

Р. Б. Струтинський, О. О. Мойбенко

Моделювання активності АТФ-залежних калієвих каналів у аорті нормотензивних і гіпертензивних тварин

Показано, что вазодилататорные эффекты нового фторсодержащего активатора АТФ-зависимых калиевых каналов — флокалина — зависят от характера повышения исходного сосудистого тонуса. Норадrenalин и, особенно, ангиотензин II частично ингибируют вазодилататорные эффекты флокалина. У животных со спонтанной артериальной гипертензией ингибирующее влияние ангиотензина II усилено. При вазоконстрикции, вызванной калиевой деполяризацией, вазодилататорные свойства флокалина практически не отличаются у нормотензивных и гипертензивных животных, тогда как вазодилататорные эффекты ацетилхолина у последних существенно ослаблены. Это позволяет считать перспективным использование флокалина при гипертензиях.

Вступ

АТФ-залежні калієві канали гладенько-м'язових клітин відіграють велику роль у регуляції судинного тонусу та беруть участь у патогенезі серцево-судинних захворювань, які супроводжуються гіпоксією та ішемією тканини. Особливістю цих каналів є те, що при дефіциті енергії вони не пригнічуються, а навпаки, активуються, і, як наслідок — гіперполяризація клітинної мембрани, вазодилатація, збільшення кровопостачання тканин та відновлення їх енергоресурсів. Для активування каналів широко використовують їх синтетичні активатори, в даній же роботі ми використали новий вітчизняний фторвмісний активатор АТФ-залежних калієвих каналів — флокалін.

Відомо, що такі важливі вазодилататори, як аденозин [18], ацетилхолін [7, 16], простагліцилін [5], β -агоністи [15], кальцитонін ген-релаксуючий пептид [22], оксид азоту [14], арахідонова кислота [2], ендотелійзалежний гіперполяризуючий фактор [7, 16] та деякі інші частково реалізують свої ефекти через АТФ-залежні калієві канали. Є дані, що деякі з них можуть активувати ці канали через моделювання активності протеїнкінази А [17]. І навпаки, є відомості, що такі потужні вазоконстриктори, як ендотелін [10, 13], ангіотензин [11, 12], вазопресин [21], фенілефрин [4], нейропептид Y [4] можуть пригнічувати активність АТФ-залежних калієвих каналів гладенько-м'язових клітин, через активування протеїнкінази С [17]. У той же час відомо, що, активування протеїнкінази С у кардіоміоцитах, навпаки, призводить до підсилення активності як сарколемальних, так і мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів [3]. Є дані, що потужні вазоконстриктори діють на гладенько-м'язові судинні клітини декількома окремими шляхами, в яких задіяні не лише механізми, які деполяри-

© Р. Б. Струтинський, О. О. Мойбенко

зують клітинну мембрану та збільшують внутрішньоклітинний вміст Ca^{2+} , але й інгібують калієві канали, що підтримують мембранний потенціал спокою на негативному рівні. Так, відомо, що ангіотензин II не тільки збільшує вміст внутрішньоклітинного Ca^{2+} , а також активує неселективні катіонні канали судин вуха кроля [9], пригнічує K_v канали портальної вени кроля [6], великі кальційзалежні калієві канали коронарної артерії [20], АТФ-залежні калієві канали мезентеріальної артерії щура [11] та коронарної артерії свині [12].

Отже, моделювання активності АТФ-залежних каналів різними нейромедіаторами, вазодилататорами та вазоконстрикторами, їх взаємодія між собою, може відігравати важливу роль у контролі судинного тонусу.

З метою визначення взаємовідносин різних механізмів регуляції судинного тонусу ми досліджували вазодилаторні ефекти флокаліну при вихідному підвищенні судинного тонусу різного генезу (гіперкалієва деполаризація, норадреналін, ангіотензин II).

