

Н.А. Струтинська, Р.Б. Струтинський, С.В. Чорна, О.М. Семенихіна, Л.А. Мись, О.О. Мойбенко, В.Ф. Сагач

## Нові фторвмісні активатори аденозинтрифосфат-чутливих калієвих каналів флокалін і тіофлокалін пригнічують кальційіндуковане відкриття мітохондріальної пори у серці щурів

*У досліджах in vitro на мітохондріях, ізольованих із тканини серця щурів, досліджували вплив активаторів аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів ( $K_{ATФ}$ -каналів) флокаліну і тіофлокаліну на кальційіндуковане відкриття мітохондріальної пори (МП) у серці щурів. Показано, що вони викликають характерне для активації  $K_{ATФ}$ -каналів помірне кальційнезалежне набухання мітохондрій, яке попереджається специфічним інгібітором 5-гідроксидеканоєвою кислотою, що дало змогу ідентифікувати ці сполуки як фармакологічні відкривачі саме мітохондріальних  $K_{ATФ}$ -каналів. Встановлена концентраційна залежність впливу як флокаліну, так і тіофлокаліну ( $10^{-7}$ – $10^{-4}$  моль/л) на величини кальційіндукованого набухання мітохондрій у серці з напівмаксимальними ефектами інгібування  $IC_{50}=50$  та  $IC_{50}=2,7$  мкмоль/л відповідно та більш потужною кардіопротекторною дією останнього. Так, флокалін у концентраціях  $10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  і  $10^{-4}$  моль/л попереджав кальційіндуковане відкриття МП на 23,89, 50,45 і 100 %, а тіофлокалін – на 20,18, 68,96 і 100 % у концентраціях  $10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  і  $10^{-5}$  моль/л відповідно. Показано, що введення цих сполук у досліджах in vivo знижує чутливість МП до дії  $Ca^{2+}$ . Отже, за фізіологічних умов активатори  $K_{ATФ}$ -каналів, ймовірно, чинять мембраностабілізуювальну дію на мітохондрії, підвищуючи тим самим резистентність органел до індуктора МП  $Ca^{2+}$ . Отримані результати дали змогу окреслити їх роль як кардіопротекторів і регуляторів утворення МП у серці, вказуючи на їх антиішемічний і антиапоптозичний ефекти, що може використовуватися для корекції мітохондріальної дисфункції при патологічних станах серцево-судинної системи.*

*Ключові слова:* флокалін, тіофлокалін,  $K_{ATФ}$ -канали, мітохондріальна пора, серце, щури.

### ВСТУП

Одним із найважливіших ендогенних механізмів кардіопротекції при ішемії міокарда є система аденозинтрифосфатзалежних калієвих каналів ( $K_{ATФ}$ -каналів) – сарколемальних і мітохондріальних, відкритих Noma [1] і Inoue [16]. Зокрема, такі ключові природні механізми кардіопротекції, як ішемічне пре-кондиціонування та ішемічне посткондиціонування опосередковуються активністю цих каналів [14, 23]. Gross [12] та Auchampach [7] в експериментах на серці собаки з використанням блокаторів  $K_{ATФ}$ -каналів глі-

бенкламиду і 5-гідроксидеканоєвої кислоти (5-ГД – специфічний інгібітор каналів саме мітохондріальної мембрани) вперше показали, що в механізмі розвитку ішемічного пре-кондиціонування беруть участь  $K_{ATФ}$ -канали як сарколемальної, так і внутрішньої мембрани мітохондрій. Загальною їх характеристикою й основним механізмом протекції є швидка реакція на зниження енергетичного потенціалу (вмісту АТФ) в кардіоміоциті – невідворотний наслідок порушення кровообігу серця. Ступінь антиішемічного захисту міокарда залежить від типу активованих  $K_{ATФ}$ -каналів:

© Н.А. Струтинська, Р.Б. Струтинський, С.В. Чорна, О.М. Семенихіна, Л.А. Мись, О.О. Мойбенко, В.Ф. Сагач

сарколемальної та мітохондріальної мембран кардіоміоцитів, гладеньком'язових та ендотеліальних клітин судин [1, 13].

Як виявилось, відкривати  $K_{ATP}$ -канали можливо і фармакологічним шляхом за допомогою активаторів цих каналів, а їх екзогенна активація призводить до реалізації потужних кардіопротекторних механізмів [8, 17, 20]. Разом з тим використання відомих активаторів цих каналів у клініці малопоширене у світовій практиці та практично відсутнє в Україні [17], що стало поштовхом до створення низки нових вітчизняних активаторів цих каналів [22]. Встановлено, що найбільш перспективними щодо створення лікарського засобу та введення в широку клінічну практику є флокалін та тіофлокалін. Проте, якщо їх вплив на калієві канали сарколемальної мембрани та антиішемічні властивості були показані (зокрема для флокаліну) в електрофізіологічних та інших експериментах [1, 4–6, 19], то про їх дію на канали мітохондріальної мембрани досі судять опосередковано, опираючись на інгібування їх ефектів 5-ГД [1].

