

УДК 57.053.2

DOI 10.34014/2227-1848-2025-1-93-103

ПЕПТИДНЫЙ ТОКСИН, НАЦЕЛЕННЫЙ НА НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ, В МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОЙ КЛЕТочНОЙ ГИБЕЛИ

Е.В. Юрова, Е.В. Расторгуева, Е.А. Белобородов, Д.Е. Сугак,
Е.С. Погодина, Ю.В. Саенко

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Инфаркт миокарда является одним из наиболее распространенных сердечно-сосудистых заболеваний в мире. Прерывание коронарного кровотока подвергает кардиомиоциты стрессу, а реперфузия повторно вводит субстрат и кислород, обеспечивая резкую нормализацию внутриклеточной среды. Все это парадоксальным образом вызывает повышение гибели клеток, в результате чего развивается ишемически-реперфузионное повреждение. Давно известно, что перегрузка натрием в миокарде является одним из наиболее важных механизмов, лежащих в основе ишемически-реперфузионного повреждения. В нашей работе для снижения притока Na^+ на стадии реперфузии и, как следствие, уменьшения повреждения мы использовали мю-агатоксин-Aa1a.

Цель. Изучение влияния мю-агатоксина-Aa1a на клеточную гибель кардиомиоцитов в *in vitro* модели ишемически-реперфузионного повреждения.

Материалы и методы. Исследование проводили на культуре кардиомиоцитов H9C2. Уровни апоптоза, некроза и концентрацию ионов натрия оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. Для подтверждения уровня некроза использовали спектрофотометрический метод определения концентрации лактатдегидрогеназы. Модель ишемически-реперфузионного повреждения была основана на инкубации культуры в среде с частичной депривацией глюкозы, выворотки и кислорода в течение 18 ч с последующим переносом в полную питательную среду на 2 ч. Токсин добавляли в начале стадии реперфузии.

Результаты. При повышении клеточной гибели в результате апоптоза и некроза в модели ишемически-реперфузионного повреждения добавление токсина в концентрации 50 нМ вызывает рост выживаемости клеток за счет снижения концентрации ионов натрия.

Выводы. Пептидный токсин мю-агатоксин-Aa1a, нацеленный на натриевые потенциалзависимые каналы и способный менять их проводимость, в концентрации 50 нМ может в значительной степени снижать гибель кардиомиоцитов при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения *in vitro*.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, кардиомиоциты, натриевые каналы, пептидный токсин.

Введение. Инфаркт миокарда является одним из наиболее распространенных сердечно-сосудистых заболеваний в мире. Кардиомиоциты в значительной степени зависимы от поступления кислорода, поэтому прерывание коронарного кровотока быстро подвергает их стрессу и в конечном итоге приводит к клеточной гибели [1]. Реперфузия повторно вводит субстрат и кислород, обеспечивая резкую нормализацию внутриклеточной среды и вымывание катаболических отходов, накопленных во время ишемии. Все это парадоксальным образом вызывает повышение гибели клеток, в результате чего развивается ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) [2].

Давно известно, что перегрузка миокарда натрием является одним из наиболее важных механизмов, лежащих в основе ишемически-реперфузионного повреждения [3, 4]. После начала ишемии концентрация Na^+ постепенно увеличивается. Массивный приток Na^+ внутрь клетки, продолжающийся во время реперфузии за счет вытеснения избыточного количества ионов H^+ через натрий-протонный насос, заставляет натрий-кальциевый насос работать нестандартно, выкачивая Na^+ в обмен на Ca^{2+} [5, 6]. Временного накопления Ca^{2+} в цитоплазме достаточно, чтобы активировать кальцийзависимые липазы и протеазы, а также широкий спектр патофизиологических реакций [7–9], что ведет к

значительному повреждению миокарда. Контролировать поступление Na^+ внутрь клетки через ионные каналы можно путем применения блокаторов. Данную стратегию в медицинской практике используют уже длительное время. Так, например, известно, что блокаторы натриевых каналов применяют как мембраностабилизирующие антиаритмические препараты. Сюда относятся хинидин, новокаинамид, аймалин с умеренной блокадой натриевых каналов [10–13], а также пропafenон, этацизин, флекаинид с выраженной блокадой [14, 15]. Несмотря на то что данный тип блокаторов оказывает выраженное влияние на концентрацию ионов натрия, работ, посвященных изучению их действия при ИРП, в настоящее время мало, и все они датируются 80–90-ми гг. XX в. [16–18].

В нашем исследовании для снижения притока Na^+ на стадии реперфузии и, как следствие, уменьшения ИРП мы использовали относящийся к модуляторам потенциалзависимых натриевых каналов токсин мю-агатоксин-Aa1a [Uniprot: T5G1A_AGEAP] из яда паука *Agelenopsis aperta*. Модификация натриевых каналов токсином вызывает повышение их чувствительности за счет смещения кривой активации к более отрицательным потенциалам [19]. Это приводит к увеличению вероятности открытия натриевых каналов. Кроме того, пептидные токсины, к которым относится мю-агатоксин-Aa1a, по своей природе обладают рядом отличительных свойств, одно из которых – высокая селективность по отношению к определенному типу каналов, за счет чего необходимый эффект может быть достигнут с использованием незначительных доз (нано- и микромолярных).

