідчать на користь безпосереднього зв'язування як механізму дії ОЕА на натрієві канали.

Видається ймовірним, що блокування NSE і ОЕА натрієвих каналів у серці, є лише одним з багатьох впливів, які чинять ці ліпіди на серцевий м'яз і знижують збудливість і негативний інотропний ефект [9]. Саме блокування NSE і ОЕА натрієвих каналів викликає зменшення амплітуди та початкової швидкості наростання ПД передсердних, шлуночкових ендо- та епікардіальних клітин у культурі неонатальних кардіоцитів [22].

О.И. Войтичук, В.С. Асмолкова, Н.М. Гула, М. Оз, Я.М. Шуба

ВЛИЯНИЕ N-СТЕАРОИЛ- И N-ОЛЕОИЛЭТАНОЛАМИНА НА ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫЕ НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ КАРДИОМИОЦИТОВ

К группе N-ацилэтанолamines (NAE) относятся липиды, способные влиять на функционирование ионных каналов плазматической мембраны клеток без участия канabinоидных рецепторов. Тем не менее действие разных представителей NAE на потенциалзависимые натриевые каналы (ПЗНК) в сердечной ткани прямо не показано. В данной работе мы исследовали модуляцию насыщенным N-стеарилэтанолamineм (NSE) и одноненасыщенным N-олеилэтанолamineм (OEA) биофизических свойств ПЗНК плазматической мембраны неонатальных кардиомиоцитов. NSE в диапазоне концентраций 1–200 мкмоль/л существенно не влиял на амплитуду входящего натриевого тока (I_{Na}), но смещал кривые его стационарной активации и инактивации на 2,4 и 10,6 мВ соответственно (при 100 мкмоль/л) в сторону гиперполяризации. Кинетика активации тока под действием NSE не изменялась, а инактивация в диапазоне потенциалов -60 – -30 мВ ускорялась приблизительно в 1,2 раза. В отличие от NSE, OEA дозозависимо блокировал I_{Na} с $K_D = 11,4 \pm 1,6$ мкмоль/л и величиной максимального блока $30 \% \pm 3 \%$, а также вызывал больший по сравнению с NSE гиперполяризационный сдвиг кривых стационарной активации и инактивации тока (-6,4 мВ и -14,0 мВ соответственно при 100 мкмоль/л OEA). OEA практически не изменял кинетику активации I_{Na} , но сильнее, чем NSE, ускорял кинетику его инактивации. Таким образом, оба представителя NAE влияют на потенциалзависимость активации, инактивации и кинетику I_{Na} . В то же время эти действия более выражены для одноненасыщенного OEA, который к тому же еще и частично подавлял ток. Описанные эффекты NSE и OEA на натриевые каналы могут частично обуславливать снижение возбудимости кардиомиоцитов под действием этих липидов в норме и патологии.

Ключевые слова: неонатальные кардиомиоциты, N-ацилэтанолamines, потенциалзависимые натриевые каналы, инактивация.

O.I. Voitychuk, V.S. Asmolkova, N.M. Gula, M.Oz, Y.M. Shuba

THE EFFECTS OF N-STEAROYL- AND N-OLEOYLETHANOLAMINE ON CARDIAC VOLTAGE-DEPENDENT SODIUM CHANNELS

The group of N-acylethanolamines (NAE) includes lipids that are capable of modulating plasma membrane ion channels without involvement of cannabinoid receptors. However, the action of various members of NAE on voltage-gated Na^+ channels

(VGSC) in cardiac tissue is still not fully elucidated. Here using patch-clamp technique we have studied the modulation of biophysical properties of VGSC of neonatal cardiomyocytes by saturated N-stearoyl ethanolamine (NSE) and monounsaturated N-oleoyl ethanolamine (OEA). NSE in 1-200 μM concentration range did not significantly alter the amplitude of inward Na^+ current (I_{Na}), but 100 μM NSE shifted its steady-state activation and inactivation curves in hyperpolarization direction by 2.4 mV and 10.6 mV, respectively. Activation kinetics of the current was not changed by NSE, but its inactivation was accelerated by about 1.2-fold in the -60 – -30 mV range of membrane potentials. Unlike NSE, OEA dose-dependently inhibited I_{Na} with $K_D = 11.4 \pm 1.6 \mu\text{M}$ and maximal block at saturating concentration of $30 \pm 3 \%$. It also stronger than NSE shifted current's steady-state activation and inactivation curves (-6.4 mV and -14.0 mV, respectively, at 100 μM) in hyperpolarization direction. The effect of OEA on I_{Na} activation kinetics was negligible, but it more pronouncedly than NSE accelerated inactivation of the current. Thus, both members of NAE influence the voltage-dependence of activation, inactivation and kinetics of I_{Na} . These effects were more prominent for monounsaturated OEA, which also partially blocked I_{Na} . The discovered effects of NSE and OEA on VGSCs may in part be responsible for the decrease of cardiomyocytes' excitability by these lipids under normal as well as pathologic conditions.

Keywords: neonatal cardiomyocytes, N-acyl ethanolamines, voltage-dependent sodium channels, inactivation.