Навантаження  $Ca^{2+}$  і оксидативний стрес є відомими індукторами неселективної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори (МП) (від англ. mitochondrial permeability transition pores, mPTP), яка є важливим регулятором функціонування мітохондрій як за фізіологічних, так і патологічних умов. Варто відмітити, що МП відіграє ключову роль у клітинних порушеннях, спричинених насамперед перевантаженням органел  $Ca^{2+}$  і виникненням оксидативного стресу [11, 21].

Мета нашої роботи – ідентифікація механізму дії нових вітчизняних фторвмісних активаторів мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів – флокаліну та тіофлокаліну в експериментах на суспензії ізольованих мітохондрій і дослідити їх вплив на кальційіндуковане відкривання МП у серці щурів.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, масою 220–250 г) щурах лінії Вістар. Всі ек-

периментальні процедури виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС). Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10 тварин.

Серця, видалені з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9%-м розчином КСІ (4°C). Мітохондрії виділяли диференційним центрифугуванням [2], і в суспензії органел визначали вміст білка за методом Лоурі.

Відкривання МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): КСІ – 120, тріс – НСІ – 25,  $KH_2PO_4$  – 3; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при  $\lambda=520$  нм за 5 хв до і впродовж 10 хв їх набухання за наявності індуктора  $Ca^{2+}$ . У дослідях на ізольованих мітохондріях для визначення відкривання МП у серці щурів використовували природний індуктор  $Ca^{2+}$  у концентрації  $10^{-4}$  моль/л. Зміну рівня набухання органел визначали як різницю у відсотках ( $\Delta, \%$ ) між показником набухання мітохондрій на 15 хв відносно вихідного значення. Концентрація білка в інкубаційному середовищі становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з подальшою реєстрацією оптичної густини протягом 15 хв. В експериментах *in vivo* одноразове введення щурам флокаліну чи тіофлокаліну у дозі 2 мг/кг здійснювали за 30 хв до декапітації тварин.

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програми Origin 7.0 («Microcall Inc.», США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що при активації мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів іони калію надходять до мітохондрій, що викликає деполяризацію

їх внутрішньої мембрани та одночасне пасивне надходження аніонів слабких кислот: ( $\text{Cl}^-$ ), ортофосфату та води, що в свою чергу призводить до набухання мітохондріального матриксу [1]. Отже, набухання (ресструється при  $\lambda=520$  нм), що відбувається при введенні фармакологічних активаторів цих каналів можна використовувати для ідентифікації механізму їх дії як відкривачів цих каналів в ізольованих мітохондріях. Флокалін і тіофлокалін викликали характерне для активації згаданих каналів помірне набухання ізольованих мітохондрій серця щури з максимальним рівнем за концентрації  $10^{-5}$  та  $10^{-7}$  моль/л відповідно (рис. 1,а). Ці ефекти попереджались специфічним інгібітором саме мітохондріальних  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів 5-ГД (рис. 1,б,в), що вказує на залежність набухання від відкривання вищезгаданих каналів. Водночас класичний інгібітор МП циклоспорин А (ЦсА) у концентрації  $10^{-5}$  моль/л не впливав на активатори калієвих каналів, що може свідчити про здатність нових фторвмісних аналогів пінацидилу (активатора обох типів каналів: сарколемальних і мітохондріальних) відкривати  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канали внутрішньої мембрани мітохондрій.

Відомо, що за фізіологічних умов МП функціонує в режимі низької провідності та характеризується циклічністю роботи, подібною за механізмом до кальційіндукованого вивільнення у цитозоль  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулума. Функціонування МП у режимі високої провідності – явище незворотне і пов'язане з глибокими наслідками для функції та структури мітохондрій і клітини в цілому. Цей режим ініціюється зокрема масивним некерованим входом кальцію в клітину і призводить до осмотичних змін в органелах і утворення в них зон набухання та деструкції. При цьому в цитоплазму вивільнюється фактор індукції апоптозу (AIF) і цитохром с, які є тригерами апоптозу [10].

Характерні криві спонтанного (контроль у безкальцієвому середовищі) та кальційіндукованого набухання мітохондрій, що відбува-