Цель исследования. Изучение влияния токсина мю-агатоксин-Aa1a на клеточную гибель кардиомиоцитов в *in vitro* модели ишемически-реперфузионного повреждения.

Материалы и методы. *Клеточная культура и условия эксперимента.* Для моделирования условий ИРП кардиомиоцитов использовалась культура H9C2, предоставленная Институтом молекулярной генетики РАН. До эксперимента она содержалась в среде DMEM с 4,5 г/л глюкозы («Панэко», Россия), 10 % FBS (Globe Kang, Китай) и пенициллина/

стрептомицина (конечные концентрации 50 ЕД/мл и 50 мкг/м; «Панэко», Россия) в CO_2 -инкубаторе MCO-5AC (Sanyo, Япония) при 37 °C и 5 % CO_2 . Пассаж культуры проводили каждые 7 дней с использованием 0,25 % раствора трипсина («Панэко», Россия).

Эксперимент проводили в 96-луночных планшетах (SPL Life Sciences, Корея). Клетки в концентрации 5000 на ячейку оставляли на 48 ч для слияния и дифференцировки. Стадию дифференцировки определяли по появлению больших многоядерных клеток. Для моделирования ИРП культуру помещали в инкубатор СВ-53 (Binder, Германия) с содержанием 1 % O_2 в среде DMEM с 1 г/л глюкозы и 1 % FBS на 18 ч, затем планшет переносили в CO_2 -инкубатор MCO-5AC с 5 % CO_2 и 18,6 % O_2 на 2 ч. Одновременно с этим в ячейки планшета добавляли токсин в конечной концентрации 50 нМ.

Флуоресцентный анализ. Для детекции апоптоза использовался краситель Yo-Pro 1, который добавлялся к культуре в точке окончания реперфузии в концентрации 1 мкМ. Клетки с красителем инкубировались 20 мин в темноте при 37 °C. Для анализа динамики некроза использовалось два способа детекции: 1) флуоресцентная микроскопия с добавлением йодистого пропидия (1 мкМ), 2) измерение концентрации лактатдегидрогеназы (ЛДГ). В случае с флуоресцентной микроскопией клетки также инкубировались с красителем в течение 20 мин в темноте при 37 °C.

Измерение концентрации ионов натрия проводили с использованием красителя ION NATRUIM Green AM по схеме, описанной выше.

Далее проводилась съемка с использованием оптической системы Nikon Ti S (Nikon, Япония) на соответствующих фильтрах. Затем данные обрабатывались в программе ImageJ, и результат представлялся в виде относительных флуоресцентных единиц.

Измерение концентрации ЛДГ. Для определения концентрации ЛДГ использовали набор LDH Abris+ (Abris, Россия) и спектрофотометр Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, США). После эксперимента забирали среду, в которой культивировались

клетки, клетки смывали и подсчитывали концентрацию. Затем определяли скорректированную абсорбцию – разницу значений абсорбции испытуемого и контрольного образцов (ДЕ/мин) в течение 3 мин на длине волны 340 нм с длиной оптического пути 1 см. Далее в соответствии с рекомендованной формулой рассчитывали концентрацию ЛДГ. Дополнительно оценивали концентрацию ЛДГ в чистой среде и в нормальных условиях роста культуры для определения тотальной ЛДГ. Процент цитотоксичности определяли по формуле

$$\% \text{ цитотоксичности} = (\text{Экспериментальная ЛДГ}) / (\text{Тотальная ЛДГ}),$$

где экспериментальная ЛДГ – концентрация ЛДГ в среде после эксперимента с вычетом ЛДГ в чистой среде, тотальная ЛДГ – концентрация ЛДГ в нормальных условиях с учетом

пересчета на концентрацию клеток и с вычетом ЛДГ в чистой среде [20].

Статистическая обработка данных. Каждый эксперимент проводили в трех повторах. Статистическую обработку проводили с использованием критерия Стьюдента для параметров флуоресцентной микроскопии. Для концентрации ЛДГ использовали тест Манна – Уитни. Данные считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. В результате моделирования ишемически-реперфузионного повреждения кардиомиоцитов при последовательном инкубировании в сменяющихся условиях без или с токсином были получены данные, представленные на рис. 1–3. Так, уровень апоптоза при детекции флуоресцентной микроскопией значительно повышался при развитии повреждения – примерно в 4 раза (рис. 1).

