

Р.Б. Струтинський, А.В. Коцюрuba, Р.А. Ровенець, Н.А. Струтинська,  
Ю.Л. Ягупольський, В.Ф. Сагач, О.О. Мойбенко

## Дослідження біохімічних механізмів кардіопротекторної дії лікарської форми активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну за ішемії–реперфузії міокарда

*У досліджах на собаках з відтворенням експериментальної ішемії (90 хв) та реперфузії (180 хв) міокарда вивчено зміни біохімічних показників в артеріальній крові при внутрішньошлунковому введенні лікарської форми (таблетки) фторвмісного активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих ( $K_{ATP}$ ) каналів флокаліну в дозі 2,2 мг/кг. Аналіз отриманих даних дозволив окреслити декілька можливих механізмів кардіопротекторної дії флокаліну. Вони полягають, з одного боку, в активації конститутивного *de novo* біосинтезу NO (зокрема, підвищення у 1,6 раза у кінці реперфузії) та обмеженні (у 3,74 та у 11,48 раза на кінець ішемії та реперфузії відповідно) деградації L-аргініну аргіназою, що зберігає субстрат для конститутивної NO-синтази. З другого боку, в пригніченні індукцйбельного *de novo* синтезу NO ферментом індукцйбельною NO-синтазою (зменчується у 2,36 раза на 60 хв ішемії та у 5 разів при реперфузії). Підвищення вмісту нітрит-аніона (у 1,32 раза на 60-й хвилині ішемії та у 1,69 раза на 120-й хвилині реперфузії) може свідчити про потужну антиішемічну дію флокаліну, адже він утворюється спонтанно при окисленні оксиду азоту лише в окисгенованих розчинах. Ще одним кардіопротекторним механізмом слід вважати значне обмеження генерації активних форм кисню та азоту (окисдатовного та нітрозативного стресу). До захисної дії відкривання  $K_{ATP}$ -каналів можна віднести зменшення утворення патогенних в умовах ішемії міокарда пептидолейкотриєну  $C_4$  (більш ніж у 2 рази протягом ішемії та у 1,4 раза під час другої години реперфузії) та тромбоксану  $B_2$  (більш ніж у 2,3 та 3 рази протягом ішемії та реперфузії відповідно). А також, пригніченні деградації АТФ та стимуляції гемоксигеназної реакції. Зменшення вмісту в артеріальній крові вільної арахідонової кислоти (у 3 та 2 рази протягом ішемії та реперфузії відповідно) може свідчити про гальмування деградації фосфоліпідів клітинних мембран, можливо в результаті пригнічення активності фосфоліпази  $A_2$ , та вказує на можливу мембраностабілізуючу дію активації  $K_{ATP}$ -каналів за ішемії–реперфузії міокарда.*

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

### ВСТУП

Відкривання АТФ-залежних калієвих ( $K_{ATP}$ ) каналів є одним із найважливіших ендогенних механізмів кардіопротекції при гіпоксії та ішемії міокарда, особливістю яких є швидка реакція на зниження вмісту АТФ в кардіоміоциті – неминучий наслідок порушення кровообігу серця. З нашої точки зору, порушення енергозабезпечення і скорочувальної функції

міокарда призводить до двох типів кардіопротекторних реакцій, спрямованих на збереження енергетичного потенціалу міокарда і його функції. З одного боку, це відбувається за рахунок зменшення навантаження на пошкоджене, ішемізоване серце, з іншого – витрат АТФ. Серед останніх важливу роль відіграють саме  $K_{ATP}$ -канали, які реалізують взаємозв'язок між вмістом останнього, електричною та скорочувальною функцією серця

© Р.Б. Струтинський, А.В. Коцюрuba, Р.А. Ровенець, Н.А. Струтинська, Ю.Л. Ягупольський, В.Ф. Сагач, О.О. Мойбенко

(його роботою). Фармакологічне відкривання цих каналів призводить до дозозалежного зниження скоротливої активності міокарда (збереження високоенергетичних фосфатів), загального та коронарного судинного опору (посилене постачання кисню та енергоресурсів) [6]. Наслідком цього за ішемії–реперфузії є відносно збереження показників скоротливої функції міокарда ішемізованого серця, помірне зниження артеріального тиску, попередження підвищення загально-периферичного опору та констрикторних реакцій у коронарних судинах у період реперфузії [7, 18]. Це наразі один з небагатьох прикладів зв'язку між молекулярними механізмами і ендогенним захистом серця при порушенні його функції. Суть такого захисту полягає в тому, що відкривання цих каналів зміщує мембранний потенціал кардіоміоцитів у бік гіперполяризації та зменшує тривалість потенціалу дії внаслідок прискорення рефрактерного періоду, під час якого кальцій надходить в клітину та, відповідно, його внутрішньоклітинну концентрацію. Останній, є одним із головних вторинних посередників численних метаболічних реакцій і активатором багатьох ферментів [13, 21]. Це, по-перше, повинно гальмувати метаболічні процеси в клітині і, знову, 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, зумовлює дилататорні реакції коронарних та інших судин та зменшує постнавантаження на ішемізоване, пошкоджене серце. По-третє, попереджує розвиток перенавантаження кардіоміоцита іонами кальція, що повинно запобігати такому небажаному наслідку, як контрактири міофібрил, що приводять до некротичних пошкоджень міокарда. По-четверте, активація  $K_{ATP}$ -каналів мітохондріальної мембрани запобігає перенавантаженню мітохондрій  $Ca^{2+}$ , інгібує відкривання мітохондріальної транспортної пори, попереджує процеси апоптозу та некрозу [13–15].

Метою нашої роботи було вивчення впливу лікарської форми (таблеток) вітчизняного активатора  $K_{ATP}$ -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран флоккаліну на зміну біохімічних показників артеріальної крові як на можливий механізм його кардіопротекторної дії при ішемії-реперфузії в експериментах *in vivo*.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на 24 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 (1,5 год) та реперфузію (3 год) міокарда без розтину грудної порожнини та зі збереженням спонтанного дихання [7]. Тварини були поділені на дві групи по 12 тварин у кожній – контрольну і дослідну. Тваринам обох груп моделювали регіональну ішемію міокарда та наступну реперфузію. Собакам лише дослідної групи за 60 хв до початку ішемії за допомогою зонда внутрішньолунково вводили лікарську форму (таблетки) флоккаліну в дозі 2,2 мг/кг. Протягом експерименту здійснювали багаторазовий відбір артеріальної крові, в якій досліджували біохімічні показники, що характеризують можливі механізми дії флоккаліну за ішемії–реперфузії міокарда – окисний метаболізм (пули  $H_2O_2$ , сечової кислоти, дієнових кон'югатів – ДК, ейкозаноїдів – пептидолейкотриєну  $C_4$  –  $LTC_4$  та тромбоксану  $B_2$  –  $TxB_2$ , біосинтез NO різними шляхами – активність індукцибельної iNOS і конститутивної cNOS NO-синтаз, пули стабільних метаболітів NO (нітрит- та нітрат-аніони), неорганічний фосфат та сумарні (інозит, гіпоксантин і ксантин) продукти деградації АТФ і ГТФ, зміни в гемоксигеназній реакції (пули загального білірубину і заліза), неокисний катаболізм L-аргініну (активність аргінази) і вміст вільної арахідонової кислоти (як маркер активності фосфоліпази A2).

