

О.І. Войтичук, В.С. Асмолова, Н.М. Гула, Г.В. Соткіс, М. Оз, Я.М. Шуба

## Регуляція збудливості неонатальних кардіоміоцитів N-стеарилетаноламіном та N-олеїлетаноламіном

*N*-ацилетаноламіни (NAE) – це біологічно активні ліпіди, які здатні модулювати іонний транспорт через плазматичну мембрану клітин, однак сигнальні механізми та митені дії цих сполук у серцевій тканині вивчено недостатньо. Оскільки вплив представників NAE може деякою мірою визначатися ступенем їх ненасиченості в цій роботі ми дослідили вплив насиченого N-стеарилетаноламіну (NSE) та одноненасиченого N-олеїлетаноламіну (OEA) на електричну збудливість плазматичної мембрани неонатальних кардіоміоцитів щура. NSE та OEA в концентрації 1 мкмоль/л зменшували тривалість потенціалів дії (ПД) кардіоміоцитів зі всіх ділянок серцевого м'язу. Вкорочення ПД було частково зворотним, причому повернення до фізіологічного значення тривалості ПД після відмивання сполук було більшим для щуричкових ендокардіальних кардіоміоцитів порівняно із епікардіальними та передсердними кардіоміоцитами. 1 мкмоль/л NSE деполаризував потенціал спокою (ПС) епікардіальних і 65 % ендокардіальних клітин, тоді як решта кардіоміоцитів у відповідь на NSE зазнавала слабозворотної гіперполяризації. OEA в концентрації 1 мкмоль/л викликав зворотню гіперполяризацію ПС у всіх досліджуваних типах клітин. NSE та OEA знижували амплітуду та початкову швидкість наростання ПД, що свідчить про їх взаємодію з натрієвими каналами. NSE більшою та OEA меншою мірою також пригнічували амплітуду фази 1 (плато) ПД, що, ймовірно, пов'язано з блокуванням ними високопорогових кальцієвих каналів. Залежний від типу кардіоміоцитів вплив NSE і OEA на ПС та тривалість фази реполяризації (фази 3) ПД вказує на диференційовану регуляцію цими ліпідами підтипів калієвих каналів вхідного випрямлення  $K_{ir}$  та потенціалозалежних калієвих каналів затриманого випрямлення. Не виключений їх вплив також на аніонні канали, калієві канали струмів витоку та іонні транспортери плазматичної мембрани кардіоміоцитів. Загалом зміни показників ПД внаслідок дії NSE були менш зворотними, ніж після дії OEA, що свідчить про більш повільну деградацію/перетворення NSE в плазматичній мембрані порівняно з OEA.

**Ключові слова:** N-ацилетаноламін, N-стеарилетаноламін, N-олеїлетаноламін, неонатальні кардіоміоцити, потенціал дії, потенціал спокою, ендоканабіноїд.

### ВСТУП

Канабіноїди – це широкий клас біоактивних ліпідних сполук, до яких належать як психоактивна складова конопель *Cannabis sativa* тетрагідроканабінол (THC –  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol), так і ендогенні ліпіди та їх синтетичні аналоги з канабіноїдоподібною активністю. Серед них виділяють групу ендоканабіноїдоподібних молекул, що синтезуються в організмі та є N- та O-зв'язаними похідними жирних кислот. До ендоканабіноїдів умовно відносять декілька груп хімічно подібних речовин: первинні аміди

(наприклад, олеамід), N-ацилетаноламіни (наприклад, анандамід, N-олеїлетаноламін), N-ациламінокислоти, N-ацилдопаміни, 2-ацилгліцероли (наприклад, 2-арахідоноілгліцерол), 2-алкілгліцероли, O-ацилетаноламіни. Взаємодія різних ендоканабіноїдів, наявних у клітині, є складною як на рівні їх метаболізму, так і на рівні їх дії на численні ефектори.

Нині ідентифіковано декілька рецепторів ендоканабіноїдів. Найбільш дослідженими з них є канабіноїдні рецептори CB1 та CB2, що належать до надродини G-білокспряжених рецепторів (GPCR, від англ. G

© О.І. Войтичук, В.С. Асмолова, Н.М. Гула, Г.В. Соткіс, М. Оз, Я.М. Шуба

protein-coupled receptor) [24], через які ці сполуки впливають на низку внутрішньоклітинних ефекторів та іонних каналів, а також ядерні рецептори PPAR (від англ. peroxisome proliferator-activated receptor). Показано, що метаботропні рецептори GPR18, GPR55 і GPR119, хоч і не є в класичному розумінні канабіноїдними, але можуть опосередковувати фізіологічну дію цих сполук у мишей з нокаутом CB1 (CB1<sup>-/-</sup>) та CB2 (CB2<sup>-/-</sup>) рецепторів [3]. Ендоканабіноїди здатні також модулювати функцію багатьох інших мембранних рецепторів та іонних каналів або через безпосередню взаємодію з ними, або через зміну мікрокривизни ліпідного бішару мембрани. Так, до мішеней прямої дії ендоканабіноїдів належать іонотропні глутаматні NMDA [13], ГАМК<sub>A</sub> [6], гліцинові [6], 5-HT<sub>2</sub>, серотонінові [2] та  $\alpha$ 7-засновані нікотинові [26] рецептори, ванілоїдний рецептор TRPV1 з родини TRP (від англ. transient receptor potential) каналів [34]. Ендоканабіноїди безпосередньо взаємодіють також з кальцієвими [5, 7], натрієвими [18] та калієвими [35] іонними каналами.

До фізіологічних функцій ендоканабіноїдної системи належить регуляція збудливості клітин завдяки модуляції катіонних каналів або через G-білки, або через безпосереднє зв'язування з каналними комплексами. Так, ендоканабіноїди, діючи на CB1, зменшують вивільнення нейромедіатора в збудливих і гальмівних синапсах, інгібуючи потенціалзалежні кальцієві канали. Ця дія рецепторів CB1 через G<sub>i/o</sub> білки ефективна відносно багатьох згаданих каналів, включаючи N-типу в клітинах нейробластоми NG108-15 [21] і нейронах смугастого тіла мозку шурів [16], P/Q-типу в нейронах кори і мозочка шурів [13] та L-типу в артеріальних гладеньком'язових клітинах головного мозку котів [9]. Синтетичні та ендогенні канабіноїди інгібують постсинаптичні струми P-типу в нейронах Пуркінєв незалежно від рецепторів CB1 [8].

