

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики  
доц. Нипорко Олексій Юрійович  
Протокол №\_\_\_ засідання кафедри  
від “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2022р.

**ПІДВИЩЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ АТФ-ЧУТЛИВИХ КАЛІЄВИХ  
КАНАЛІВ АСОЦІЮЄТЬСЯ З ПОСИЛЕННЯМ  
ВАЗОДИЛАТАТОРНИХ РЕАКЦІЙ ТА АНТИШЕМІЧНИМ  
ЗАХИСТОМ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студента спеціальності  
091 Біологія  
ОП «Біологія (високі технології)»  
**Сулими Ігоря Миколайовича**

Науковий керівник від кафедри  
доцент кафедри молекулярної біотехнології та  
біоінформатики  
к.б.н. **Самофалова Дарія Олексіївна**

Робота виконана відділу загальної  
та молекулярної патофізіології  
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця  
під керівництвом д.б.н. **Р.Б. Струтинського**

Оцінка захисту роботи

---

## Анотація

Сулима І.М. «Підвищення експресії АТФ-чутливих калієвих каналів асоціюється з посиленням вазодилататорних реакцій та антиішемічним захистом». Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «високі технології».

Вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату дорослим щурам майже вдвічі підвищувало експресію мРНК пороутворюючої Kir6.2 та регуляторної SUR2 субодиниць кардіоспецифічних сарколемальних  $K_{ATP}$ -каналів серцевого типу, та у 1,5 раза експресію субодиниці SUR1  $K_{ATP}$ -каналів мітохондріального типу. Вперше показано, що введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам підвищувало у 3,6 раза експресію пороутворюючої субодиниці Kir6.1  $K_{ATP}$ -каналів судинного типу та у 2,4 раза регуляторної SUR2 субодиниці сарколемальних  $K_{ATP}$ -каналів судинного і серцевого типу. За допомогою тензометричних експериментів на ізольованих судинних смужках показано значне зростання ефектів через  $K_{ATP}$  канали, що може свідчити про підвищення їх щільності на клітинних мембранах. Вперше показано, що у тварин із збільшеною експресією Kir6.1 та SUR2 за допомогою піридоксаль-5-фосфату відновлення скоротливої діяльності та коронарного потоку під час реперфузії ішемізованого серця було значно кращим. Пригнічення цих ефектів специфічним інгібітором  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламідом свідчить, що принаймні частково ці захисні ефекти викликані активацією  $K_{ATP}$ -каналів.

Ключові слова: ЕНДОГЕННИЙ ЗАХИСТ;  $K_{ATP}$ -КАНАЛИ; ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ; ПІРИДОКСАЛЬ-5-ФОСФАТ; СУДИННІ РЕАКЦІЇ; КАРДІОПРОТЕКЦІЯ.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
ВСТУП .....	5
РОЗДІЛ 1. СТРУКТУРА ТА ЗАХИСНІ ВЛАСТИВОСТІ $K_{AT\Phi}$ -КАНАЛІВ..	8
1.1. Структура $K_{AT\Phi}$ -каналів.....	8
1.2. Протекторні властивості $K_{AT\Phi}$ -каналів.....	12
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	27
2.1. Експериментальні тварини.....	27
2.2. Метод визначення експресії мРНК Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниць $K_{AT\Phi}$ -каналів.....	27
2.3. Дослідження показників скорочувальної функції ізольованого серця щурів за ішемії-реперфузії .....	28
2.4. Тензометричні вимірювання реакцій скорочення/розслаблення ізольованих судинних смужок.....	30
2.5. Статистичне оброблення результатів .....	31
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	33
3.1. Дослідження експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 за дії піридоксаль-5-фосфату.....	33
3.2. Дослідження реакцій скорочення/розслаблення ізольованих судинних смужок у тварин з підвищеною експресією $K_{AT\Phi}$ -каналів.....	37
3.3. Кардіопротекторні ефекти у тварин з підвищеною експресією $K_{AT\Phi}$ - каналів за ішемії-реперфузії міокарду.....	41
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	52

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

·ОН – гідроксильний радикал

ABCC8 – ген, що кодує SUR1 субодиницю  $K_{ATP}$ -каналу

ABCC9 – ген, що кодує SUR2 субодиницю  $K_{ATP}$ -каналу

$H_2O_2$  – пероксид водню

KCNJ11 – ген, що кодує Kir6.2 субодиницю  $K_{ATP}$ -каналу

KCNJ8 – ген, що кодує Kir6.1 субодиницю  $K_{ATP}$ -каналу

Kir6.1 – пороутворююча субодиниця ATP-чутливого калієвого каналу

Kir6.2 – пороутворююча субодиниця ATP-чутливого калієвого каналу

mtNOS – мітохондріальна NO-синтаза

NAM – нікотинамід

$O_2^{\cdot-}$  – супероксид-аніон

PLP – піридоксаль-5-фосфат

ROMK (Kir1) – мембранний канал

SUR1 – регуляторна субодиниця ATP-чутливого калієвого каналу

SUR2 – регуляторна субодиниця ATP-чутливого калієвого каналу

TMD0, TMD1 и TMD2 – ділянки у структурі SUR субодиниці  $K_{ATP}$ -каналу

ГМК – гладеньком'язові клітини

ГРДС – гострий респіраторний дистрес-синдром

ІПК – ішемічне прекодиціювання

ІСФ – інтенсивність скоротливої функції

$K_{ATP}$  канал – ATP-чутливий калієвий канал

міто- $K_{ATP}$ -канал – ATP-чутливий калієвий канал внутрішньої мембрани  
мітохондрій

МП – мітохондріальна транспортна пора

сарко- $K_{ATP}$ -канал – ATP-чутливий калієвий канал сарколемальної мембрани

## ВСТУП

Сучасний розвиток людства супроводжується урбанізацією населення та технолізацією життя, що змінює спосіб життя людей, зменшуючи рухливість та збільшуючи кількість рафінованих продуктів споживання. Все це, разом з підвищенням соціальних негараздів та стресових станів суттєво збільшує розвиток «цивілізаційних» захворювань, до яких з впевністю можна віднести захворювання серцево-судинної системи. Незважаючи на істотний прогрес у профілактиці та лікуванні серцево-судинних захворювань вони все ще залишаються основною причиною смертності (67%) та інвалідності населення у більшості країн світу [1, 2]. В Україні за останні 30 років їх поширеність зростає в 3,5 рази, а рівень смертності від них – на 46 % [1]. Наслідком постійного збільшення техногенного втручання людей у природне середовище та неуклісний ріст збільшення населення на планеті все частіше виникають нові захворювання різної природи. Одним із них є найважливіша на сьогодні медико-соціальна проблема – лікування COVID-19, збудником якої є вірус SARS-CoV-2 та його нові модифікації, чи, принаймні, спроба мінімізувати патогенний вплив цього захворювання на людину. Одним із таких наслідків COVID-19 може бути поліорганна гіпоксія та ішемія, індуковані різними факторами, такими як пневмонія, гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС), порушенням функції еритроців, тромбоутворення, порушенням функції мітохондрій [3]. Гострі стани кисневого голодування призводять до порушення функції органів та у важких випадках до некрозу тканин та загибелі організму в цілому. Проте природа еволюційно підготувалась до захисту від таких патологічних факторів (зокрема, COVID-19-індукованих), створивши ендogenous механізми протидії ішемічним ушкодженням, одним із яких є система АТФ-чутливих калієвих ( $K_{ATP}$ ) каналів клітинних мембран [4-6]. Їх особливістю є властивість відкриватися у відповідь на зменшення внутрішньоклітинної концентрації АТФ (енергоресурсів) нижче від мілімолярних значень [6]. Це дає змогу вважати  $K_{ATP}$ -канали центральним метаболічним сенсором клітини щодо

її енергозабезпечення [5, 7]. Такі високочутливі до вмісту АТФ молекулярні структури відіграють виняткову роль у синхронизації метаболізму та електричної активності клітин, регулюють потенціалзалежні мембранні функції та підтримують гормональний гомеостаз, а їх дисфункція може сприяти патогенезу [7-10]. І навпаки, активація цих каналів має захисні ефекти. Зокрема особливу роль  $K_{ATP}$ -канали мають у серцево-судинній системі, адже реалізують взаємозв'язок енергоресурсу серця, його електричної та скоротливої функцій та регулюють судинний тонус [11]. Потужна кардіопротекторна дія активації  $K_{ATP}$ -каналів є актуальною також при COVID-19 [12]. Етіологія серцевих порушень при цьому захворюванні багатofакторна і включає як пряме вірусне ураження міокарда, так і гіпоксію, запальні процеси, порушення АПФ2-рецепторів та катехоламін-адренергічної регуляції та інше [12].

Потужність захисних ефектів залежить від щільності  $K_{ATP}$ -каналів на клітинних мембранах. В експериментах з ішемією-реперфузією та експериментальним інфарктом міокарда було показано, що при більшій щільності  $K_{ATP}$ -каналів на мембрані захисний ефект потужніший [13-15]. При збільшенні експресії  $K_{ATP}$ -каналів формується стійкий до ішемії фенотип серця [15]. Навіть потужний ендogenous кардіопротекторний феномен ішемічного прекондиціонування пов'язують із збільшенням щільності  $K_{ATP}$ -каналів на мембранах кардіоміоцитів [15, 16]. Проте механізми, що підвищують експресію  $K_{ATP}$ -каналів мало відомі. Це поодинокі дослідження про таку властивість в більшості патологічних чинників, таких як гіпоксія [15, 17], ендотоксини [18], формальдегід [19] та сірководень [20].

Таким чином, розробка нових оригінальних методів підвищення експресії  $K_{ATP}$ -каналів клітинних мембран, як потужної універсальної системи ендogenous захисту, що підвищує стійкість організму до дії патологічних гіпоксичних та ішемічних чинників є вельми актуальним напрямком сучасної фізіології та медицини. Розроблені в ході реалізації проекту методи підвищення експресії  $K_{ATP}$ -каналів можуть бути використані з метою профілактики та лікування патологій ішемічної природи, зокрема, захворювань серцево-

судинної системи та для попередження дисфункції органів при поліорганній гіпоксії та ішемії, в т.ч. при COVID-19 [3], та значно полегшувати перебіг захворювання.

## РОЗДІЛ 1.

### СТРУКТУРА ТА ЗАХИСНІ ВЛАСТИВОСТІ $K_{AT\Phi}$ -КАНАЛІВ

#### 1.1. Структура $K_{AT\Phi}$ -каналів

Один із основних ендогенних механізмів захисту клітини при зниженні її енергоресурсів – активація АТФ-чутливих калієвих ( $K_{AT\Phi}$ ) каналів, які були відкриті трохи більше 30 років тому [4-7, 11]. Їх особливістю є властивість відкриватися у відповідь на зменшення внутрішньоклітинної концентрації АТФ нижче від мілімолярних значень [5, 6]. Це дає змогу вважати  $K_{AT\Phi}$ -канали центральним метаболічним сенсором клітини щодо її енергозабезпечення [5, 7]. Такі високочутливі до вмісту АТФ молекулярні структури відіграють виняткову роль у синхронизації метаболізму та електричної активності клітин, регулюють потенціалзалежні мембранні функції та підтримують гормональний гомеостаз, а їх дисфункція може сприяти патогенезу [7-10]. І навпаки, активація  $K_{AT\Phi}$ -каналів має захисні ефекти, зокрема, за ішемічного та епілептичного інсульту – підтримує електричну стабільність нейронів та попереджує їх ушкодження, адже їх активація призводить до гіперполяризації цитоплазматичної мембрани та зменшення вмісту цитозольного кальцію, що послаблює електричну збудливість цих клітин, а в м'язових клітинах – відповідно скоротливість [9, 11].

Відомо, що цей канал має октаметричну структуру - пара каналу утворюється чотирма  $K_{ir6.x}$  субодинацями, які зовні оточуються чотирма SUR субодинацями (рис.1.1), і, щонайменше, чотирма допоміжними білками - аденілаткіназами та креатинкіназами першого типу, м'язову форму лактатдегідрогеназами (ЛДГ-м) і гліцераальдегід 3-фосфатдегідрогеназами (GAPDH) [21-25].

Є декілька типів субодинаць, які відрізняються між собою за складом трансмембранних доменів і визначають специфічні властивості каналу.

Принаймні дві Kir6.x субодиниці – Kir6.1 та Kir6.2, та три SUR-рецептора – SUR1, SUR2A та SUR2B [26, 27]. Комбінації цих білків утворюють різні підтипи  $K_{ATФ}$ -каналів, які визначають їх властивості та відповідають певним тканинам організму [27, 28]. Зокрема, комбінація SUR2B/Kir6.1 переважно відповідає судинним ГМК. Проте у ворітній вені виявлено також підтип SUR2B/Kir6.2, який проявляє спонтанну активність на окремих ділянках мембрани, високу чутливість до інгібуючої дії АТФ ( $K_{1/2 ATФ} \approx 20$  мкмоль/л) та підвищену провідність, подібну до провідності SUR2A/Kir6.2 у кардіоміоцитах.

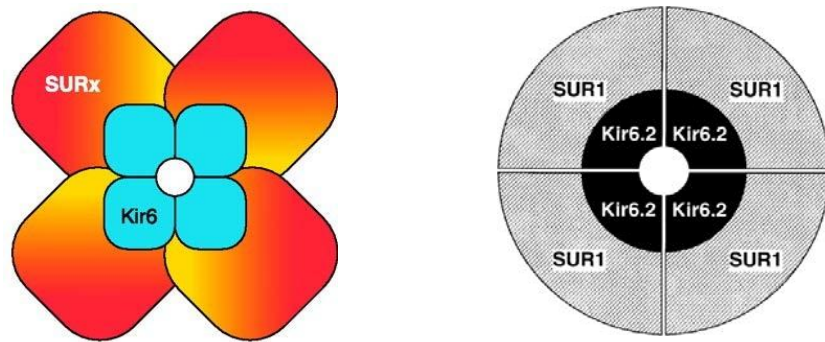


Рис. 1.1 Октаметрична структура  $K_{ATФ}$ -каналу.

Підтип SUR2B/Kir6.2 відповідає також переважно не судинним ГМК. SUR2B, Kir6.1 та Kir6.2 – ендотеліальним клітинам коронарних судин [29] та аорти [30-32]. SUR2A/Kir6.2 – скелетним м'язам, SUR1/Kir6.2 – панкреатичним  $\beta$ -клітинам [27, 28]. В яєчках та кардіоміоцитах зустрічаються всі 5 вище перерахованих субодиниць. Проте для останніх комбінація SUR2A/Kir6.2 є найбільш поширеною [27, 28, 32, 33]. Слід зауважити, що у мишей сарколемальні канали кардіоміоцитів передсердя складаються переважно з SUR1/Kir6.2, тоді як у шлуночках з SUR2A/Kir6.2 [34, 35]. Можливо, що у великих тварин та людей такої чіткої диференціації цих SUR білків у структурі каналу клітин передсердя та шлуночків немає [36]. Ситуація зі структурою  $K_{ATФ}$ -каналів клітин сіноатриальних вузлів та провідних пучків є ще більш заплутаною [37]. Можлива присутність як Kir6.2, так і Kir6.1 білків [38]. Крім

того, субодиниця SUR1 є частиною  $K_{ATP}$ -каналу нейрональних клітин та внутрішньої мембрани мітохондрій. Згодом виявилось, що цей канал, в подальшому названий міто- $K_{ATP}$ -каналом, задіяний в механізмах кардіопротекції. Зокрема, в ішемічному пре- та посткондиціонуванні [39-42].

Раніше вважали, що міто- $K_{ATP}$ -канал складається з SUR1 і Kir6.1 [43], проте пізніше виявилось, що структура цих каналів значно складніша [28]. За сучасними уявленнями він утворюється модифікованими SUR1 та ROMK2 (Kir1) субодиницями, та має значно складнішу структуру ніж канал плазматичної мембрани [28, 44]. За Ardehali et al [45, 46] макромолекулярний комплекс каналу складається з ключового ферменту циклу Кребса і електрон-транспортного ланцюжка – сукцинатдегідрогенази, мітохондріальної АТФ-зв'язуючої касети протеїну-1 (mABC-1), АТФ-синтази, аденіннуклеотидтранслокази, фосфатних білків-переносників та невідомих компонентів, що утворюють каналну пору [60, 61]. У 2012 р. останні були ідентифіковані як ROMK2 [44]. Відомо, що крім мітохондрій в клітині  $K_{ATP}$  - канали також є на мембранах ядер [47] та ендоплазматичного ретикулюма (Kir6.2/SUR1 чи SUR2) [48], інсулін-секреторних гранул  $\beta$ -клітин (SUR1/Kir6.2) [49, 50] та зимогенних гранулах ацинарних клітин (Kir6.1) підшлункової залози [51]. Нервові  $K_{ATP}$ -канали переважно складаються з комбінації SUR1/Kir6.2, проте варіанти SUR2B/Kir6.1, та SUR2B/Kir6.2 також присутні [7]. Таким чином,  $K_{ATP}$ -канали в різних тканинах мають різну чутливість до модуляторів їх активності.