Інтенсивність оксидативного стресу оцінювали за вмістом пероксиду водню і ДК-продуктів вільнорадикальної ланцюгової реакції перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), [1, 11]. Концентрацію сечової кислоти визначали в колориметричній реакції в аліквотах плазми крові за допомогою добірки реактивів фірми «Філіст-Діагностика» (Україна). Вміст ейкозаноїдів LTC<sub>4</sub> та TxV<sub>2</sub> вимірювали в спиртових екстрактах крові за допомогою радіоімунного методу, користуючись стандартними добірками реактивів фірми «Amersham» (Англія). Радіоактивність проб визначали на лічильнику фірми «Beckman» (Німеччина). Концентрацію арахідонової кислоти вимірювали методом тонкошарової хроматографії. Активність кальційзалежних конститутивних (cNOS=eNOS+nNOS) та кальційнезалежної iNOS оцінювали за комбінацією класичного метода [16] та сучасної його модифікації [10], пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Останній визначали високочутливим колориметричним методом [9]. Вміст нітрит- (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) та нітрат-аніона (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) визначали в безбілкових аліквотах крові в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [12] та бруциновим методом [8]. Базальну аргіназну активність оцінювали за утворенням сечовини [8]. Сумарні продукти деградації АТФ і ГТФ визначали спектрофотометрично, вимірюючи поглинання безбілкових аліквот крові при довжині хвилі 254 нм (D<sub>254</sub>) на спектрофотометрі СФ-26 ЛОМО у кварцевих кюветах. Зміни вмісту неорганічного фосфату, що утворюється при послідовній деградації як АТФ, так і ГТФ, фіксували колориметричним методом Островського [3]. Активність деградації гему захисним ферментом гемоксигеназою оцінювали за змінами вмісту загального білірубину і заліза. Білірубін визначали методом Яндрашика з використанням стандартної добірки реактивів (АТ «Реагент», Україна), залізо – фотометричним методом з використанням добірки реактивів фірми

«Філіст-Діагностика» (Україна). Вміст загального білка визначали 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 Стюдента. Значення P<0,05 розглядали як статистично достовірні.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дослідах на собаках з відтворенням експериментальної ішемії та реперфузії вперше вивчено зміни біохімічних показників в артеріальній крові при активації K<sub>АТФ</sub>-каналів лікарською формою флокаліну. Аналіз результатів дав змогу окреслити можливі кардіопротекторні механізми, що розвиваються при активації цих каналів. Отже, одним з них є потужний вплив на систему оксиду азоту. Виявлено, що в контрольних експериментах протягом ішемії–реперфузії міокарда значно зростає активність ферменту Ca<sup>2+</sup>-незалежної iNOS, з максимальним збільшенням у 7,46 раза на кінець реперфузії (рис. 1,а). Натомість швидкість сумарного конститутивного Ca<sup>2+</sup>-залежного синтезу оксиду азоту (в основному цитозольним ізоферментом eNOS і ізоферментом nNOS у мітохондріях), навпаки, пригнічена, з максимальним зменшенням у 2,88 раза на кінець ішемії (див. рис. 1,б). Зростає також неокисна деградація L-аргініну ферментом аргіназою, з максимальним збільшенням у 17,49 раза на 120-й хвилині реперфузії (див. рис. 1,в), що, за рахунок обмеження пулів спільного субстрату (L-аргініну) створює умови для одночасної генерації супероксид-аніона і оксиду азоту всіма ізоферментами NOS і, тим самим, утворення пероксинітриту і реалізації його пошкоджувальної дії в кардіоміоцитах і порушення роботи серця в цілому.

Водночас передішемичне активування K<sub>АТФ</sub>-каналів за допомогою флокаліну інгібує

стимульовані ішемією-реперфузією біохімічні реакції в міокарді. Так, активність ферменту iNOS за його дії суттєво не відрізняється від вихідного рівня (умови нормоксії) та істотно зменшується порівняно з ішемією-реперфузією без введення флокаліну, з максимумом у 2,36 раза на 60-й хвилині ішемії та у 5 разів на 3-й годині реперфузії (див. рис. 1,а). Слід зауважити, що через годину після введення, ще до початку ішемії, флокалін знижував активність ферменту iNOS у 1,31 раза. Аналогічні зміни протягом ішемії-реперфузії відбуваються і з активністю аргінази (див. рис. 1,в). В дослідях з флокаліном вона була значно зменшеною порівняно з експеримента-

ми без нього, з найбільшим значенням у 3,74 раза на 90-й хвилині ішемії та у 11,48 раза на кінець реперфузії. Натомість активність ферментів cNOS без активації  $K_{ATP}$ -каналів дещо пригнічена, особливо під час ішемії. Проте через годину після введення флокаліну, ще до початку ішемії, вона підвищувалася у 1,28 раза (порівняно з умовами нормоксії) та була такою протягом першої години ішемії. Значно посилювалася активність ферментів cNOS і у кінці реперфузії – у 1,6 раза. Відповідно, вона є збільшеною порівняно з експериментами без флокаліну у 2,72 та 2,93 раза на 10-й та 90-й хвилині ішемії, та у 1,78 раза на 180-й хвилині реперфузії (див. рис. 1,б).

