

¹К.В. Тарасова, ¹Т.С. Лагодич, ²Т.І. Древицька, ²С.Б. Французова, ¹І.М. Карвацький

Вплив фармакологічної активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів на спонтанну скоротливу активність ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура

¹Нац. мед. ун-т ім.О.О. Богомольця; Київ; ²Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; E-mail: fkokalin@voliacable.com

Досліджено спонтанну скоротливу активність ізольованих культивованих неонатальних кардіоміоцитів. Виявлено, що через 48 год після виділення значення показників становило: амплітуда скорочень – $1,96 \pm 0,362$ мкм, частота – $59,4 \pm 6,59$ хв⁻¹, швидкість скорочення – $10,39 \pm 1,92$ мкм/с, швидкість розслаблення – $7,16 \pm 1,89$ мкм/с. У порівняльному вивченні впливу активаторів аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів діазоксиду і його фторвмісного аналога показано, що вони різною мірою впливають на скоротливу функцію ізольованих кардіоміоцитів: діазоксид викликає її повне припинення, а його фторвмісний аналог – незначні зміни: зменшення часу досягнення піку (з $0,16 \pm 0,02$ до $0,15 \pm 0,15$ с), амплітуди скорочень (з $1,91 \pm 0,39$ до $1,47 \pm 0,28$ мкм), швидкості розслаблення (з $9,53 \pm 1,62$ до $7,82 \pm 1,1$ мкм/с) при незмінній частоті та швидкості скорочення. Неістотний гальмівний вплив фторвмісного аналога діазоксиду на скоротливу активність неонатальних кардіоміоцитів є перевагою цієї речовини порівняно з її прототипом (діазоксидом).

Ключові слова: ізольовані неонатальні кардіоміоцити, показники спонтанної скоротливої активності, активатори аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів.

ВСТУП

Серцево-судинні захворювання є основною причиною смертності населення України, що створює необхідність розробки ефективних фізіологічно обґрунтованих підходів до корекції функції серця, зокрема, через застосування кардіопротекторів. До таких сполук відносять активатори аденозинтрифосфатчутливих калієвих (K_{ATP})-каналів, механізм дії яких остаточно не з'ясований. Отже, вивчення функціональних змін серцевого м'яза під впливом модуляторів калієвих каналів є актуальною фізіологічною проблемою.

Використання як об'єкта дослідження ізольованих кардіоміоцитів дає змогу дослідити морфологічні, біохімічні та фізіологічні

характеристики серця. Це зручна модель для оцінки скоротливості, моделювання ішемії, аноксії – реоксигенації, визначення кардіотоксичності різних сполук тощо. Особливістю неонатальних кардіоміоцитів є їх здатність до спонтанних скорочень, що виникають у культурі клітин починаючи з 3-ї доби культивування, а за умови вибіркової адгезії великих клітин – через добу після посіву [1]. Разом з тим практично немає праць у вітчизняних авторів з вивчення показників скорочення ізольованих неонатальних кардіоміоцитів.

Інтерес до дослідження функції K_{ATP} -каналів зумовлений тим, що, закриті в звичайних умовах (при вмісті АТФ у клітині у межах норми), вони водночас найчисленніші серед усіх каналів у серці (приблизно 2000–3000 у

кожній клітині). Припускають, що активатор цих каналів діазоксид має низку потенційно корисних властивостей, з чим і пов'язана різноплановість досліджень цієї речовини. Так, кардіопротекторну властивість діазоксиду – здатність викликати прекодиціювання серця, вивчали зокрема, на рівні ізольованих кардіоміоцитів [2–4]. Проте немає чітких даних про механізми розвитку цього впливу. Нині діазоксид, препарат з неодноразово підтвердженими на тваринних моделях кардіопротекторними властивостями, як лікувальний засіб практично не використовують, що, очевидно, пов'язано з його численними побічними ефектами (затримка натрію та води, гіперглікемія тощо). Тому науковий інтерес викликає дослідження сполук з корисними властивостями прототипу (діазоксиду), що водночас позбавлені його негативних ефектів. Раніше нами встановлено, що фторвмісний аналог діазоксиду має переваги порівняно з прототипом: не викликає інтерстиційного набряку в міокарді [5], більш ефективно покращує в ньому енергетичний обмін, менше впливає на проникність клітинної мембрани [6], швидше відновлює амплітуду скорочень ішемізованого папілярного м'яза [7].