Слід зауважити, що насамперед ступінь відкривання/інгібування каналу залежить від стану нуклеотид-зв'язуючих ділянок каналу та співвідношення інгібуючих та стимулюючих канал нуклеотидів, а саме АТФ і АДФ відповідно. Відомо, SUR субодиниця (~160 kDa) каналу є регуляторною та відноситься до нуклеотид-зв'язуючих білків (рис. 1.2).

Kir6.x субодиниця (~40 kDa) є білком, який відноситься до калієвих каналів внутрішнього випрямлення та переважно визначає провідні властивості  $K_{ATP}$ -каналу [52]. Проте АТФ-зв'язуюча ділянка, що інгібує канал, розташована

саме на тетраметричному комплексі, що утворюється з чотирьох Kir6.x субодиниць (див. рис. 1.2) [26].

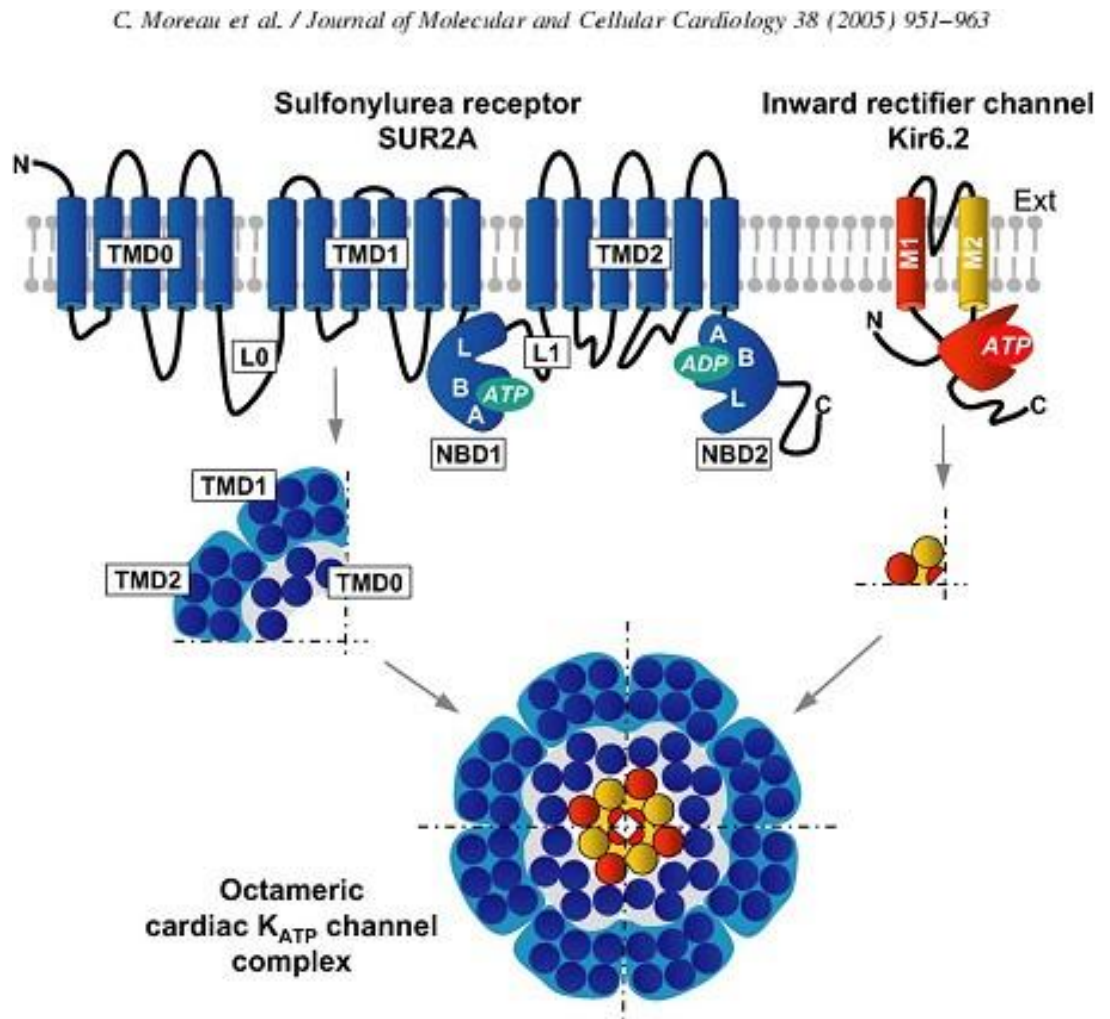


Рис. 1.2 Мембранна топологія і структурна організація  $K_{ATP}$ -каналу кардіоміоцита по Moreau C. et al [57]. Основними структурними компонентами  $K_{ATP}$ -каналу кардіоміоцита є Kir6.2 субодиниця (390 амінокислот) і SUR2A регуляторний рецептор (1549 амінокислот).

Кожна Kir6.x субодиниця складається з двох трансмембранних окремих доменів: M1 і M2. Водночас  $NH_2$ - і  $COOH$ -кінці субодиниць розташовані в цитоплазмі клітини та утворюють ділянку, що відповідає за зв'язування молекул АТФ. Вважається, що у приєднанні однієї молекули АТФ приймають

участь два Kir6.x білка [28, 34, 53]. Зокрема, коли K185 і R201 ділянки С-закінчення однієї Kir6.x субодиниці і R50 в N-закінченні іншої прямо взаємодіють з  $\gamma$ - і  $\beta$ - фосфатами АТФ відповідно, аденінове кільце молекули АТФ взаємодіє з E179 та R301 ділянками другої субодиниці Kir6.x [54]. Також цей комплекс може посилювати здатність каналу до відкривання та зменшувати чутливість каналу до АТФ, відповідає за регулювання чутливості каналу фосфоліпідами, зокрема PIP2 [55, 56].

У структурі SUR-рецептору виділяють три окремих ділянки, названих TMD0, TMD1 и TMD2, що складаються з 5, 6 і 6 трансмембранних доменів відповідно (див. рис. 1.2, SUR2A). NH<sub>2</sub>-кінець SUR білка від плазматичної мембрани розташований зовні. COOH-кінець – в цитоплазмі клітини [28, 58]. SUR-рецептор каналу також містить два гідрофільні АТФ-зв'язуючі домени (нуклеотид-зв'язуючі ділянки): NBD1 і NBD2, кожен з яких утворює по дві ділянки, названі Walker A і Walker B motifs, що сполучені так званою Linker L-сайтом, та утворюють каркас для LSGGQ-зв'язуючої ділянки та два залишки – глутаміновий (Q-петля) і гістаміновий (H-петля).

Таким чином, K<sub>АТФ</sub>-канал є складним комплексом, що містить 96 переважно трансмембранних доменів і 12 нуклеотид-зв'язуючих регуляторних зон. Інгібування каналу за допомогою АТФ відбувається на комплексі Kir6.x, а активація каналу за допомогою MgАТФ та АДФ на комплексі SUR [26, 28, 53].

## 1.2. Протекторні властивості K<sub>АТФ</sub>-каналів

K<sub>АТФ</sub>-канали є високочутливими до рівнів [АТФ] і молекулярними структурами, що регулюють потенціал-залежні мембранні функції [7, 8, 54, 59]. Зважаючи на їх виняткову роль в синхронизації метаболізму та трансмембранної електричної активності слід зазначити, що їх дисфункція підвищує сприйнятливості людей до цілого ряду небезпечних для життя захворювань [7, 60-62].

Зокрема, ці канали підтримують електричну стабільність нейронів

(особливо за ішемічного та епілептичного інсульту), де вони не лише зменшують електричну збудливість, пригнічуючи постсинаптичну деполяризацію, що була індукована звільненням збуджуючих нейротрансмітерів, зокрема, глутамату та аспартату (які виділяються за гіпоксії при деполяризації нейронів), а також завдяки зменшенню цитозольного кальцію, при цьому попереджують ушкодження нейронів [63-65]. Крім того, відкриття вищезазначених калієвих каналів інгібує індукований окисним стресом апоптоз нейронів [66] та захищає нейрони і судинні ендотеліальні клітини від  $\beta$ -амілоїдної токсичності, яка є головною нейропатологічною рисою хвороби Альцгеймера і старіння [67]. Відомо, що порушення реполяризації мембран нейронів сприяє генерації судом та розладів руху. Водночас відкриття  $K_{ATP}$ -каналів призводить до гіперполяризації мембрани нейронів та зменшення їх збудливості, що попереджує епілептичні напади [65].

Фармакологічні активатори цих каналів також зменшують втомлюваність скелетних м'язів та покращують їх роботу при гіпокаліємічному паралічі [68]. Стимуляція  $K_{ATP}$ -каналів може мати знеболюючий ефект, що опосередковується вивільненням ендорфінів, енкефалінів та активацією опіоїдних рецепторів [69, 70]. Синтетичні активатори можуть посилювати анальгетичну дію наркотичних препаратів [71] та попереджувати синдром відміни морфіну [72]. Отже, активатори цих каналів можна використовувати в терапевтичних цілях як анальгетики при хронічних больових синдромах замість наркотичних знеболювальних засобів та при лікуванні наркозалежності.

Значну роль ці канали відіграють в попередженні порушень гормонального гомеостазу [73, 74].

У пульмонології стимуляцію  $K_{ATP}$ -каналів можна застосовувати для зняття бронхоспазму та покращення вентиляції легень при астмі, хронічному обструктивному бронхіті та у хворих на ГРДС [15, 75]. Водночас ГРДС часто супроводжує COVID-19, а люди з супутньою патологією легень відносяться до групи ризику [12]. Позитивний ефект активації цих каналів полягає не лише в зменшенні гіперактивності м'язової стінки бронхів, а також у зниженні

збудливості нейронів та зменшенні утворення слизу секреторними клітинами у відповідь на алергени та інші подразники [76].

В урології фармакологічна активація цих каналів може бути застосована при гіперактивності сечовидільної системи [77] та еректильній дисфункції нейрогенної та судинної етіології [78], для нефропротекції [79]. За відкриття вищезазначених каналів відбувається гіперполяризація мембран ГМК та, як наслідок, їх розслаблення та заповнення печеристих тіл [79, 80].

У дерматології синтетичні активатори вищезазначених каналів, завдяки їх властивості посилювати кровопостачання волосяних фолікул, застосовують для відновлення нормального росту волосся [81].

При ішемії активація  $K_{AT\Phi}$ -каналів має потужну антиоксидантну [82, 83] та протизапальну дію – пригнічує утворення лейкотриєнів [84, 85], які є одними з найбільш потужних хемоатрактантів для нейтрофілів, неконтрольоване накопичення яких в легенях при COVID-19 збільшує їх ураження [86]. Слід зазначити, що ці канали пригнічують утворення надлишкового NO індукцибельною NO-синтазою [87], який значно збільшується в легенях при ГРДС і вважається патологічним чинником [86]. З огляду на ряд повідомлень про згущення крові при COVID-19 позитивною дією  $K_{AT\Phi}$ -каналів можна вважати зменшення утворення при ішемії тромбоксану  $TxB_2$  [85, 87]. Таким чином, активація  $K_{AT\Phi}$ -каналів може зменшувати клітинні енергозатрати при поліорганній гіпоксії та ішемії, в т.ч. при COVID-19 [3], може попереджувати дисфункцію органів та значно полегшувати перебіг захворювання.

Проте особливу роль  $K_{AT\Phi}$ -канали мають у серцево-судинній системі, адже реалізують взаємозв'язок енергоресурсу серця (вмістом АТФ), його електричної та скоротливої функцій та регулюють судинний тонус. Зниження вмісту АТФ є характерним для таких загальнопатологічних станів, як ішемія і гіпоксія міокарда – найбільш поширених причин гострих порушень діяльності серця. Водночас  $K_{AT\Phi}$ -канал, що миттєво реагує на зниження АТФ чи співвідношення вмісту АТФ/АДФ вважають одним із головних ендогенних механізмів захисту від ішемії [5, 6]. Зокрема, такі ключові природні механізми

кардіопротекції, як ішемічне прекодиціювання (ІПК) та посткодиціювання опосередковуються активністю цих каналів [40, 88, 89]. Помірне їх відкривання попереджує та скасовує вже існуючі аритмії різної етіології, а саме атріальні та шлуночкові зміни ритму ішемічної та реперфузійної природи [90-92], індуковані порушеннями процесів реполяризації, депполяризації та автоматії аритмії [90, 93, 94], синдромом з вродженою чи набутою пролонгацією QT-періоду [95, 96], синдромом Бругада [90]. Незначна стимуляція  $K_{ATФ}$ -каналів знімає фібриляції, тахікардію та катехоламініндуковані аритмії шлуночків [90, 96, 97]. При метаболічних порушеннях міокарда вона стабілізує мембранний потенціал спокою, пригнічує патологічну міжклітинну сигналізацію і ектопічну пейсмейкерну активність [93].

Фармакологічні активатори  $K_{ATФ}$ -каналів зменшують зону інфаркту міокарда, попереджують ішемічну хворобу та серцеву недостатність, ремодилування та гіпертрофію шлуночків серця [98-102]. Завдяки пригніченню метаболізму, їх активація може значно покращувати збереження донорського серця за глобальної ішемії при трансплантації [103, 104]. Значний кардіопротекторний ефект спостерігається при коронарних синдромах, церебральних вазоспазмах, легеневій та артеріальній гіпертензії, патології периферичних судин [92, 105-108]. Така потужна протекторна дія активаторів  $K_{ATФ}$ -каналів є наслідком не тільки коронаролітичного ефекту, але і зниження пост- і переднавантаження на серце внаслідок дії на резистивні і венозні судини [109].

Важливість  $K_{ATФ}$ -каналів як захисного механізму при патологічних змінах в енергетичному забезпеченні міокарда підкреслює їх щільність на плазматичній мембрані кардіоміоцита. Якщо щільність  $K_{ATФ}$ -каналів на плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин (ГМК) сечовода і сечового міхура становить близько 160 і 425 каналів відповідно або 1 канал на 39  $\mu\text{m}^2$  клітини сечовода [110, 111], то на плазматичній мембрані ГМК артерій їх розташовано близько 300-700 (десь 0,1-1 канал на 10  $\mu\text{m}^2$  артерії) [112, 113] і близько 330 на ГМК легеневої та 350-700 на коронарних артерій [112, 114-117].

На міоцитах комірної вени – 200-600 каналів [118, 119]. Водночас на плазматичній мембрані кардіоміоцитів розташовано на порядок більше цих каналів – близько 3000 на кардіоміоцит або 1-10 каналів на  $10 \text{ мкм}^2$  поверхні кардіоміоцита [4, 52]. Така значна щільність  $K_{\text{ATФ}}$ -каналів у кардіоміоцитах порівняно з іншими клітинами свідчить про їх важливість для міокарда.

У кардіопротекції виділяють  $K_{\text{ATФ}}$ -канали сарколемальних (сарко- $K_{\text{ATФ}}$ ) і мітохондріальних (міто- $K_{\text{ATФ}}$ ) мембран. Ступінь антиішемічного захисту міокарда залежить від типу активованих каналів: плазматичної і мітохондріальної мембран кардіоміоцитів, ГМК та ендотеліальних судинних клітин. Слід зауважити, що індуковані активацією сарко- $K_{\text{ATФ}}$  і міто- $K_{\text{ATФ}}$ -каналів механізми протекції примножуються, а через низку внутрішньоклітинних месенджерів, зокрема, протеїнкінази та активні форми кисню (АФК), можуть взаємодіяти [120, 121].

### **1.2.1. Кардіопротекторні ефекти активації сарко- $K_{\text{ATФ}}$ -каналів**

Суть антиішемічного захисту активації  $K_{\text{ATФ}}$ -каналів плазматичної мембрани полягає в тому, що звичайно закриті при нормальному внутрішньоклітинному вмісту АТФ, при його зниженні (гіпоксія, ішемія міокарда) вони відкриваються [4]. Це зміщує потенціал мембрани в бік гіперполяризації, зменшує тривалість потенціалу дії кардіоміоцитів, під час якого  $\text{Ca}^{2+}$  надходить в клітину, зокрема через  $\text{Ca}^{2+}$ -канали L-типу та, відповідно, знижує внутрішньоклітинну концентрацію кальцію (рис. 1.3), який є одним із головних вторинних посередників численних метаболічних реакцій і активатором багатьох ферментів [28, 122]. Це, по-перше, повинно гальмувати метаболічні процеси в клітині і зменшувати її потреби в кисні та призводити до економії енергетичних матеріалів, що дуже важливо у разі дефіциту кровопостачання серця. По-друге, гальмування входу кальцію в клітину повинно зменшувати активність ферментів, зокрема, з одного боку, може попереджати деградацію фосфоліпідів мембран фосфоліпазами

(мембраностабілізуюча дія) [123, 124], з іншого – зменшувати утворення патогенних в умовах ішемії міокарда ейкозаноїдів, зокрема – лейкотрієнів [123-125].