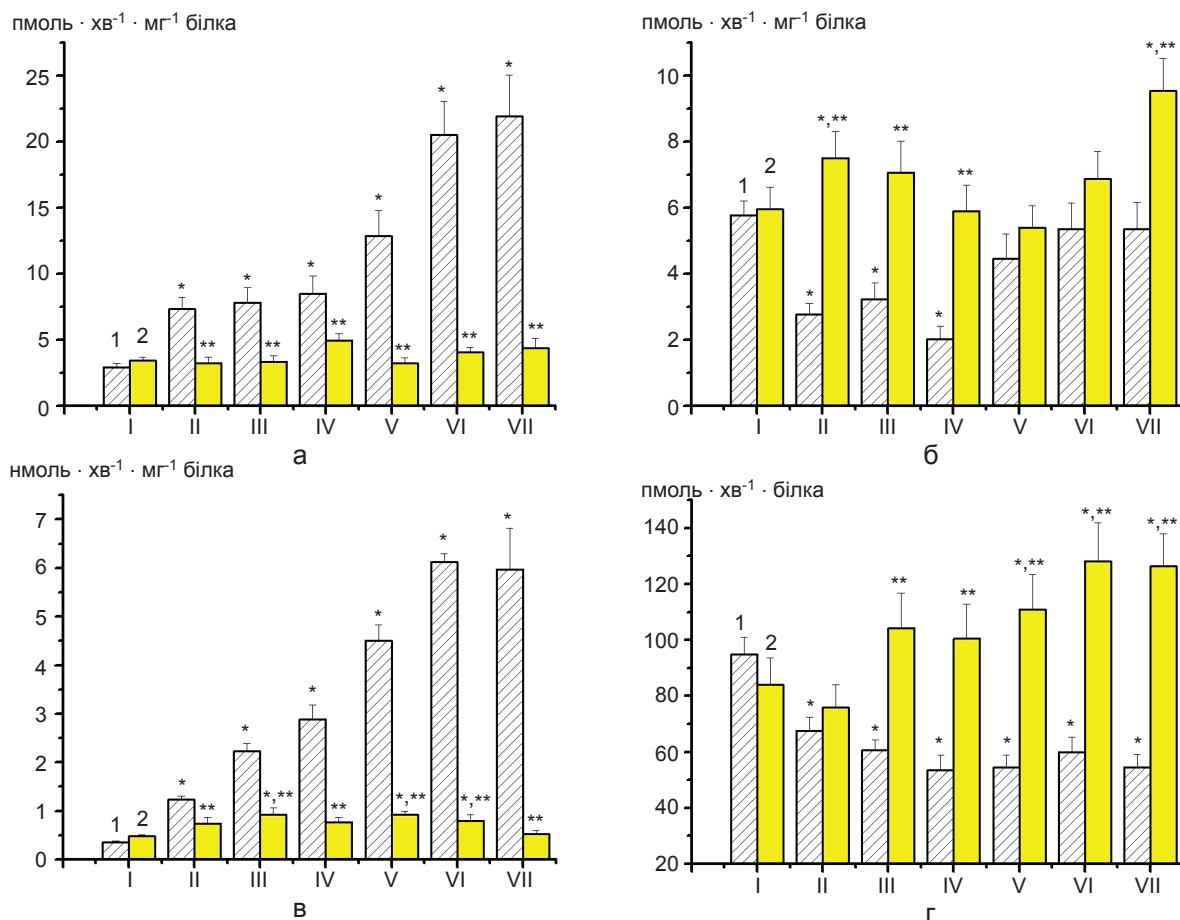


Рис. 1. Дія флокаліну на активність ферментів індукцибельної (а) та конститутивної NO-синтази (б), аргінази (в) та вміст нітрит-аніона (г) в артеріальній крові собак за ішемії-реперфузії міокарда в дослідях *in vivo*: 1 – контроль (без флокаліну), 2 – після введення флокаліну: I – вихідний рівень за умов нормоксії, II–VII – ішемія-реперфузія, II–IV – 10, 60 та 90 хв ішемії; V–VII – 60, 120 та 180 хв реперфузії. \* $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з контролем (ішемія-реперфузія без флокаліну)



Таким чином, одним із можливих кардіопротекторних механізмів дії флокаліну можна вважати інгібування надлишкового індукцйбельного синтезу оксиду азоту і деградації L-аргініну аргіназою, що забезпечує збереження субстрату для конститутивного синтезу оксиду азоту та, водночас, посилення синтезу останнього. Крім того, як нами було показано раніше, флокалін істотно пригнічує реутилізаційний синтез оксиду азоту (зменшення активності ферменту нітратредуктази) в різних зонах ішемізованого міокарда, який спостерігається винятково в умовах ішемії [4], що також може свідчити про його потужну антиішемічну дію.

Показником останньої може бути і вміст в артеріальній крові  $\text{NO}_2^-$ , який утворюється спонтанно при окисненні оксиду азоту лише в окисгенованих розчинах (рис. 1,г). В контрольних експериментах протягом усієї ішемії–реперфузії міокарда він значно зменшується щодо вихідного рівня з максимальними значеннями у 2,23 раза на 90-й хвилині ішемії та у 2,17 раза на 60-й та 180-й хвилині реперфузії. Водночас активація  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналів флокаліном призводила до підвищення вмісту  $\text{NO}_2^-$  в артеріальній крові у 1,34 раза (через годину після введення). З початком ішемії він продовжував триматися збільшеним, зокрема у 1,32 та 1,26 раза на 60-й та 90-й хвилині ішемії відповідно, порівняно з контрольними цифрами. З початком реперфузії він продовжував зростати та сягав максимальних значень на 3-тю годину реперфузії – у 1,69 та 1,66 раза на 120- та 180-й хвилині відповідно (див. рис. 1,г).

Ще одним проявом кардіопротекції за активації  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналів флокаліном можна вважати значне зниження вільнорадикальних процесів та попередження зниження активності ферментів антиоксидантної системи – каталази та супероксиддисмутази [17]. Про обмеження як оксидативного (генерація активних форм кисню – АФК), так і нітрозативного (утворення пероксинітриту) стресу за дії флокаліну можуть свідчити зміни вміс-

ту стабільної активної форми кисню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) і продуктів неферментативного дієнові кон'югати (ДК) та ферментативного [пептидолейкотриєни  $\text{C}_4$  і тромбокساني  $\text{B}_2$  ( $\text{LTC}_4$  і  $\text{TxB}_2$ )] окиснення ліпідів (див. рис. 2, 3). Пероксид водню утворюється, в основному, ферментативно із супероксид-аніона ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) за дії супероксиддисмутази (СОД) і є маркером на окисний стрес, який розвивається за ішемії–реперфузії. Зокрема, в контрольних експериментах вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$  під час ішемії та реперфузії значно збільшується з максимальними значеннями у 11,76 та 7,59 раза протягом ішемії та реперфузії відповідно (див. рис. 2,а), вказуючи на значне зростання генерації супероксид-аніона. Водночас введення флокаліну достовірно зменшувало пули пероксиду водню, а, отже, і генерацію супероксиданіону. Зокрема, порівняно з результатами за ішемії–реперфузії на 10-й і 60-й хвилині ішемії пули були зменшеними відповідно у 4 та 3,47 раза. Протягом реперфузії вони були зниженими у 2 рази зі ще більшим зменшенням у 2,5 раза на 180-й хвилині.