У літературі є лише поодинокі відомості про вплив активаторів і блокаторів K_{ATP} -каналів у не стресових для ізольованих кардіоміоцитів умовах [8]. Враховуючи високу спорідненість діазоксиду до K_{ATP} -каналів ми припустили, що їх фармакологічне відкривання може позначитися на скоротливій функції кардіоміоцитів без моделювання ішемії.

Мета нашої роботи – дослідження порівняльного впливу активаторів K_{ATP} -каналів (діазоксиду та його фторвмісного аналога) на спонтанну скоротливу активність ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура.

МЕТОДИКА

Неонатальні кардіоміоцити отримували з міокарда шлуночків дводобових щурів ферментативним гідролізом [9] із модифікаціями

[10]. Шлуночки відокремлювали від передсердь, механічно подрібнювали ножицями, а отримані шматочки міокарда розміром 1–2 мм³ переносили у буферний сольовий розчин (рН 7,4) такого складу (ммоль/л): HEPES – 20, KCl – 5,4, NaCl – 116,4, глюкоза – 5,5, Na₂HPO₄ – 0,4 та K₂HPO₄ – 0,4, що містив колагеназу II типу (95 ОД/мл) і панкреатин (0,6 мг/мл). Виділені клітини ресуспендували у живильному середовищі Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 – 4 : 1), теляча сироватка – 15 %, Na₂CO₃ – 462 ммоль/л, HEPES – 15 ммоль /л та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл). Клітини розміщували у чашки для культивування із щільністю 120 000 на 1 см², яке проводили при 37 °С у газовому середовищі – 5 % CO₂ та 95 % атмосферного повітря протягом 2–5 діб.

Частоту спонтанних скорочень кардіоміоцитів визначали й оцінювали за методикою Webster та співавт. [11]: кількість скорочень визначали візуально за 60 с у поодинокі розташованих клітин, починаючи з 2 діб культивування. Скоротливу функцію горизонтально розташованих кардіоміоцитів реєстрували та аналізували за допомогою системи IonOptix, що сканує відхилення лінії краю кардіоміоцита при його скороченні. Механічні властивості клітин оцінювали за такими показниками: пік скорочення (ПС) або амплітуда скорочення в мікрометрах або у відсотках відносно довжини клітини в стані розслаблення), час досягнення ПС (ЧПС, секунди), час відновлення довжини (ЧВД, секунди), максимальна швидкість скорочення (МШС, мікрометри за 1 с) і розслаблення (МШР, мікрометри за 1 с). Кардіоміоцити, що проявляли, або занадто часті скорочення, або ті, що скорочувалися менше ніж на 5 % від вихідної довжини не вивчали.

Для вивчення впливу досліджуваних речовин на показники скорочень клітин їх обробляли препаратом, таку саму кількість клітин досліджували, замінювали середо-

вище, клітини інкубували протягом ще 2 год і втретє визначали показники. На всіх етапах клітини спостерігали під мікроскопом «Olympus СКХ 41» і одночасно на моніторі комп'ютера з використанням камери «IonOptix MyoCam». Результати обробляли за методикою Belostotskaya та співавт. [1]: усереднювали значення кожного експерименту, декількох повторів і різних експериментів з однаковими умовами проведення. Значення представлені як «середнє \pm похибка середнього» ($M \pm m$). Результати обробляли статистично з допомогою програми Excel 2000 та Origin 8.0. Вірогідність різниці середніх значень визначали за критерієм t Стюдента. Значення $P < 0,05$ вважали вірогідними.