Серед іонних каналів, через які ендоканабіноїди можуть модулювати електрофізіологічні характеристики кардіоміоцитів, насамперед є різні типи натрієвих, кальцієвих і калієвих каналів. Ця модуляція може опосередковуватись як рецепторами CB1 та CB2, так і відбуватися завдяки безпосередній дії на канали, але конкретні механізми поки залишаються нез'ясованими. Рецептори CB1 та CB2 наявні в серці, де вони є частиною ендогенної канабіноїдної системи, залученої у кардіопротекторні процеси [1, 27]. Ендо- та синтетичні канабіноїди здатні зменшувати ділянку інфаркту, тоді як антагоністи рецепторів CB2 призводять до протилежних ефектів. Показано, що важливий ендоканабіноїдний агоніст анандамід (AEA, від англ. N-arachidonoylethanolamine) в мікромольних концентраціях інгібує ендогенні та гетерологічно експресовані кальцієві канали T-типу [4]. Оскільки цей ефект не міг бути відтворений ні іншим ендогенним ендоканабіноїдом, агоністом CB1-рецепторів – 2-AG (від англ. 2-arachidonoylglycerol), ні синтетичними агоністами канабіноїдних рецепторів та не блокувався римонабантом, то був зроблений висновок про пряму взаємодію AEA з каналом [4]. Також було показано блокування цих каналів різними представниками N-ацилетаноламінів (NAE) і жирними кислотами внаслідок їх прямого зв'язування з каналами [5].

Ендоканабіноїди діють також на низку калієвих каналів – потенціалкеровані (K<sub>v</sub>), G-білок-спряжені внутрішнього випрямлення (GIRK, від англ. G protein-coupled inwardly rectifying potassium) та двопородові (K<sub>2p</sub>). Так, показано, що AEA та синтетичні канабіноїди CP55940 і WIN55212-2 незалежно від рецептора CB1 блокують представника K<sub>2p</sub>-каналів TASK-1, що відповідає за струм втрат, чутливий до анестетиків і пониження pH [22]. Водночас WIN55212-2 і AEA активують калієві канали внутрішнього випрямлення (K<sub>ir</sub>, від

англ. potassium inwardly rectifying) із залученням рецепторів CB1 [35]. Механізм активації GIRK канабіноїдами до кінця не з'ясований, але вважається, що він опосередковується  $G_{\beta\gamma}$ -димером білка G [15]. Канабіноїди також посилюють калієвий струм типу А внаслідок CB1-опосередкованого пониження рівня цАМФ і активності протеїнкінази А [14]. Існує досить мало робіт, які стосуються дії канабіноїдів на натрієві канали. Було виявлено, що АЕА інгібує тетродотоксинчутливі та нечутливі натрієві канали задньокорінцевих гангліїв шурів переважно в інактивованому стані незалежно від рецепторів CB1, CB2 та каналів TRPV1 [18].

Серцева тканина є однією з найменш досліджених щодо фізіологічної дії ендоканабіноїдів. Незрозумілою залишається роль наявних у ній численних мішеней канабіноїдної системи. Збудливий апарат серцевих клітин має багато особливостей. Типові потенціали дії (ПД) кардіоміоцитів значно триваліші (200–400 мс), ніж ПД нервових (1 мс) і скелетних м'язів (2–5 мс), а їх характеристики визначаються, як правило, більшою кількістю іонних провідностей.

Мета нашої роботи дослідити дію двох ендоканабіноїдів з групи NAE – насиченого N-стеарилетаноламіну (NSE) та одненасиченого N-олеїлетаноламіну (ОЕА) на загальну електричну збудливість плазматичної мембрани неонатальних кардіоміоцитів з різних ділянок серця та запропонували ймовірні функціональні та молекулярні мішені дії цих ліпідів.

## МЕТОДИКА

Первинна культура неонатальних кардіоміоцитів. Для виділення та культивування неонатальних серцевих міоцитів шурів використовували загальноприйнятту методику з незначними змінами [29]. Серця асептично виділяли із дво-три-добових шурів відразу після декапітації та поміщали

в безкальцієвий фізіологічний розчин при 0° С наступного складу (ммоль/л): NaCl – 144, KCl – 4, MgSO<sub>4</sub> – 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,43, піруват натрію – 5, HEPES – 10, глюкоза – 10; рН 7,35. Після подрібнення шматочки тканини розміром ~1 мм<sup>3</sup> поміщали на 4 хв у фізіологічний розчин при 21° С, який прогазовували карбогеном (суміш 95 % O<sub>2</sub> та 5 % CO<sub>2</sub>). Ферментативне диспергування тканини проводили у фізіологічному розчині з додаванням 0,46 мг/мл колагенази (тип ІА, «Sigma-Aldrich», США) при 37° С в три етапи по 10 хв зі зміною розчину ферменту в кінці кожного етапу при легкому перемішуванні і прогазовуванні карбогеном. Після ферментативної обробки тканину піпетували, центрифугували при 3000 хв<sup>-1</sup> і після видалення супернатанту вміщували у безферментний фізіологічний розчин, що містив Ca<sup>2+</sup> в концентрації 0,2 ммоль/л. Після цього концентрацію кальцію у фізіологічному розчині підвищували до 1,5 ммоль/л. Це давало змогу підготувати кальційтолерантні клітини до перенесення в розчин з фізіологічною концентрацією кальцію. Після центрифугування при 3000 хв<sup>-1</sup> супернатант видаляли, клітини переносили в культуральне середовище DMEM з додавання 10 % телячої сироватки і ще раз піпетували. З суспензії, яку отримали, клітини наносили із щільністю близько 200000 см<sup>-2</sup> на скельця, покриті желатином («Sigma-Aldrich», США) і вміщені в чашки Петрі із культуральним середовищем. Клітини інкубували в атмосфері газів 5 % CO<sub>2</sub> + 95 % O<sub>2</sub> при 37 °С протягом 1–3 днів. Кожні 24 год культуральне середовище замінювали на свіже. Життєздатні клітини, що прикріпилися до скла, спонтанно скорочувалися через 12 год після культивування. Характер і частота скорочень кожного кардіоміоцита були різними і не залежали від активності сусідніх клітин. Для електрофізіологічних дослідів використовували клітини, які спонтанно скорочувалися.