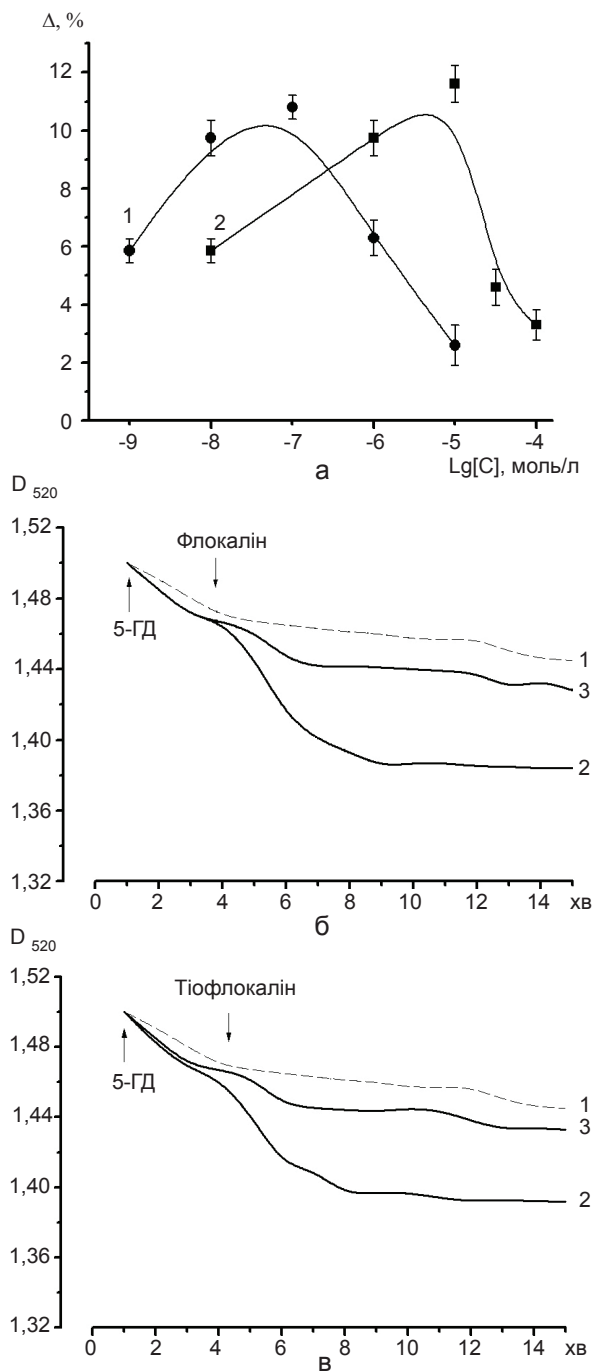


Рис. 1. Концентраційна залежність набухання мітохондрій серця щури при дії нових фторвмісних активаторів  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів тіофлокаліну (1) та флокаліну (2) без блокади (а) та за умов дії інгібітора вищезгаданих каналів мітохондріальних мембран – 5-гідроксидеканоєвої кислоти (5-ГД,  $10^{-4}$  моль/л); б – для флокаліну,  $10^{-5}$  моль/л; в – для тіофлокаліну,  $10^{-7}$  моль/л, для б і в: 1 – контроль; 2 – дія активаторів  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів; 3 – преінкубація з 5-ГД, дія активаторів  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів

лося внаслідок відкриття МП у серці шурів показані на рис. 2. У контролі зміна рівнів набухання ( $\Delta$ ) становила 7,28 %. В умовах навантаження мітохондрій кальцієм відбувалося високоамплітудне набухання ( $\Delta$ , = 17,96 %). Слід зауважити, що останнє практично повністю попереджалося ЦсА у концентрації  $10^{-5}$  моль/л (див. рис. 2,а). Преінкубація ізольованих мітохондрій з інгібіторами мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів 5-ГД ( $10^{-4}$  моль/л) та глібенкламідом (ГБК) ( $10^{-4}$  моль/л) не змінювала набухання органел, що було індуковане іонами

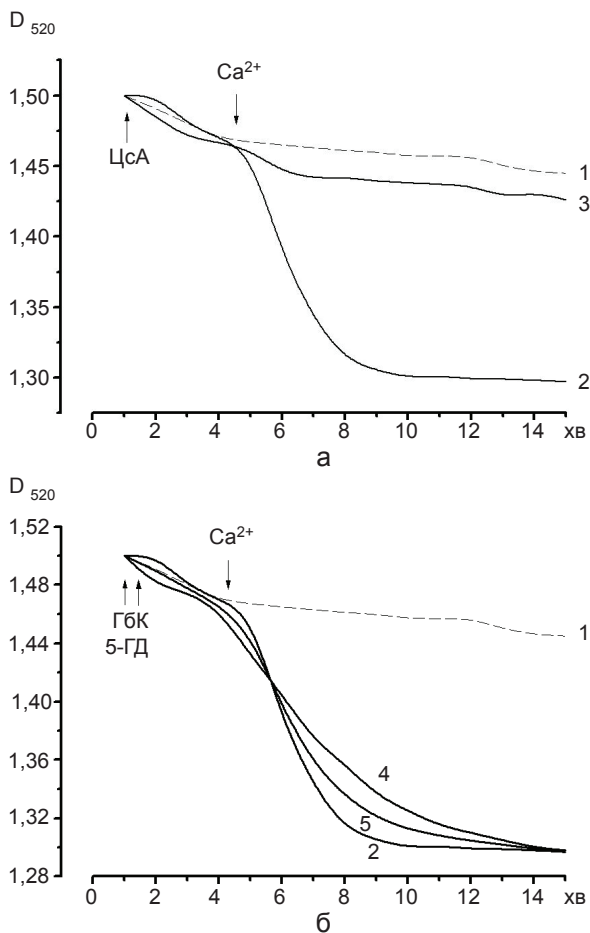


Рис. 2. Вплив інгібітора мітохондріальної пори циклоспорину А (ЦсА) (а) та блокувальників  $K_{ATP}$ -каналів – глібенкламідом (ГБК) та 5-гідроксидеканоевої кислоти (5-ГД) (б) на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця шурів: 1 – контроль; 2 – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л), 3 – преінкубація з ЦсА ( $10^{-5}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$ , 4 – преінкубація з ГБК ( $10^{-4}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$ ; 5 – преінкубація з 5- ГД ( $10^{-4}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$

$Ca^{2+}$  (див рис. 2, б). Цей факт може свідчити про те, що інгібування згаданих каналів не впливає на кальційіндуковане відкриття МП та збільшення матриксу мітохондрій, тому що початково вони знаходяться в закритому стані.