Підтвердженням антиоксидантної дії активації  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналів може бути зменшений порівняно з контрольними експериментами (ішемія–реперфузія) вміст продуктів ПОЛ ДК (див. рис. 2,б). В експериментах без флокаліну вміст ДК в артеріальній крові порівняно з вихідним рівнем практично протягом всієї ішемії–реперфузії був збільшений у 5,5 раза, з максимальним підвищенням у першу годину реперфузії у 7,4 раза (див. рис. 2,б). Активация цих каналів попереджувала утворення ДК – протягом ішемії у 1,3 та реперфузії у 1,8 раза, з подальшим зниженням у кінці реперфузії – у 2,4 раза. ДК утворюються при неферментативному окисненні ліпідів, а зниження їх вмісту свідчить про потужну антиоксидантну дію флокаліну та інгібування утворення ініціаторів ПОЛ:  $\cdot\text{OH}$ -радикала (при перетворенні  $\text{H}_2\text{O}_2$  в реакціях Фентона і Хабер-Вайса за наявності заліза) та  $\cdot\text{OH}$  і  $\cdot\text{NO}_2$ -радикалів, що утворюються при розпаді пероксинітриту. Відкривання  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналів

чинить виражену антиоксидантну дію інгібуючи ПОЛ через зменшення пулів супероксид-аніона ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) пригнічуючи активність таких його генераторів, як ксантиноксидаза (про що свідчить зниження вмісту сечової кислоти, див. рис. 2,в), ліпоксигеназа (зниження вмісту  $\text{LTC}_4$ , див. рис. 3,б) та циклооксигеназа (зниження вмісту  $\text{TxB}_2$ , див. рис. 3,в). Сечова кислота утворюється в ксантиноксидазній реакції, коли одночасно з нею генерується супероксид-аніон і, таким чином, вона є тестом на активність цього процесу. Вміст сечової кислоти в артеріальній крові

протягом ішемії–реперфузії постійно зростає, з піком на 2-гу годину реперфузії – у 9,6 та 8 разів на 90-й та 120-й хвилині відповідно від вихідного рівня. Активування калієвих каналів значно зменшувало її утворення (див. рис. 2,в). Це є дуже важливим з огляду на те, що за ішемії–реперфузії одночасно активується не лише генерація супероксид-аніона, але і інтенсивний синтез NO ізоферментом iNOS (див. рис. 1,а), що є передумовою для утворення пероксинітриту ( $\text{NO} + \text{O}_2^- = \text{ONOO}^-$ ). Підтвердженням зменшення продукції останнього при активації  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналів за ішемії–

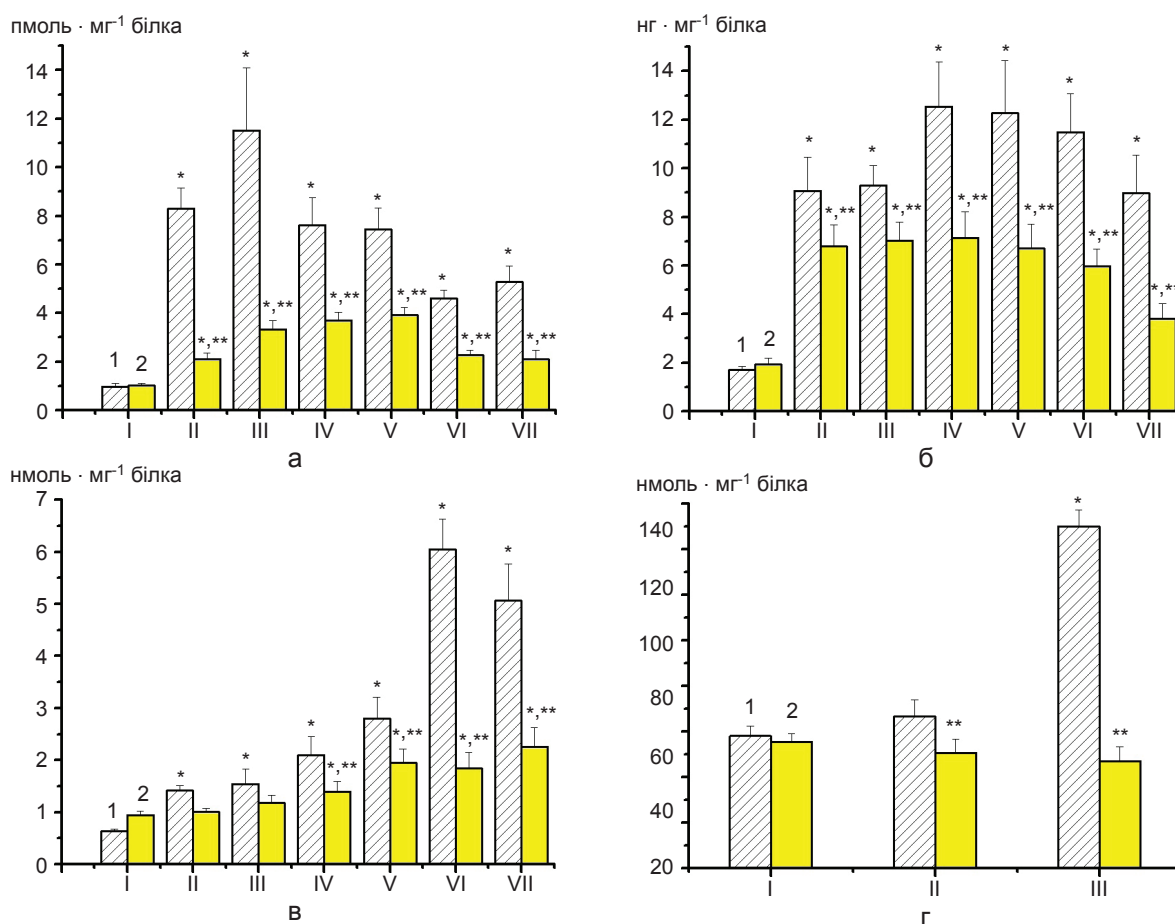


Рис. 2. Вплив флокаліну на вміст перексиду водню (а), дієнових кон'югатів (ДК; б), сечової кислоти (в) та продукту деградації пероксинітриту – нітрат-аніона (г) в артеріальній крові собак за ішемії–реперфузії міокарда в досліді *in vivo*: 1 – контроль (без флокаліну), 2 – після введення флокаліну, I – вихідний рівень за умов нормоксії, II–VII – ішемія–реперфузія, для перексиду водню – II–IV – 10, 60 та 90 хв ішемії; V–VII – 10, 120 та 180 хв реперфузії; для ДК та сечової кислоти II та III – 60 та 90 хв ішемії; IV–VII – реперфузія (для ДК – 10, 60, 90 та 180 хв, для сечової кислоти – 10, 60, 90 та 120 хв); для нітрат-аніона – II та III – 120 та 180 хв реперфузії. \* $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з контролем (ішемія–реперфузія без флокаліну)