Електрофізіологічний експерименти та розчини. Досліди проводили за допомогою методу "patch-clamp" у конфігурації "ціла клітина" при 36° С з використанням підсилювача PC-ONE («Dagan Corp.», США), аналогово-цифрового перетворювача Digidata 1200A («Axon Instr.», США), персонального комп'ютера та програмного забезпечення pCLAMP («Axon Instr.», США). Для швидкої зміни зовнішньоклітинних розчинів (близько 1 с) та прикладання речовин в умовах сталої температури використовували багатоканальну термостабілізовану мікроперфузійну систему власної розробки. Реєструвальні скляні мікропіпетки виготовляли за допомогою витяжки P-97 («Sutter Instr. Co.», США) з боросилікатних капілярів із зовнішнім діаметром 1,5 мм («World Precision Instruments», США). Після заповнення внутрішнім розчином піпетки мали опір 1–3 МОм. Для обробки та аналізу записів і візуалізації результатів використовували програмне забезпечення Matlab («Mathworks Corp.», США) і Origin («OriginLab Corp.», США).

Стандартний зовнішньоклітинний розчин Тіроде, в якому проводили контрольні виміри та в який додавали досліджувані сполуки був такого складу (ммоль/л): NaCl – 144, KCl – 5,4, CaCl<sub>2</sub> – 1,8, MgCl<sub>2</sub> – 1,2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,5, HEPES – 10, глюкоза – 10; pH 7,4. Реєструвальну мікропіпетку заповнювали штучним внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): KCl – 25, КОН – 110, NaCl – 8, аспарагінова кислота – 65, MgCl<sub>2</sub> – 1, HEPES – 10, MgATФ – 4, сахароза – 25; pH 7,2 (доводили з допомогою аспарагінової кислоти). Усі реактиви, які використовували для приготування розчинів були від фірми "Sigma-Aldrich", (США). N-стеарилетаноламін та N-олеїлетаноламін (отримані у відділі біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України) попередньо розчиняли в етанолі у концентрації 20 ммоль/л та додавали до розчину Тіроде для отри-

мання необхідної концентрації речовини. Концентрація етанолу у розчинах з NAE не перевищувала 0,01 %.

## РЕЗУЛЬТАТИ

У генерації ПД кардіоміоцитів бере участь значна кількість катіонних і аніонних каналів і транспортерів. Ендоканабіноїди з групи NAE здатні діяти на більшість із цих мембранних білків, таким чином впливаючи на збудливість кардіоміоцитів. Дослідження змін загальної збудливості плазматичної мембрани у відповідь на прикладання NSE або OEA ми приводили в режимі фіксації струму при стимуляції кардіоміоцитів пороговими прямокутними імпульсами тривалістю 3 мс, які викликали генеріцію ПД. Імпульси прикладали з частотою 0,2 Гц, при якій не спостерігалось ніяких частотозалежних змін у характеристиках ПД [37]. Поділ клітин на підтипи (передсердні, шлуночкові) проводили переважно за тривалістю та формою ПД кардіоміоцитів шурів відповідного віку та величини їх ПС [17, 28]. Також брали до уваги такі характеристики ПД, як амплітуда, початкова швидкість наростання та тривалість на різних рівнях реполяризації.

Ефект насиченого NSE в концентрації 1 мкмоль/л на форму ПД неонатальних кардіоміоцитів з різних ділянок серця показано на рис. 1. Видно, що в усіх типах досліджених клітин (шлуночкові енд-, епікардіальні та передсердні) NSE скорочував тривалість ПД. Однак зміни потенціалу спокою (ПС) у відповідь на прикладання NSE були більше гетерогенними. Так, у 60 % ендокардіальних клітин (тип 1) спостерігалось підвищення ПС (див. рис. 1,а), тоді як решта 40 % (тип 2) зазнавали гіперполяризації (див. рис. 1,б). В усіх шлуночкових епікардіальних клітинах NSE викликав депполяризацію ПС (див. рис. 1,в), а у передсердних – гіперполяризацію. Скорочення ПД та зміна ПС в усіх випадках