Показано, що в умовах преінкубації мітохондрій з флокаліном чи тіофлокаліном спостерігали зменшення кальційіндукованого набухання органел у серці шурів (рис. 3). Отже, попереднє відкриття мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів новими фторвмісними активаторами попереджало кальційіндуковане відкриття МП у серці тварин. Причому їх ефекти мали дозозалежний характер (рис. 4). Зокрема, введення у інкубаційний розчин флокаліну у концентраціях  $10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  і  $10^{-4}$  моль/л зменшувало величину набухання ізольованих мітохондрій серця шурів, що було індуковане іонами кальцію на 23,89, 50,45 і 100 % відповідно. Додавання тіофлокаліну ( $10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  і  $10^{-5}$  моль/л) пригнічувало це набухання на 20,18, 68,96 і 100 % відповідно (див. рис. 4,а,б). Ми встановили напівмаксимальні ефекти інгібування кальційіндукованого набухання мітохондрій і, як наслідок, відкриття МП, при концентрації 50 та 2,7 мкмоль/л для флокаліну та тіофлокаліну

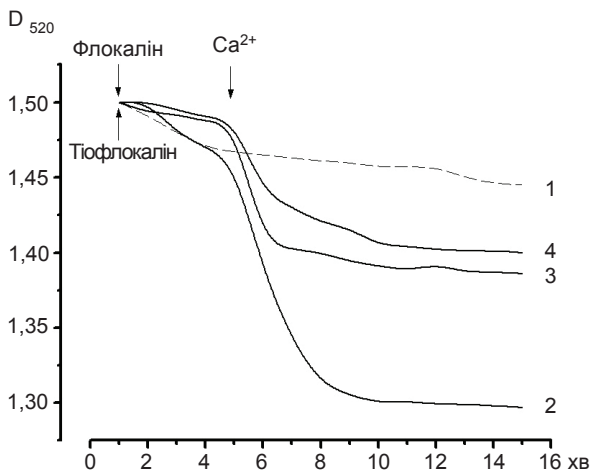


Рис. 3. Вплив попередньої активації мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів флокаліну та тіофлокаліну на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця шурів: 1 – контроль, 2 – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л), 3 – преінкубація з флокаліном ( $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$ , 4 – преінкубація з тіофлокаліном ( $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$