Використано речовини: діазоксид (7-chloro-3-methyl-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide) і його аналог, синтезований в Інституті органічної хімії НАН України під керівництвом проф. Л.М. Ягупольського, що містить у положенні 7 конденсованого гетероциклу диформетоксильну групу замість хлору. Обидві сполуки розчиняли в диметилсульфоксиді, кінцева концентрація якого не перевищувала 0,1% і використовували в концентрації 100 мкмоль/л.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При фіксації свіжовиділених кардіоміоцитів на дні чашок швидко змінювалася їхня

форма: округлі клітини діаметром близько 10 мкм, розпластуючись, відпускали від двох відростків, збільшуючись у розмірі приблизно втричі. Через 2 доби після посіву більшість кардіоміоцитів у полі зору проявляли спонтанні скорочення, що неістотно відрізнялися за амплітудою ($1,96 \pm 0,362$ мкм) і частотою ($59,4 \pm 6,59$ хв⁻¹), МШС становила $10,39 \pm 1,92$, МШР – $7,16 \pm 1,89$ мкм/с. Приклад репрезентативних фрагментів запису кривих скорочення представлено на рисунку.

Зареєстровані нами показники наближені до даних літератури. Так, частота спонтанних скорочень за спостереженнями різних дослідників становить від 61 до 83 хв⁻¹ [12–14], хоча у різних культурах може значно відрізнятися (25 – 140 хв⁻¹), і при великій частоті неповне розслаблення знижує амплітуду скорочення [15]. Швидкість теж варіює в широких межах: від 3,4 [13] до 30,1 мкм/с [16]. Значне зменшення амплітуди та швидкості скорочення і розслаблення є проявом ішемічного пошкодження кардіоміоцитів.

Показано, що значення скоротливої активності кардіоміоцитів через 48 ($n=22$) і 72 або 96 ($n=22$) год після виділення помітно відрізняються: при збільшенні терміну культивування існує тенденція до зростання амплітуди (з $1,96 \pm 0,362$ до $2,55 \pm 0,28$ мкм, $P > 0,05$), збільшується частота (з $59,4 \pm 6,59$ до $84 \pm 5,92$ хв⁻¹, $P < 0,05$), швидкість скорочення (з $10,39 \pm 1,92$ до $16,36 \pm 2,17$ мкм/с, $P < 0,05$)



Скорочення інтактних ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура: а – три послідовних скорочення, б – поодинокі скорочення. Цифрами позначено секунди, у відсотках – зменшення довжини кардіоміоцита відносно вихідного значення

і розслаблення (з $7,16 \pm 1,89$ до $10,95 \pm 0,72$ мкм/с, $P < 0,05$) й не змінюється тривалість скорочення. Про збільшення скоротливої активності кардіоміоцитів при подовженні терміну культивування свідчать літературні дані [11].

Разом з тим реєстрація показників скоротливої активності саме у поодинокі розташованих закріплених неонатальних кардіоміоцитів при збільшенні часу культивування значно ускладнювалася через їх здатність утворювати міжклітинні з'єднання. Враховуючи достатню (не менше 50 % у полі зору) кількість таких клітин їх було використано як контроль.

Водночас за частотою скорочень ця популяція кардіоміоцитів виявилася неоднорідною, але в межах частот спонтанних скорочень від $28 \pm 3,69$ до $68,75 \pm 5,23$ хв⁻¹ значної різниці відсотка зменшення довжини клітини не було (7,33 і 8,72 % відповідно, $P > 0,05$), тобто властива серцю щура негативна хроноінотропна залежність не спостерігалася. Очевидно, про таку залежність можливо говорити лише у такому разі, коли під дією екзогенних або ендогенних чинників власти-

ва цій клітині частота скорочень зазнає змін. Кардіоміоцити проявили адекватну реакцію на адреналін (таблиця): істотно підвищилася частота скорочень, МШС і МШР, незначно зменшився ПС, що свідчить про належну якість їх виділення і культивування.

