

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСПОРТА ИОНОВ K^+ ПО КАНАЛАМ ИОННЫХ ОБМЕННИКОВ В ПРИСУТСТВИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ – АКТИВАТОРОВ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

Масленникова О.М.¹, Сибирев А.Л.², Криштоп В.В.³, Шипко М.Н.², Степович М.А.⁴, Ленчер О.С.⁵

¹ Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации
ул. Маршала Тимошенко, 19, стр. 1А, г. Москва, 121359, РФ; e-mail: o.m.maslennikova@gmail.com

² Ивановский государственный энергетический университет им. В.И. Ленина
ул. Рабфаковская, 34, г. Иваново, 153003, РФ; e-mail: alsibirev@mail.ru, michael-1946@mail.ru

³ Национальный исследовательский университет ИТМО, Международный научный центр SCAMT
(Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies)

ул. Ломоносова, 9, г. Санкт-Петербург, 191002, РФ; e-mail: chrishtop@mail.ru

⁴ Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского
ул. Степана Разина, 26, г. Калуга, 248023, РФ; e-mail: m.stepovich@rambler.ru

⁵ Ивановская государственная медицинская академия
Шереметевский пр., 8, г. Иваново, 153012, РФ; e-mail: chrishtop@mail.ru

Поступила в редакцию:

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. Изучены информативные возможности метода газоразрядной визуализации для оценки биологического эффекта, вызванного агонистами калиевых каналов эритроцитов. Эффективность транспорта электронов зависит от многих факторов, однако по изменению энергетического спектра вылетающих электронов можно судить о степени изменения проводимости водных сред K^+ каналов для электронов а, следовательно, ионов K^+ к соответствующим каналам. Это позволяет оценивать оптимальное количество лекарственного средства в водной среде организма для получения максимального эффекта от его применения. Полученные данные указывают на заметные различия в процессе каналирования зарядов при наличии в суспензиях эритроцитов никорандила. Установлено, что в результате взаимодействия катионов никорандила с молекулярными комплексами водной среды и стенок канала наблюдается отталкивание электронов от стенок, что обеспечивает высокую эффективность транспорта зарядов.
Ключевые слова: газоразрядная визуализация, лекарственные средства, транспорт ионов K^+ , калиевые каналы.

ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени в понимании фармакологических эффектов лекарственных препаратов остается ряд вопросов, так как отсутствуют прямые методы оценки особенностей перестройки молекулярных комплексов, обеспечивающих протекание биологических процессов в организме. Косвенно информацию о таких процессах дают методы энергофильтрационной электронной микроскопии, Cryo-EM визуализации, позволяющие оценивать вклад белков ионных обменников в транспорт катионов K^+ , Ca^{2+} , Na^{2+} , H и др. [1]. При этом для описания механизмов транспорта ионов в ион-проводящих каналах используют различные модели структурно-функциональной организации молекулярных комплексов биологической жидкости. В большинстве из них важная роль отводится водной среде, лигандным образованиям и мембранному потенциалу [2]. Попытки стереохимического представления о структуре и состоянии каналов для описания особенностей транспорта заряженных частиц между водными компартаментами клеток и тканей оказались безуспешными. Поэтому распространенными моделями являются модели каналирования ионов, учитывающими межмолекулярное и кулоновское взаимодействие в объеме цитоплазмической мембраны при наличии воды [3]. Эти модели применимы для описания биохимических и биофизических реакций, протекающих в организмах при использовании водно-спиртовых растворов, так как наличие воды определяет характер изменения знака и интенсивности межмолекулярного взаимодействия между жидкими компартаментами организма и лекарственными средствами [4]. В таком случае предполагается, что знак потенциальной энергии каналирующего иона определяется разностью электрической восприимчивости взаимодействующих атомов лекарственного препарата и молекул водной среды, присутствующей в канале [5]. При этом учитывается состояние молекулярных комплексов, формирующих стенки каналов, по которым осуществляется транспорт ионов и электронов.

Полноценная верификация биохимических и биофизических клеточных реакций возможна лишь при наличии данных, полученных физико-химическими методами, обеспечивающими получение информации об эффективности транспорта зарядов по каналам ионных обменников, которые лимитируют большинство внутриклеточных биохимических каскадов. Такие данные могут быть получены на примере изучения особенностей каналирования электронов в суспензиях биологических объектов, характеризующихся различным

функциональным состоянием калиевых и кальциевых каналов клеточной оболочки эритроцитов, вызванных действием агонистов и антагонистов этих каналов [6-10].