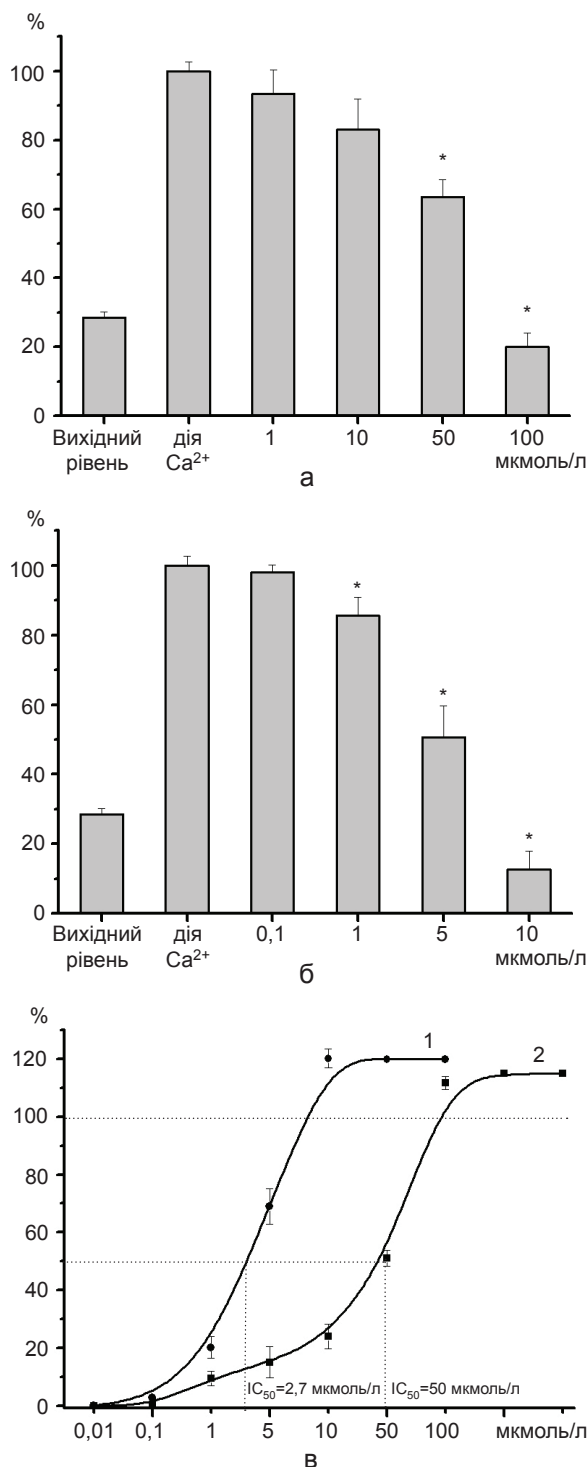


Рис. 4. Дія різних концентрацій флокаліну (а) та тіофлокаліну (б) на  $Ca^{2+}$ -індуковане ( $10^{-4}$  моль/л) набухання мітохондрій серця щури та криві доза – ефект (від 0 до 100%) (в) для тіофлокаліну (1) та флокаліну (2) відповідно. \* $P < 0,05$  порівняно з дією  $Ca^{2+}$  (для а і б)

відповідно (див. рис. 4,в). Їх відомий закордонний аналог пінацидил мав такі впливи за концентрації 128 мкмоль/л [15]. Таким чином, нові фторвмісні похідні пінацидилу значно краще попереджують кальційіндуковане відкриття МП. Слід зауважити, що аналогічні напівмаксимальні ефекти відомого активатора  $K_{ATP}$ -каналів і кардіопротектора діазоксиду були близькими до дії флокаліну та спостерігалися за його концентрації 65 мкмоль/л [15]. Проте тіофлокалін попереджав відкриття МП у концентраціях на порядок нижчих, ніж діазоксид (2,7 і 50 мкмоль/л відповідно).

Повне інгібування кальційіндукованого набухання мітохондрій у серці спостерігали за дії флокаліну та тіофлокаліну в концентраціях 100 і 10 мкмоль/л відповідно. Отже, отримані результати вказують на те, що тіофлокалін на порядок сильніше попереджає кальційіндуковане набухання МП, ніж флокалін та інші відомі активатори  $K_{ATP}$ -каналів. Більш потужна дія тіофлокаліну підтвердилася і в наступних експериментах з попередньою індукцією набухання за допомогою кальцію та подальшим введенням цих активаторів.

Отже, нові фторвмісні активатори калієвих каналів є потужними інгібіторами відкриття МП і, таким чином, процесів апоптозу та некрозу кардіоміоцитів. Прямі впливи флокаліну а, отже, і активації  $K_{ATP}$ -каналів, на розвиток цих механізмів було нами показано раніше в експериментах з аноксією (30 хв) та реоксигенацією (60 хв) ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура [6]. Зокрема, виявлено, що у дозі 5 мкмоль/л він спричиняв зсув співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин у бік живих, відсоток яких практично не відрізнявся від контрольних експериментів без аноксії – реоксигенації. Відкриття калієвих каналів флокаліном зменшувало процеси некрозу у два рази та повністю запобігало розвитку апоптозу, що був індукований аноксією – реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів.

Наступним етапом нашої роботи було до-

слідження впливу активації мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів за допомогою нових сполук на процес набухання мітохондрій на тлі попередньої індукції МП. Флокалін і тіофлокалін вводили в інкубаційне середовище через 5 та 60 с після додавання кальцію. Виявлено, що у першому випадку, в умовах попереднього відкриття МП, дія досліджуваних активаторів призводила до часткового припинення високоамплітудного кальційзалежного набухання мітохондрій серця (рис. 5). А інгібітор  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламід запобігав описаним ефектам. Водночас відкриття згаданих каналів через 60 с після індукції МП не мало суттєвого протекторного впливу і скасовувало патологічне розширення матриксу мітохондрій незначно (див. рис. 5).

Процес пороутворення тісно пов'язаний зі зміною проникності мітохондріальних мембран, що характеризується різною їх чутливістю до дії індукторів. Оскільки МП є структурною організацією мембран, то однією з характерних її властивостей – це чутливість до індукторів її відкриття, зокрема до  $Ca^{2+}$  та окисників. Як раніше нами було показано, чутливість МП до індуктора  $Ca^{2+}$  була підвищеною за старіння та гіпертензії [2, 3]. В експериментах *in vivo* досліджували одноразове введення щурам нових активаторів для встановлення чутливості МП до індуктора кальцію у серці (рис. 6). Так, показано, що ін'єкція як флокаліну, так і тіофлокаліну зменшує чутливість МП до кальцію ( $10^{-4}$  та  $10^{-5}$  моль/л), з більш потужною кардіпротекторною дією останнього.