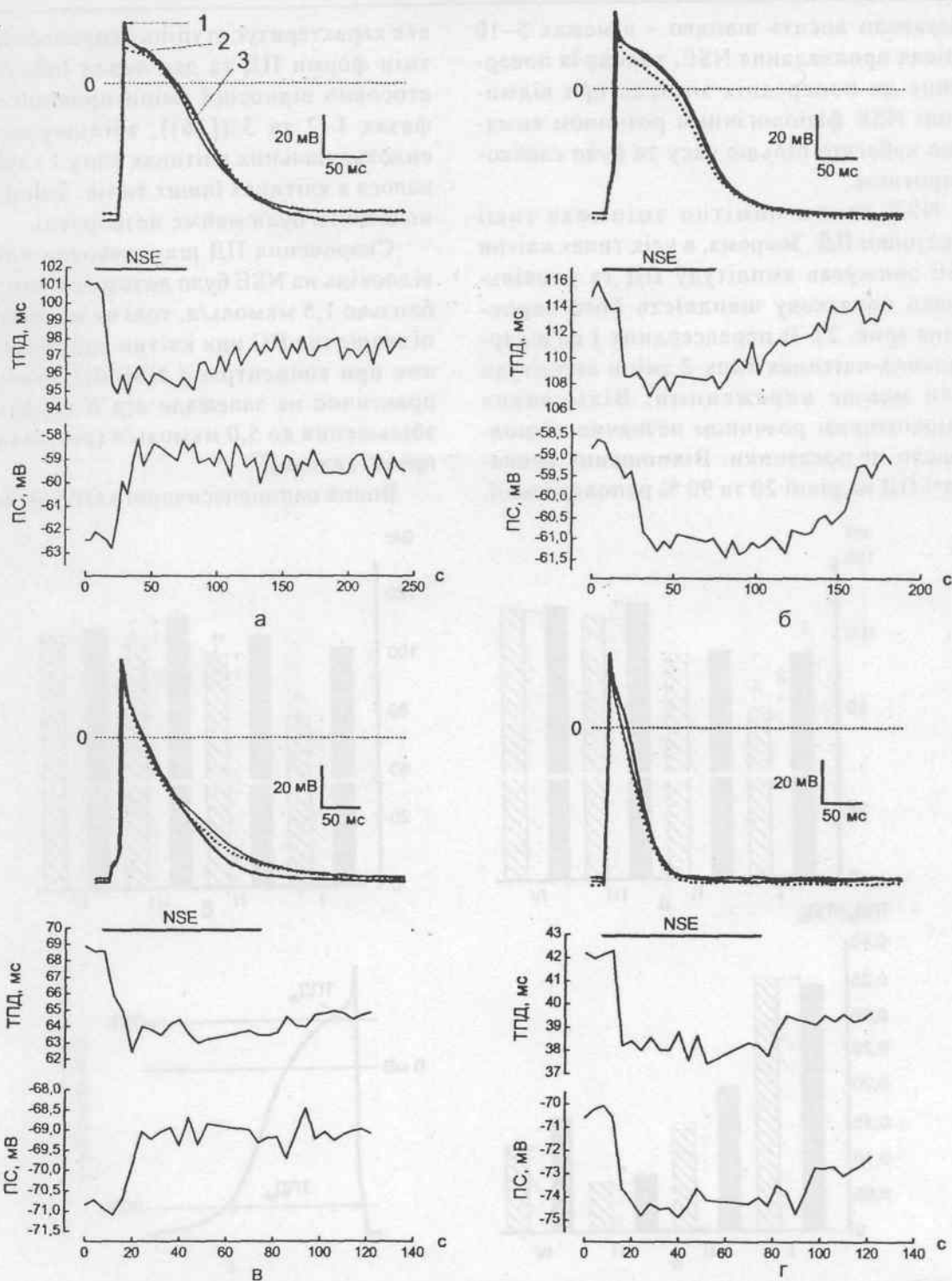


Рис. 1. Зміна форми потенціалу дії внаслідок впливу N-старилетаноламіну (NSE) на підтипи неонатальних кардіоміоцитів. Зображені потенціали дії венірикулярних ендокардіальних (а, б), спікардіальних (в) та атріальних (г) клітин у контрольних умовах (1), за наявності 1 мкмоль/л NSE (2) та після відмивання фізіологічним розчином (3). Нижче показані зміни тривалості потенціалу дії на рівні 60% реполяризації (ТПД<sub>60</sub>) і потенціалу спокою (ПС) клітин залежно від часу спостереження. «0» відповідає нульовому мембранному потенціалу

наставали досить швидко – в межах 5–10 с після прикладання NSE, тоді як їх повернення до попередніх значень при відмиванні NSE фізіологічним розчином вимагало набагато більше часу та було слабкозворотним.

NSE також помітно змінював інші показники ПД. Зокрема, в усіх типах клітин NSE знижував амплітуду ПД та уповільнював початкову швидкість його наростання (рис. 2). В передсердних і ендокардіальних клітинах типу 2 зміни амплітуди були менше вираженими. Відмивання фізіологічним розчином незначно відновлювало ці показники. Відношення тривалості ПД на рівні 20 та 90 % реполяризації,

яке характеризує ступінь непропорційності змін форми ПД та дає певну інформацію стосовно відносної зміни провідностей в фазах 1–2 та 3 ([36]), збільшувалося в ендокардіальних клітинах типу I і зменшувалося в клітинах інших типів. Зміни цього показника були майже незворотні.

Скорочення ПД шлуночкових клітин у відповідь на NSE було дозозалежним з  $EC_{50}$  близько 1,5 мкмоль/л, тоді як максимальне підвищення ПС цих клітин спостерігалося вже при концентрації NSE 0,2 мкмоль/л і практично не залежало від її подальшого збільшення до 5,0 мкмоль/л (результати не представлено).