реперфузії може бути деяке зниження вмісту нітрат-аніона. Пули останнього утворюються ферментативно за дії гемвісних ферментів (міоглобіном у кардіоміоцитах, гемоглобіном в еритроцитах), або неферментативно при розпаді пероксинітриту, який утворюється із NO і  $O_2^-$  в умовах окисного стресу, що виникає за ішемії–реперфузії. В контрольних експериментах ми спостерігали значне підвищення у 2,6 раза вмісту нітрат-аніона в плазмі крові в останню годину реперфузії. Водночас введення флокаліну зменшувало їх вміст у 3,2 раза. Наномольні пули нітрат-аніона є найбільш вираженим показником інгібування надлишкового синтезу оксиду азоту нітратредуктазним шляхом при ферментативному відновленні нітрат-аніона NADH- і NADPH-залежними нітратредуктазами, активність яких значно підвищується за ішемії. Крім

того, в низьких концентраціях сечова кислота є водорозчинним антиоксидантом за рахунок зв'язування пероксинітриту і  $OH^-$  та інгібування ксантиноксидазної реакції за механізмом зворотного зв'язку. У високих концентраціях вона є токсичною і тому зниження її вмісту за активування калієвих каналів є одним із механізмів їх кардіопротекторної дії.

За ішемії–реперфузії значно зростає вміст  $LT C_4$ , з найвищими значеннями при ішемії у 5,6 та 6,4 раза на 60-й та 90-й хвилині, та у 3,6 та 3,7 раза на 10-й та 90-й хвилині реперфузії відповідно. Аналогічно збільшується і вміст  $TxB_2$  – з максимумом у 3 та 3,5 раза на 60-й та 90-й хвилині ішемії, та у 3,1 та 4,7 раза у той самий час реперфузії відповідно (див. рис. 3,б,в). Це може свідчити про збільшення активності ферментів ліпоксигенази, циклооксигенази та, відповідно, утворення супе-

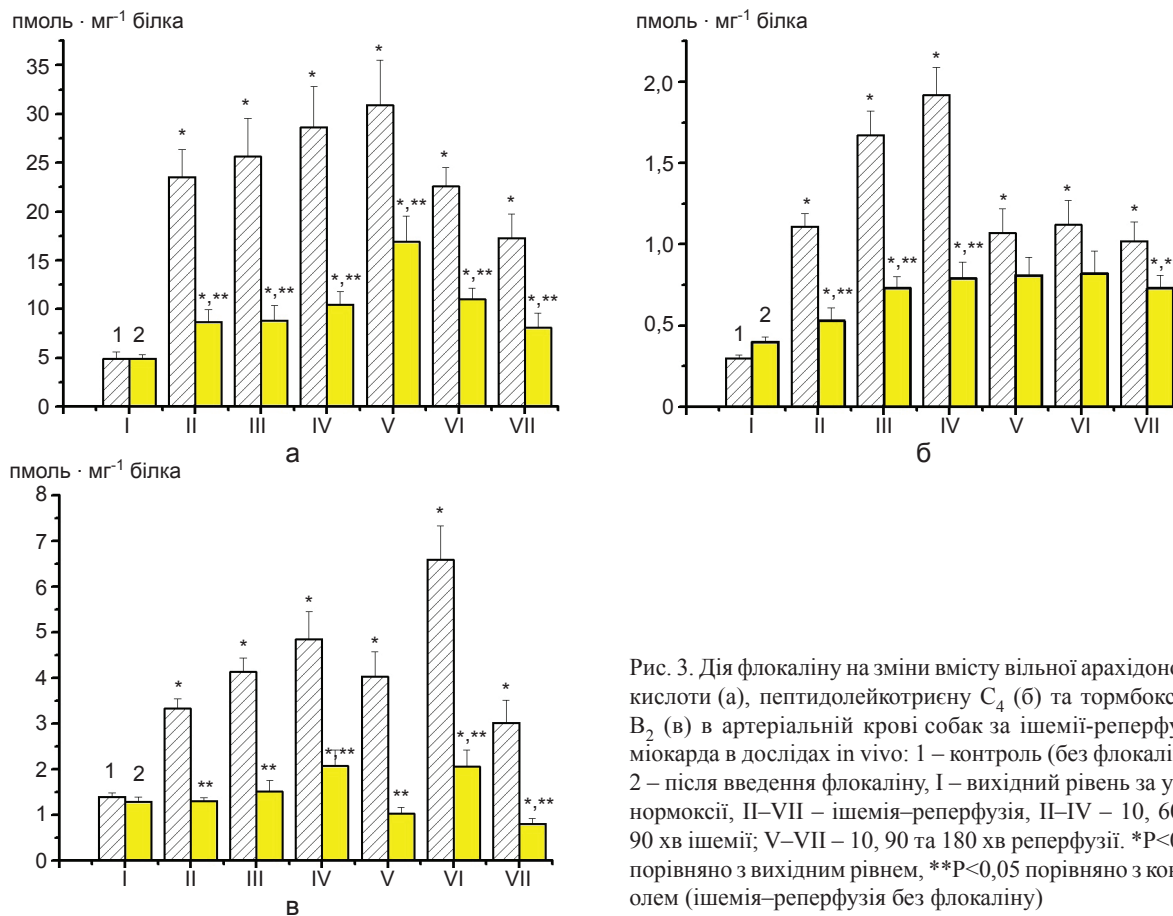


Рис. 3. Дія флокаліну на зміни вмісту вільної арахідонової кислоти (а), пептидолейкотриєну  $C_4$  (б) та тромбоксану  $B_2$  (в) в артеріальній крові собак за ішемії–реперфузії міокарда в досліді *in vivo*: 1 – контроль (без флокаліну), 2 – після введення флокаліну, I – вихідний рівень за умов нормоксії, II–VII – ішемія–реперфузія, II–IV – 10, 60 та 90 хв ішемії; V–VII – 10, 90 та 180 хв реперфузії. \* $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з контролем (ішемія–реперфузія без флокаліну)