Ми провели порівняльне дослідження впливу потенційних кардіопротекторів – активаторів K_{ATP} -каналів на показники скоротливої активності ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура. При додаванні в розчин для культивування діазоксиду протягом 5 хв припинялися спонтанні скорочення усіх кардіоміоцитів. Через 30–60 хв після заміни розчину у більшості клітин така активність відновлювалася до вихідного рівня. Наші результати загалом узгоджуються з даними літератури: на схожих моделях показано негативний хронотропний [17] і, залежно від дози, позитивний [18] чи негативний [19] інотропний вплив діазоксиду.

Установлено, що фторвмісний аналог діазоксиду викликав зникнення спонтанної активності лише у незначній кількості кардіоміоцитів, у яких частота скорочень у вихідному стані була мінімальною (18–

Показники спонтанної скоротливої активності ізольованих культивованих неонатальних кардіоміоцитів щура

Показники	До дії адреналіну (n=28)	Адреналін (n=10)	До дії аналога діазоксиду (n=22)	Аналог діазоксиду (n=16)
Частота скорочення, хв ⁻¹	$45,00 \pm 6,106$	$82,00 \pm 5,686^*$	$48,86 \pm 10,93$	$49,00 \pm 9,768$
Відсоток зменшення довжини	$8,41 \pm 0,687$	$6,13 \pm 0,055^*$	$9,73 \pm 1,969$	$7,53 \pm 1,255$
Час піку скорочення, с	$0,12 \pm 0,016$	$0,06 \pm 0,003^*$	$0,16 \pm 0,019$	$0,15 \pm 0,015$
Час відновлення довжини скорочення, с	$0,14 \pm 0,016$	$0,09 \pm 0,001^*$	$0,19 \pm 0,025$	$0,21 \pm 0,020$
Максимальна швидкість скорочення, мкм/с	$8,30 \pm 0,240$	$16,46 \pm 1,347^*$	$9,53 \pm 1,619$	$8,64 \pm 0,874$
Максимальна швидкість розслаблення, мкм/с	$7,91 \pm 0,255$	$10,44 \pm 0,642^*$	$8,26 \pm 0,818$	$7,82 \pm 1,105$

Примітка. * $P < 0,05$.

24 хв⁻¹), що, очевидно, зумовлено більшою порівняно з прототипом ліпофільністю цієї речовини та її меншою токсичністю. У більшості кардіоміоцитів неістотно зменшилась амплітуда скорочень (з $1,91 \pm 0,39$ до $1,47 \pm 0,28$ мкм, інші показники практично не змінилися (див. таблицю). Незначний гальмівний вплив діазоксиду на скоротливу активність інтактних неонатальних кардіоміоцитів є перевагою цієї речовини порівняно з її прототипом (діазоксидом). Але слід зазначити, що висновки таких досліджень відносно органа або організму в цілому повинні застосовуватися обережно, бо вони не відображають усієї складності процесів, які відбуваються в позаклітинному просторі, а також судинних, гормональних і нервових впливів. Враховуючи перспективність вивчення і механізмів дії аналога діазоксиду, ми вважаємо за необхідне продовжити дослідження на різних моделях ішемії кардіоміоцитів, зокрема, у віковому аспекті.

Е.В. Тарасова, Т.С. Лагодич, Т.И. Древицкая, И.Н. Карвацкий, С.Б. Французова

ВЛИЯНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАНАЛОВ НА ПАРАМЕТРЫ СПОНТАННУЮ СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ

Исследовано спонтанную сократительную активность изолированных культивируемых неонатальных кардиомиоцитов. Показано, что величина ее показателей зависит от длительности культивирования: с 48 до 72–96 ч увеличивается амплитуда (с $1,96 \pm 0,362$ до $2,55 \pm 0,28$ мкм), частота (с $59,4 \pm 6,59$ до $84 \pm 5,92$ сокращений за 1 мин), скорость сокращения (с $10,39 \pm 1,92$ до $16,36 \pm 2,17$ мкм за 1 с) и расслабления (с $7,16 \pm 1,89$ до $10,95 \pm 0,72$ мкм за 1 с). В сравнительном исследовании влияния диазоксида и его фторсодержащего аналога показано, что эти активаторы аденозинтрифосфатчувствительных калиевых каналов в разной степени воздействуют на сократительную функцию изолированных кардиомиоцитов: диазоксид вызывает ее полное прекращение, а фторсодержащий его аналог – незначительные изменения показателей: уменьшение времени достижения пика (с $0,16 \pm 0,02$ до $0,15 \pm 0,15$ с), амплитуды сокращений (с $1,91 \pm 0,39$ до $1,47 \pm 0,28$ мкм), скорости расслабления (с $9,53 \pm 1,62$ до $7,82 \pm 1,1$ мкм в 1 с)

и не изменяет частоту и скорость сокращения. Небольшое угнетающее влияние фторсодержащего аналога диазоксида на сократительную активность неонатальных кардиомиоцитов является преимуществом данного вещества по сравнению с его прототипом (диазоксидом).

Ключевые слова: изолированные неонатальные кардиомиоциты, показатели спонтанной сократительной активности, активаторы аденозинтрифосфатчувствительных калиевых каналов.

K.V.Tarasova, T.S.Lagodych, T.I.Drevytska, I.M.Karvatsky, S.B.Frantsuzova.

THE IMPACT OF PHARMACOLOGICAL ACTIVATION OF ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS ON THE PARAMETERS OF SPONTANEOUS ACTIVITY OF ISOLATED NEONATAL RAT CARDIOMYOCYTES

We investigated spontaneous contractile activity of isolated cultured neonatal cardiomyocytes. It was shown that contractile activity of isolated cardiomyocytes depends on the duration of culture. Culture from 48 to 72 or 96 hours the amplitude of contraction grows (from $1,96 \pm 0,362$ to $2,55 \pm 0,28$ micrometers), frequency (from $59,4 \pm 6,59$ to $84 \pm 5,92$ contractions by minute) contraction speed (from $10,39 \pm 1,92$ to $16,36 \pm 2,17$ micrometers per second) and relaxation (from $7,16 \pm 1,89$ to $10,95 \pm 0,82$ micrometers per second). Comparative study of the effect of diazoxide and its fluorine analog has shown that the activators of ATP-sensitive potassium channels influence the contractile function of isolated cardiomyocytes in different degrees: diazoxide causes its full termination, but its fluorine analog evokes only minor changes: a peak-reaching time decreases (from $0,16 \pm 0,02$ to $0,15 \pm 0,15$ seconds), contraction amplitude decreases (from $1,91 \pm 0,39$ to $1,47 \pm 0,28$ micrometers), relaxation speed decreases (from $9,53 \pm 1,62$ to $7,82 \pm 1,1$ micrometers per second) with constant frequency and contraction speed. A minor inhibitory effect of fluorine analog of diazoxide on the contractile activity of neonatal cardiomyocytes is an advantage of this agent compared with its prototype diazoxide.

Key words: isolated neonatal cardiomyocytes, the parameters of the spontaneous contractile activity, activators of the K_{ATP} channels.

Bogomoletz National University, Kyiv

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of NAS Ukraine, Kyiv.

REFERENCES

1. Belostotskaya GB, Darashina IV, Golovanova TA, Khrustaleva RS, Tsyrlin VA. Assessment of the functional state of freshly isolated and cultured cardiomyocytes of rats under conditions of oxidative stress. Regional haemodyn.