Відомо, що мітохондріальні  $K_{ATP}$ -канали відіграють центральну роль у захисті серця від ішемічно/реперфузійних пошкоджень (явище ішемічного прекодиціювання). Активатори мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів (діазоксид, пінацидил, нікоранділ, міноксиділ та ін.) зв'язуються з їх SUR-субодиницею та, відкриваючи канали, можуть значно покращувати стан клітин за патологічних умов, зокрема гіпоксії та ішемії тканин. Ми намагалися з'ясувати, яким чином активування

цих каналів може здійснювати протекцію у постішемічних пошкодженнях серця, зокрема досліджуючи вплив активаторів каналів на відкриття неселективної циклоспоринчутливої МП, яка є важливим регулятором функціонування мітохондрій як за фізіологічних, так і патологічних умов, ініціюючи розвиток патологічних станів, що супроводжуються некротичними й апоптотичними процесами [10, 21].

У літературі існує декілька пояснень можливого протекторного механізму дії відкривачів мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів. По-перше, їх активація викликає деполяризацію потенціалу внутрішньої мембрани мі-

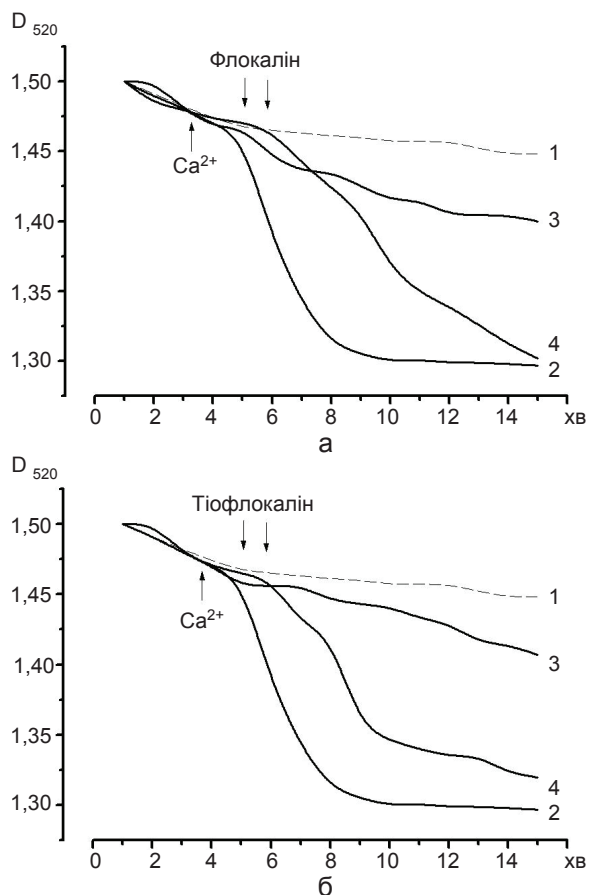


Рис. 5. Вплив активаторів  $K_{ATP}$ -каналів флокаліну ( $10^{-4}$  моль/л) (а) та тіофлокаліну ( $10^{-5}$  моль/л) (б) на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця щурів: 1 – контроль; 2 – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л); 3 – введення активаторів через 5 с після додавання  $Ca^{2+}$ , 4 – введення активаторів через 60 с після додавання  $Ca^{2+}$

тохондрій ( $\Delta\Psi_m$ ), наслідком чого є зменшення рушійної сили для транспортування іонів кальцію у органели, що в свою чергу захищає мітохондріальний матрикс від їх перевантаження. З іншого боку, навантаження  $Ca^{2+}$  і оксидативний стрес є відомими індукторами МП. Згідно з альтернативною гіпотезою, активація мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів може викликати помірне мітохондріальне набухання, яке певною мірою захищає мітохондрії, зберігаючи структуру та функцію їх міжмембранного простору. Інша гіпотеза стосовно кардіопротекторної дії одного з активаторів мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів діазоксиду припускає, що останній може модулювати продукування мітохондріями реактивних видів кисню [9].

Таким чином, у цій роботі ми розглянули один із механізмів дії нових вітчизняних фторвмісних сполук. Індукція характерного для активації  $K_{ATP}$ -каналів помірного набухання ізольованих мітохондрій серця та його попередження специфічним інгібітором саме  $K_{ATP}$ -каналів мітохондріальної мембрани – 5-ГД дало змогу ідентифікувати флокалін та тіофлокалін як фармакологічні відкривачі цих каналів. В експериментах з кальційіндукованим набуханням мітохондрій показано,

що активація калійселективної проникності у внутрішній мембрані мітохондрій цими активаторами призводить до дозозалежного інгібування відкривання МП у серці з більш потужною кардіопротекторною дією тіофлокаліна. Отримані результати дали змогу окреслити роль флокаліну та тіофлокаліну як кардіопротекторів і регуляторів утворення МП у серці, вказуючи на їх антиішемічний і антиапоптотичний ефекти, що може використовуватися для корекції мітохондріальної дисфункції при патологічних станах серцево-судинної системи.