Целью настоящей работы являлось изучение возможностей использования параметров углового и энергетического распределения киловольтных электронов, проходящих через растворы эритроцитов с лекарственными средствами, для оценки биофизических эффектов таких средств.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Цельную кровь получали путем пункции сердца у наркотизированного животного в вакуумные пробирки с 3,8% цитратом натрия. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (15 мин. при 3000 об./мин.), клетки трижды отмывали в изотоническом растворе с фосфатным буфером (РВС, «Sigma», USA). Для получения рабочей суспензии 0,06 мл трехкратно отмытых эритроцитов ресуспендировали в 12 мл 0,9% NaCl для последующей их инкубации с препаратами. В эксперименте было изучено влияние никорандила ($C_8H_9N_3O_4$, 2-Nicotinamidoethyl Nitrate) – активатора АТФ-зависимых калиевых каналов. Всего в эксперименте было выполнено две серии исследований. Контрольное исследование выполнено с 1 мл суспензии эритроцитов. Для второй серии экспериментов было использовано 5 мл суспензии эритроцитов, в которую вносили никорандил для получения конечных концентраций активатора калиевых каналов 0,01; 0,1; 1, 10, 100 мМ. Суспензии эритроцитов инкубировали с препаратами в течение 30 мин. при комнатной температуре.

Для исследования проводимости калиевых каналов клеточной оболочки эритроцитов был использован серийный прибор «ГРВ-камера», аттестованный в качестве прибора медицинского назначения [11-13]. Его блок-схема показана на рисунке 1. Прибор состоит из металлического электрода, эмитирующего электроны (5), оптически прозрачного кварцевого электрода с токопроводящим покрытием (2), находящимся на объективе фотокамеры (4) цифрового видео-преобразователя и устройства визуализации изображения, генератора импульсов электрического напряжения (3), модифицированного шприца, позволяющего сформировать на его конце каплю биологической жидкости (1). Электрические биполярные импульсы от генератора амплитудой 9 кВ, длительностью $2 \cdot 10^{-6}$ с стимулируют эмиссию электронов из металлического электрода (5), которые проходят через каплю раствора (1), попадают в воздушное пространство между мениском капли и плоским кварцевым электродом, вызывая скользящий газовый разряд. Его свечение регистрируется фотокамерой, оцифровывается видео-преобразователем и визуализируется на экране компьютера в виде светящего диска и стримеров, представляющих картину стереографических проекций следов движения электронов через каплю раствора и ее поверхности.

Параметрический анализ этих картин с использованием программы GDV Scientific Laboratory позволяет получить угловое распределение электронов, которое воспроизводит стереографические проекции направлений облегченного движения электронов (каналов), сформированных молекулярными комплексами биологической жидкости [14, 15]. Последующая обработка картин углового распределения электронов с помощью специальной программы позволяет получить распределение стримеров рассматриваемого разряда по длине, что коррелирует с распределением электронов по энергиям. В результате по угловому и энергетическому распределению электронов можно судить о количестве и особенностях каналов облегченного движения электронов, а также о взаимодействии электронов с молекулярными комплексами, формирующими стенки каналов. Объектами для исследования служили суспензии эритроцитов с лекарственными средствами, являющимися агонистами ионных каналов клеточной оболочки.

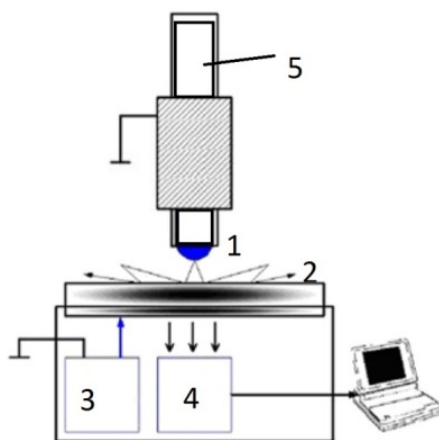


Рисунок 1. Блок-схема прибора газоразрядной визуализации «ГРВ-камера»: 1 – мениск жидкости; 2 – кварцевый электрод с токопроводящим покрытием; 3 – генератор импульсов напряжения; 4 – оптическая система; 5 – металлический электрод [11, 12]