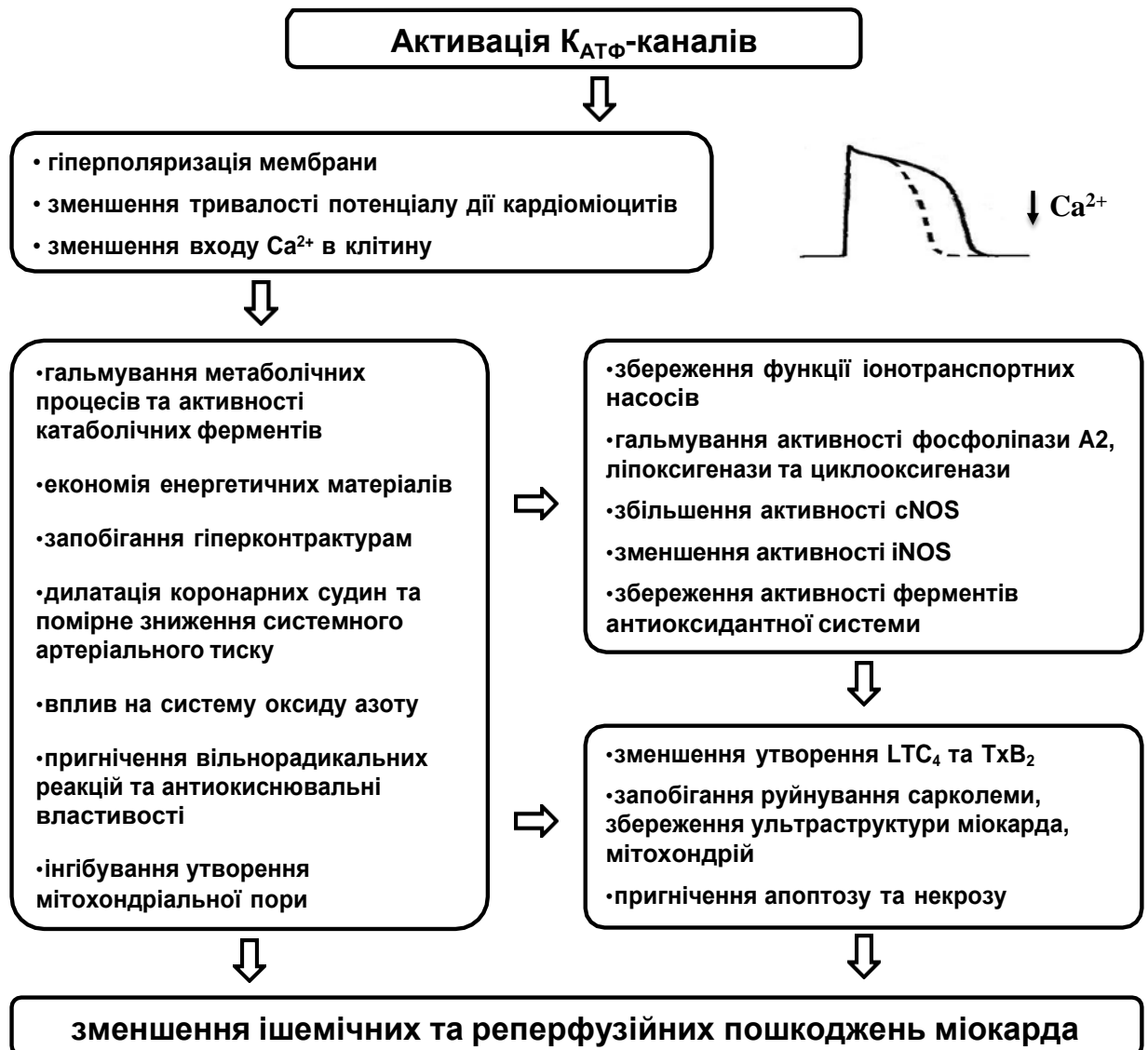


Рис. 1.3 Основні кардіопротекторні механізми активації K<sub>ATP</sub>-каналів за ішемії-реперфузії міокарда; cNOS та iNOS – конституційна і індукційна NO-синтази відповідно; LTC<sub>4</sub> та TxB<sub>2</sub> – лейкотрієн C<sub>4</sub> і тромбоксан B<sub>2</sub> відповідно [11].

По-третє, активація сарко-K<sub>ATP</sub>-каналів міоцитів та ендотеліоцитів коронарних судин розширює їх, що збільшує приток крові, кисню та

енергоресурсів до міокарда та попереджує реперфузійні вазоконстрикції в ішемізованому міокарді [126-129]. Тобто зумовлює краще кровопостачання міокарда. По-четверте, активація цих каналів попереджує перенавантаження кардіоміоцитів іонами кальцію і, відповідно, запобігає контрактурам міофібрил, які приводять до некротичних пошкоджень міокарда [28, 130]. Протекторним також можна вважати помірне зниження артеріального тиску, що послаблює навантаження на уражене ішемізоване серце, попередження реперфузійного підвищення загального периферичного опору, та відносно збереження показників скоротливості міокарда в період реперфузії [126, 127, 131].

### 1.2.2. Кардіопротекторні ефекти активації міто- $K_{ATP}$ -каналів

Один із важливих механізмів антиішемічного захисту міокарда при активації міто- $K_{ATP}$ -каналів полягає в зменшенні входу в мітохондрію кальцію та попередження її перенавантаження цим іоном (рис. 1.4) [107, 132, 133-135]. Саме відкривання цих каналів супроводжується входом кальцію в матрикс, деполяризацією внутрішньої мітохондріальної мембрани (зменшення її потенціалу) [134] та інгібуванням потенціалзалежного кальцієвого уніпортера. Це попереджує надмірне накопичення кальцію в мітохондрії [136], посилює її резистентність до цього іона [134, 137] та сприяє збереженню функції мітохондрій за ішемії-реперфузії серця.

Надмірне збільшення в матриксі мітохондрії  $Ca^{2+}$  та вільних радикалів при ішемії та, особливо, під час реперфузії ішемізованого міокарда призводить до підвищення проникності їх мембран і утворення мітохондріальної транспортної пори високої провідності. Збільшення цієї проникності, по-перше, спричинює порушення окисного фосфорилування та зменшення синтезу АТФ, по-друге – вихід з мітохондрій проапоптотичних сполук (зокрема, цитохрому *c*), які через каскад каспаз запускають апоптоз [138]. Стимуляція міто- $K_{ATP}$ -каналів пригнічує утворення АФК [139], запобігає відкриванню мітохондріальної пори [137, 138], апоптозу і некрозу [8, 132, 140].

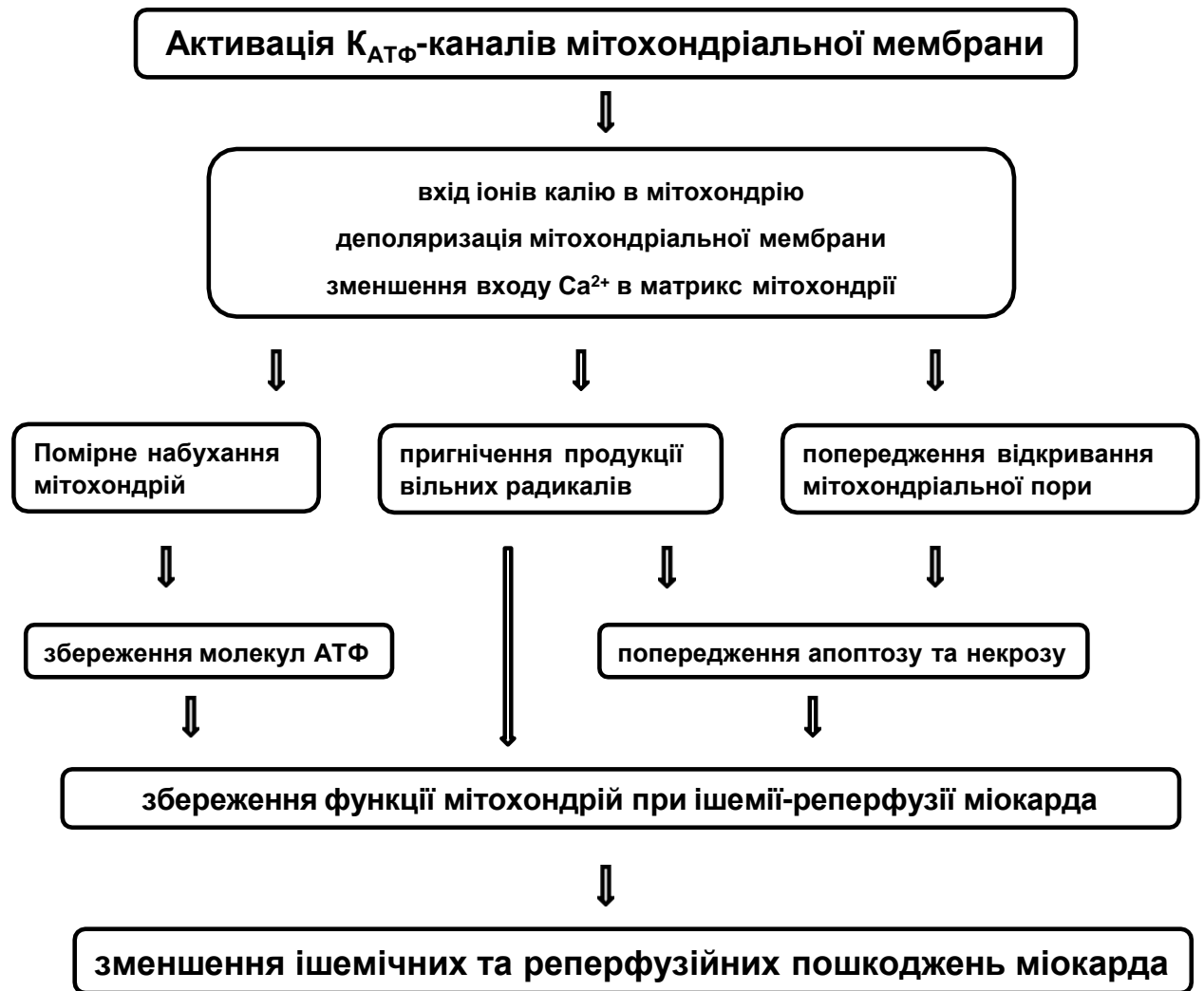


Рис. 1.4 Можливі кардіопротекторні механізми при активації  $K_{ATP}$ -каналів внутрішньої мітохондріальної мембрани [11]

Активация вищезгаданих каналів спричиняє помірне набухання мітохондрій, що попереджує розпад АТФ [133, 141], стимулює дихання і зниження потенціалу на НАД-залежних субстратах [133, 142, 143]. Вхід у мітохондрію іонів калію при відкритті цих каналів супроводжується входом неорганічного фосфату і води (що призводить до помірного осмотичного набухання матриксу мітохондрій), змінами процесів дихання та фосфорилування, алкалізацією мітохондрій [139, 144]. Причиною алкалозу

матриксу є збереження загальної електронейтральності транспорту іонів – вхід  $K^+$  компенсується виходом  $H^+$ , концентрація яких у матриксі мітохондрій зменшується, а рН збільшується. Проте частково цей процес компенсується активацію  $K^+/H^+$ -обмінника [144]. Кардіопротекторна роль помірного набухання ймовірно зумовлена збереженням за ішемії контактних сайтів між зовнішньою та внутрішньою мембранами в оптимальній орієнтації для входу АДФ у матрикс мітохондрії та збереженням взаємодії транспортних систем [141]. Транспорт нуклеотидів у матрикс мітохондрії через потенціалзалежний аніонний канал зовнішньої мембрани, міжмембранний простір (Mi-CK) та розташовані на внутрішній мембрані АДФ/АТФ-транслокази. Водночас змінюється енергетичне перенесення фосфату та пригнічується використання АТФ [145].

### **1.2.3. Вплив активації $K_{ATP}$ -каналів на вміст АТФ при ішемії-реперфузії**

Одним із потужних захисних антиішемічних кардіопротекторних механізмів відкриття  $K_{ATP}$ -каналів є пригнічення витрат АТФ та його накопичення в кардіоміоцитах [8, 146], що супроводжується збереженням роботи іонних насосів та репаративних процесів при ішемії-реперфузії [147]. Проте якщо механізми, що зменшують споживання високоенергетичних фосфатів за відкриття сарко- $K_{ATP}$ -каналів, не викликають сумнівів, то питання про процеси, що підтримують високий вміст АТФ при ішемії за активації міто- $K_{ATP}$ -каналів є досить дискусійними. Відомо, що стимуляція цих каналів мітохондріальної мембрани пригнічує гідроліз АТФ та підвищує його вміст при ішемії [135]. Ішемічне та фармакологічне (за допомогою пінацидилу та діазоксиду) прекодиціонування збільшувало вміст АТФ та креатинфосфату [146, 148]. Подібне підвищення було отримане при дії флокаліну в експериментах з гострим порушенням мозкового кровообігу [149]. У разі реперфузії в одних дослідженнях синтез АТФ не змінювався [145], в інших ІПК

забезпечувало швидкий ресинтез АТФ та креатинфосфату [147]. Отже, ймовірно, що адаптація мітохондрій до гіпоксичних умов при активації  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів робить ці органели стійкішими і більш резистентними до ішемії, що дає їм змогу швидко відновлювати вміст високоенергетичних фосфатів у клітині під час реперфузії [147, 150]. Виділені з прекодиціонованого міокарда мітохондрії, на відміну від органел з інтактного серця, є більш толерантними до патогенної дії високих доз кальцію [137, 147, 150]. Потужне навантаження мітохондрій цим іоном за ішемії-реперфузії є одним із ключових механізмів пошкодження кардіоміоцитів [134], тому поява резистентності мітохондрій до кальцієвого навантаження за активації  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів може відігравати важливу роль в механізмах адаптації міокарда до ішемії [137, 147]. Водночас при умовах, що є близькими до фізіологічних, фармакологічна стимуляція цих каналів діазоксидом і флокаліном посилювала мітохондріальне дихання та зменшувала спряження окисного фосфорилування, тобто синтез АТФ [122, 123, 151]. В інших експериментах діазоксид практично не змінював ні вміст креатинфосфату, ні АТФ [152]. Разом з цим активатор  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів пінацидил за різних умов експерименту або підвищував вміст АТФ, або не впливав на концентрацію цих макроергів [152, 153]. Стимуляція вищезгаданих каналів бімакалімом зменшувала, а хронічна гіпоксія посилювала синтез АТФ у мітохондріях серця кроликів [151]. Ймовірно, що в разі зменшення синтезу АТФ, відкриття міто- $K_{\text{АТФ}}$ -каналів може стимулювати транспорт електронів у дихальному ланцюзі і збільшувати окиснення жирних кислот [134].

Позитивним при активації  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів за ішемії-реперфузії вірогідно є пригнічення активності ферменту ксантинооксидази, про що може свідчити зменшення вмісту сечової кислоти і неорганічного фосфату [123, 124, 128]. Це попереджує повний розпад АТФ і ГТФ, при якому відбувається деградація пуринових основ (гіпоксантину і ксантину) і втрачається можливість ресинтезу цих молекул.

Таким чином, досі залишається до кінця не вивченою роль змін у синтезі АТФ за кардіопротекторної дії ішемічного та фармакологічного

прекондиціювання. Проте беззаперечно, що активація  $K_{AT\Phi}$ -каналів підвищує стійкість мітохондрій до ішемії, забезпечує збереження їх функції, зменшує витрати АТФ та швидко відновлює його вміст під час реперфузії [151].

#### **1.2.4. Потужний вплив активації $K_{AT\Phi}$ -каналів на систему оксиду азоту**

Кардіопротекторні механізми стимуляції  $K_{AT\Phi}$ -каналів можуть полягати в збереженні на високому рівні протекторного конститутивного синтезу оксиду азота та, навпаки, пригніченні надлишкового індукбельного та реутилізаційного синтезу NO і гальмування деградації L-аргініну аргіназою [123, 124] (див. рис. 1, справа). Першому може сприяти індуковане відкриванням цих каналів підвищення вмісту сфінгозину [154], однією з функцій якого є  $Ca^{2+}$ -незалежна активація конститутивної NO-синтази через збільшення активності протеїнкінази PKB/Akt [155].

Слід зауважити, що зменшення активності нітратредуктаз, як і збільшення вмісту нітрит-аніона може свідчити про збільшення оксигенації та потужну антиішемічну дію активації цих каналів. Адже реутилізаційний синтез NO відбувається винятково в умовах ішемії, а нітрит-аніон утворюється при окисненні оксиду азоту лише в оксигенованих розчинах [123, 124].