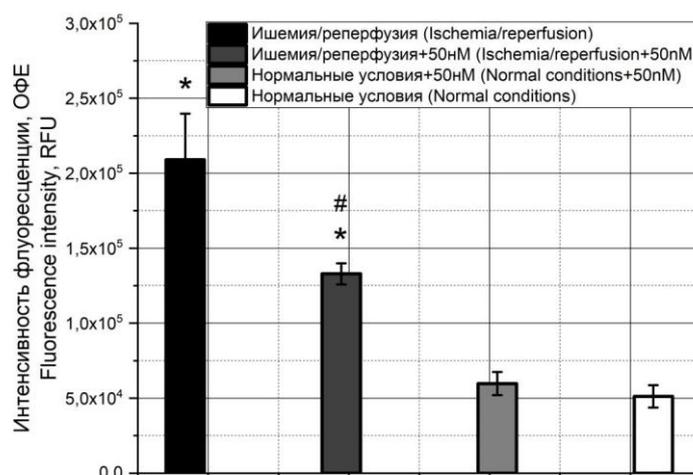


Рис. 1. Динамика апоптоза при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения в культуре Н9С2 в отсутствие токсина и при его добавлении в концентрации 50 нМ, а также влияние токсина на клеточную гибель в культуре при отсутствии повреждения (здесь и далее: * – достоверное отличие от группы с нормальными условиями, $p < 0,05$, # – достоверное отличие от группы «ишемия/реперфузия», $p < 0,05$)

Fig. 1. Dynamics of apoptosis in modeling ischemia-reperfusion injury in H9C2 culture with toxin (concentration 50 nM) and without it, and toxin effect on cell death in the culture in the absence of injury (hereinafter: * – the differences are significant compared with the norm, $p < 0.05$; # – the differences are significant compared with the ischemia/reperfusion group, $p < 0.05$)

При добавлении токсина в концентрации 50 нМ уровень апоптоза снижался почти в два раза, однако все равно оставался повышен-

ным. При этом в одиночной инкубации клеточной культуры с токсином апоптоз развивался.

При детекции развития некроза в культуре методом флуоресцентной микроскопии видно, что некроз при моделировании ИРП

развивался (рис. 2). Однако добавление токсина при детекции таким методом не оказывало влияния на данный параметр.

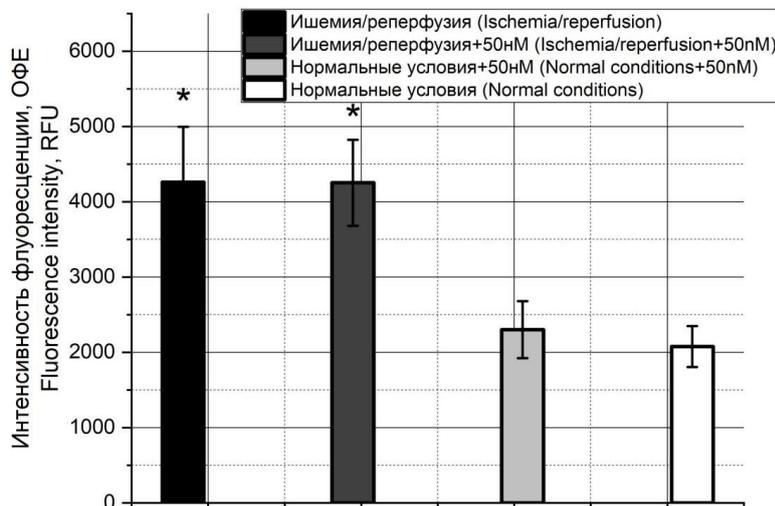


Рис. 2. Динамика некроза при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения в культуре Н9С2 в отсутствие токсина и при его добавлении в концентрации 50 нМ, а также влияние токсина на клеточную гибель в культуре при отсутствии повреждения

Fig. 2. Dynamics of necrosis in modeling ischemia-reperfusion injury in H9C2 culture with toxin (concentration 50 nM) and without it, and toxin effect on cell death in the culture in the absence of injury

С другой стороны, в экспериментальных условиях зафиксирован рост концентрации лактатдегидрогеназы, что указывает на повреждение клеток в следствие развития в т.ч. и некроза (рис. 3).

Однако добавление токсина вело к снижению уровня ЛДГ. Кроме того, непосредственно сам токсин в той же концентрации не вызывает повышение уровня лактатдегидрогеназы, что подтверждают оба метода.