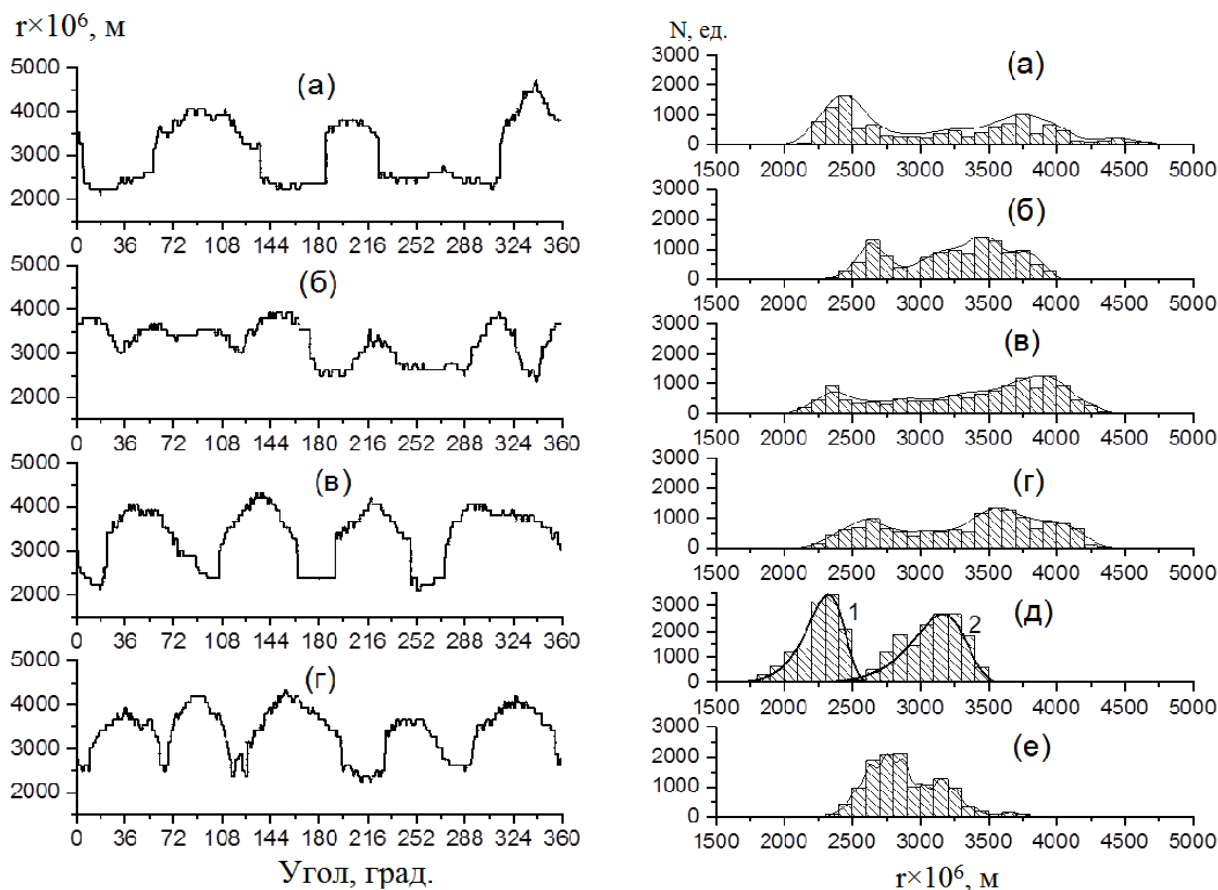


Рисунок 2. Слева – угловое распределение электронов, прошедших через суспензии эритроцитов с различной концентрацией никорандила; справа – распределение стримеров поверхностного барьерного разряда по длине после каналирования электронов через суспензии эритроцитов с различной концентрацией никорандила. Концентрация никорандила, мМ: а – 100; б – 1,0; в – 0,1; г – 0. На правом рисунке показаны также соответствующие зависимости для: д – бидистиллированной воды (кривая 1) и физиологического раствора хлорида натрия (кривая 2); е – физиологического раствора хлорида натрия с никорандилом концентрации 100 мМ

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рисунке 2 приведено угловое распределение электронов, проходящих через суспензию эритроцитов, содержащую активаторы калиевых каналов при различных концентрациях. Видно, что концентрация лекарственного средства влияет на количество, параметры и положение максимумов углового распределения электронов.