- microcircul. 2008;7(2):85-92.
2. Xia Y, Rajapurohitam V, Cook MA, Karmazyn M. Inhibition of phenylephrine induced hypertrophy in rat neonatal cardiomyocytes by the mitochondrial KATP channel opener diazoxide. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 37(5):1063-67.
 3. Maffit SK, Sellitto AD, Al-Dadah AS, Schuessler RB, Damiano RJ, Lawton JS. Diazoxide maintains human myocyte volume homeostasis during stress. *Jam Heart Assoc.* 2012; 1(2):1-8.
 4. Al-Dadah AS, Voeller R K, Schuessler RB, Damiano RJ, Lawton JS. Maintenance of myocyte volume homeostasis during stress by diazoxide is cardioprotective. *Ann Thorac Surg.* 2007; 84(3):857-62.
 5. Tarasova KV, Shevchuk VG, Grygoruk OV, Frantsuzova SB, Lisova GO. Research of structural changes of a myocardium of rats under long influence of potassium channels activators (diazoxide and it fluorine containing analogues). *JVinn Med Univers.* 2007; 11(2/1):538-41.
 6. KV Tarasova, LL Arshinnikova, LI Antonenko, SB Frantsuzova, VG Shevchuk. Effect of long administration of activators of KATP channels on the energy supplying of myocardium and the permeability of cell membranes. *Pharmacology and Drug Toxicology.* 2011;4:51-56.
 7. Tarasova EV, Shevchuk VG Influence of KATP activators (diazoxid and its fluorinated analogues) on contractile activity of isolated papillary muscle of heart of old rats. *Ukrainian Medical Almanac.*2009; 12 (2):245-48.
 8. Kicinska A, Szewczyk A. Protective effects of the potassium channel opener-diazoxide against injury in neonatal rat ventricular myocytes. *Gen Physiol Biophys.*2003; 22:383-395.
 9. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts a study in normal and injured rat hearts. *Circulation.*1999;100:193-202.
 10. Dosenko VE, Nagibin VS, Tumanovskaya LV, Moibenko AA, Vaage J. Postconditioning prevents apoptotic, necrotic and autophagic cardiomyocyte cell death in culture. *Fiziol Zh.*2005; 51:12-17.
 11. Webster DR, Patrick DL. Beating rate of isolated neonatal cardiomyocytes is regulated by the stable microtubule subset. *AJP Heart.* 2000; 278 (5):H1653-H1661.
 12. Lalevee N, Rebsamen MC, Barre`re-Lemaire S, Perriera E, Nargeot J, Benitah J-P, Rossier MF. Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.*2005; 67:216-224.
 13. Lancaster JJ, Johnson NM, Juneman E, Thai HM, Bahl J, Goldman S. Construction of a spontaneously contracting biologically active cardiomyocyte scaffold. *J Cardiac failure.* 2009; 15(6):4-5.
 14. Er F, Larbig R, Ludwig A, Biel M, Hofmann F, Beuckelmann DJ, Hoppe UC. Dominant-negative suppression of HCN channels markedly reduces the native pacemaker current *I*_f and undermines spontaneous beating of neonatal cardiomyocytes. *Circulation.* 2003; 107:485-89.
 15. Lorenzen-Schmidt I, Schmid-Schönbein GW, Giles WR, McCulloch AD, Chien S, Omens JH. Chronotropic response of cultured neonatal rat ventricular myocytes to short-term fluid shear. *Cell. Biochem. Biophys.* 2006; 46 (2):113-22.
 16. Jung AS, Kubo H, Wilson R, Houser SR, Margulies KB. Modulation of contractility by myocyte-derived arginase in normal and hypertrophied feline myocardium. *Am J Physiol.* 2006; 290 (5):H1756-H1762.
 17. Kocić I, Gruchała M, Petruszewicz J. Gender differences in effects of pinacidil but not diazoxide on heart automatism in the isolated guinea pig right atria. *Pol J Pharmacol.* 2003; 55(3):419-24.
 18. De Giusti VC, Correa MV, Beltrano C, Yeves AM, Villa-Abrille MC, Chiappe de Cingolani GE, Cingolani HE, Aiello AE. The positive inotropic effect of endothelin-1 is mediated by mitochondrial reactive oxygen species. *Life Sciences.*2008; 83:264-71.
 19. Deja MA, Golba KS, Kolowca M, Widenka K, Biernat J, Wos S. Diazoxide provides protection to human myocardium in vitro that is concentration dependent. *Ann Thorac Surg.*2004; 77: 226-32.

Матеріал надійшов до редакції 24.06.2014