#### **1.2.5. Вплив активації $K_{AT\Phi}$ -каналів на вільнорадикальні процеси та антиоксидантну систему**

Потужним механізмом кардіопротекторної дії активації  $K_{AT\Phi}$ -каналів при ішемії-реперфузії є пригнічення окисного метаболізму за рахунок гальмування генерації активних форм кисню і азоту, та попередження зниження активності ключових ферментів антиоксидантної системи – каталази та супероксиддисмутази [128, 154]. Зменшення стрімкої генерації вільних радикалів при ішемії-реперфузії міокарда при відкриванні міто- $K_{AT\Phi}$ -каналів, можливо, є наслідком зниження вмісту  $Ca^{2+}$  в матриксі мітохондрій та

пригнічення активності ферментів циклу трикарбонових кислот [156].

Про обмеження оксидативного стресу при активації  $K_{ATФ}$ -каналів при ішемії-реперфузії свідчать зменшення вмісту пероксиду водню і продуктів перекисного окиснення (ПОЛ) – дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду [123, 124, 128]. Пригнічення утворення малонового діальдегіду (кінцевий продукт ПОЛ) свідчить, що стимуляція цих каналів може чинити не лише антиоксидантну, але і антирадикальну дію, укорочуючи (обриваючи) ланцюги реакції ПОЛ.

Про обмеження нітрозативного стресу та пригнічення генерації пероксинітриту у разі активації цих каналів при ішемії-реперфузії міокарда може вказувати практично незмінний вміст нітрат-аніона (утворюється при розпаді пероксинітриту нерадикальним шляхом) [123, 128]. При активації  $K_{ATФ}$ -каналів за ішемії-реперфузії разом із попередженням надмірної генерації індубельного та реутилізаційного синтезу оксиду азоту пригнічується також утворення супероксид-аніона, який при взаємодії з оксидом азоту якраз формує пероксинітрит. Про зниження генерації супероксид-аніона за активації цих каналів може свідчити попередження стрімкого зростання при ішемії-реперфузії вмісту ейкозаноїдів, що утворюються паралельно із супероксидним радикалом його ліпідними генераторами – ліпоксигеназою і циклооксигеназою, та практично незмінний вміст сечової кислоти і неорганічного фосфату, що вказує на зменшення генерації супероксид-аніона ксантинооксидазою [123, 124, 128, 154].

Позитивним при активації  $K_{ATФ}$ -каналів також можна вважати попередження значного утворення вже вищезгаданої сечової кислоти та сечовини, які у високих концентраціях є токсичними, а у низьких – антиоксидантами [123, 124].

### **1.2.6. Мембранопротекція та активність катаболічних ферментів**

Важливим показником антиішемічного захисту активації  $K_{ATФ}$ -каналів

при ішемії-реперфузії міокарда є попередження стрімкого наростання вмісту вільної арахідонової кислоти та її похідних – лейкотрієнів і тромбоксанів [123, 124, 154]. Зниження вмісту арахідонової кислоти при активації цих каналів може свідчити про пригнічення активності фосфоліпази  $A_2$  та зменшення деградації мембранних фосфоліпідів при ішемії-реперфузії, і таким чином, мембранопротекцію. Ці мембраностабілізуючі ефекти активації  $K_{ATФ}$ -каналів були підтверджені за допомогою електронно-мікроскопічних досліджень [130]. Стимуляція згаданих каналів при ішемії-реперфузії міокарда сприяла збереженню цілісності сарколеми, структури внутрішньоклітинних органел, зменшувала контрактири міофіламентів, значною мірою попереджувала деструкцію мітохондрій [130].

Попередження значного утворення патогенних при ішемії лейкотрієнів і тромбоксанів (зокрема,  $LTC_4$  та  $TXB_2$ ), які можуть мати коронарострикторну, проаритмічну та прооксидантну дію, є ще одним потужним кардіопротекторним механізмом активації  $K_{ATФ}$ -каналів [123, 124]. Це також може свідчити про зменшення активності ліпоксигенази та циклооксигенази (див. рис. 1, справа). До позитивної дії вищезазначених каналів при ішемії-реперфузії міокарда слід віднести також посилення гемоксигеназної реакції [123, 124], оскільки відомо про нейро- і кардіопротекторні ефекти її кінцевого продукту – монооксиду вуглецю [157].

### **1.2.7. Узагальнення кардіопротекторних ефектів активації $K_{ATФ}$ -каналів**

Таким чином, зниження внутрішньоклітинного вмісту АТФ (зокрема при гіпоксії чи ішемії) призводить до швидкого відкривання  $K_{ATФ}$ -каналів та розвитку протекторних і компенсаторних реакцій, в основі яких лежать гальмівні процеси, що реалізуються судинною системою та безпосередньо міокардом (зміни у цитоплазмі кардіоміоцитів та міжклітинному просторі). Перша, через гіперполяризацію мембрани ГМК коронарних судин призводить

до їх розширення, посиленого кровотоку та забезпечення міокарда енергетичними ресурсами і киснем. Друга, через економний режим роботи та пригнічення метаболічних процесів призводить до заощадження клітинних енергоресурсів. Енергодефіцит міокарда призводить до відкривання двох типів вище зазначених каналів – плазматичної та мітохондріальної мембран. Внаслідок гіперполяризації першої (та зменшення ТПД) та депольаризації другої відбувається зменшення входу іонів кальцію як в цитоплазму клітини, так і в матрикс мітохондрій. Що по-перше, попереджує патологічне за ішемії-реперфузії навантаження як цитоплазми клітин, так і матриксу мітохондрій кальцієм, по-друге – гальмує метаболічні процеси (пригнічується активність  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних ферментів). Наслідком чого є зниження активності міокарда – який переходить в економний режим роботи з меншими витратами АТФ, зменшення пошкоджень міокарда та збереження функції серця (в т.ч. структури та функції мітохондрій, як основних енергогенеруючих одиниць кардіоміоцитів) при ішемії та, особливо, під час реперфузії ішемізованого серця. До позитивних змін кардіогемодинаміки при активації  $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналів слід віднести помірне зниження артеріального тиску (що послаблює навантаження на уражене ішемізоване серце і сприяє збереженню серцевого викиду в перші години ішемії), попередження реперфузійного підвищення опору коронарних судин та загального периферичного опору та відносно збереження показників скоротливості міокарда в період реперфузії. Кардіопротекторні ефекти активації  $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналів при ішемії-реперфузії також полягають в пригніченні надлишкового індуцибельного та реутилізаційного та, навпаки, підвищенні протективного конститутивного синтезу оксиду азоту, генерації сфінгозину і монооксиду вуглецю, пригніченні деградації L-аргініну аргіназою. Важливим захисним механізмом активації  $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналів при ішемії є мембранопротекція, збереження цілісності сарколеми та структури клітинних органел (в т.ч. мітохондрій), зменшення контрактури міофіламентів, попередження утворення мітохондріальної пори, пригнічення апоптозу та некрозу кардіоміоцитів, зменшення розпаду АТФ та попередження утворення патогенних за ішемії

лейкотриєнів і тромбоксанів. Важливим антиішемічним механізмом активації  $K_{ATP}$ -каналів є гальмування утворення вільних радикалів та збереження на високому рівні активності ферментів антиоксидантної системи – каталази і супероксиддисмутази.

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### **2.1. Експериментальні тварини**

Дослідження проведено на дорослих (6-8 міс, маса тіла 200-250 г) та старих (22-24 міс, маса тіла 350-450 г) щурах-самцях лінії Вістар. Тварини перебували в стандартних умовах утримання та на раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України з вільним доступом до їжі та води. Усі експериментальні процедури проводились з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986) та Директиви ЄС 2010/63/EU «Стосовно захисту тварин, що використовуються у наукових цілях». Протоколи експериментів були затверджені Комітетом з біомедичної етики Інституту фізіології імені Богомольця НАН України (дозвіл №1/13 від 15.03.2017 та №2/21 від 16.06.2021).

Тварин було поділено на три групи: I (контрольна) – дорослі щури (6 міс), II – старі щури (22-24 міс), III – дорослі щури, яким вводили розведений у дистильованій воді піридоксаль-5-фосфат per os у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів, IV – старі щури, яким вводили вірогідний індуктор експресії генів, що кодуєть  $K_{ATP}$ -канали.

#### **2.2. Метод визначення експресії мРНК Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 субодиниць $K_{ATP}$ -каналів.**

Для дослідження експресії генів здійснювали забір верхівки серця і виділяли тотальну РНК за допомогою реагента TRIZOL («Sigma», США) згідно з інструкцією виробника. Концентрацію загальної РНК визначали за

допомогою NanoDrop спектрофотометра ND1000 (NanoDrop Technologies Inc., США). Зворотну транскрипцію або синтез комплементарної до РНК молекули ДНК проводили за допомогою набору RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва). Отриману одноланцюгову ДНК використовували для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі для ампліфікації фрагментів генів Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 із застосуванням флуоресцентного барвника SYBR-Green та наступних праймерів: прямий 5'-TCT CTT CTC CAT CGA GGT TCA-3' та зворотний 5'-CTG CAG AAT CAA AAC CGT GAT-3' для Kir6.1; прямий 5'-ATG AGAGAA AGG GGG ACA AGA-3' та зворотний 5'-AGG CTG GAG TCA AGG GTA GAG-3' для Kir 6.2; прямий 5'-GGG CTT CTG GTG ATC CTC TAC-3' та зворотній 5'-GGC TTT ACT TCC CTT GGT GTC-3' для SUR1; прямий 5'-GCT CTG GAA ATT GCT CAG TTG-3' та зворотний 5'-CTG TCC AAC GCT GAA GTT CTC-3' для SUR2. Для контролю за якістю виділення РНК та порівняння інтенсивності експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 паралельно ампліфікували фрагмент гена β-актину – одного із house-keeping-генів з використанням таких праймерів: прямий 5'-AAG TCC CTC ACC CTC CCA AAA-3' та зворотний 5'-AAG CAA TGC TGT SAC CTT CCC-3'. Ампліфікація складалася з циклів: денатурація – 95°C, 20 с, приєднання праймерів – 95°C, 3 с і елонгація 60 ° С протягом 30 с (45 циклів) з використанням 7500 Fast Real-Time PCR («Applied Biosystems»). Аналіз результатів проводили з 7500 Fast Real-Time PCR Software. Розраховували відносний рівень експресії мРНК Kir до актину.

### **2.3. Дослідження показників скорочувальної функції ізольованого серця щурів за ішемії-реперфузії**

Для індукції ішемії-реперфузії у серці старих щурів застосовували модель перфузії коронарних судин ізольованого серця методом Лангендорфа [159]. Після декапітації та розтину грудної порожнини серце швидко вилучали і одразу поміщали в охолоджений (5°C) розчин Кребса-Хензелейта до повної

його зупинки. Серця приєднували до апарату (рис. 2.1), в якому перфузія коронарних судин здійснювалася через аорту. Для перфузії застосовували розчин Кребса-Хензелейта з постійним тиском 75-80 мм.рт.ст., який містив (ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO<sub>4</sub> – 1,2; NaHCO<sub>3</sub> – 24; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; глюкоза – 10; CaCl<sub>2</sub> – 2,5 (pH 7,4), та який аерували карбогеном (95% O<sub>2</sub> та 5% CO<sub>2</sub>). Розчин фільтрували за допомогою фільтру «Sinpore» (діаметр пори – 2,0 мкм) та насичували киснем за допомогою карбогену. За допомогою автоматичного термостата температуру системи підтримували на рівні 37<sup>0</sup>C з точністю до ±0,5<sup>0</sup>C. Перед початком експериментальних вимірювань кожному серцю давали стабілізуватися протягом 20 хв. Після періоду стабілізації серця піддавали 20-хвилинній тотальній ішемії через повне перекривання перфузійного потоку з подальшим періодом 40-хвилинної реперфузії у всіх групах. Зміну скоротливої діяльності та кінцевий діастолічний тиск визначали за змінами тиску в латексному балончику, який вводили в лівий шлуночок, а також за першою похідною тиску в лівому шлуночку – dp/dt. Реєстрацію здійснювали за допомогою тензометричного датчика 746 («Мінгограф – 82», «Eletma», Швеція) і реєстрували на комп'ютері за допомогою програмного забезпечення Global Lab. Швидкість коронарного потоку оцінювали як об'єм перфузійного розчину, який відтікав від серця за 1 хв. Інтенсивність скоротливої функції (ІСФ) розраховували як добуток P<sub>шл</sub> і частоти серцевих скорочень (ЧСС). Для розрахунку артеріо-венозної різниці вимірювали парціальний тиск кисню у пробах розчину, що притікав і відтікав від серця, за допомогою газоаналізатора BMS3Mk2 (Данія). Напруження кисню в буфері на вході в серце становило в середньому 400-450 мм рт. ст. Споживання кисню міокардом розраховували за методом Neely [160], враховуючи коронарний потік і суху масу серця, яка в середньому становила 0,212 г у дорослих і 0,237 г у старих тварин. Розраховували також кисневу вартість роботи міокарда як співвідношення споживання кисню до інтенсивності скоротливої функції.

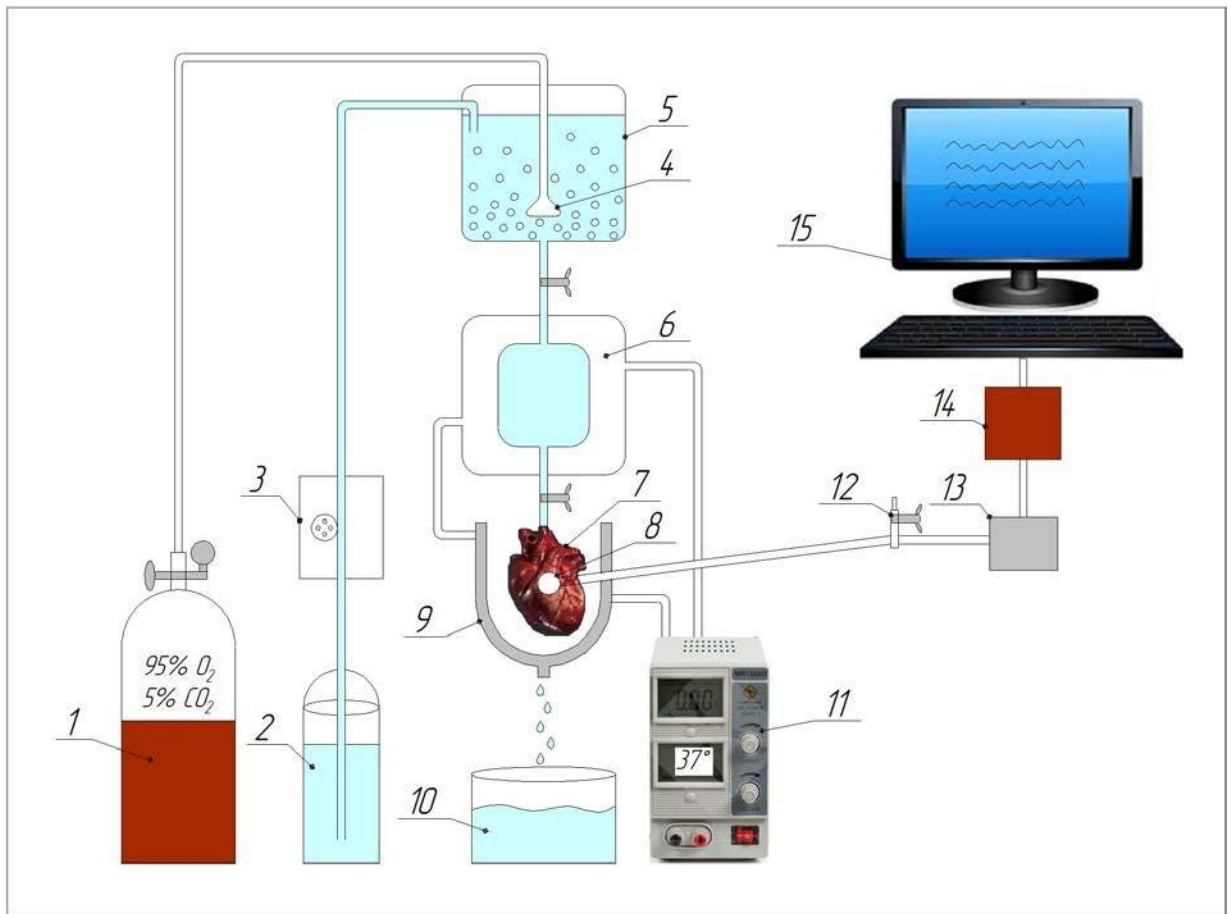


Рис. 2.1 Схема установки для перфузії ізолюваного серця за Лангендорфом при постійному тиску. 1 – балон з карбогеном; 2 – резервуар з розчином Кребса-Хейнзелейта; 3 – перистальтичний насос; 4 – розпилювач; 5 – резервуар з перфузійним розчином Кребса-Хейнзелейта, насиченим киснем; 6 – колба для обігріву перфузійного розчину та для стравлення газу; 7 – ізолюване серце; 8 – латексний балончик у лівому шлуночку; 9 – термостатована камера для обігріву серця; 10 – ємність з відпрацьованим розчином Кребса; 11 – термостат; 12 – шприц, що підтримує герметичність системи «балончик-тензодатчик»; 13 – тензодатчик; 14 – підсилювач; 15 – комп'ютер. Блакитним кольором відмічено розчин Кребса.