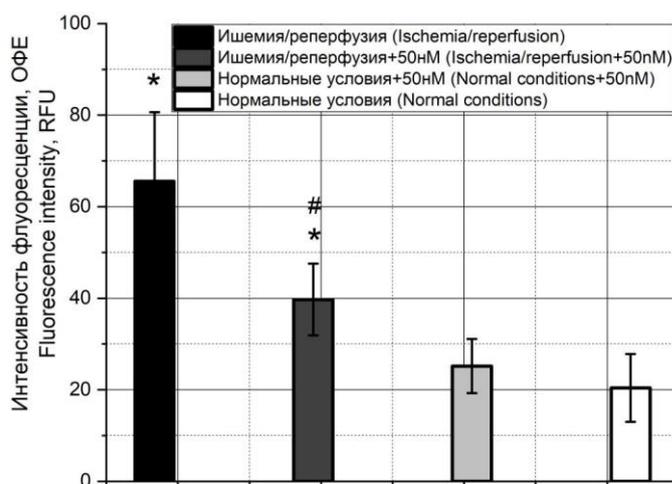


Рис. 3. Концентрация лактатдегидрогеназы при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения в культуре Н9С2 в отсутствие токсина и при его добавлении в концентрации 50 нМ, а также влияние токсина на концентрацию в культуре при отсутствии повреждения

Fig. 3. Lactate dehydrogenase concentration in modeling ischemia-reperfusion injury in H9C2 culture with toxin (concentration 50 nM) and without it, and toxin effect on cell death in the culture in the absence of injury

Ализ изменения концентрации ионов натрия при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения и при добавлении ток-

сина показывает, что содержание ионов натрия повышалось при ИРП (рис. 4).

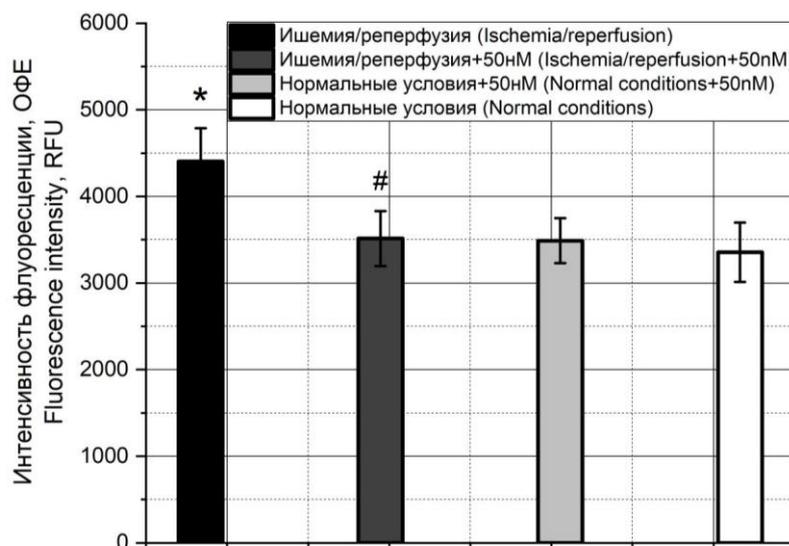


Рис. 4. Концентрация ионов натрия при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения в культуре Н9С2 в отсутствие токсина и при его добавлении в концентрации 50 нМ, а также влияние токсина на концентрацию в культуре при отсутствии повреждения

Fig. 4. Sodium ion concentration in modeling ischemia-reperfusion injury in Н9С2 culture with toxin (concentration 50 nM) and without it, and toxin effect on cell death in the culture in the absence of injury

Добавление токсина вело к нормализации концентрации ионов до уровня нормальных условий. Также токсин не изменяет динамику содержания ионов натрия при отсутствии повреждения.

Обсуждение. Ишемия и последующая реперфузия вызывают функциональные и метаболические нарушения кардиомиоцитов. Ряд исследовательских работ доказывает гипотезу о ключевой роли ионов натрия в развитии повреждения. Так, пропилпарабен, противомикробный консервант, способен значительно ингибировать потенциалзависимые натриевые каналы в изолированных кардиомиоцитах взрослых крыс, в результате чего предотвращается развитие ИРП [21]. Ингибитор сердечных потенциалзависимых натриевых каналов 3,4-дигидро-N-[(2S)-3-[(2-метоксифенил)тио]-2-метилпропил]-2H-(3R)-1,5-бензоксатиепин-3-амин продемонстрировал мощный антиишемический эффект в моделях *in vitro* и *in vivo* [22].

В нашей работе мы предлагаем использовать пептидный токсин, который способен модулировать проводимость потенциалзависимых натриевых каналов типа Nav1.5, – мю-агатоксин-Aa1a. Природные пептидные токсины, избирательно связывающиеся с натриевыми ионными каналами, применялись уже не раз. Например, тетродотоксин, блокатор натриевых каналов, вызывал значительное увеличение количества жизнеспособных клеток в модели изолированных кардиомиоцитов крысы [23, 24].

При использовании мю-агатоксина-Aa1a за счет изменения конформации канала снижается его чувствительность к мембранному потенциалу, благодаря чему канал остается открытым, что отражается на выживаемости клеток при развитии ишемически-реперфузионного повреждения.