Вплив одоненасиченого ОЕА на неона-

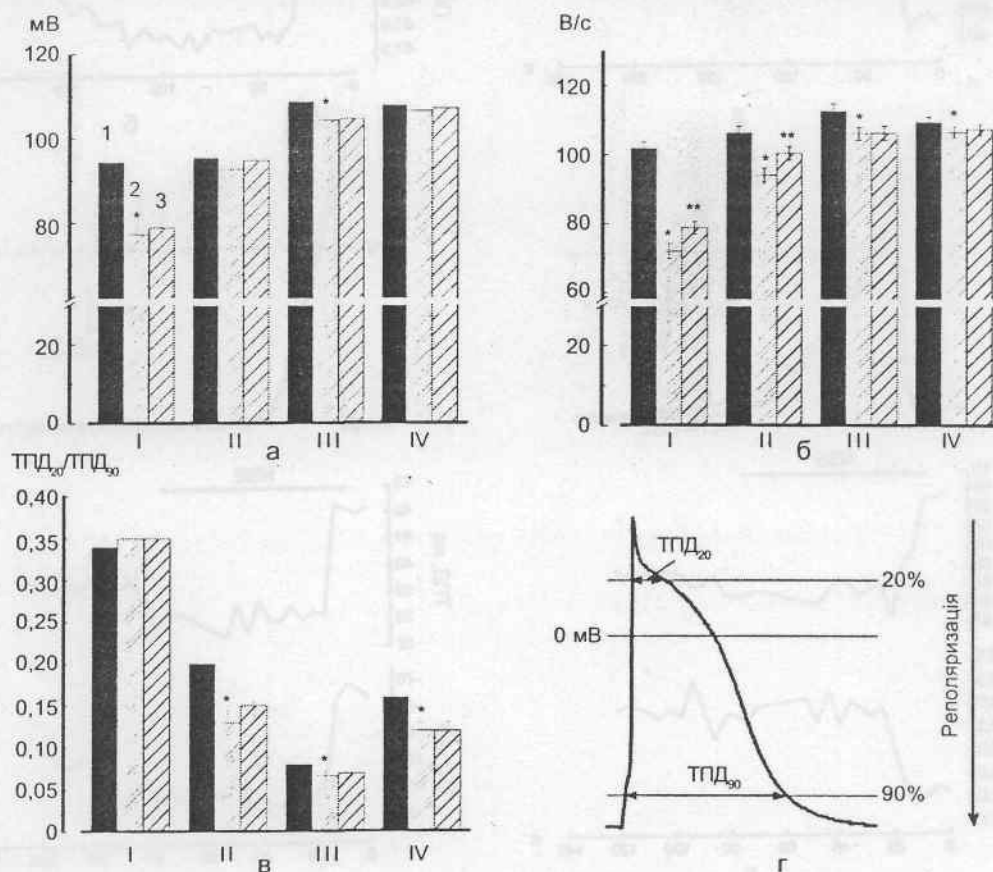


Рис. 2. Зміна потенціалу дії (ПД) внаслідок впливу N-стеарилетаноламіну (NSE) на підтипи неонатальних кардіоміоцитів. Вказані типові значення амплітуди (а), початкової швидкості наростання ПД (б) і відношення тривалості ПД на рівнях 20 і 90 % реполяризації (в) у контрольних умовах (1), після прикладання 1 мкмоль/л NSE (2) і після відмивання фізіологічним розчином (3). На вставці схематично зображений метод розрахунку  $TPД_{20}$  і  $TPД_{90}$ . \* $P < 0,05$  порівняно з контрольним значенням, \*\* $P < 0,05$  порівняно зі значенням за наявності NSE; I – ендокард I, II – ендокард 2, III – епікард, IV – передсердя

тальні кардіоміоцити дещо відрізнявся від описаного для NSE (рис. 3). У всіх типах досліджених клітин, незалежно від форми їх ПД ОЕА (1 мкмоль/л) викликав гіперполяризацію ПС та скорочення тривалості ПД (див. рис. 3,а). Для шлуночкових ендокардіальних клітин також спостерігалася краща зворотність дії ОЕА порівняно з NSE: відновлення ПС і тривалості ПД було більш повним і швидким. Як і у разі з NSE, відновлення нормальної тривалості ПД було більш повним для ендокардіальних шлуночкових і найменш повним для клітин з коротким ПД, тобто передсердних.

Як і у разі NSE, ОЕА також зворотно зменшував амплітуду та початкову швидкість наростання ПД (рис. 4). Відношення тривалості ПД на рівні 20 і 90 % реполяризації ( $TPD_{20}/TPD_{90}$ ) неістотно зменшу-

валося в ендокардіальних та збільшувалося в епікардіальних і передсердних клітинах, що вказує на диференційований, клітиноспецифічний вплив цих сполук на форму ПД.

### ОБГОВОРЕННЯ

У цій роботі ми показали, що NSE та ОЕА відіграють роль модуляторів електричної збудливості плазматичної мембрани неонатальних кардіоміоцитів шура через вплив на рівень ПС, тривалість та амплітуду ПД.

Весь ПД умовно поділяють на 4 фази: 0 – фаза деполяризації, 1-ша – фаза швидкої початкової гіперполяризації, 2-га – фаза плато, 3-тя – фаза реполяризації та 4-та – фаза слідової гіперполяризації та ПС [12]. Кожній з цих фаз відповідають періоди