роксид-аніона. Передішемичне активування  $K_{ATP}$ -каналів флокаліном значно зменшувало утворення як  $LT C_4$ , так і  $TxB_2$ . Зокрема, вміст  $LT C_4$  протягом ішемії був зменшеним більш ніж удвічі з максимумом у 2,4 раза на 90-й хвилині. Найбільше зниження його вмісту в крові під час реперфузії – у 1,4 раза відбувалося протягом 2-ї години (див. рис. 3,б). Подібним чином під час ішемії змінювався і вміст  $TxB_2$  – зменшення більш ніж у 2,3 раза, з максимальним значенням на 60-й хвилині у 2,7 раза. Протягом реперфузії цей показник був зменшеним більш ніж у 3 рази з найбільшими значеннями у 3,9 та 3,7 раза на 10-й та 180-й хвилині відповідно (див. рис. 3,в). Це може говорити про зниження активності вищезгаданих ферментів при активації  $K_{ATP}$ -каналів за ішемії–реперфузії міокарда та, як наслідок, зменшення утворення супероксид-аніона. Добре відомо про патогенну роль в умовах ішемії міокарда цих ейкозаноїдів. Вони мають коронарострикторну та аритмогенну дію, крім того, лейкотриєни є одним з найбільш потужних хемоатрактантів для нейтрофілів [19]. Тобто при гальмуванні продукції  $LT C_4$  та  $TxB_2$  слід чекати усунення констрикторних реакцій судин серця, що ми спостерігали раніше [4, 18], протидію порушенням ритму [2, 18] та прооксидантним явищам, пов'язаним з акумуляцією нейтрофілів вогнищі інфаркту [4, 17]. Повністю підтверджує це передбачення отримане нами зменшення вмісту пероксиду водню, ДК та малонового діальдегіду в різних зонах ішемізованого серця в експериментах *in vivo* [4, 17].

Зменшення утворення окиснених метаболітів арахідонової кислоти, можливо, відбувається не тільки за рахунок пригнічення ліпоксигеназного та циклооксигеназного шляхів її метаболізму, а і внаслідок зменшення вмісту в артеріальній крові самої вільної кислоти. Під час ішемії–реперфузії спостерігали, як завжди, значне збільшення пулів вільної арахідонової кислоти з максимальними значеннями на 90-й хвилині ішемії та 10-й хвилині реперфузії – у 5,9 та 6,4 раза

відповідно (див. рис. 3,а). При цьому лікарська форма флокаліну через активування  $K_{ATP}$ -каналів запобігала підвищенню вмісту вільної арахідонової кислоти: протягом ішемії він був зменшений порівняно з контрольними значеннями майже у 3 рази, під час реперфузії вдвічі. Зниження вмісту вільної арахідонової кислоти може свідчити про гальмування деградації фосфоліпідів клітинних мембран, а оскільки наслідком відкривання  $K_{ATP}$ -каналів є зменшення входу кальцію в клітину то вірогідним є пригнічення за дії флокаліну активності  $Ca^{2+}$ -залежних ферментів, зокрема і  $Ca^{2+}$ -залежної фосфоліпази  $A_2$ . Властивість інгібувати високопорогові кальцієві канали була недавно описана нами для флокаліну [20]. Ці дані можуть свідчити про його мембраностабілізуючу дію та добре співвідносяться з електронноморфологічними даними про корекцію порушень проникності мембран кардіоміоцитів та збереження структури внутрішньоклітинних органел, що були отримані нами при ішемії–реперфузії ізольованого серця морської свинки [5].

За ішемії–реперфузії зростає деградація гему, яка здійснюється захисним стрес-ферментом гемоксигеназою (гем  $\rightarrow$  білірубін +  $CO + Fe$ ), про що може свідчити підвищення вмісту в артеріальній крові продуктів його розпаду – білірубину та заліза (рис. 4). Зокрема на кінець періоду ішемії їх вміст зростав у 1,4 та 1,6 раза відповідно. На 3-ю годину реперфузії у 16 (180 хв) та 2,1 (120 хв) раза відповідно. Водночас флокалін посилював цей процес (див. рис. 4). За активації  $K_{ATP}$ -каналів ці показники під час ішемії були вищими вже у 1,7 та 3 рази, при реперфузії у 25 та у тричі відповідно. Це збільшення продуктів деградації гему (особливо вільного гемоглобіну, що виходить із еритроцитів при гемолізі) може носити захисний характер, оскільки відомо про нейро- і кардіопротекторну дію білірубину і оксиду вуглецю, що утворюються при його деградації.

При ішемії–реперфузії міокарда також значно зростає вміст сумарних продуктів



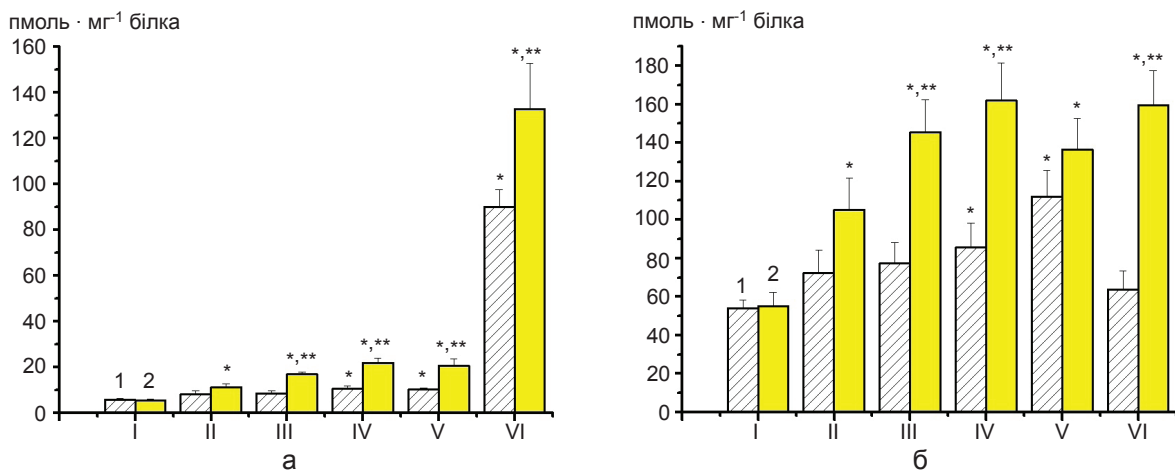


Рис. 4. Вплив флокаліну на вміст продуктів деградації гемоглобіну (а) та заліза (б) в артеріальній крові собак при ішемії–реперфузії міокарда *in vivo*: 1 – контроль (без флокаліну), 2 – після введення флокаліну, І – вихідний рівень за умов нормоксії, для білірубіну – ІІ–VI – 10, 60, 90, 120 та 180 хв реперфузії; для заліза ІІ–IV – 10, 60 та 90 хв ішемії; V–VI – 120 та 180 хв реперфузії. \* $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з контролем (ішемія–реперфузія без флокаліну)