С уменьшением концентрации активатора калиевых каналов увеличивается количество и ширина максимумов, что свидетельствует об увеличении количества направлений облегченного движения электронов через раствор [16]. Наличие пологих склонов наблюдаемых максимумов указывает на интенсивное взаимодействие электронов с молекулярными комплексами, образующими стенки каналов их облегченного движения. Полученные данные свидетельствуют о заметном влиянии активатора калиевых каналов на эмиссионные свойства суспензии эритроцитов. Наиболее отчетливо такое изменение прослеживается на распределении электронов по энергиям, которое коррелирует с распределением различных стримеров по длине. Видно, что на кривых распределения стримеров по длине отчетливо прослеживается 2 максимума: низкоэнергетический и высокоэнергетический – положения и параметры которых зависят от концентрации активатора калиевых каналов в растворе. Они указывают на различный характер взаимодействия электронов с микроокружением во время их движения через суспензию эритроцитов. Это может быть вызвано различным характером молекулярных комплексов, образующих каналы облегченного транспорта. Такой эффект может быть обусловлен гетерогенностью водных сред, вызванный компартиментализацией проводящих сред мембранами эритроцитов.

Для идентификации картин углового распределения электронов были получены аналогичные картины для физиологического раствора хлорида натрия и водного раствора с активатором калиевых каналов. На картине углового распределения электронов, проходящих через физиологический раствор хлорида натрия, не наблюдается максимумов, указывающих на наличие направлений их облегченного движения, т.е. на изотропный характер жидкостей. При изучении физиологического раствора, содержащего активатор калиевых каналов

(никорандил) на картине углового распределения наблюдается 3 максимума малой интенсивности, свидетельствующих о взаимодействии молекулярных комплексов активатора калиевых каналов с молекулами воды. При внесении в суспензию эритроцитов активатора калиевых каналов изменяются форма, положение и ширина максимумов на картинах углового распределения электронов, что может быть обусловлено взаимодействием никорандила со специфическими белками-переносчиками [17, 18]. Это указывает на изменение особенностей взаимодействия электронов с молекулярными комплексами, формирующими стенки каналов облегченного транспорта последних через суспензию эритроцитов. Наиболее отчетливо такие изменения проявляются на картинах распределения стримеров по длине.

Из рисунка 2 также видно, что с увеличением концентрации активатора калиевых каналов в суспензии эритроцитов до 1 мМ увеличивается интенсивность максимумов, длина которых находится в интервале $(3,2-4,5) \times 10^{-3}$ м, соответствующих суспензии эритроцитов в физиологическом растворе. При этом интенсивность максимумов для стримеров длиной $(2,7-3,2) \times 10^{-3}$ м уменьшается, что указывает на отсутствие в суспензии молекул активатора калиевых каналов, не взаимодействующих с соответствующими ионными обменниками эритроцитами. При увеличении концентрации никорандила в суспензии эритроцитов до 10 мМ наблюдается повышение интенсивности максимумов, соответствующих длине стримеров $(3,5-4,0) \times 10^{-3}$ м, что указывает на повышение эффективности транспорта зарядов при введении никорандила, которая может быть обусловлена транспортом нерелятивистских электронов через ион-проводящих каналы в эритроцитах [13]. Однако даже при концентрации никорандила в суспензии с эритроцитами 100 мМ не обнаружено стримеров, свойственных свободным состояниям его молекулярных комплексов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования указывают на возможность применения метода газоразрядной визуализации для оценки биологического эффекта, вызванного агонистами калиевых каналов эритроцитов. Такие возможности связаны с тем, что при движении через эритроциты электронов, способных ионизировать воздух, происходит их торможение внутренним электрическим полем каналов, а также молекулярными комплексами, образующими стенки. Большое влияние на оба фактора оказывает водная среда, которая определяет степень торможения зарядов. Несмотря на тот факт, что эффективность транспорта зарядов зависит от многих факторов, по изменению энергетического спектра вылетающих электронов можно судить о степени изменения проводимости водных сред K^+ каналов для электронов а, следовательно, ионов K^+ к соответствующим каналам, а также оценивать оптимальное количество лекарственного средства в водной среде организма для получения максимального эффекта. Приведенные данные указывают на заметные различия специфики каналирования зарядов при наличии никорандила в суспензиях эритроцитов. В результате взаимодействия катионов никорандила с молекулярными комплексами водной среды и стенок канала наблюдается отталкивание электронов от стенок, что обеспечивает высокую эффективность транспорта зарядов.