#### **2.4. Тензометричні вимірювання реакцій скорочення/розслаблення ізолюваних судинних смужок**

Досліди проведені на ізолюваних, перфузованих при температурі 37<sup>0</sup> С нормальним розчином Кребса, кільцевих смужках аорти дорослих і старих

щурів. Ізольовані судинні кільця мали діаметр 2 мм, ширину 1,5 мм. Усі тестування проводили в ізометричному режимі при початковій заданій напруженості, при якій вони генерували максимальну силу у відповідь на інфузію норадреналіну (10 мкмоль/л). Температуру розчину в експериментальній камері (37<sup>0</sup>С з точністю до ±0,5<sup>0</sup>С) підтримували за допомогою автоматичного термостату. Робочий розчин насичувався киснем за допомогою карбогену (газова суміш 95% O<sub>2</sub> і 5% CO<sub>2</sub>). Перед вимірюванням, препарати, закріплені в експериментальній камері, витримувалися протягом 60 хв у нормальному розчині Кребса такого складу (в ммоль/л): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; NaHCO<sub>3</sub> – 15,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; глюкоза – 11,5. Дослідження вазодилаторних ефектів відкривая K<sub>ATФ</sub>-каналів проводили на фоні підвищеного тонуусу препаратів аорти, яке отримували за допомогою норадреналіну (10 мкмоль/л). Цілісність судинного ендотелію визначали за наявністю ендотелій-залежних тестових реакцій на ацетилхолін (1 мкмоль/л).

Для відкривання K<sub>ATФ</sub> каналів використовували вітчизняний фармакологічний активатор K<sub>ATФ</sub> каналів флокалін в дозах від 0,1-100 мкмоль/л. Характер вазодилаторних реакцій судинних смужок визначали за допомогою специфічного інгібітора K<sub>ATФ</sub> каналів глібенкламід, який в дозі 100 мкмоль/л вводили в перфузійний розчин за 10 хвилин до дії флокаліну та продовжували перфузію протягом активації K<sub>ATФ</sub> каналів.

## 2.5. Статистичне оброблення результатів

Отримані результати обробляли математично за методом варіаційної статистики за допомогою комп'ютерних програм "Excel 2000", Origin 7.0 («Microcall Inc.», США) та статистичного програмного пакета IBM SPSS Statistics 22.0. Дані були виражені як середнє арифметичне значення ± стандартна похибка середнього (M ± m). Достовірність результатів визначали за критерієм t Стьюдента. Нормальність розподілу було перевірено тестом

Колмогорова-Смирнова. Рівність відмінностей між групами оцінювалася за допомогою тесту Левене. One-Way ANOVA (аналіз дисперсії) виконували, якщо спостерігалася гомоскедастичність. Тести Брауна-Форсайт та Велха були використані в разі гетероскедастичності. Тест Tukey HSD був використаний для мультимірних порівнянь. Статистичну обробку результатів експериментів по вивченню впливу глутатіону на функцію ізольованого серця проводили за допомогою Microsoft Excel. Для перевірки нормальності розподілу використовували критерій Шапіро–Уїлка. Для з'ясування наявності відмінностей використовували критерій Мана-Вітні. Значення  $P < 0,05$  розглядали як статистично достовірні.

РОЗДІЛ 3.  
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**3.1. Дослідження експресії генів KCNJ8, KCNJ11, ABCC8 та ABCC9 за дії піридоксаль-5-фосфату.**

Результати дослідження експресії мРНК субодиниць  $K_{ATP}$ -каналів Kir6.1, Kir6.2, SUR1 і SUR2 та її зміни при дії піридоксаль-5-фосфату представлені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1.

Експресія мРНК субодиниць Kir6.1, Kir6.2, SUR1 та SUR2  $K_{ATP}$ -каналів у міокарді дорослих і старих щурів, і старих щурів при дії піридоксаль-5-фосфату; ( $M \pm m$ ).

Субодиниці $K_{ATP}$ -каналів	Дорослі щури	Старі щури	Старі щури + піридоксаль-5-фосфат
Kir6.1	0,38 ± 0,11 (n=7)	0,45 ± 0,10 (n=11)	1,64 ± 0,70 * (n=8)
Kir6.2	5,42 ± 1,85 (n=7)	4,06 ± 1,09 (n=10)	2,97 ± 0,95 (n=8)
SUR1	5,66 ± 1,6 (n=6)	15,04 ± 6,26 (n=11)	7,41 ± 1,85 (n=8)
SUR2	25,44 ± 7,23 (n=6)	27,23 ± 3,79 (n=10)	64,8 ± 16,98 * (n=6)

Примітка: \* $P < 0.05$  порівняно зі старими щурами.

Вперше показано, що за умов введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам експресія пороутворюючих субодиниць  $K_{ATP}$ -каналів судинного типу значно Kir6.1 зросла у 3,64 рази ( $P < 0,05$ ) до  $1,64 \pm 0,70$  ум.од. Водночас пороутворюючі субодиниці  $K_{ATP}$ -каналів серцевого типу Kir6.2 достовірно не відрізнялися (рис. 3.1). При визначенні рівня експресії мРНК генів ABCC8 і ABCC9, що кодують SUR1- і SUR2-субодиниці  $K_{ATP}$ -каналу відповідно у серці

дорослих та старих щурів, достовірних відмінностей не виявлено (табл. 3.1), проте у старих щурів спостерігається тенденція до збільшення експресії регуляторної субодиниці мітохондріального типу SUR1(рис. 3.2).

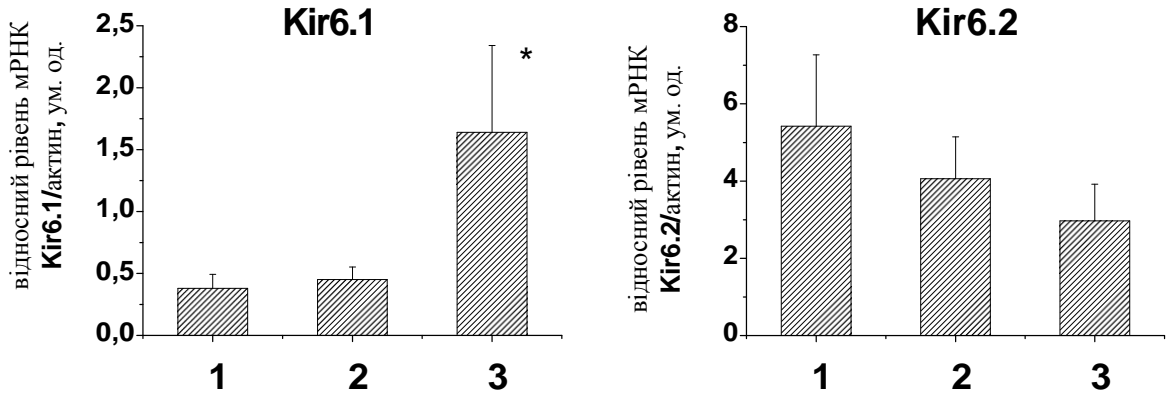


Рис. 3.1 Рівень експресії мРНК генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують Kir6.1- і Kir6.2-субодиниці АТФ-чутливих калієвих каналів відповідно у серці дорослих (1), старих (2) щурів та старих щурів після введення піридоксаль-5-фосфату (3). \* $P < 0,05$  відносно значень у старих щурів.

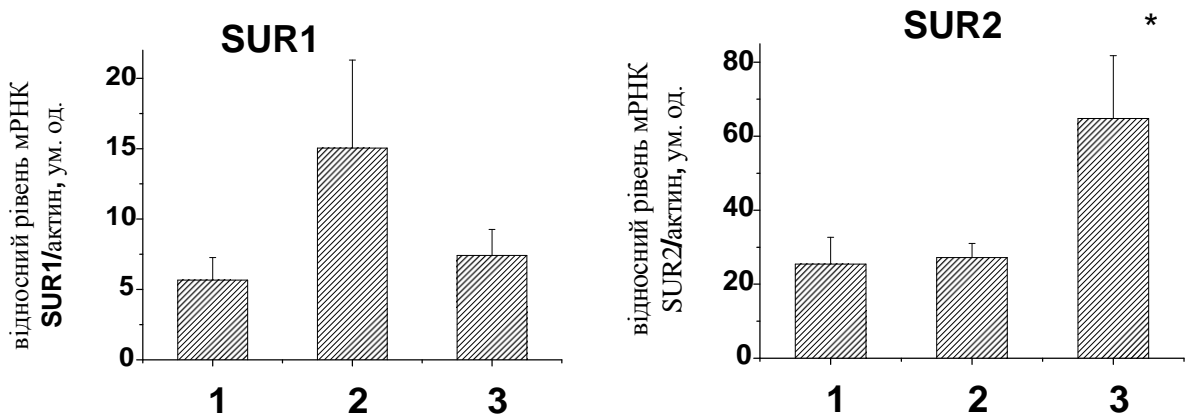


Рис. 3.2 Рівень експресії мРНК генів ABCC8 і ABCC9, що кодують SUR1- і SUR2- субодиниці АТФ-чутливих калієвих каналів відповідно у серці дорослих (1), старих (2) щурів та старих щурів після введення піридоксаль-5-фосфату (3). \* $P < 0,05$  відносно значень у старих щурів.

Водночас за умов введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам експресія регуляторної субодиниць  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів SUR2 була у 2,38 раза ( $P < 0,05$ )

вищою (див. рис. 3.2).

Як згадувалося в розділі 1,  $K_{ATФ}$ -канал має октаметричну структуру – пара каналу утворюється чотирма Kir6.x субодинацями, які зовні оточуються чотирма SUR субодинацями, а комбінація субодинаць Kir6.1 та Kir6.2, та рецепторів SUR1, SUR2A та SUR2B утворюють різні підтипи  $K_{ATФ}$ -каналів, які визначають їх властивості та відповідають певним тканинам організму. Зокрема, SUR2B/Kir6.1 переважно відповідає судинним гладенькомязовим клітинам, тоді як SUR2A/Kir6.2 кардіоміоцитам.

Результати дослідження зміни рівня експресії мРНК генів KCNJ8 і KCNJ11, що кодують субодинаці Kir6.1 і Kir6.2  $K_{ATФ}$ -каналу відповідно у серці дорослих щурів при введенні піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів представлені на рис. 3.3.

Показано, що введення піридоксаль-5-фосфату достовірно не змінювало експресію мРНК Kir6.1 і майже вдвічі ( $P < 0,05$ ,  $n=7$ ) підвищувало експресію мРНК Kir6.2, яка є кардіоспецифічною субодинацею  $K_{ATФ}$ -каналів.

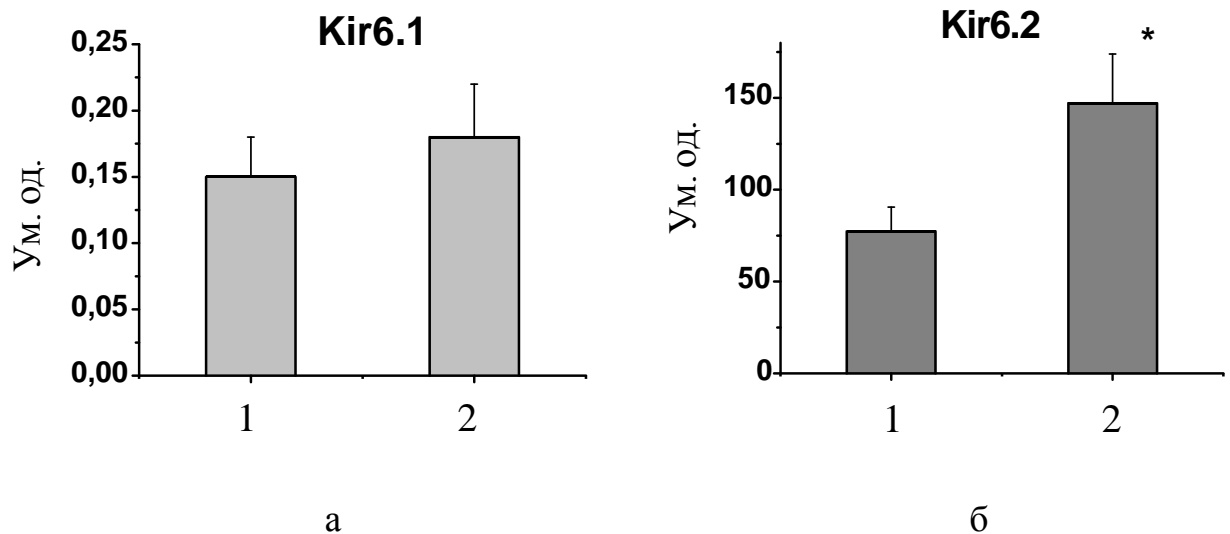


Рис. 3.3 Зміни рівня експресії мРНК генів KCNJ8 (а) і KCNJ11 (б), що кодують субодинаці Kir6.1 і Kir6.2  $K_{ATФ}$ -каналів відповідно у серці дорослих щурів, контроль (1), та після введення піридоксаль-5-фосфату (2). \* $P < 0,05$  відносно значень у дорослих щурів

При дослідженні впливу піридоксаль-5-фосфату на зміну рівня експресії мРНК генів *ABCC8* і *ABCC9*, що кодують *SUR1* і *SUR2* субодиниці  $K_{ATФ}$ -каналу відповідно, виявлено значне достовірне підвищення їх експресії при дії піридоксаль-5-фосфату (рис.3.4). А саме, збільшення експресії мРНК субодиниці *SUR1* (переважно  $K_{ATФ}$ -каналів мітохондріального типу) у 1,5 раза ( $P<0,05$ ,  $n=7$ ), та підвищення експресії мРНК субодиниці *SUR2* (переважно  $K_{ATФ}$ -каналів сарколемального типу судин та кардіоміоцитів) у 1,9 раза ( $P<0,05$ ,  $n=6$ ).

Таким чином, виявлено, що введення піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів дорослим шурам майже у двічі підвищувало експресію пороутворюючої *Kir6.2* та регуляторної *SUR2* субодиниць  $K_{ATФ}$ -каналів серцевого типу, що може мати важливе значення для підвищення стійкості серця до патологічних впливів ішемічної природи.

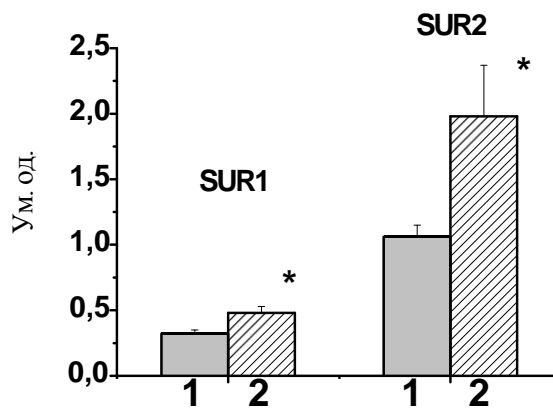


Рис. 3.4 Рівень експресії мРНК генів *ABCC8* і *ABCC9*, що кодують *SUR1* і *SUR2* субодиниці  $ATФ$ -чутливих калієвих каналів відповідно у серці дорослих щурів (1) та після введення піридоксаль-5-фосфату (2). \* $P<0,05$  відносно значень у дорослих щурів

Вперше показано, що введення піридоксаль-5-фосфату вищезгаданим методом призводить до достовірного у 1,5 раза підвищення рівня експресії мРНК регуляторної субодиниці *SUR1*  $K_{ATФ}$ -каналу мітохондріального типу, що

може мати важливе значення у підвищенні резистентності мітохондрій до дії патологічних чинників, та підвищувати загальну стійкість організму.

### **3.2. Дослідження реакцій скорочення/розслаблення ізольованих судинних смужок у тварин з підвищеною експресією $K_{ATP}$ -каналів**

За допомогою молекулярно-генетичних досліджень нами було встановлено, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів може змінювати експресію пороутворюючої субодиниці Kir6.1 ATP-чутливих калієвих каналів судинного типу, та регуляторних субодиниць SUR2 і SUR1  $K_{ATP}$  каналів сарколемальних та внутрішньої мітохондріальної мембрани  $K_{ATP}$  каналів. Зокрема, введення піридоксаль-5-фосфату дорослим щурам достовірно підвищує експресію мРНК генів ABCC8 і ABCC9, що кодують регуляторні SUR1 і SUR2 субодиниці  $K_{ATP}$  каналів відповідно (див. рис. 3.4).

Для відкриття  $K_{ATP}$  каналів використовували вітчизняний фармакологічний активатор  $K_{ATP}$  каналів флокалін в дозах від 0,1-100 мкмоль/л. Характер вазодилаторних реакцій судинних смужок визначали за допомогою специфічного інгібітора  $K_{ATP}$  каналів глібенкламіду, який в дозі 100 мкмоль/л вводили в перфузійний розчин за 10 хвилин до дії флокаліну та продовжували перфузію протягом активації  $K_{ATP}$  каналів.