деградації пуринових нуклеотидів (АТФ і ГТФ) – неорганічного фосфату та суми ксантину, гіпоксантину і інозину. Максимальне збільшення  $\Delta D$  (довжина хвилі 254 нм) ми зафіксували в артеріальній крові контрольних тварин на 90-й хвилині ішемії та реперфузії (у 4,6 та 14 разів відповідно). Водночас флокалін значно пригнічує це зростання, порівняно з контролем воно є зменшеним у 2,8 раза на

90-й хвилині ішемії, та у 5,7 та 6,2 раза на 120-й та 180-й хвилині реперфузії відповідно (рис. 5, а). Аналогічні зміни відбувалися і з пулами фосфату, максимальне зростання яких ми зафіксували на 90-й хвилині ішемії (у 6,4 раза) та реперфузії (у 11,6 раза). Активація калієвих каналів флокаліном зменшувала зростання пулів фосфату з максимальним значенням у 5 разів на 90-й хвилині ішемії,

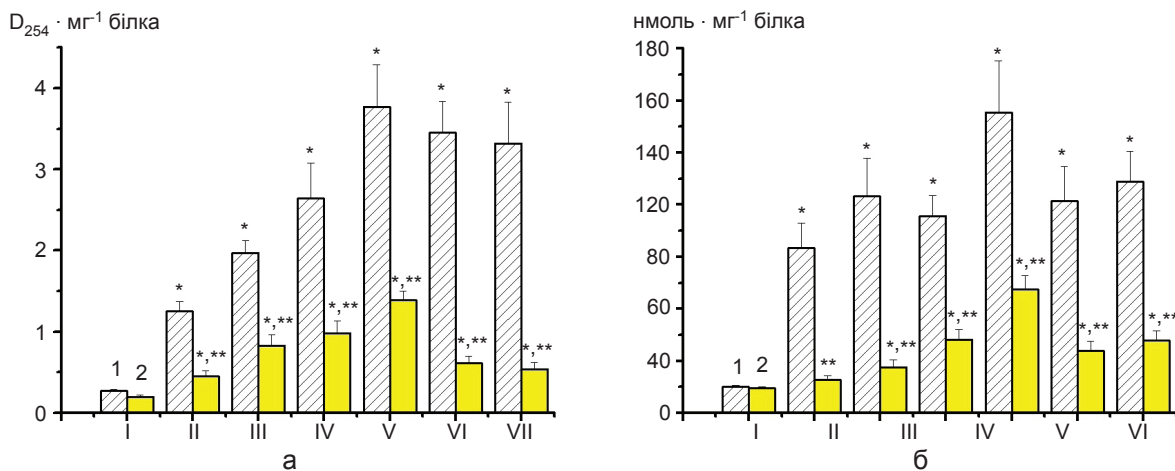


Рис. 5. Вміст сумарних продуктів деградації пуринових нуклеотидів (АТФ+ГТФ) інозину, гіпоксантину і ксантину (а), і неорганічного фосфату (б) в артеріальній крові собак за ішемії–реперфузії міокарда в досліді *in vivo*: 1 – контроль (без флокаліну), 2 – після введення флокаліну, І – вихідний рівень за умов нормоксії, ІІ–VII – ішемія–реперфузія, ІІ – 90 хв ішемії; ІІІ–VII – 10, 60, 90, 120 та 180 хв реперфузії. \* $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з контролем (ішемія–реперфузія без флокаліну)

та у 4,7 раза на 10-й хвилині реперфузії (див. рис. 5,б). З одного боку, зниження вмісту АТФ погіршує роботу серця, з іншого, спричиняє, залежно від ступеня його зниження в мітохондріях, апоптоз чи некроз кардіоміоцитів та ушкодження міокарда. Попередження значного підвищення утворення неорганічного фосфату при відкритті калієвих каналів за ішемії–реперфузії свідчить, по-перше, про запобігання повної деградації пуринових нуклеотидів флокаліном, що покращує умови для їх ресинтезу та є причиною зменшення продукції супероксид-аніона, при деградації гіпоксантину і ксантину ферментом ксантиноксидазою, по-друге – про можливе обмеження процесу апоптозу кардіоміоцитів за дії флокаліну, що може бути ще одним важливим механізмом його кардіопротекторної дії.

## ВИСНОВКИ

1. Показано, що одним із основних кардіопротекторних механізмів дії лікарської форми активатора  $K_{ATP}$ -каналів флокаліну за ішемії–реперфузії міокарда собак в досліді *in vivo* є попередження значного зростання надлишкового токсичного (за рахунок утворення пероксинітриту) індукційного (за дії ферменту iNOS) та, навпаки, підвищення протективного конститутивного (за дії ферменту cNOS) *de novo* синтезу оксиду азоту та пригнічення деградації L-аргініну аргіназою.

2. Ще одним захисним механізмом флокаліну за ішемії–реперфузії міокарда може бути значне обмеження генерації активних форм кисню (оксидативного стресу) та азоту (нітрозативного стресу).

3. Показником кардіопротекції є зменшення вмісту в артеріальній крові вільної арахідонової кислоти (може свідчити про гальмування деградації фосфоліпідів клітинних мембран фосфоліпазою  $A_2$ , що вказує на мембраностабілізуючу дію флокаліну) та її патогенних в умовах ішемії міокарда похідних –  $LTC_4$  та  $TxB_2$ .

4. Проявами кардіопротекторної дії також

можна вважати пригнічення деградації АТФ та стимуляцію гемоксигеназної реакції.

**Р.Б. Струтинский, А.В. Коцюруба, Р.А. Ровенец, Н.А. Струтинская, Ю.Л. Ягупольский, В.Ф. Сагач, А.А. Мойбенко**

## ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ АКТИВАТОРА $K_{ATP}$ -КАНАЛОВ ФЛОКАЛИНА ПРИ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА