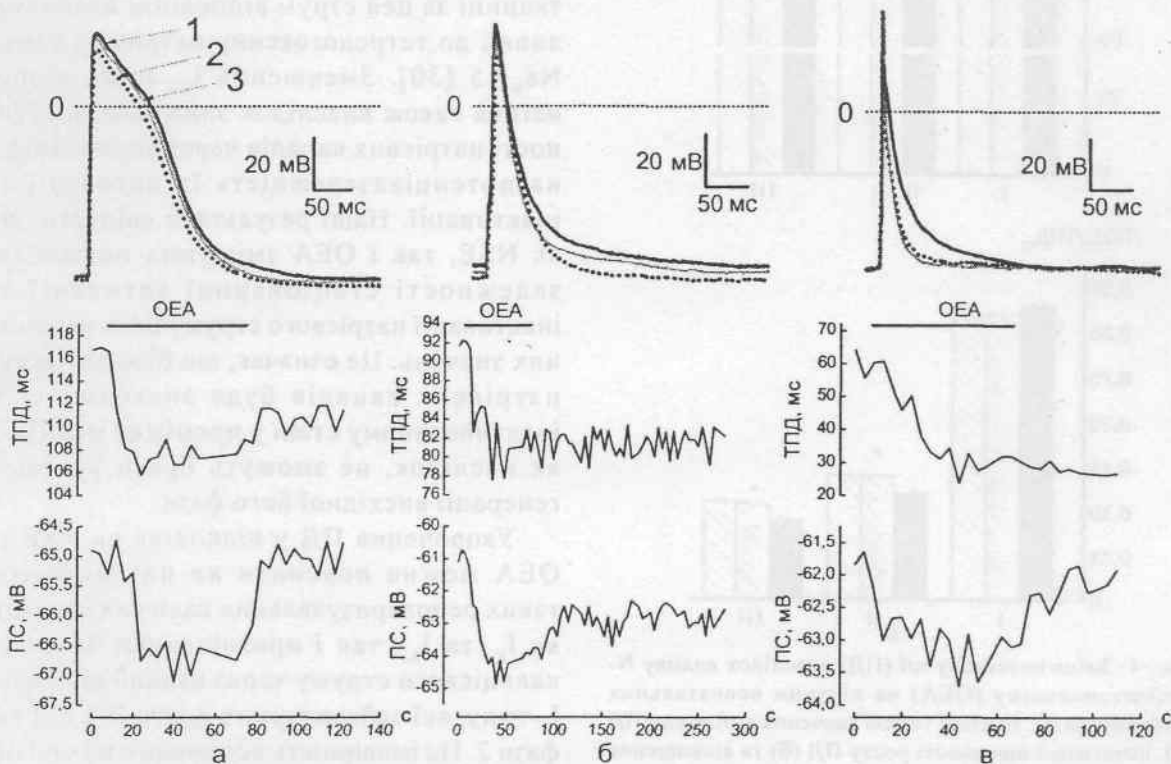


Рис. 3. Зміна форми потенціалу дії внаслідок впливу N-олеїлестаноламіну (ОЕА) на підтипи неонатальних кардіоміоцитів. Зображені потенціали дії венікулярих ендокардіальних (а), епікардіальних (б) та атріальних (в) клітин у контрольних умовах (1), за наявності 1 мкмоль/л ОЕА (2) та після відмивання фізіологічним розчином (3). Нижче показані зміни тривалості потенціалу дії ( $TPD_{90}$ ) і потенціалу спокою клітин (ПС) залежно від часу спостереження. «0» відповідає нульовому мембранному потенціалу

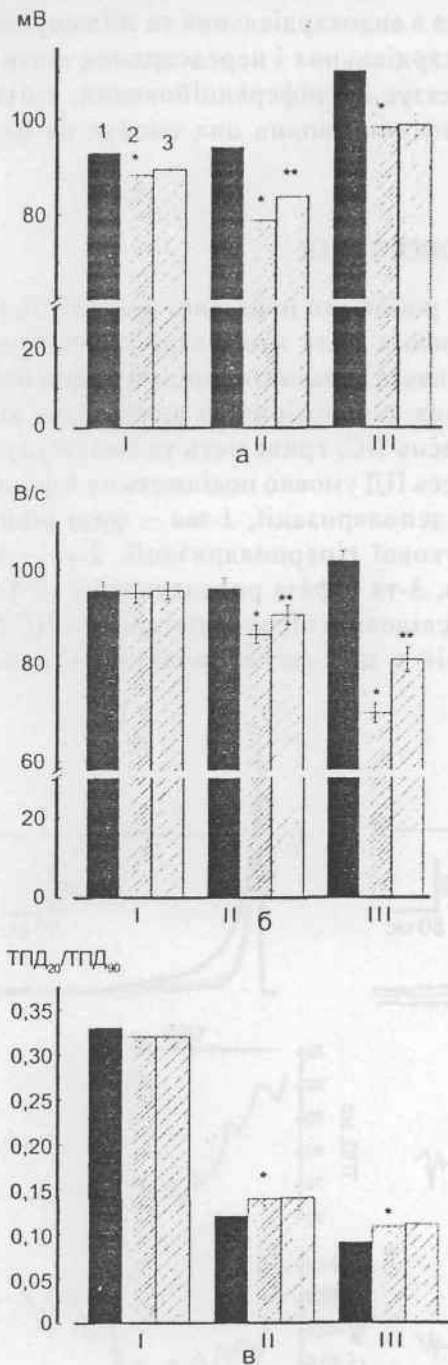


Рис. 4. Зміна потенціалу дії (ПД) внаслідок впливу *N*-олеїлгетаноламіну (ОЕА) на підтипи неонатальних кардіоміоцитів. Вказані типові значення амплітуди ПД (а), початкової швидкості росту ПД (б) та відношення тривалості ПД на рівнях 20 і 90 % реполяризації (в) у контрольних умовах (1), після прикладання 1 мкмоль/л ОЕА (2) і після відмивання фізіологічним розчином (3). \* $P < 0,05$  порівняно з контрольним значенням, \*\* $P < 0,05$  порівняно зі значенням за наявності ОЕА

активації окремих складових провідностей плазматичної мембрани кардіоміоцитів. ПД серця щурів має низку характерних рис. Так, тривалість ПД на рівні 90 % реполяризації всіх типів кардіоміоцитів дорослих щурів знаходиться в межах 35–80 мс, типовий потенціал спокою нижчий, ніж в інших видів ссавців, і становить -75–85 мВ, більшою є початкова швидкість наростання ПД (140–190 В/с), фаза 2 (плато) в них слабо виражена. Більше того, збудливість кардіоміоцитів щура досить суттєво змінюється в період постнатального розвитку [10, 17].

Зниження амплітуди та початкової швидкості наростання ПД при дії обох ліпідів вказує на ймовірне пригнічення ними швидкого натрієвого струму –  $I_{Na}$ , який є основним деполяризувальним струмом під час фази 0 ПД. У серцевій тканині за цей струм відповідає слабочутливий до тетродотоксину натрієвий канал  $Na_v1.5$  [30]. Зменшення  $I_{Na}$  може відбуватися також внаслідок зниження доступності натрієвих каналів через вплив ліпідів на потенціалзалежність їх активації та інактивації. Наші результати свідчать, що як NSE, так і ОЕА зміщують потенціалзалежності стаціонарної активації та інактивації натрієвого струму в бік негативних значень. Це означає, що більша частка натрієвих каналів буде знаходитись у інактивованому стані у проміжку між ПД і, як наслідок, не зможуть брати участь у генерації висхідної його фази.

Укорочення ПД у відповідь на NSE та ОЕА можна пояснити як потенціалізацію таких реполяризувальних калієвих струмів, як  $I_{Ks}$  та  $I_{Kr}$ , так і пригніченням вхідного кальцієвого струму через кальцієві канали L-типу, які забезпечують плато ПД під час фази 2. На імовірність останнього механізму свідчать дані літератури щодо блокування підтипів високопорогових кальцієвих каналів в нейронах і м'язах, яке опосередковане рецепторами CB1 [35].