Перфузія смужок грудної аорти дорослих та старих щурів фармакологічного активатором  $K_{ATP}$  каналів флокаліном в дозах від 0,1-100 мкмоль/л призводило до дозозалежних вазодилаторних реакцій препаратів судин. Достовірних відмінностей в амплітуді розслаблюючого ефекту флокаліну у дорослих і старих щурів не спостерідалося (рис. 3.5). Що цілком відповідає нашим даним про відсутність значних відхилень у значеннях експресії мРНК Kir6.1 субодиниць ATP-чутливих калієвих каналів судинного типу у дорослих щурів (рис. 3.5 б), та складала  $0,38 \pm 0,11$  в.од. та  $0,45 \pm 0,10$  в.од. у дорослих та старих щурів відповідно. Попередня (10 хвилин) та

продовжена під час дії флокаліну перфузія цих судинних препаратів специфічним інгібітором  $K_{ATP}$  каналів глібенкламідом в дозі 10 мкмоль/л повністю попереджувала вазодилаторні реакції, що може свідчити, що ці вазодилаторні реакції відбуваються внаслідок активації  $K_{ATP}$  каналів клітинних мембран.

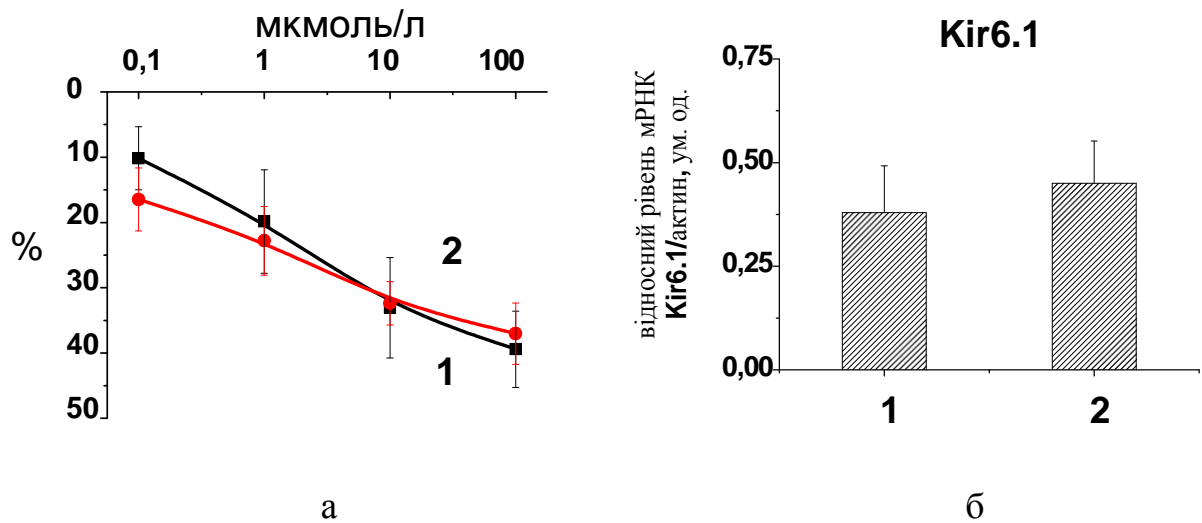


Рис. 3.5 Вазодилаторні реакції (а) препаратів аорти дорослих (1) та старих (2) щурів і рівень експресії (б) мРНК пороутворюючих Kir6.1 субодиниць  $K_{ATP}$  каналів судинного типу у дорослих (1) та старих (2) щурів.

Значних відмінностей в амплітуді вазодилаторних реакцій препаратів аорти контрольних дорослих щурів і дорослих тварин після введення піридоксаль-5-фосфату також не спостерігалось (рис. 3.6 а). Попередня (10 хвилин) та продовжена під час дії флокаліну перфузія цих судинних смужок специфічним інгібітором  $K_{ATP}$  каналів глібенкламідом в дозі 10 мкмоль/л повністю попереджувала вазодилаторні реакції, що може свідчити, що ці вазодилаторні реакції відбуваються внаслідок активації  $K_{ATP}$  каналів клітинних мембран.

Підвищення експресії мРНК регуляторних SUR1 і SUR2 субодиниць  $K_{ATP}$

каналів на введення піридоксаль-5-фосфату для підвищення вазодилаторних реакцій на активацію вищезазначених каналів виявилось замало, адже експресія мРНК пороутворюючої Kir6.1 субодиниці  $K_{ATP}$  каналів судинного типу у дорослих щурів за введення піридоксаль-5-фосфату практично не змінилася (рис. 3.6 б). Відомо, що цей мембранний канал складається з 4-х Kir6.1 і 4-х SUR2B субодиниць, і відсутність одного із цих компонентів внаслідок його низької експресії унеможливорює збільшення утворення каналів, і збільшення їх щільності на клітинній мембрані.

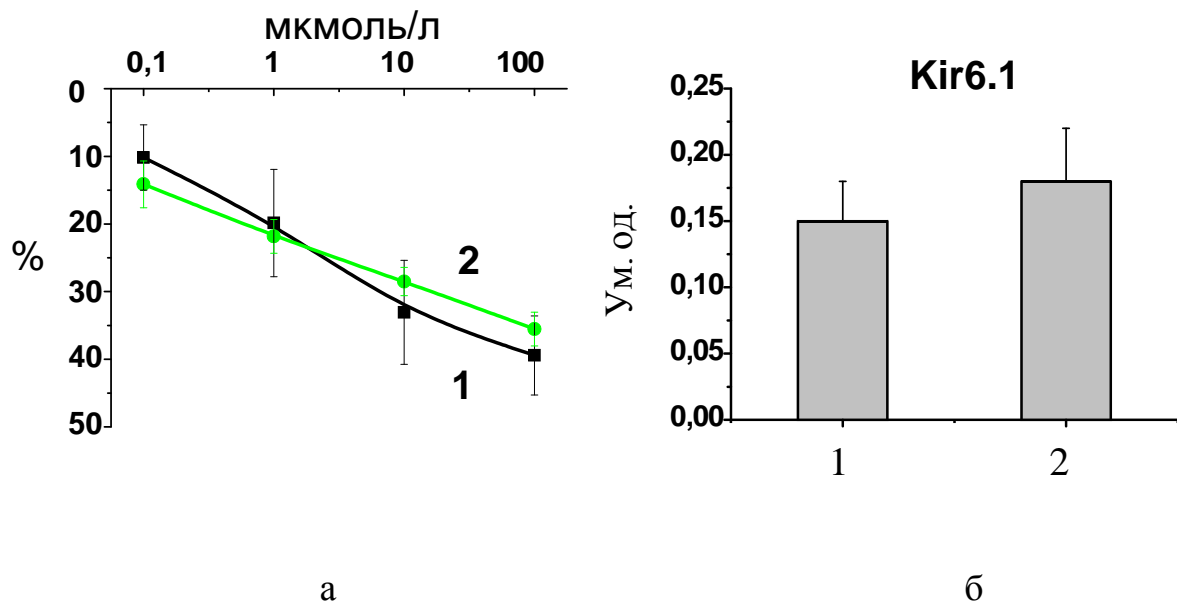


Рис. 3.6. Вазодилаторні реакції (а) препаратів аорти дорослих щурів до (1) і після (2) введення піридоксаль-5-фосфату і рівень експресії (б) мРНК пороутворюючих Kir6.1 субодиниць  $K_{ATP}$  каналів судинного типу до (1) і та після (2) введення піридоксаль-5-фосфату (2).

Водночас ведення піридоксаль-5-фосфату старим щурам достовірно підвищувало експресію мРНК гену KCNJ8 (у 3,4 раза), що кодує Kir6.1 субодиницю судинних  $K_{ATP}$  каналів (рис. 3.7 б), що значно підвищило

амплітуду вазодилататорних ефектів флокаліну (рис. 3.7 а), а саме на 93% ( $P<0,05$ ), на 73% ( $P<0,05$ ), на 23 та 26 % при дозах фармакологічного активатора  $K_{ATФ}$  каналів 0,1, 1, 10 та 100 мкмоль/л відповідно. Це може свідчити про підвищення мембранної щільності цих каналів, вірогідно завдяки посиленню експресії саме Kir6.1. Значне посилення амплітуди реакції при малих дозах активатора  $K_{ATФ}$  каналів та гальмування наростання амплітуди реакції за великих доз флокаліну (10 мкмоль/л і більше) може вказувати на якийсь обмежуючий фактор для утворення  $K_{ATФ}$  каналів у обох типах тварин, контрольних і з модифікованою експресією цих каналів. Вірогідно таким лімітуючим фактором є обмежена кількість SUR2В субодиниць, які у тварин експресуються з запасом, а зі збільшенням експресії Kir6.1 у модифікованих тварин цей запас вичерпується на утворення  $K_{ATФ}$  каналів.

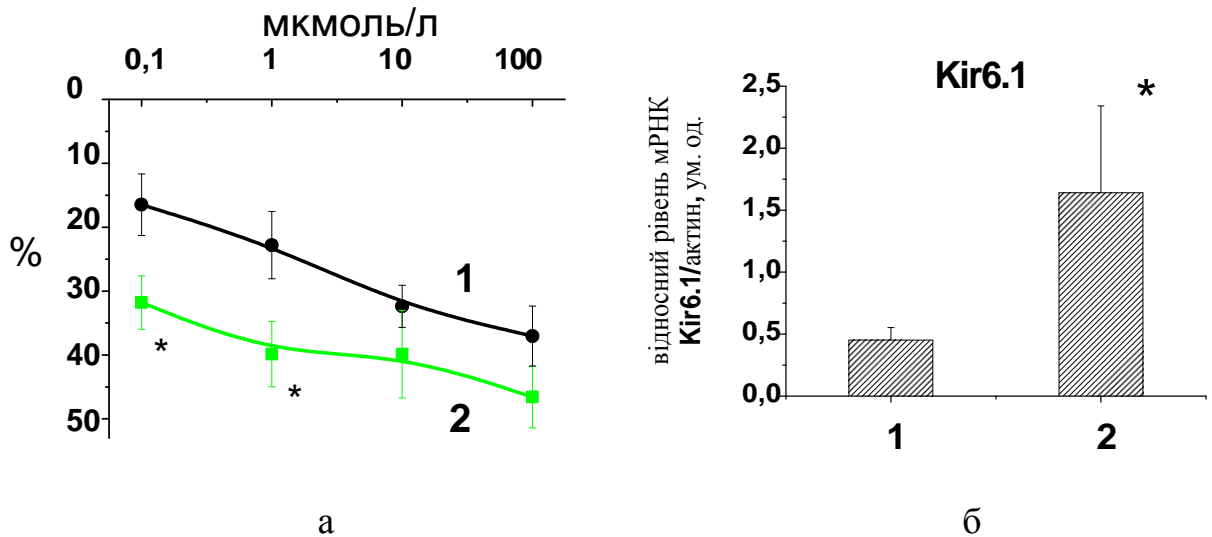


Рис. 3.7 Вазодилататорні реакції (а) препаратів аорти старих щурів до (1) і після (2) введення піридоксаль-5-фосфату і рівень експресії (б) мРНК пороутворюючих Kir6.1 субодиниць  $K_{ATФ}$  каналів судинного типу до (1) і та після (2) введення піридоксаль-5-фосфату (2). \* $P<0,05$  відносно значень у контрольних щурів

Таким чином, вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів старим щурам значно посилює амплітуду вазодилататорних реакцій препаратів аорти у відповідь на активацію  $K_{ATФ}$  каналів флокаліном в дозах від 0,1-100 мкмоль/л, що може свідчити про зростання утворення за даних умов  $K_{ATФ}$  каналів судинного типу (Kir6.1/ SUR2B), тобто про підвищення мембранної щільності цих каналів, та збігається з даними молекулярно-генетичних досліджень про підвищення у них у 3,4 раза ( $P < 0,05$ ) експресії мРНК гену KCNJ8, що кодує Kir6.1 пороутворюючі субодиниці судинних  $K_{ATФ}$  каналів, та зростання у 2,4 раза ( $P < 0,05$ ) експресії мРНК гену ABCC9, що кодує SUR2 регуляторні субодиниці  $K_{ATФ}$  каналів як судинного, так і серцевого типу.

### **3.3. Дослідження кардіопротекторних ефектів у тварин з підвищеною експресією $K_{ATФ}$ -каналів за дії піридоксаль-5-фосфату**

Як і в серії експериментів з глутатіоном, що описані вище, у скоротливій функції дорослих і старих тварин, про що свідчить достовірне збільшення систолічного тиску в лівому шлуночці (на 47,9%) і швидкості наростання тиску в лівому шлуночку (на 53,3%). Водночас на 40,5% у старих тварин збільшився коронарний потік та зменшилася ЧСС (табл. 3.2).

Загальновідомо, що 20-хвилинна тотальна ішемія серця та наступна його реперфузія призводять до розвитку суттєвих порушень кардіодинаміки та окисного метаболізму міокарда. Курсове введення PLP в наших дослідах запобігало розвитку значних ішемічно-реперфузійних порушень функції серця. Відновлення кардіодинаміки після 20 хвилин ішемії і протягом всієї реперфузії було значно кращим, ніж у старих щурів, яким не вводили PLP. Через 40 хвилин реперфузії показники відновлення функції ішемізованого серця також були значно вищими. Показано, що двотижневе введення старим щурам PLP сприяє кращому відновленню скорочувальної функції ішемізованого серця під час реперфузії (рис. 3.8-3.10).

Таблиця 3.2

Вихідні показники функціонального стану ізолюваного серця експериментальних щурів до і після введення піридоксаль-5-фосфату ( $M \pm m$ ).

	дорослі щури (n=11)	старі щури (n=11)	старі щури + PLP (n=11)
Тиск у лівому шлуночку, мм рт.ст.	98,8±5,1	146,16±8,2 ***	91,42±7,8 ###
Кінцевий діастолічний тиск, мм рт.ст.	4,98±0,9	4,86±1,0	4,28±1,3
dP/dt <sub>max</sub> , мм рт.ст./с	1807±116	2770±175 ***	1670±132 ###
dP/dt <sub>min</sub> , мм рт.ст./с	2109±130	2162±96	1466±123 ###
Коронарний потік, мл/хв	11,1±1,3	15,6±1,6*	12,3±0,7
Частота серцевих скорочень, уд/хв	306±14	226±16 **	210±15

Примітка: \*P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001 відносно значень у дорослих щурів; #P<0,05; ## P<0,01; ### P<0,001 відносно значень у старих щурів.

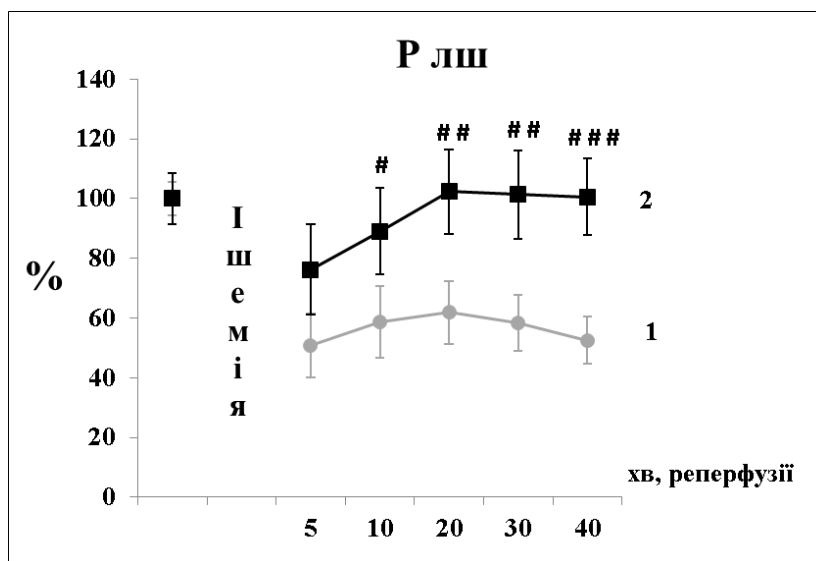


Рис. 3.8 Зміни тиску, що розвивається у лівому шлуночку під час реперфузії ішемізованого серця старих щурів в контролі (1) та при дії піридоксаль-5-фосфату (2). #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

Зокрема, відновлення тиску, що розвивається у лівому шлуночку на 5-й хвилині реперфузії становило 76 % порівняно з 50,7 % у тварин, яким не вводили PLP (див. рис. 3.8). Позитивна динаміка відновлення тиску спостерігалася до кінця експерименту і на 40-й хвилині реперфузії його величина становила 100,6% порівняно з 52,5% у контрольних щурів ( $P < 0,001$ ). Водночас кінцево-діастолічний тиск під час всього періоду реперфузії при впливі PLP був значно нижчим ніж в контролі і на 40-й хвилині реперфузії становив  $9,6 \pm 2,7$  мм рт.ст. порівняно з  $26,7 \pm 5,3$  мм рт.ст. у старих контрольних щурів ( $P < 0,05$ ) (див. рис. 3.9).