Список литературы / References:

1. Fay J.F., Aleksandrov L.A., Jensen T., Cui L., Kousouros J.N., He L., Aleksandrov A.A., Gingerich D., Riordan J.R., Chen J. Cryo-EM visualization of an active high open probability CFTR anion channel. *Biochemistry*, 2018, vol. 57, no. 43. DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00763
2. Мельников К.Н., Вислобоков А.И., Колпакова М.Э., Борисова В.А., Игнатов Ю.Д. Калиевые ионные каналы клеточных мембран. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, 2009, т. 7, № 1, с. 3-27. [Melnikov K.N., Vislobokov A.I., Kolpakova M.E., Borisova V.A., Ignatov Yu.D. Potassium ion channels of cell membranes. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2009, vol. 7, no. 1, pp. 3-27. (In Russ.)]
3. Высоцкий В.И., Карлаш А.Ю. Особенности селективного транспорта и каналирования ионов в водной среде в каналах биологических мембран. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, 2010, № 12, с. 64-71. [Vysotsky V.I., Karlash A.Yu. Features of selective transport and channeling of ions in the aquatic environment in the channels of biological membranes. *Surface. X-ray, synchrotron and neutron research*, 2010, no. 12, p. 64-71. (In Russ.)]
4. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science*, 1998, vol. 280, no. 5360, pp. 69-77. DOI: 10.1126/science.280.5360.69
5. Горбунов А.М., Ильенко В.А., Владимирова Е.С. Фармакологическое действие водных растворов лекарственных препаратов и воды, модифицированной электромагнитным полем. *Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине: Научные труды VII международного конгресса*, СПб, 2015, т. 7, с. 31. [Gorbunov A.M., Pienko V.A., Vladimirova E.S. Pharmacological action of aqueous solutions of drugs and water modified by an electromagnetic field. Weak and superweak fields and radiation in biology and medicine: Proceedings of the VII International Congress, St. Petersburg, 2015, vol. 7, p. 31. (In Russ.)]
6. Пушкарев Б.С., Витковский Ю.А. Кальциевые ионные каналы. Ч. II. *Забайкальский медицинский вестник*, 2016, № 1, с. 93-104. [Pushkarev B.S., Vitkovsky Yu.A. Calcium ion channels. Part II. *Zabaikalsky Medical Bulletin*, 2016, no. 1, pp. 93-104. (In Russ.)]
7. Горбунов А.М., Ильенко В.А., Владимирова Е.С. Исследование фармакологической активности препаратов методом оптической спектроскопии. *Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине:*

Научные труды VIII международного конгресса, СПб, 2018, т. 8, с. 167-168. [Gorbunov A.M., Plienko V.A., Vladimirova E.S. Study of the pharmacological activity of drugs by optical spectroscopy. *Weak and superweak fields and radiation in biology and medicine: Proceedings of the VIII International Congress*, St. Petersburg, 2018, vol. 8, pp. 167-168. (In Russ.)]

8. Zhou Y., MacKinnon R. The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.*, 2003, no. 7, vol. 333, no. 5, pp. 965-75. PMID: 14583193

9. Frieden M., Malli R., Samardzija M., Demareux N., Graier W.F. Subplasmalemmal endoplasmic reticulum controls K(Ca) channel activity upon stimulation with a moderate histamine concentration in a human umbilical vein endothelial cell line. *J. Physiol.*, 2002, vol. 540, pt. 1, pp. 73-84.

10. Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A., MacKinnon R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, 2001, vol. 414, no. 1, no. 6859, pp. 43-48. PMID: 11689936

11. Коротков К.Г., Орлов Д.В., Величко Е.Н. Применение метода газоразрядной визуализации для анализа различных жидкостей. *Известия высших учебных заведений. Приборостроение*, 2011, т. 54, № 12, с. 40-46. [Korotkov K.G., Orlov D.V., Velichko E.N. Application of the gas-discharge visualization method for the analysis of various liquids. *Proceedings of higher educational institutions. Instrument making*, 2011, vol. 54, no. 12, pp. 40-46. (In Russ.)]