International center for molecular physiology of the National academy of sciences of Ukraine, Kyiv;

Palladin Institute of biochemistry of the National academy of sciences of Ukraine, Kyiv;

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, UAE University, Al Ain, UAE

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Alexander S.P., Kendall D.A. The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism // *Brit. J. Pharmacol.* – 2007. – **152**, № 5. – P. 602–623.
- Bachur N.R., Masek K., Melmon K.L., Udenfriend S. Fatty Acid Amides of Ethanolamine in Mammalian Tissues // *J. Biol. Chem.* – 1965. – **240**, № 3. – P. 1019–1024.
- Bradshaw H.B., Walker J.M. The expanding field of cannabinimetic and related lipid mediators // *Brit. J. Pharmacol.* – 2005. – **144**, № 4. – P. 459–465.
- Chemin J., Monteil A., Perez-Reyes E., Nargeot J., Lory P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide // *EMBO J.* – 2001. – **20**, № 24. – P. 7033–7040.
- Chemin J., Nargeot J., Lory P. Chemical determinants involved in anandamide-induced inhibition of T-type calcium channels // *J. Biol. Chem.* – 2007. – **282**, № 4. – P. 2314–2323.
- Chen C., Bazan N.G. Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection // *Prostaglandins and Other Lipid Mediat.* – 2005. – **77**, № 1–4. – P. 65–76.
- Di Marzo V., Melck D., De Petrocellis L., Bisogno T. Cannabimimetic fatty acid derivatives in cancer and inflammation // *Ibid.* – 2000. – **61**, № 1–2. – P. 43–61.
- Freund T.F., Katona I., Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling // *Physiol Rev.* – 2003. – **83**, № 3. – P. 1017–1066.
- Frol'kis V.V., Artamonov M.V., Zhukov O.D., Klimashevs'kii V.M., Marhitych V.M., Hula N.M. [Influence of saturated long-chain N-acyl ethanolamines on lipid composition and heart contractility of isolated rat heart under ischemia-reperfusion] // *Ukr Biokhim Zh.* – 2000. – **72**, № 1. – P. 56–63.
- Fu H., Xiao J.M., Cao X.H., Ming Z.Y., Liu L.J. Effects of WIN55,212-2 on voltage-gated sodium channels in trigeminal ganglion neurons of rats // *Neurol Res.* – 2008. – **30**, № 1. – P. 85–91.
- Gulaya N.M., Melnik A.A., Balkov D.I., Volkov G.L., Vysotskiy M.V., Vaskovsky V.E. The effect of long-chain N-acyl ethanolamines on some membrane-associated functions of neuroblastoma C1300 N18 cells // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 1993. – **1152**, № 2. – P. 280–288.
- Hiley C.R., Hoi P.M. Oleamide: a fatty acid amide signaling molecule in the cardiovascular system? // *Cardiovasc Drug Rev.* – 2007. – **25**, № 1. – P. 46–60.
- Kim H.I., Kim T.H., Shin Y.K., Lee C.S., Park M., Song J.H. Anandamide suppression of Na^+ currents in rat dorsal root ganglion neurons // *Brain Res.* – 2005. – **1062**, № 1–2. – P. 39–47.
- Leaf A., Xiao Y.F., Kang J.X., Billman G.E. Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids // *Pharmacol. Therap.* – 2003. – **98**, № 3. – P. 355–377.
- Nicholson R.A., Liao C., Zheng J., David L.S., Coyne L., Errington A.C., Singh G., Lees G. Sodium channel inhibition by anandamide and synthetic cannabinimimetics in brain // *Brain Res.* – 2003. – **978**, № 1–2. – P. 194–204.
- Oz M. Receptor-independent effects of endocannabinoids on ion channels // *Curr Pharm. and Des.* – 2006. – **12**, № 2. – P. 227–239.
- Park K.A., Vasko M.R. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons // *Trends Pharmacol Sci.* – 2005. – **26**, № 11. – P. 571–577.
- 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.
- Schmid H.H., Schmid P.C., Berdyshev E.V. Cell signaling by endocannabinoids and their congeners: questions of selectivity and other challenges // *Chem. Phys. Lipids.* – 2002. – **121**, № 1–2. – P. 111–134.
- Schuel H., Burkman L.J. A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of

- neurons and sperm // Biol. Reprod. – 2005. – **73**, № 6. – P. 1078–1086.
21. Veldhuis W.B., van der Stelt M., Wadman M.W., van Zadelhoff G., Maccarrone M., Fezza F., Veldink G.A., Vliegenthart J.F., Bar P.R., Nicolay K., Di Marzo V. Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases // J. Neurosci. – 2003. – **23**, № 10. – P. 4127–4133.
22. Voitychuk O.I., Asmolkova V.S., Hula N.M., Sotkis H.V., Oz M., Shuba Ia M. Regulation of the excitability of neonatal cardiomyocytes by N-stearoyl- and N-oleoyl-ethanolamines // Fiziol. Zh. – 2009. – **55**, № 3. – P. 55–66.
23. Wang J., Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system // Prostaglandins Other Lipid Mediat. – 2009. – **89**, № 3–4. – P. 112–119.

*Міжнарод. центр молекул. фізіології НАН України, Київ;
Ин-т біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
Ун-т Об'єднаних Арабських Еміратів*

*Матеріал надійшов
до редакції 11.01.2010*