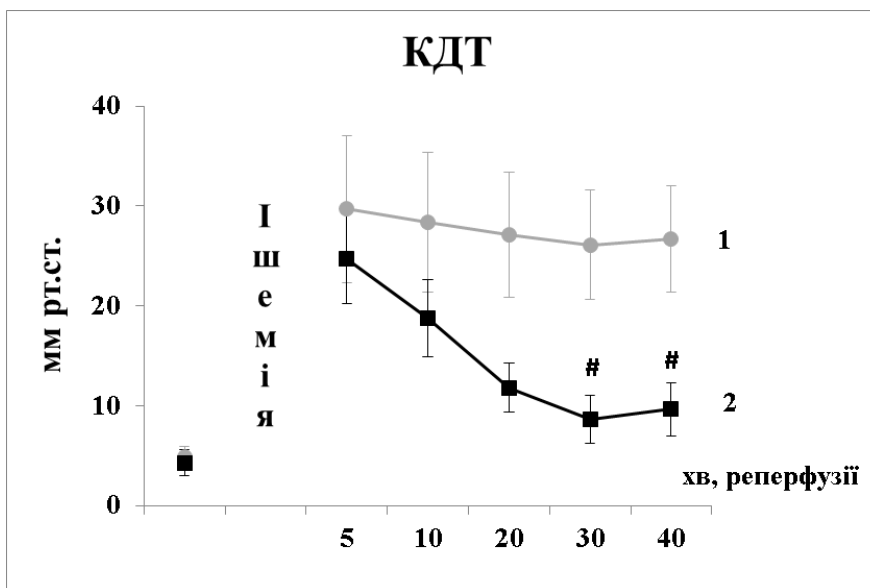


Рис. 3.9 Зміни кінцево-діастолічного тиску у лівому шлуночку під час реперфузії ішемізованого серця старих щурів в контролі (1) та при дії піридоксаль-5-фосфату (2). # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  статистично достовірні різниці відносно значень у контролі.

Показники швидкості скорочення та розслаблення міокарда в умовах курсового введення PLP також були значно кращими, ніж у контрольних тварин (див. рис. 3.10). Зокрема, швидкість наростання тиску у лівому

шлуночку, тобто швидкість скорочення міокарда ( $dP/dt_{max}$ ), після введення PLP значно зросла:  $107,9 \pm 13,1\%$  порівняно з  $54,7 \pm 8,4\%$  у контрольних старих щурів на 40-ій хвилині реперфузії (див. рис. 3.10). Швидкість зменшення тиску у лівому шлуночку, тобто швидкість розслаблення міокарда ( $dP/dt_{min}$ ), також була збільшена, що вказує на краще відновлення діастолічної функції міокарда:  $101,9\%$  відносно  $51,5\%$  у старих щурів (див. рис. 3.10).

Водночас, PLP збільшував величину коронарного потоку порівняно з контрольними старими щурами (рис. 3.11). Отже, введення PLP сприяло зменшенню ішемічно-реперфузійних порушень роботи серця, що справляло позитивний ефект на його функціонування.

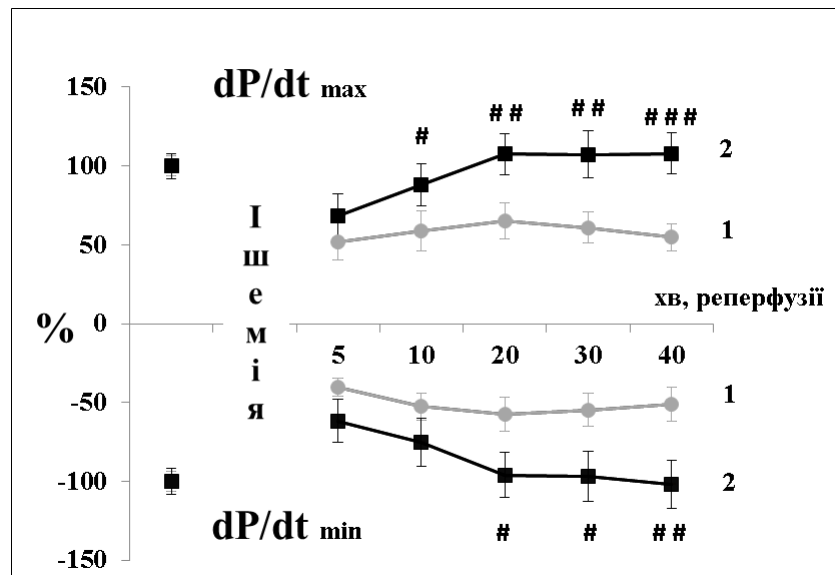


Рис. 3.10 Зміни швидкості скорочення ( $dP/dt_{max}$ ) та розслаблення міокарда ( $dP/dt_{min}$ ) під час реперфузії ішемізованого серця старих щурів в контролі (1) та при дії піридоксаль-5-фосфату (2).  $\#P<0,05$ ,  $\#\#P<0,01$ ,  $\#\#\#P<0,001$  статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

При ішемії-реперфузії серця відбувається перевантаження (overload) кардіоміоцитів іонами  $Ca^{2+}$ , а відновлення оксигенації під час реперфузії призводить до утворення великої кількості АФК/АФА та відкривання

мітохондріальної пори (МП) [196, 197]. Crompton M. та співавт. (1987) першими зафіксували МП, як критичну детермінанту смерті кардіоміоцитів в умовах гострої ішемії-реперфузії, показавши, що виснаження АТФ, перевантаження мітохондрій кальцієм, окисний стрес і високий вміст фосфатів були ключовими чинниками відкриття МП, яка інгібується CsA [198, 199]. Потім Griffiths E.J. та Halestrap A.P. (1995) зробили важливий висновок, що МП залишався закритою протягом ішемічного періоду і відкривався лише в перші 2-3 хв реперфузії [200]. Водночас активація  $K_{ATP}$ -каналів запобігає як перевантаженню кардіоміоцитів (та інших клітин) іонами  $Ca^{2+}$ , пригнічує утворення АФК/АФА та попереджує відкриття МП [11, 201].

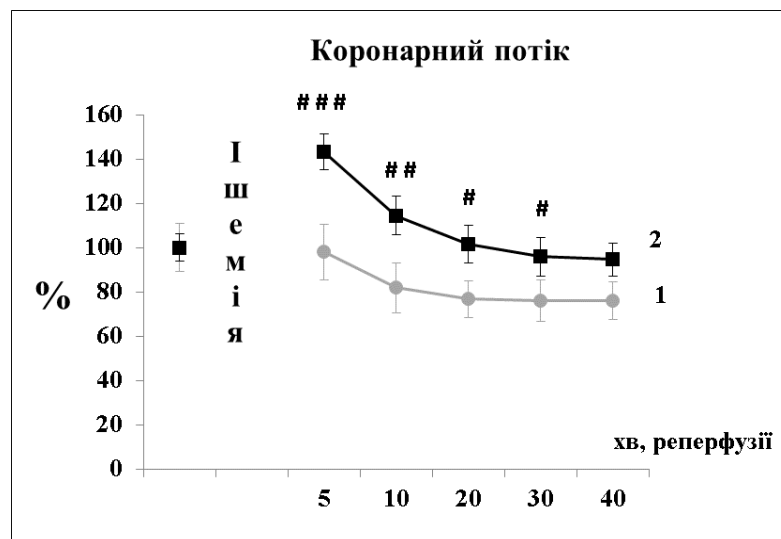


Рис. 3.11 Зміни коронарного потоку під час реперфузії ішемізованого серця старих щурів в контролі (1) та при дії піридоксаль-5-фосфату (2). <sup>#</sup> $P < 0,05$ , <sup>##</sup> $P < 0,01$ , <sup>###</sup> $P < 0,001$  статистично достовірні різниці відносно значень у контролі.

Для з'ясування внеску підвищеної експресії  $K_{ATP}$ -каналів клітинних мембран при курсовому введенні PLP в цих кардіопротекторних ефектах ми використовували специфічний блокатор  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламід. У результаті дії глібенкламід (15 мг/кг, одноразово, внутрішньочеревинно, за 20

хв до декапітації) на тлі курсового введення PLP тиск, що розвивається у лівому шлуночку знизився вдвічі порівняно з групою без введення глібенкламід. Цей результат спостерігався як до моделювання ішемії так і в період реперфузії (рис. 3.12). Кінцево-діастолічний тиск в цих експериментах достовірно не відрізнявся (рис. 3.13).

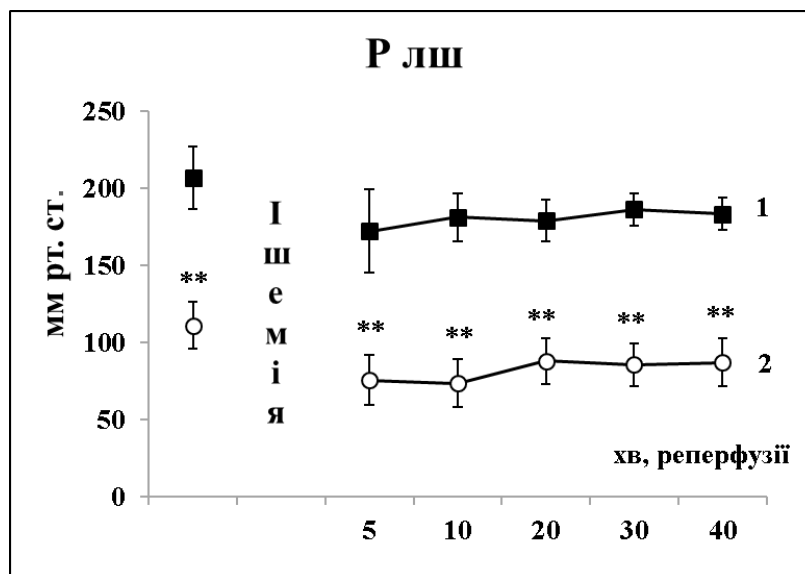


Рис. 3.12 Вплив інгібітора  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламід на зміну тиску, що розвивається у лівому шлуночку (а) та на кінцево-діастолічний тиск (б) при ішемії-реперфузії ізольованого серця щурів підданих дії піридоксаль-5-фосфату; де 1 – PLP (контроль), 2 – PLP + глібенкламід.  $**P < 0,01$  статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

Швидкість наростання тиску в лівому шлуночку та швидкість зниження тиску в лівому шлуночку при інгібуванні  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламідом також значно знизилися (рис. 3.14).

Як і очікувалося, глібенкламід значним чином знизив коронарний потік, що був збільшений під впливом 14-ти добового введення піридоксаль-5-фосфату (рис. 3.15).

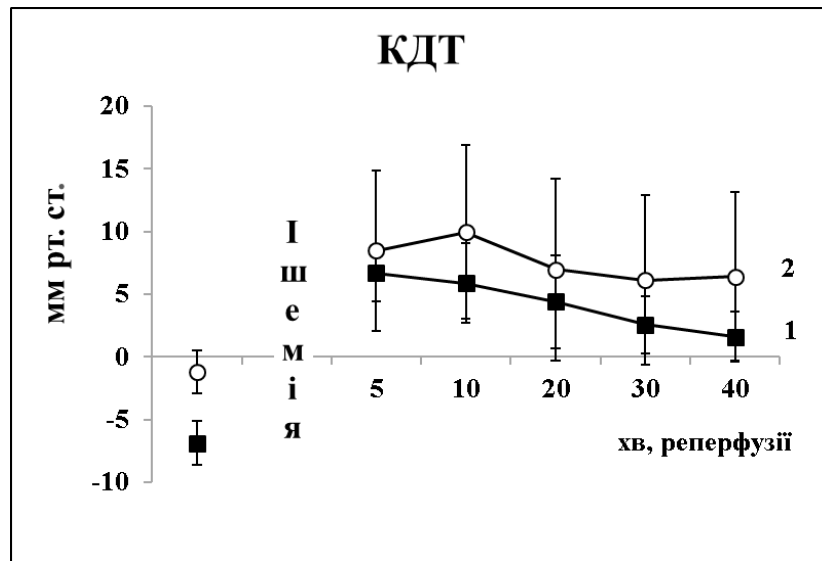


Рис. 3.13 Вплив інгібітора  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламід (2) на кінцево-діастолічний тиск при ішемії-реперфузії ізолюваного серця старих щурів підданих дії піридоксаль-5-фосфату; де 1 – PLP (контроль), 2 – PLP + глібенкламід контроль.

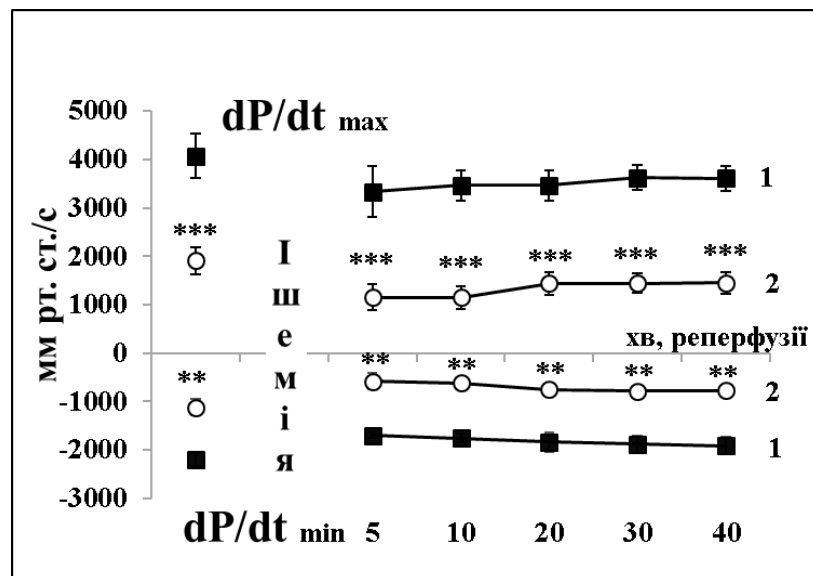


Рис. 3.14 Зміни швидкості скорочення ( $dP/dt_{max}$ ) та розслаблення міокарда ( $dP/dt_{min}$ ) під час реперфузії ішемізованого серця старих підданих дії піридоксаль-5-фосфату щурів без глібенкламід (1) і після введення інгібітора  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламід (2). \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  статистично достовірна різниця відносно значень у контролі (без дії глібенкламід).

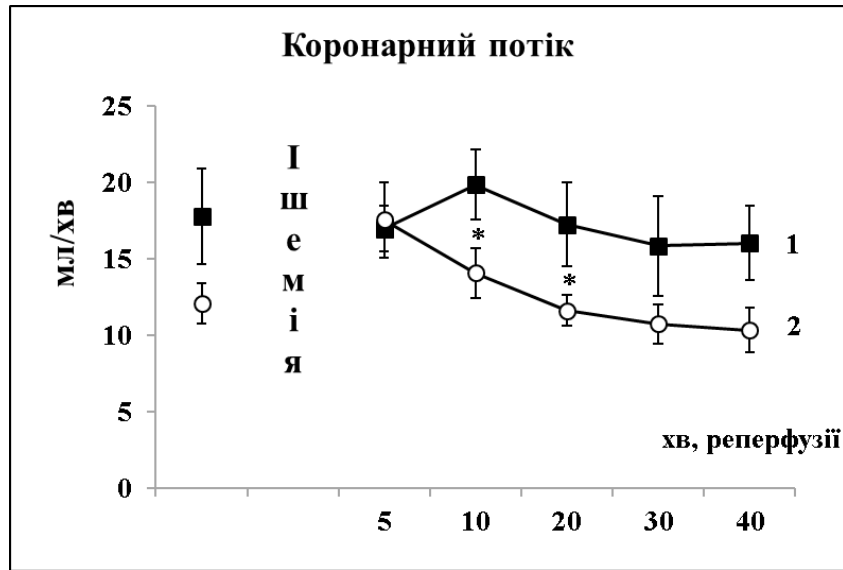


Рис. 3.15 Вплив інгібітора  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламіду на зміни коронарного потоку при ішемії-реперфузії ізолюваного серця старих щурів підданих дії піридоксаль-5-фосфату; де 1 – PLP (контроль), 2 – PLP + глібенкламід. \* $P < 0,05$  статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

Інтенсивність скоротливої функції серця під впливом глібенкламіду також знизилась в середньому в 2,5 раза на тлі курсового введення PLP (рис. 3.16).