В ходе работы были подобраны оптимальные условия для развития клеточной гибели при моделировании ИРП (18 ч глюкозной и

кислородной депривации и 2 ч реперфузии в полной питательной среде) в культуре клеток, которые проявляли признаки дифференцировки. Так, после моделирования ИРП в культуре Н9С2 происходит развитие как апоптоза, так и некроза, о чем свидетельствует увеличение сигнала флуоресценции (рис. 1) концентрации ЛДГ (рис. 3). Добавление токсина на стадии реперфузии значительно повышает выживаемость клеток: уровень апоптоза и концентрация ЛДГ в данном случае значительно ниже, чем при ишемии/реперфузии. При этом токсин в одиночной инкубации при отсутствии повреждения не оказывает влияния на жизнеспособность клеток.

ИРП сопровождается изменением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , Na^{+} и K^{+} . Так, на стадии ишемии происходит увеличение концентрации ионов Na^{+} в результате активации NHE и притока через натриевые каналы мембраны. На стадии реперфузии активность натрий-протонного насоса растет за счет вымывания кислой внеклеточной жидкости и восстановления градиента протонов. Повышенная активность насоса приводит к вторичному повышению концентрации Na^{+} .

Чтобы вернуться к доишемической концентрации Na^{+} происходит отток ионов Na^{+} через $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -насос за счет притока внутрь клетки ионов Ca^{2+} . Концентрация Ca^{2+} увеличивается, в результате чего активируется каскад реакций, ведущий к клеточной гибели. С другой стороны, повышенные концентрации Na^{+} вызывают приток воды в клетку, в результате чего наблюдается набухание. Органеллы, такие как митохондрии, вакуолируются, что препятствует выработке клеточной энергии и усугубляет дисбаланс жидкости и электролитов внутри клетки. В конечном итоге это может привести к гибели клеток [25, 26]. В нашем случае развитие клеточной гибели сопровождалось повышением концентрации ионов натрия (рис. 4), однако добавление токсина на стадии реперфузии приводило к нормализации их уровня.

Заключение. Таким образом, пептидный токсин мю-агатоксин-Aala, нацеленный на натриевые потенциалзависимые каналы и способный менять их проводимость, в концентрации 50 нМ может значительно снижать гибель кардиомиоцитов при моделировании ишемически-реперфузионного повреждения *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FEUF-2022-0008).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования: Саенко Ю.В., Юрова Е.В.

Литературный поиск, участие в исследовании, обработка материала: Юрова Е.В.,

Расторгуева Е.В. Белобородов Е.А., Сугак Д.Е.

Статистическая обработка данных: Погодина Е.С.

Анализ и интерпретация данных: Юрова Е.В.

Написание и редактирование текста: Юрова Е.В., Саенко Ю.В.

Литература

1. Lejay A., Fang F., John R., Van J.A., Barr M., Thaveau F., Chakfe N., Geny B., Scholey J.W. Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus. *J Mol Cell Cardiol.* 2016; 91: 11–22. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.020.
2. Simonis G., Strasser R.H., Ebner B. Reperfusion injury in acute myocardial infarction. *Crit Care.* 2012; 16 (2): A22. DOI: <https://doi.org/10.1186/cc11280>.
3. Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev.* 1999; 79 (3): 917–1017. DOI: 10.1152/physrev.1999.79.3.917.
4. Pierce G.N., Czubyrt M.P. The contribution of ionic imbalance to ischemia/reperfusion-induced injury. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27 (1): 53–63. DOI: 10.1016/s0022-2828(08)80007-7.