12. Коротков К.Г. *Принципы анализа ГРВ биоэлектрографии*. Санкт-Петербург: Реноме, 2007, 286 с. [Korotkov K.G. *Principles of GDV bioelectrography analysis*. St. Petersburg: Renome, 2007, 286 p. (In Russ.)]

13. Hartmann H.A., Kirsch G.E., Drewe J.A. et al. Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. *Science (Wash. DC)*, 1991, vol. 251, pp. 942-944.

14. Шипко М.Н., Степович М.А., Сибирев А.Л., Усольцева Н.В., Масленникова О.М., Смирнова А.И. Магнитоимпульсное воздействие на структурное состояние растворов поверхностно-активных веществ. *Известия РАН. Серия физическая*, 2018, vol. 82, no. 8, pp. 1058-1062. [Shipko M.N., Stepovich M.A., Sibirev A.L., Usoltseva N.V., Maslennikova O.M., Smirnova A.I. Magneto-pulse effect on the structural state of solutions of surfactants. *Izvestiya RAN. Physical series*, 2018, vol. 82, no. 8, pp. 1058-1062. (In Russ.)] doi: 10.1134/S0367676518080367.

15. Shipko M.N., Stepovich M.A., Sibirev A.L., Usoltseva N.V., Maslennikova O.M. Smirnova A.I. Impact of Magnetic Pulses on the Structural State of Surfactant Solutions. *Bull. Russ. Acad. Sci.: Phys.*, 2018, vol. 82, no. 8, pp. 956-960. DOI: 10.3103/S1062873818080361

16. Рябов В.А. *Эффект каналирования*. М.: Энергоатомиздат, 1994, 239 с. [Ryabov V.A. *Channeling effect*. Moscow: Energoatomizdat, 1994, 239 p. (In Russ.)]

17. Escande D., Caverio I. K⁺ channel openers and “natural” cardioprotection. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1992, vol. 13, pp. 269-272. doi: 10.1016/0165-6147(92)90083-I

18. Hegermann J., Overbeck J., Schrempf H. In vivo monitoring of the potassium channel KcsA in *Streptomyces lividans* hyphae using immuno-electron microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy. *Microbiology*, 2006, vol. 152, pt. 9, pp. 2831-2841.

STUDY OF THE EFFICIENCY OF K⁺ ION TRANSPORT THROUGH ION EXCHANGER CHANNELS IN THE PRESENCE OF DRUGS – POTASSIUM CHANNEL ACTIVATORS

Maslennikova O.M.¹, Sibirev A.L.², Krishtop V.V.³, Shipko M.N.², Stepovich M.A.⁴, Lencher O.S.⁵

¹Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs,

st. Marshal Timoshenko, 19, bld. 1A, Moscow, 121359, Russia; e-mail: o.m.maslennikova@gmail.com

²Lenin Ivanovo State Power Engineering University,

Rabfakovskaya st. 34, Ivanovo, 153025 Russia; e-mail: alsibirev@mail.ru, michael-1946@mail.ru

³Национальный исследовательский университет ИТМО, Международный научный центр SCAMT (Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies),

st. Lomonosov, 9, St. Petersburg, 191002, Russia; e-mail mail: chrishtop@mail.ru

⁴Tsiolkovsky Kaluga State University,

Stepan Razin st. 26, Kaluga, 248023, Russia; e-mail: m.stepovich@rambler.ru

⁵Ivanovo State Medical Academy,

Sheremetevsky Ave., 8, Ivanovo, 153012, Russia; e-mail: chrishtop@mail.ru

Abstract. The informative capabilities of the gas-discharge visualization method for assessing the biological effect caused by agonists of potassium channels of erythrocytes were studied. The efficiency of electron transport depends on many factors; however, by the change in the energy spectrum of the emitted electrons, one can judge the degree of change in the conductivity of aqueous media K⁺ channels for electrons and, consequently, K⁺ ions to the corresponding channels. This allows to evaluate the optimal amount of a drug in the aquatic environment of the body to maximize the effect of drug usage. The data obtained indicate noticeable differences in the process of charge channeling in the presence of nicorandil in erythrocyte suspensions. It was found that as a result of the interaction of nicorandil cations with molecular complexes of the aqueous medium and the channel walls, the repulsion of electrons from the walls is observed, which ensures a high efficiency of charge transport.

Key words: *gas-discharge imaging, drugs, K⁺ ion transport, potassium channels.*