**Н.А. Струтинская, Р.Б. Струтинский, С.В. Черная, Е.Н. Семенихина, Л.А. Мись, А.А. Мойбенко, В.Ф. Сагач**

**НОВЫЕ ФТОРСОДЕРЖАЩИЕ АКТИВАТОРЫ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ФЛОКАЛИН И ТИОФЛОКАЛИН ИНГИБИРУЮТ КАЛЬЦИЙИНДУЦИРОВАННОЕ ОТКРЫВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ В СЕРДЦЕ КРЫС**

В опытах *in vitro* на митохондриях, изолированных из ткани сердца крыс, исследовали влияние активаторов аденозинтрифосфатчувствительных калиевых каналов ( $K_{ATP}$ -каналов) флокалина и тиофлокалина на кальцийиндуцированное открывание митохондриальной поры (МП) в сердце крыс. Они вызвали характерное для активации  $K_{ATP}$ -каналов умеренное кальцийнезависимое набухание митохондрий, которое предупреждалось специфическим ингибитором 5-гидроксидеканоевой кислоты, что позволило идентифицировать эти соединения как фармакологические открыватели именно митохондриальных  $K_{ATP}$ -каналов. Установлена концентрационная зависимость влияния как флокалина, так и тиофлокалина ( $10^{-7}$ – $10^{-4}$  моль/л) на величины кальцийиндуцированного набухания митохондрий в сердце с полумаксимальными эффектами ингибирования  $IC_{50}=50$  и  $IC_{50}=2,7$  мкмоль/л соответственно, и более мощным кардиопротекторным действием последнего. Так, флокалин в концентрациях  $10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  и  $10^{-4}$  моль/л предупреждал кальцийиндуцированное открывание МП на 23,89, 50,45 и 100 %, а тиофлокалин – на 20,18, 68,96 и 100 % в концентрациях  $10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  и  $10^{-5}$  моль/л соответственно. Показано, что введение этих соединений в опытах *in vivo* снижает чувствительность МП к действию  $Ca^{2+}$ . Таким образом, в физиологических условиях активаторы  $K_{ATP}$ -каналов, вероятно, оказывают мембраностабилизирующее воздействие на митохондрии, повышая тем самым резистентность органелл к индуктору

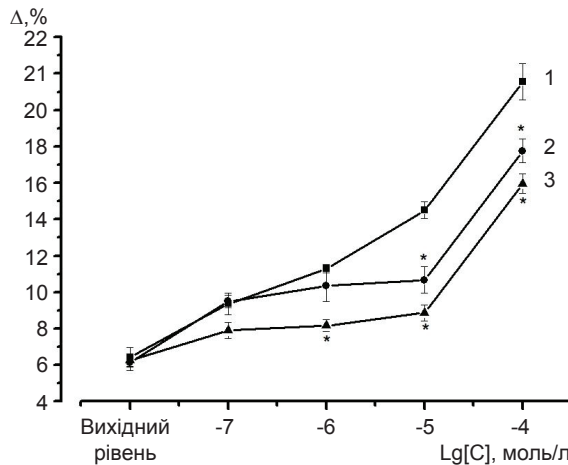


Рис. 6. Зміни чутливості мітохондріальної пори до індуктора  $Ca^{2+}$  у серці шурів за умов введення *in vivo* флокаліну та тіофлокаліну: 1 – контроль 2 – дія флокаліну (2 мг/кг), 3 – дія тіофлокаліну (2 мг/кг). \*  $P < 0,05$  порівняно з контролем

МП  $\text{Ca}^{2+}$ . Полученные результаты позволили определить их роль как кардиопротекторов и регуляторов образования МП в сердце, указывая на антиишемический и антиапоптотический эффекты, что может использоваться для коррекции митохондриальной дисфункции в патологических состояниях сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: флокалин, тиофлокалин,  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналы, митохондриальная пора, сердце, крысы.

**N.A. Strutynska, R.B. Strutynskyi, S.V. Chorna, O.M. Semenykhina, L.A. Mys, O.O. Moibenko, V.F. Sagach**

**NEW FLUORINE-CONTAINING OPENERS OF ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS FLOKALIN AND TIOFLOKALIN INHIBIT CALCIUM-INDUCED MITOCHONDRIAL PORE OPENING IN RAT HEARTS**

In experiments *in vitro* on the mitochondria isolated from the rat's heart we studied the effects of the openers of ATP-sensitive potassium channels ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ -channels), floccalin and tiolfloccalin, on the calcium-induced mitochondrial pore (MPTP) opening. Floccalin and tiolfloccalin caused moderate  $\text{Ca}^{2+}$ -independent mitochondria swelling, which was prevented by a specific inhibitor of 5-hydroxydecanoate. This allowed to identify these compounds as mitochondrial  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -channels openers. We found that concentration-dependent inhibitory effects ( $10^{-7}$  to  $10^{-4}$  M) of floccalin (with  $\text{IC}_{50}=50 \mu\text{M}$ ) and tiolfloccalin (with  $\text{IC}_{50}=2,7 \mu\text{M}$ ) on  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial swelling (MPTP opening) in the heart characterized more powerful cardioprotective action of the latter. It was shown that the administration of these compounds in experiments *in vivo* decreased the sensitivity of the MPTP opening to  $\text{Ca}^{2+}$ . Thus, under physiological conditions the activators  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -channels probably provide the membrane-stabilizing effects, thereby effectively increasing the organelles resistance to  $\text{Ca}^{2+}$ , an inductor of MPTP. The results obtained allowed to characterize the role of the compound studied as *cardioprotectors* and regulators of the MPTP formation in the heart, indicated their anti-ischemic and *anti-apoptotic* effects that can be used in order to correct the mitochondrial dysfunction under pathological conditions of the cardiovascular system.