Зміщення ПС у відповідь на прикладання NSE та OEA вказує на ймовірну взаємодію цих ліпідів з каналами  $K_{ir}$ , фоновими  $K_{2p}$  та/або  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазою. В серці експресується декілька представників  $K_{ir}$ -каналів:  $K_{ir2.1}$  відповідає за струм  $I_{K1}$ , який визначає потенціал спокою кардіоміоцитів,  $K_{ir3.1/3.4}$  утворюють GIRK, керований через мускаринові ацетилхолінові рецептори, а  $K_{ir6.2}$  є молекулярним компонентом АТФ-чутливого калієвого каналу ( $K_{ATP}$ ). Всі ці представники  $K_{ir}$  диференційовано експресуються в різних типах кардіоміоцитів і можуть специфічно модулюватися NSE і OEA. Збільшення тривалості ПД на рівні 90 % реполяризації в епікардіальних клітинах при дії NSE може бути пов'язане з блокуванням саме підтипів каналів  $K_{ir}$ , а реполяризація ПС та скорочення тривалості ПД на рівні 90 % реполяризації в інших випадках, зокрема внаслідок дії OEA, свідчить про можливу активацію як представників  $K_{ir}$ , так і реполяризувальних струмів затриманого випрямлення –  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$ , що визначають фазу 3 ПД. Наші результати свідчать, що OEA здатний активувати значний часонезалежний вихідний калієвий та/або хлорний струму. Цей ефект може частково пояснити зниження ПС і пропорційне за амплітудою скорочення ПД без суттєвої зміни тривалості ПД на рівні 90 % реполяризації під впливом OEA.

Загалом можна відзначити, що NSE більше, ніж OEA змінює форму ПД. Це деякою мірою протирічить тому факту, що OEA, як ненасичений представник NAE, є, як вважають, більш фізіологічно активним, ніж NSE. Це частково можна пояснити більш швидкою деградацією OEA в мембрані або більш значним фізіологічним ефектом блокування FAAH (від англ. fatty acid amide hydrolase) у присутності NSE та збільшенням кількості активних ейкозаноїдів, таких, наприклад, як AEA та 2-AG. Ефекти зменшення тривалості ПД і зміщення ПС є в багатьох випадках відмінними за ступенем та кінетикою повернення до

попереднього значення внаслідок відмивання, що свідчить про множинність мішеней дії NSE та OEA. Дія останнього на ПС переважно зводиться до гіперполяризації, що корелює з можливістю активації ненасиченими представниками NAE каналів GIRK через канабіноїдні рецептори [15].

Нещодавно встановлено, що участь у підтриманні ПС та фази 4 ПД кардіоміоцитів беруть також фонові канали  $K_{2p}$ . Зважаючи на здатність ендоканабіноїдів безпосередньо блокувати представників  $K_{2p}$ -каналів TASK-1 і TREK-1 [11, 22], ці канали також можуть бути мішенями дії NSE і OEA. Ендогенними активаторами/інгібіторами цієї родини каналів є зміни рН і концентрації кисню, внутрішньоклітинної осмотичності, температури, кривизни плазматичної мембрани, а також механічний тиск, лізофосфоліпіди і поліненасичені жирні кислоти [19, 31]. Слід також враховувати ймовірний опосередкований вплив NSE і OEA через рецептори GPR18, GPR55, GPR119, хоча літературних даних щодо участі цих рецепторів у такій сигналізації в серцевих клітинах немає.

Динаміка ПС і показників ПД внаслідок дії NAE відбувались, як зазначалося вище, менша ніж за 5 с, що свідчить про швидке вбудовування обох ліпідів у мембрану та дію їх на потенційні мішені переважно з зовнішньоклітинного боку. Зміни мали більш тривалий характер при дії NSE, що, ймовірно, відбувалося через повільнішу деградацію/перетворення ліпиду. Можна припустити, що кількість OEA, на відміну від NSE, більш тонко регулюється в клітині, як це відбувається в клітинах травної системи, де OEA бере участь у регуляції енергетичного балансу [23]. Хоча за нормальних умов, як зазначалося в мембранах клітини, кількість NSE більше, ніж OEA. Порушення регуляції вмісту NSE призводить до запуску апоптозу через мітохондріальний шлях.

Недостатньо дослідженим залишається вплив NAE на канали  $K_{ir}$ , ERG, хлорні канали, іонні транспортери та канали, які

переносять серцевий струм  $I_r$ . Вимагають більш детального вивчення сигнальні механізми, що задіяні в їх регуляції. Структурні дослідження також можуть дати відповідь на питання щодо безпосереднього зв'язування багатьох підтипів ендоканабіноїдів з мембранними білками. Набір каналів плазматичної мембрани кардіоміоцитів відрізняється в щурів різного віку, тому порівняльний аналіз впливу NAE на загальну збудливість таких тварин може дати інформацію щодо мішеней та направленості дії цих ліпідів в нативних умовах.

На відміну від класичних нейромедіаторів, ендоканабіноїди не зберігаються у внутрішньоклітинних компартментах клітини, а синтезуються "on demand" ("на замовлення") та відразу виходять з клітини за поки що не встановленим механізмом. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  при деполяризації клітини або при стимуляції GPCR призводить до синтезу багатьох ендоканабіноїдів, серед яких переважають NAE з насиченими довголанцюговими жирними кислотами [20]. Кількість ендоканабіноїдів у клітині може також різко підвищуватися з піко- або наномолярних концентрацій в нормі до мікромольних концентрацій за багатьох патологічних станів [32, 33]. Зокрема, це відбувається при ішемізації різних органів [25]. При цьому вивільнені ендоканабіноїди можуть впливати на збудливі та сигнальні характеристики сусідніх клітин. З'ясування характеру та спрямованості цих впливів в міокарді є важливим не тільки для фундаментальної науки, а і клініки.