5. Schäfer C., Ladilov Y., Inserte J., Schäfer M., Haffner S., Garcia-Dorado D., Piper H.M. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovascular Research*. 2001; 51 (2): 250. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00282-6).
6. Sanada S., Komuro I., Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301 (5): H1723-41. DOI: 10.1152/ajpheart.00553.2011.
7. Hausenloy D.J., Yellon D.M. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol*. 2016; 13 (4): 193–209. DOI: 10.1038/nrcardio.2016.5.
8. Garcia-Dorado D., Ruiz-Meana M., Inserte J., Rodriguez-Sinovas A., Piper H.M. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2012; 94 (2): 168–180. DOI: 10.1093/cvr/cvs116.
9. Hausenloy D.J., Yellon D.M. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2003; 35 (4): 339–341. DOI: 10.1016/s0022-2828(03)00043-9.
10. Yang F., Hanon S., Lam P., Schweitzer P. Quinidine Revisited. *The American Journal of Medicine*. 2009; 122 (4): 317–321. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.11.019>.
11. Holstege C.P., Rushton W. Procainamide. In: *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier; 2014: 1070–1072.
12. Deshmukh A., Larson J., Ghannam M., Saeed M., Cunnane R., Ghanbari H., Latchamsetty R., Crawford T., Jongnarangsin K., Pelosi F., Chugh A., Oral H., Morady F., Bogun F., Liang J. Efficacy and tolerability of quinidine as salvage therapy for monomorphic ventricular tachycardia in patients with structural heart disease. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 2021; 32 (12): 3173–3178. DOI: <http://doi.org/10.1111/jce.15260>.
13. Kelson K., deSouza I. Procainamide Versus Amiodarone for Stable Ventricular Tachycardia. *Acad Emerg Med*. 2019; 26 (9): 1099–1101. DOI: 10.1111/acem.13767.
14. Stoschitzky K., Stoschitzky G., Lercher P., Brussee H., Lamprecht G., Lindner W. Propafenone shows class Ic and class II antiarrhythmic effects. *Europace*. 2016; 18 (4): 568–571. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/europace/euv195>.
15. Andrikopoulos G.K., Pastromas S., Tzeis S. Flecainide: Current status and perspectives in arrhythmia management. *World J Cardiol*. 2015; 7 (2): 76–85. DOI: 10.4330/wjc.v7.i2.76.
16. Nakamura T., Kashimoto S., Oguchi T., Kumazawa T. Effects of propafenone on function and metabolism in the ischemic working rat heart. *Heart Vessels*. 1992; 7 (4): 169–174. DOI: 10.1007/BF01744601.
17. Liu J.X., Tanonaka K., Yamamoto K., Takeo S. Propafenone and disopyramide enhance post-ischemic contractile and metabolic recovery of perfused hearts. *Eur J Pharmacol*. 1993; 250 (3): 361–369. DOI: 10.1016/0014-2999(93)90022-a.
18. Louis A. Brunsting, Michael E. Jessen, Anwar S. Abd-Elfattah, W. Kenneth Mask, Christopher K. Godwin, Andrew S. Wechsler. Myocardial protective effects of the class Ic antiarrhythmic agent flecainide. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1987; 94 (6): 904–910. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(19\)36163-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(19)36163-X).
19. Dos Santos W.F. Spider and wasp neurotoxins. In: *Botulinum Toxin*. Elsevier; 2009: 471–484. DOI: 10.1016/B978-1-4160-4928-9.00038-X.
20. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018; 2018 (6). DOI: 10.1101/pdb.prot095497.
21. Ji X., Xu Z., Criswell H.E., Boysen P.G. Propyl paraben inhibits voltage-dependent sodium channels and protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury. *Life Sci*. 2004; 74 (24): 3043–3052. DOI: 10.1016/j.lfs.2003.11.007.
22. Le Grand B., Pignier C., Létienné R., Cuisiat F., Rolland F., Mas A., Vacher B. Sodium late current blockers in ischemia reperfusion: is the bullet magic? *J Med Chem*. 2008; 51 (13): 3856–3866. DOI: 10.1021/jm800100z.
23. Yang C.K., Yang S.Q., Tan S.T. Effects of cardioplegia with tetrodotoxin on intracellular sodium overload of ischemia/reperfusion cardiomyocytes. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. Chinese. 2009; 25 (1): 23–26.
24. Tanonaka K., Takasaki A., Kajiwara H., Takeo S. Contribution of sodium channel and sodium/hydrogen exchanger to sodium accumulation in the ischemic myocardium. *Gen Pharmacol*. 2000; 34 (3): 167–174. DOI: 10.1016/s0306-3623(00)00057-4.

25. Zhang M., Liu Q., Meng H., Duan H., Liu X., Wu J., Gao F., Wang S., Tan R., Yuan J. Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2024; 9 (1): 12. DOI: 10.1038/s41392-023-01688-x.
26. Pedriali G., Ramaccini D., Bouhamida E., Wieckowski M.R., Giorgi C., Tremoli E., Pinton P. Perspectives on mitochondrial relevance in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Front Cell Dev Biol.* 2022; 10: 1082095. DOI: 10.3389/fcell.2022.1082095.

Поступила в редакцию 23.12.2024; принята 12.02.2025.

Авторский коллектив

Юрова Елена Валерьевна – младший научный сотрудник НИТИ имени С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: urovaev523@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7484-2671>.

Расторгуева Евгения Владимировна – младший научный сотрудник НИТИ имени С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: rastorgueva.e.v@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1518-4677>.

Белобородов Евгений Алексеевич – научный сотрудник НИТИ имени С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: beloborodov.evgeniy.a@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5666-5154>.

Сугак Дмитрий Евгеньевич – младший научный сотрудник НИТИ имени С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: dmitriysugak@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3276-8976>.

Погодина Евгения Сергеевна – кандидат биологических наук, начальник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин НИТИ имени С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: janeg1411@ya.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8183-5103>.

Саенко Юрий Владимирович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник НИТИ имени С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: saenkojuv@yandex.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4402-1482>.

Образец цитирования

Юрова Е.В., Расторгуева Е.В., Белобородов Е.А., Сугак Д.Е., Погодина Е.С., Саенко Ю.В. Пептидный токсин, нацеленный на натриевые каналы, в модели ишемически-реперфузионной клеточной гибели. *Ульяновский медико-биологический журнал.* 2025; 1: 93–103. DOI: 10.34014/2227-1848-2025-1-93-103.