Keywords: floccalin, tiolfloccalin,  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -channels, mitochondrial pore, heart, rats.

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

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца // К.: Наук. думка, 2008. – 518 с.
2. Сагач В.Ф., Вавилова Г.Л., Струтинська Н.А., Рудик

- О.В. Старіння підвищує чутливість до індукторів митохондриальної пори в серці шурів // Фізіол. журн. – 2004. – **50**. – №2. – С. 49–63.
3. Струтинська Н.А., Дорофеева Н.О., Вавилова Г.Л., Сагач В.Ф. Підвищена чутливість митохондриальної пори до індуктора  $\text{Ca}^{2+}$  у серці шурів зі спонтанною гіпертензією // Там само. – 2012. – **58**, № 6. – С. 3–8.
4. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Чебанов В.А., Горобець М.Ю. Моделювання промислового процесу виробництва препарату “Флокалін” та визначення його оптимально-ефективної дози для лікування захворювань серця // Наука та інновації. – 2013. – **9**, №1. – С. 55–63.
5. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М., Юзьків М.Я., Квочіна Л.І., Шиш А.М. Дослідження кардіопротекторних ефектів нового фтормісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів // Фізіол. журн. – 2001. – **47**, №2. – С. 16–23.
6. Струтинський Р.Б., Нагібін В.С., Струтинська Н.А., Янчій О.Р., Мойбенко О.О. Вплив флокаліну на розвиток апоптозу та некрозу при аноксії-реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів // Там само. – 2013. – **59**, №3. – С. 3–9.
7. Auchampach J., Grover G., Gross G. Blockade of ischemic preconditioning in dogs by the novel ATP-dependent potassium channel antagonism sodium 5-hydroxydecanoate // Cardiovascular. Res. – 1992 – **26**, № 11. – P. 1054–1062.
8. Bhatnagar A., Bolli R. Modulation of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels to protect the ischemic myocardium: Clinical implications // Exp. Clin. Cardiol. – 1999. – **4**, №1. – P. 20–22.
9. Cheng Y, Debska-Vielhaber G, Siemen D. Interaction of mitochondrial potassium channels with the permeability transition pore // FEBS Lett. – 2010. – **584**, № 10 – P. 2005–2012.
10. Di Lisa F., Carpi A., Giorgio V., Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection // Biochim. and Biophys. Acta. – 2011. – **1813**, № 7. – P. 1316–1322.
11. Elrod J.W., Molkentin J.D. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore // Ibid. – 2013 – **77**, № 5 – P. 1111–1122.
12. Gross G.J., Auchampach J.A. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs // Ibid. – 1992. – **70**. – P.223–233.
13. Gross G.J., Fryer R.M. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels and myocardial preconditioning // Ibid. – 1999. – **84**, №9. – P. 973–979.
14. 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. – **39**, №1. – P. 17–50.
15. Holmuhamedov E.L., Wang L., Terzic A. ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel openers prevent  $\text{Ca}^{2+}$  overload in rat cardiac mitochondria // J. Physiol. (London). – 1999. – **519**, №2. – P. 347–360.
16. Inoue I., Nagase H., Kishi K., Higuti T. ATP-sensitive  $\text{K}^+$



- channels in the mitochondrial inner membrane // Nature. – 1991. – **352**, №6332. – P. 244–247.
17. Jahandir A., Terzic A.  $K_{ATP}$  channel therapeutics at the bedside // J. Molec. and Cell. Cardiol. – 2005. – **39**. – P. 99–112.
18. Noma A. ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle // Nature. – 1983. – **305**, №5930. – P. 147–148.
19. Voitychuk O.I., Strutynskiy R.B., Yagupolskii L.M., Tinker A., Moibenko O.O., Shuba Y.M. Sarcolemmal cardiac KATP channels as a target for the cardioprotective effects of the fluorine-containing pinacidil analogue flocalin // Brit. J. Pharmacol. – 2011. – **162**, №3. – P. 701–711.
20. Wakahara N., Katoh H., Yaguchi Y., Uehara A., Satoh H., Terada H., Fujise Y., Hayashi H., Difference in the cardioprotective mechanisms between Ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning by diazoxide in rat hearts // Circular. J. – 2004. – **68**. – P. 156–162.
21. Webster K.A. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species // Future Cardiol. – 2012. – **8**, № 6 – P 863–884.
22. Yagupolskii L.M., Maletina I.I., Petko K.I. New fluorine-containing hypotensive preparations // J. Fluor. Chem.- 2001.- **109**. - P.87-94.
23. Yang X.M., Proctor J.B., Cui L., Krieg T., Downey J.M., Cohen M.V. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways // J. Amer. Coll Cardiol. – 2004. – **44**, №5. – P. 1103–1110.

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

*Матеріал надійшов до  
редакції 14.10.2013*