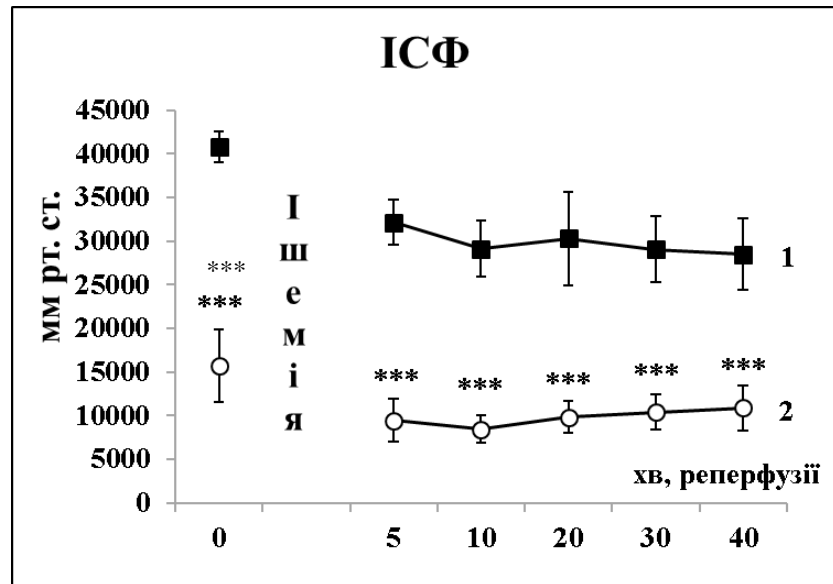


Рис. 3.16 Вплив інгібітора  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламіду на інтенсивність скоротливої функції серця при ішемії-реперфузії ізолюваного серця щурів

підданих дії піридоксаль-5-фосфату; де 1 – PLP (контроль), 2 – PLP + глібенкламід. \*\*\* $P < 0,001$  статистично достовірна різниця відносно значень у контролі.

Отже, значне зменшення кардіопротекторних ефектів двотижневого введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам при ішемії-реперфузії серця при застосуванні специфічного інгібітора  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламідом свідчить, що принаймні частково ці кардіопротекторні ефекти викликані активацією  $K_{ATP}$ -каналів. Що також підтверджує дані молекулярно-генетичних досліджень про збільшення експресії  $K_{ATP}$ -каналів при двотижневому введенні PLP старим щурам, що може бути однією з причин підвищення резистентності міокарда до ішемії. Введення піридоксаль-5-фосфату per os у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів значно покращувало відновлення ішемізованого серця під час реперфузії, зокрема підвищувало скоротливу діяльність та коронарний потік. Значне зменшення кардіопротекторних ефектів піридоксаль-5-фосфату глібенкламідом свідчить, що принаймні частково ці захисні ефекти викликані активацією  $K_{ATP}$ -каналів.

Таким чином, було показано, що у тварин із збільшеною експресією Kir6.1 та SUR2 субодиниць  $K_{ATP}$ -каналів за допомогою піридоксаль-5-фосфату відновлення скоротливої діяльності та коронарного потоку під час реперфузії ішемізованого серця було значно кращим, ніж в контрольних тварин. А саме, тиск у лівому шлуночку на 5-ту хвилину реперфузії відновлювався на 50% краще ніж в контрольній групі тварин. На кінець реперфузії (40 хв) цей показник вже був майже вдвічі, а кінцево-діастолічний тиск майже втричі краще, ніж в контрольній групі. Пригнічення цих ефектів специфічним інгібітором  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламідом свідчить, що принаймні частково ці захисні ефекти викликані активацією  $K_{ATP}$ -каналів.

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено новий метод підвищення експресії АТФ-чутливих калієвих каналів клітинних мембран, за допомогою тензометричних експериментів на судинних смужках відповідно показано зростання ефектів через  $K_{ATP}$ -канали, що може свідчити про підвищення їх щільності на клітинних мембранах, результати експериментів з ішемією-реперфузією ізольованого серця щурів можуть свідчити про підвищення кардіозахисту у модифікованих тварин.
2. Вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату фосфату у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів дорослим щурам майже вдвічі підвищувало експресію мРНК пороутворюючої Kir6.2 та регуляторної SUR2 субодиниць кардіоспецифічних сарколемальних  $K_{ATP}$ -каналів серцевого типу, та у 1,5 раза експресію субодиниці SUR1  $K_{ATP}$ -каналів мітохондріального типу.
3. Вперше показано, що введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам підвищувало у 3,6 раза експресію пороутворюючої субодиниці Kir6.1  $K_{ATP}$ -каналів судинного типу та у 2,4 раза регуляторної SUR2 субодиниці сарколемальних  $K_{ATP}$ -каналів судинного і серцевого типу.
4. Вперше показано, що пероральне введення піридоксаль-5-фосфату старим щурам значно посилює амплітуду вазодилататорних реакцій кільцевих смужок аорти у відповідь на активацію  $K_{ATP}$ -каналів флокаліном у концентраціях від 0,1-100 мкмоль/л, з максимальним ефектом майже вдвічі, що може свідчити про зростання утворення за даних умов  $K_{ATP}$ -каналів судинного типу (Kir6.1/SUR2B), тобто про підвищення мембранної щільності цих каналів, та збігається з нашими результатами молекулярно-генетичних досліджень про зростання у них експресії пороутворюючих Kir6.1 субодиниць судинних  $K_{ATP}$ -каналів

та SUR2 регуляторних субодиниць  $K_{ATP}$ -каналів як судинного, так і серцевого типу.

5. В експериментах з ішемією-реперфузією ізольованого серця щурів вивчено кардіопротекторні ефекти у тварин з підвищеною експресією  $K_{ATP}$  каналів. Вперше показано, що у тварин із збільшеною експресією Kir6.1 та SUR2 субодиниць  $K_{ATP}$ -каналів за допомогою піридоксаль-5-фосфату відновлення скоротливої діяльності та коронарного потоку під час реперфузії ішемізованого серця було значно кращим, ніж в контрольних тварин. Зокрема, тиск у лівому шлуночку на 5-ту хвилину реперфузії відновлювався на 50% краще, ніж в контрольній групі тварин. На кінець реперфузії (40 хв) цей показник вже був майже вдвічі, а кінцево-діастолічний тиск майже втричі краще, ніж в контрольній групі. Пригнічення цих ефектів специфічним інгібітором  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламідом свідчить, що принаймні частково ці захисні ефекти викликані активацією  $K_{ATP}$ -каналів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Горбась І.М. Фактори ризику серцево-судинних захворювань: поширеність і контроль. Медичний портал «здоровя України». Опубліковано 28.03.2015. Режим доступу: [www.health-ua.com](http://www.health-ua.com)
2. Дудник С. Серцево-судинні захворювання в Україні: прогнози — невтішні. Медична газета «Ваше здоров'я», Кардіологія. Опубліковано 09.01.2015. Режим доступу: [www.vz.kiev.ua](http://www.vz.kiev.ua).
3. Gong Feng, Kenneth I Zheng, Qin-Qin Yan, Rafael S Rios , Giovanni Targher , Christopher D Byrne, Sven Van Poucke, Wen-Yue Liu, Ming-Hua Zheng. COVID-19 and Liver Dysfunction: Current Insights and Emergent Therapeutic Strategies. *J Clin Transl Hepatol*. 2020 Mar 28;8(1):18-24.
4. Noma A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature*. 1983 Sep 8-14;305(5930):147-8.
5. Nichols CG. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature*. 2006; 440(7083): 470-6.
6. Ngo AT, Riemann M, Holstein-Rathlou NH, Torp-Pedersen C, Jensen LJ. Significance of K(ATP) channels, L-type Ca<sup>2+</sup> channels and CYP450<sub>1A</sub> enzymes in oxygen sensing in mouse cremaster muscle arterioles in vivo. *BMC Physiol*. 2013 May 12;13-8.
7. Olson TM, Terzic A. Human KATP channelopathies: diseases of metabolic homeostasis. *Pflugers Arch*. 2010 Jul;460(2):295-306.
8. Teshima Y, Akao M, Li RA, Chong TH, Baumgartner WA, Johnston MV, Marbán E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress. *Stroke*. 2003 Jul;34(7):1796-802.
9. Wickenden AD. Potassium channels as anti-epileptic drug targets. *Neuropharmacology*. 2002 Dec;43(7):1055-60.
10. Harel S, Cohen AS, Hussain K, Flanagan SE, Schlade-Bartusiak K, Patel M, et al. Alternating hypoglycemia and hyperglycemia in a toddler with a

- homozygous p.R1419H ABCC8 mutation: an unusual clinical picture. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2015 Mar;28(3-4):345-51.
11. Strutynskiy RB. Protective properties of opening ATP-sensitive potassium channels. *Fiziol Zh.* 2019;65(3):74-86.
  12. Kochi AN, Tagliari AP, Forleo GB, Fassini GM, Tondo C. Cardiac and arrhythmic complications in patients with COVID-19. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2020 May;31(5):1003-8.
  13. Ranki HJ, Crawford RM, Budas GR, Jovanović A. Ageing is associated with decrease in number of sarcolemmal ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in a gender-dependent manner. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123:695-705.
  14. Crawford RM, Jovanović S, Budas GR, Davies AM, Lad H, Wenger RH, Robertson KA, Roy DJ, Ranki HJ, Jovanović A. Chronic mild hypoxia protects heart-derived H9c2 cells against acute hypoxia/reoxygenation by regulating expression of the SUR2A subunit of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem.* 2003; 278:31444-55.
  15. Du Q, Jovanović S, Clelland A, Sukhodub A, Budas G, Phelan K, Murray-Tait V, Malone L, Jovanović A. Overexpression of SUR2A generates a cardiac phenotype resistant to ischemia *FASEB J.* 2006; 20(8): 1131-41.
  16. Budas GR, Jovanović S, Crawford RM, Jovanović A. Hypoxia-induced preconditioning in adult stimulated cardiomyocytes is mediated by the opening and trafficking of sarcolemmal K<sub>ATP</sub> channels. *FASEB J.* 2004;18:1046-8.
  17. Ranki HJ, Budas GR, Crawford RM, Jovanović A. Gender-specific difference in cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:906-15.
  18. Shi W, Cui N, Wu Z, Yang Y, Zhang S, Gai H, Zhu D, Jiang C. Lipopolysaccharides up-regulate Kir6.1/SUR2B channel expression and enhance vascular K<sub>ATP</sub> channel activity via NF-kappaB-dependent signaling. *J Biol Chem.* 2010 Jan 29;285(5):3021-9.
  19. Zhao Y, Ge J, Li X, Guo Q, Zhu Y, Song J, Zhang L, Ding S, Yang X, Li R. Vasodilatory effect of formaldehyde via the NO/cGMP pathway and the

- regulation of expression of  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  and L-type  $Ca^{2+}$  channels. *Toxicol Lett.* 2019; Sep 15;312:55-64.
20. Sun Y, Huang Y, Zhang R, Chen Q, Chen J, Zong Y, Liu J, Feng S, Liu AD, Holmberg L, Liu D, Tang C, Du J, Jin H. Hydrogen sulfide upregulates  $K_{ATP}$  channel expression in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Med (Berl)*. 2015 Apr;93(4):439-55.
  21. Ashcroft FM, Gribble FM. Correlating structure and function in ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Trends Neurosci.* 1998 Jul;21(7):288-94.
  22. Carrasco AJ, Dzeja PP, Alekseev AE, Pucar D et al. Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc Acad Natl Sci USA.* 2001 Jun 19;98(13):7623-8.
  23. Crawford RM, Ranki HJ, Botting CH, Budas GR, Jovanovic A. Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive  $K^+$  channel in vivo. *FASEB J.* 2002 Jan;16(1):102-4.
  24. Russell M Crawford, Grant R Budas, Sofija Jovanović, Harri J Ranki, Timothy J Wilson, Anthony M Davies, Aleksandar Jovanović. M-LDH serves as a sarcolemmal  $K_{ATP}$  channel subunit essential for cell protection against ischemia. *EMBO J.* 2002 Aug 1;21(15):3936-48.
  25. Jovanović S, Du Q, Crawford RM, Budas GR, Stagljarić I, Jovanović A. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase serves as an accessory protein of the cardiac sarcolemmal  $K_{ATP}$  channel. *EMBO Rep.* 2005 Sep;6(9):848-52.
  26. de Araujo ED. and Kanelis V. Successful development and use of a thermodynamic stability screen for optimizing the yield of nucleotide binding domains. *Protein Expr Purif.* 2014;103:38-47.
  27. Zhou M, He HJ, Tanaka O, Zhouet M.al. Different localization of ATP sensitive  $K^+$  channel subunits in rat testis. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011 Apr;294(4):729-37.
  28. Nichols C.G.  $K_{ATP}$  channels and cardiovascular disease: suddenly a syndrome. Nichols CG<sup>1</sup>, Singh GK, Grange DK. *Circ Res.* 2013 Mar 29;112(7):1059-72.

29. Malester B, Tong X, Ghiu I, et al. Transgenic expression of a dominant negative KATP channel subunit in the mouse endothelium: effects on coronary flow and endothelin-1 secretion. *FASEB J* 2007;21:2162-72.
30. Katnik C, Adams DJ. Characterization of ATP-sensitive potassium channels in freshly dissociated rabbit aortic endothelial cells. *Am J Physiol.* 1997;272:H2507-H2511.
31. Mederos y Schnitzler M, Derst C, Daut J, Preisig-Muller R. ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. *J Physiol.* 2000;525 (Pt 2):307-17.
32. Miki T, Suzuki M., Shibasaki T. et al. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med.* 2002; 8 (5):466-72.
33. Morrissey A, Rosner E, Lanning J, et al. Immunolocalization of KATP channel subunits in mouse and rat cardiac myocytes and the coronary vasculature. *BMC Physiol* 2005;5:1.
34. Flagg TP, Kurata HT, Masia R, Caputa G, Magnuson MA, Lefer DJ, Coetzee WA, Nichols CG. Differential structure of atrial and ventricular KATP: atrial KATP channels require SUR1. *Circ Res.* 2008;103:1458-65.
35. Glukhov AV, Flagg TP, Fedorov VV, Efimov IR, Nichols CG. Differential K(ATP) channel pharmacology in intact mouse heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48 (1): 152-160.
36. Fedorov VV, Glukhov AV, Ambrosi CM, KostECKI G, Chang R, Janks D, Schuessler RB, Moazami N, Nichols CG, Efimov IR. Effects of KATP channel openers diazoxide and pinacidil in coronary-perfused atria and ventricles from failing and non-failing human hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51:215-25.
37. Han X, Light PE, Giles WR, French RJ. Identification and properties of an ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in rabbit sino-atrial node pacemaker cells. *J Physiol (Lond).* 1996; 490(2):337-50.
38. Fukuzaki K, Sato T, Miki T, Seino S, Nakaya H. Role of sarcolemmal ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the regulation of sinoatrial node automaticity: an evaluation using Kir6.2-deficient mice. *J Physiol (Lond).* 2008;586:2767-78.

39. Barsukevich V, Basalay M, Sanchez J, Mrochek A, Whittle J, Ackland GL, Gourine AV, Gourine A. Distinct cardioprotective mechanisms of immediate, early and delayed ischaemic postconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2015 Jan;110(1):452-62.
40. Hanley PJ, 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 Jul;39(1):17-50.
41. Penna C, Pasqua T, Perrelli MG, Pagliaro P, Cerra MC, Angelone T. Postconditioning with glucagon like peptide-2 reduces ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts: role of survival kinases and mitochondrial KATP channels. *Basic Res Cardiol*. 2012 Jul;107(4):272.
42. Rana A, Goyal N, Ahlawat A, Jamwal S, Reddy B, Sharma S. Mechanisms involved in attenuated cardio-protective role of ischemic preconditioning in metabolic disorders. *Perfusion*. 2015 Mar;30(2):94-105.
43. Liu Y, Ren G, O'Rourke B, Marbon E, Seharaseyon J. Pharmacological comparison of native mitochondrial K(ATP) channels with molecularly defined surface K(ATP) channels. *Mol Pharmacol*. 2001;59: 225-30.
44. Foster DB, Ho AS, Rucker JJ, Garlid AO, Chen L, Sidor A, Garlid KD, O'Rourke B. Mitochondrial ROMK Channel Is a Molecular Component of MitoKATP. *Circ Res*. 2012;111:446-54.
45. Ardehali H, O'Rourke B, Marb6n E. Cardioprotective role of the mitochondrial ATP-binding cassette protein 1. *Circ Res*. 2005;97: 740-42.
46. Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejna-Alvarez R, Marb6n E. Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:11880-5.
47. Quesada I, Rovira JM, Martin F, Roche E, Nadal A, Soria B. Nuclear KATP channels trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> transients that modulate nuclear function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:9544-9.
48. Salari S, Ghasemi M, Fahanik-Babaei J, Saghiri R, Sauve R, Eliassi A. Evidence for a KATP Channel in Rough Endoplasmic Reticulum (rerKATP Channel) of

- Rat Hepatocytes/ PLoS One. 2015;10 (5): e0125798.
49. Ozanne SE, Guest PC, Hutton JC, Hales CN. Intracellular localization and molecular heterogeneity of the sulphonylurea receptor in insulin-secreting cells. *Diabetologia*. 1995;38:277-82.
  50. Varadi A, Grant A, McCormack M, Nicolson T, Magistri M, Mitchell KJ, Halestrap AP, Yuan H, Schwappach B, Rutter GA. Intracellular ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse pancreatic  $\beta$  cells: against a role in organelle cation homeostasis. *Diabetologia*. 2006;49:1567-77.