PEPTIDE TOXIN TARGETING SODIUM CHANNELS IN THE MODEL OF ISCHEMIA-REPERFUSION CELL DEATH

E.V. Yurova, E.V. Rastorgueva, E.A. Beloborodov, D.E. Sugak,
E.S. Pogodina, Yu.V. Saenko

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

Myocardial infarction is one of the most common cardiovascular diseases worldwide. Interruption of coronary blood flow subjects cardiomyocytes to stress, while reperfusion reintroduces substrate and oxygen, providing a sharp normalization of the intracellular milieu. All this paradoxically increases cell death, resulting in ischemia-reperfusion injury. It has long been known that sodium overload in the myocardium is one of the most important mechanisms underlying the ischemia-reperfusion injury. In our work, we used mu-agatoxin-Aa1a to reduce the influx of Na⁺ at the reperfusion stage and, thereby, to reduce damage. Objective. The aim of the study is to examine the effect of mu-agatoxin-Aa1a on cardiomyocyte cell death in an in vitro ischemia-reperfusion injury model.

Materials and Methods. The study was performed on H9C2 cardiomyocyte culture. Fluorescence microscopy was used to assess the apoptosis and necrosis levels, and sodium ion concentration. Spectrophotometric method for determining lactate dehydrogenase concentration was used to confirm the necrosis level. The ischemia-reperfusion injury model was based on 18-hour culture incubation in the medium with partial glucose, serum, and oxygen deprivation, followed by transfer to a nutrient medium for 2 hours. The toxin was added at the beginning of the reperfusion stage

Results: In case of increased cell death caused by apoptosis and necrosis in the ischemia-reperfusion injury model, the addition of toxin at a concentration of 50 nM causes an increase in cell survival due to a decrease in the sodium ion concentration.

Conclusion. The peptide toxin mu-agatoxin-Aa1a, which targets sodium voltage-gated channels and can change their conductance, at a concentration of 50 nM significantly reduces cardiomyocyte death in an in vitro model of ischemia-reperfusion injury.

Key words: ischemia, reperfusion, cardiomyocytes, sodium channels, peptide toxin.

The work is financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FEUF-2022-0008).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Research concept and design: Saenko Yu.V., Yurova E.V.

Literature search, participation in the study, data processing: Yurova E.V., Rastorgueva E.V.

Beloborodov E.A., Sugak D.E.

Statistical data processing: Pogodina E.S.

Data analysis and interpretation: Yurova E.V.

Text writing and editing: Yurova E.V., Saenko Yu.V.

References

1. Lejay A., Fang F., John R., Van J.A., Barr M., Thaveau F., Chakfe N., Geny B., Scholey J.W. Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus. *J Mol Cell Cardiol.* 2016; 91: 11–22. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.020.
2. Simonis G., Strasser R.H., Ebner B. Reperfusion injury in acute myocardial infarction. *Crit Care.* 2012; 16 (2): A22. DOI: <https://doi.org/10.1186/cc11280>.
3. Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev.* 1999; 79 (3): 917–1017. DOI: 10.1152/physrev.1999.79.3.917.
4. Pierce G.N., Czubyrt M.P. The contribution of ionic imbalance to ischemia/reperfusion-induced injury. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27 (1): 53–63. DOI: 10.1016/s0022-2828(08)80007-7.
5. Schäfer C., Ladilov Y., Inverte J., Schäfer M., Haffner S., Garcia-Dorado D., Piper H.M. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovascular Research.* 2001; 51 (2): 250. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00282-6).
6. Sanada S., Komuro I., Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 301 (5): H1723–41. DOI: 10.1152/ajpheart.00553.2011.
7. Hausenloy D.J., Yellon D.M. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol.* 2016; 13 (4): 193–209. DOI: 10.1038/nrcardio.2016.5.
8. Garcia-Dorado D., Ruiz-Meana M., Inverte J., Rodriguez-Sinovas A., Piper H.M. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2012; 94 (2): 168–180. DOI: 10.1093/cvr/cvs116.
9. Hausenloy D.J., Yellon D.M. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35 (4): 339–341. DOI: 10.1016/s0022-2828(03)00043-9.
10. Yang F., Hanon S., Lam P., Schweitzer P. Quinidine Revisited. *The American Journal of Medicine.* 2009; 122 (4): 317–321. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.11.019>.
11. Holstege C.P., Rushton W. Procainamide. In: *Encyclopedia of Toxicology.* Elsevier; 2014: 1070–1072.