В опытах на анестезированных собаках с воспроизведением экспериментальной ишемии (90 мин) и реперфузии (180 мин) миокарда исследованы изменения биохимических показателей в артериальной крови при внутрижелудочном введении лекарственной формы (таблетки) фторсодержащего активатора АТФ-чувствительных калиевых ( $K_{ATP}$ ) каналов флокалина в дозе 2,2 мг/кг. Анализ полученных результатов позволил очертить несколько возможных механизмов кардиопротекторного действия флокалина. Они заключаются, с одной стороны, в активации конститутивного *de novo* биосинтеза оксида азота (в частности, повышение в 1,6 раза в конце реперфузии) и ограничения (в 3,74 та в 11,48 раза в конце ишемии и реперфузии соответственно) деградации L-аргинина аргиназой, что сохраняет субстрат для фермента конститутивной NO-синтазы. С другой стороны, в угнетении индуцибельного *de novo* синтеза оксида азота ферментом индуцибельной NO-синтазой (уменьшение в 2,36 раза на 60-й минуте ишемии и в 5 раз при реперфузии). Повышение содержания нитрит-аниона (в 1,32 раза на 60-й минуте ишемии и в 1,69 раза на 120-й минуте реперфузии) может свидетельствовать о сильном антиишемическом действии активации этих каналов, ведь он образуется спонтанно при окислении оксида азота только в оксигенированных растворах. Еще одним кардиопротекторным механизмом можно считать ограничение генерации активных форм кислорода и азота (оксидативного и нитрозативного стресса). К защитному действию активации  $K_{ATP}$ -каналов можно причислить уменьшение продукции патогенных в условиях ишемии миокарда пептидолейкотриена  $C_4$  (более чем в 2 раза при ишемии и в 1,4 раза во время второго часа реперфузии) и тромбксана  $B_2$  (более чем в 2,3 и 3 раза во время ишемии и реперфузии соответственно), а также угнетение деградации АТФ и стимуляция гемоксигеназной реакции. Уменьшение содержания в артериальной крови свободой арахидонової кислоти (в 3 и 2 раза во время ишемии и реперфузии соответственно) может свидетельствовать о торможении деградации фосфолипидов клеточных мембран в результате угнетения активности фосфолипазы  $A_2$ , и указывает на возможное мембраностабилизирующее действие активации  $K_{ATP}$ -каналов при ишемии–реперфузии миокарда.

Ключевые слова:  $K_{ATP}$ -каналы, флокалин, ишемия–репер-

фузия, оксидативный стресс, нитрозативный стресс, перекисное окисление липидов, de novo синтез NO, аргиназа.

**R.B. Strutyński, A.V. Kotsuruba, R.A. Rovenets, N.A. Strutyńska, Yu.L. Yagupolskii, V.F. Sahach, A.A. Moibenko.**

# **BIOCHEMICAL MECHANISMS OF K<sub>ATP</sub> CHANNELS OPENER FLOCALIN (MEDICAL FORM) CARDIOPROTECTIVE ACTION AT ISCHEMIA-REPERFUSION OF MYOCARDIUM**

In experiments on the anaesthetized dogs with modeling of experimental ischemia (90min) and reperfusion (180 min) of myocardium it was investigated changes of biochemical processes in arterial blood at 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 mechanisms of cardioprotective action of flocalin, which prevented the opening of a mitochondrial permeability transition pore (MPTP) and inhibition of apoptosis induced by it. They consist, from one side, in activating of the constitutive de novo biosynthesis of nitric oxide by cNOS, from other side, in suppression of inducible nitric oxide de novo synthesis by iNOS in such way to prevent the formation of toxic peroxynitrite by co-operation of surplus nitric oxide with superoxide anion, thereby limits the generation of toxic active forms of nitrogen (\*NO<sub>2</sub>) and oxygen (\*OH). The first effect of flocalin takes place due to limitation the degradation of L-arginine by arginase which keeps substrat for cNOS, second – due to the inhibition of superoxide generation, in particular, by xanthine oxidase (marker uric acid), lipoxigenase (marker LTC<sub>4</sub>) and cyclooxygenase (marker TxB<sub>2</sub>). Because LTC<sub>4</sub> have coronarconstrictory, arrhythmogenic and chemoattractory properties in the conditions of myocardial ischemia, inhibition of its production both with superoxide generation (markers H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and diene conjugates) may be the another mechanisms of flocalin's cardioprotection. Powerful antiischemic action of flocalin (marker nitrite anion) as the mechanisms of cardioprotection is possible as well as inhibition of ATP and GTP degradation (marker hypoxanthine+xanthine+inosine levels in the blood) and, possibly, stimulation of haem degradation by haem oxygenase (markers total bilirubin and Fe in the blood). Diminishing content of free arachidonic acid in arterial blood can testify inhibition of cellular membranes phospholipides degradation by phospholipase A<sub>2</sub> as a result of flocalin cardioprotection. Key words: K<sub>ATP</sub>-channels, flocalin, ischemia-reperfusion, oxidative stress, nitrozative stress, lipid peroxidation, de novo synthesis of NO, arginase.

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

*Institute of Organic Chemistry 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 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. – 2, №4. – С. 77–82.
3. Покровский А.А. Биохимические методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1969. – 437 с.
4. Струтинський Р.Б., Коцюруба А.В., Нещерет О.П., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Зміни метаболізму в міокарді при ішемії-реперфузії та активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів // Фізіол. журн. – 2012. – 58, №1. – С. 13–26.
5. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну: відносна роль активації сарколемальних та мітохондріальних аденозинтрифосфатзалежних калієвих КАТФ каналів // Там само. – 2008. – 54, №6. – С.15–23.
6. Струтинський Р.Б., Ровенець Р.А., Струтинська Н.А., Нещерет О.П., Мойбенко О.О. Вплив активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліном на функцію серцево-судинної системи // Там само. – 2013. – 59, №1. – С. 11–16.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J. Increased activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277, № 5. – P. 797–804.
11. 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.
12. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J. Analysis of nitrate, nitrite and [+5N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – 126, № 1. – P.131–138.
13. Gross G.J., Fryer R.M. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and myocardial preconditioning // Circ. Res. – 1999. – 84, №9. – P. 973–979.
14. Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial

- permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – **61**. – P. 372–385.
15. Hanley P.J., 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. – **1**. – P.17–50.
16. Salter M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent nitric oxide synthases // *FEBS Lett.* – 1991. – **291**, № 1. – P. 145–149.
17. Strutynskyi 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. – **1**, №4. – P. 305–313.
18. Strutynskyi 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.* – 2010. – **1**, №3. – C. 211–218.
19. Takase B, Maruyama T, Kurita A, Uehata A, Nishioka T, Mizuno K, Nakamura H, Katsura K, Kanda Y Arachidonic acid metabolites in acute myocardial infarction // *Angiology.* – 1996. – **47**, №7. – P.649–661.
20. Voitychuk O.I., Strutynskyi R.B., Moibenko O.O., Shuba Y.M. Effects of fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium channels, pinacidil-derivative flocalin, on cardiac voltage-gated sodium and calcium channels // *NSAP.* – 2012. – **385**. – №11. – P. 1095–1102.
21. Yokoshiki H., Sunagawa M., Seki T., Sperelakis N. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1998. – **274**. – P. 25–37.

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

*Матеріал надійшов  
до редакції 03.06.2013*