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

**РЕГУЛЯЦИЯ ВОЗБУДИМОСТИ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ N-СТЕАРИЛЭТАНОЛАМИНОМ И N-ОЛЕИЛЭТАНОЛАМИНОМ**

N-ацилэтанолamines (NAE) это биологически активные липиды, способные модулировать ионный транспорт через

плазматическую мембрану клетки, однако сигнальные механизмы и мишени действия этих соединений в сердечной ткани изучены недостаточно. Поскольку действие представителей NAE может определяться степенью их насыщенности, мы исследовали влияние насыщенного N-стеарилэтанолamina (NSE) и одноненасыщенного N-олеилэтанолamina (OEA) на электрическую возбудимость плазматической мембраны неонатальных кардиомиоцитов крысы. NSE и OEA в концентрации 1 мкмоль/л уменьшали длительность потенциалов действия (ПД) кардиомиоцитов со всех участков сердечной мышцы. Укорочение ПД было частично обратимым, причем возвращение к физиологическому значению длительности ПД после отмывания соединений было более полным для желудочковых эндокардиальных кардиомиоцитов по сравнению с эпикардиальными и предсердными кардиомиоцитами. NSE деполяризовал потенциал покоя (ПС) эпикардиальных и 50 % эндокардиальных клеток, тогда как остальные кардиомиоциты в ответ на действия NSE испытывали слабозвратимую гиперполяризацию. OEA вызывал обратимую гиперполяризацию ПС у всех исследуемых типов клеток. NSE и OEA снижали амплитуду и начальную скорость нарастания ПД, что свидетельствовало об их взаимодействии с натриевыми каналами. NSE в большей и OEA в меньшей мере также подавляли амплитуду фазы 1 (плато) ПД, что, вероятно, связано с блокированием ими высокопороговых кальциевых каналов. Зависимое от типа кардиомиоцитов влияние NSE и OEA на ПС и длительность фазы реполяризации (фазы 3) ПД свидетельствует о дифференциальной регуляции этими липидами подтипов калиевых каналов входящего выпрямления  $K_{ir}$  и потенциалзависимых калиевых каналов задержаного выпрямления. Не исключено их влияние также на анионные каналы, калиевые каналы тока утечки и ионные транспортеры плазматической мембраны кардиомиоцитов. В общем изменения показателей ПД вследствие действия NSE были менее обратимы, чем после OEA, что свидетельствует о более медленной деградации/преобразовании NSE в плазматической мембране по сравнению с OEA.

Ключевые слова: N-ацилэтаноламин, N-стеарилэтаноламин, N-олеилэтаноламин, неонатальные кардиомиоциты, потенциал действия, потенциал покоя, эндоканабинонд.

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

**REGULATION OF THE EXCITABILITY OF NEONATAL CARDIOMYOCYTES BY N-STEARYL- AND N-OLEYLETHANOLAMINES**

N-acylethanolamines (NAE) are biologically active lipids able of modulating ion transport through the cellular plasma membrane, however specific targets of their action and signaling mechanisms involved in cardiac tissue are still poorly understood. Physiological activity of NAEs is known to depend on the level of unsaturation. Therefore, here we investigated the

21. Mackie K., Devane W.A., Hille B. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells // *Mol. Pharmacol.* – 1993. – **44**. – P. 498–503.
22. Maingret F., Patel A.J., Lazdunski M., Honore E. The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1 // *EMBO J.* – 2001. – **20**. – P. 47–54.
23. Matias I., Gonthier M.P., Petrosino S. et al. Role and regulation of acylethanolamides in energy balance: focus on adipocytes and beta-cells // *Brit. J. Pharmacol.* – 2007. – **152**. – P. 676–690.
24. Matsuda L.A. Molecular aspects of cannabinoid receptors // *Crit. Rev. Neurobiol.* – 1997. – **11**. – P. 143–166.
25. Natarajan V., Schmid P.C., Schmid H.H. N-acyl-ethanolamine phospholipid metabolism in normal and ischemic rat brain // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 1986. – **878**. – P. 32–41.
26. Oz M., Ravindran A., Diaz-Ruiz O. et al. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes // *J. Pharmacol. Exp. Therap.* – 2003. – **306**. – P. 1003–1010.
27. Pacher P., Hasko G. Endocannabinoids and cannabinoid receptors in ischemia-reperfusion injury and preconditioning // *Brit. J. Pharmacol.* – 2008. – **153**. – P. 252–262.
28. Pandit S.V., Clark R.B., Giles W.R., Demir S.S. A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes // *Biophys. J.* – 2001. – **81**. – P. 3029–3051.
29. Rogers T.B., Gaa S.T., Allen I.S. Identification and characterization of functional angiotensin II receptors on cultured heart myocytes // *J. Pharmacol. Exp. Therap.* – 1986. – **236**. – P. 438–444.
30. Rosen M.R. The electrocardiogram 100 years later: electrical insights into molecular messages // *Circulation.* – 2002. – **106**. – P. 2173–2179.
31. Sanders K.M., Koh S.D. Two-pore-domain potassium channels in smooth muscles: new components of myogenic regulation // *J. Physiol.* – 2006. – **570**. – P. 37–43.
32. Schmid P.C., Kuwae T., Krebsbach R.J., Schmid H.H. Anandamide and other N-acyl-ethanolamines in mouse peritoneal macrophages // *Chem. Phys. Lipids.* – 1997. – **87**. – P. 103–110.
33. Schmid P.C., Wold L.E., Krebsbach R.J. et al. Anandamide and other N-acyl-ethanolamines in human tumors // *Lipids.* – 2002. – **37**. – P. 907–912.
34. Starowicz K., Nigam S., Di Marzo V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids // *Pharmacol Therap.* – 2007. – **114**. – P. 13–33.
35. Vasquez C., Navarro-Polanco R.A., Huerta M. et al. Effects of cannabinoids on endogenous K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in HEK293 cells // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2003. – **81**. – P. 436–442.
36. Verkerk A.O., Veldkamp M.W., Abbate F. et al. Two types of action potential configuration in single cardiac Purkinje cells of sheep // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **277**. – P. H1299–1310.
37. Wickenden A.D., Kaprielian R., Parker T.G. et al. Effects of development and thyroid hormone on K<sup>+</sup> currents and K<sup>+</sup> channel gene expression in rat ventricle // *J. Physiol.* – 1997. – **504** ( Pt 2). – P. 271–286.

*Міжнарод. центр молекуляр. фізіології НАН України, Київ;  
In-m біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;  
In-m фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Ун-т Об'єд. Араб. Еміратів  
E-mail: v\_oleg@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до  
редакції 04.12.2008*