12. Deshmukh A., Larson J., Ghannam M., Saeed M., Cunnane R., Ghanbari H., Latchamsetty R., Crawford T., Jongnarangsin K., Pelosi F., Chugh A., Oral H., Morady F., Bogun F, Liang J. Efficacy and tolerability of quinidine as salvage therapy for monomorphic ventricular tachycardia in patients with structural heart disease. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 2021; 32 (12): 3173–3178. DOI: <http://doi.org/10.1111/jce.15260>.
13. Kelson K., deSouza I. Procainamide Versus Amiodarone for Stable Ventricular Tachycardia. *Acad Emerg Med*. 2019; 26 (9): 1099–1101. DOI: 10.1111/acem.13767.
14. Stoschitzky K., Stoschitzky G., Lercher P., Brussee H., Lamprecht G., Lindner W. Propafenone shows class Ic and class II antiarrhythmic effects. *Europace*. 2016; 18 (4): 568–571. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/europace/euv195>.
15. Andrikopoulos G.K., Pastromas S., Tzeis S. Flecainide: Current status and perspectives in arrhythmia management. *World J Cardiol*. 2015; 7 (2): 76–85. DOI: 10.4330/wjc.v7.i2.76.
16. Nakamura T., Kashimoto S., Oguchi T., Kumazawa T. Effects of propafenone on function and metabolism in the ischemic working rat heart. *Heart Vessels*. 1992; 7 (4): 169–174. DOI: 10.1007/BF01744601.
17. Liu J.X., Tanonaka K., Yamamoto K., Takeo S. Propafenone and disopyramide enhance post-ischemic contractile and metabolic recovery of perfused hearts. *Eur J Pharmacol*. 1993; 250 (3): 361–369. DOI: 10.1016/0014-2999(93)90022-a.
18. Louis A. Brunsting, Michael E. Jessen, Anwar S. Abd-Elfattah, W. Kenneth Mask, Christopher K. Godwin, Andrew S. Wechsler. Myocardial protective effects of the class Ic antiarrhythmic agent flecainide. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1987; 94 (6): 904–910. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(19\)36163-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(19)36163-X).
19. Dos Santos W.F. Spider and wasp neurotoxins. In: *Botulinum Toxin*. Elsevier; 2009: 471–484. DOI: 10.1016/B978-1-4160-4928-9.00038-X.
20. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018; 2018 (6). DOI: 10.1101/pdb.prot095497.
21. Ji X., Xu Z., Criswell H.E., Boysen P.G. Propyl paraben inhibits voltage-dependent sodium channels and protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury. *Life Sci*. 2004; 74 (24): 3043–3052. DOI: 10.1016/j.lfs.2003.11.007.
22. Le Grand B., Pignier C., Létienné R., Cuisiat F., Rolland F., Mas A., Vacher B. Sodium late current blockers in ischemia reperfusion: is the bullet magic? *J Med Chem*. 2008; 51 (13): 3856–3866. DOI: 10.1021/jm800100z.
23. Yang C.K., Yang S.Q., Tan S.T. Effects of cardioplegia with tetrodotoxin on intracellular sodium overload of ischemia/reperfusion cardiomyocytes. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi. Chinese*. 2009; 25 (1): 23–26.
24. Tanonaka K., Takasaki A., Kajiwara H., Takeo S. Contribution of sodium channel and sodium/hydrogen exchanger to sodium accumulation in the ischemic myocardium. *Gen Pharmacol*. 2000; 34 (3): 167–174. DOI: 10.1016/s0306-3623(00)00057-4.
25. Zhang M., Liu Q., Meng H., Duan H., Liu X., Wu J., Gao F., Wang S., Tan R., Yuan J. Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2024; 9 (1): 12. DOI: 10.1038/s41392-023-01688-x.
26. Pedriali G., Ramaccini D., Bouhamida E., Wieckowski M.R., Giorgi C., Tremoli E., Pinton P. Perspectives on mitochondrial relevance in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 1082095. DOI: 10.3389/fcell.2022.1082095.

Received December 23, 2024; accepted February 12, 2025.

Information about the authors

Yurova Elena Valer'evna, Junior Researcher, Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: urovaev523@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7484-2671>.

Rastorgueva Evgeniya Vladimirovna, Junior Researcher, Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: rastorgueva.e.v@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1518-4677>.

Beloborodov Evgeniy Alekseevich, Researcher, Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: beloborodov.evgeniy.a@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5666-5154>.

Sugak Dmitriy Evgen'evich, Junior Researcher, Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: dmitriysugak@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3276-8976>.

Pogodina Evgeniya Sergeevna, Candidate of Sciences (Biology), Head of the Laboratory for the Development of Peptide Drugs and Vaccines, Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: janeg1411@ya.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8183-5103>.

Saenko Yuriy Vladimirovich, Doctor of Sciences (Biology), Leading Researcher, Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: saenkoyv@yandex.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4402-1482>.

For citation

Yurova E.V., Rastorgueva E.V., Beloborodov E.A., Sugak D.E., Pogodina E.S., Saenko Yu.V. Peptidnyy toksin, natselenny na natrievye kanaly, v modeli ishemicheski-reperfuzionnoy kletochnoy gibeli [Peptide toxin targeting sodium channels in the model of ischemia-reperfusion cell death]. *Ulyanovskiy mediko-biologicheskiy zhurnal*. 2025; 1: 93–103. DOI: 10.34014/2227-1848-2025-1-93-103 (in Russian).