Методика

Досліди проведені на ізольованих, перфузованих нормальним розчином Кребса при 37°C , кільцевих смужках аорти морської свинки та щурів з нормальним рівнем систолічного тиску — нормотензивних ($119 \text{ мм рт. ст.} \pm \pm 11 \text{ мм рт. ст.}$, $n = 15$) та щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією — спонтанно гіпертензивних (рівень систолічного артеріального тиску — $160 \text{ мм рт. ст.} \pm 10 \text{ мм рт. ст.}$, $n = 12$). Використовували тварин масою $0,2\text{--}0,25 \text{ кг}$. Ізольовані судинні кільця мали діаметр 2 мм , ширину $1,5 \text{ мм}$. Усі тестування проводили в ізометричному режимі при початково заданій напруженості, при якій вони генерували максимальну силу у відповідь на інфузію норадреналіну (10 мкмоль/л). Дослідження вазодилаторних ефектів флокаліну проводили на фоні підвищеного судинного тонусу препаратів аорти, який отримували за допомогою попереднього використання норадреналіну, або ангіотензину II, або гіперкалієвого розчину Кребса. Автоматичний термостат дозволяв підтримувати температуру розчину в камері 37°C з точністю до $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Робочий розчин насичували киснем за допомогою карбогену. Перед вимірюванням препарати, закріплені в експериментальній камері, витримували протягом 60 хв у нормальному розчині Кребса такого складу (в ммоль/л): $\text{NaCl} - 120,4$; $\text{KCl} - 5,9$; $\text{NaHCO}_3 - 15,5$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 1,2$; $\text{MgCl}_2 - 1,2$; $\text{CaCl}_2 - 2,5$; глюкоза — $11,5$. Гіперкалієвий розчин Кребса виготовляли еквімолярною заміною NaCl на KCl , кінцева молярність яких була (в ммоль/л): $\text{NaCl} - 36,3$ та $\text{KCl} - 90$ відповідно.

Солі, використані для приготування нормального та гіперкалієвого розчинів Кребса, а також норадреналін, ангіотензин II, ацетилхолін та аденозин були виробництва фірми «Sigma Chemical» (США). Перед використанням флокалін розчиняли в диметилацетаміді (вироблені співробітниками Інституту органічної хімії НАН України).

Концентрація диметилацетаміду в експериментальній камері не перевищувала $0,1 \%$. Ця концентрація розчинника викликала зменшення напруження судинного тонусу від вихідного рівня у середньому на $2,7 \% \pm 0,2 \%$

($n = 12$; $P < 0,05$). Цілісність судинного ендотеліального шару клітин визначали за наявністю ендотелійзалежних реакцій на ацетилхолін (1 мкмоль/л).

Результати дослідження обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ розглядали як статистично достовірні.

Результати та їх обговорення

У I серії в досліджах на морських свинках, нами було проведено порівняльне дослідження вазомоторних реакцій, опосередкованих активацією АТФ-залежних калієвих каналів флокаліном на фоні підвищення судинного тонуусу гіперкалієвим розчином Кребса, норадреналіном (10 мкмоль/л) та ангіотензином II (1 мкмоль/л) в аорті морських свинок. Як контроль використовували максимальні вазодилаторні реакції на аденозин (1 ммоль/л) на фоні норадреналінової деполяризації. Як свідчать отримані результати, флокалін (0,1 ммоль/л) розслаблює аорту морської свинки від вихідного рівня — рівня максимального підвищення тонуусу препаратів різними вазоконстрикторними впливами — у середньому на $28,39 \pm 3,1$ ($n = 11$; $P < 0,001$), $24,12 \pm 2,4$ ($n = 12$; $P < 0,03$) та $39,23\% \pm 4,72\%$ ($n = 11$; $P < 0,001$) на фоні норадреналінової, ангіотензинової та гіперкалієвої деполяризації відповідно (рис. 1). Отже, вазодилаторні ефекти флокаліну,

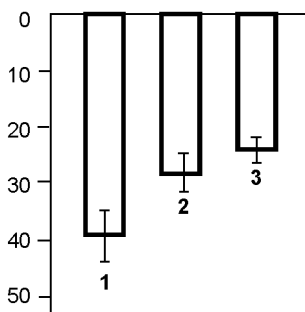


Рис. 1. Залежність напруженості судинної смужки (P, %) в аорті морської свинки від типу попередньої вазоконстрикції: 1 — гіперкалієвий розчин Кребса і флокалін; 2 — норадреналін і флокалін; 3 — ангіотензин II і флокалін. За 100 % прийнято максимальне зменшення напруженості аорти морської свинки при дії аденозину (1 ммоль/л). $P_{1,2} < 0,04$; $P_{1,3} < 0,04$; $P_{2,3} < 0,05$.

викликані активацією АТФ-залежних калієвих каналів на фоні норадреналінової та ангіотензинової деполяризації були значно меншими, ніж викликані флокаліном при калієвій деполяризації. Це може свідчити про те, що норадреналін та ще більшою мірою ангіотензин II можуть частково пригнічувати активність АТФ-залежних калієвих каналів гладенько-м'язових клітин аорти морської свинки, а їх сила інгібування вазодилаторних ефектів флокаліну становила у середньому $27,63 \pm 7,9$ ($n = 11$; $P < 0,05$) та $38,52\% \pm 5,14\%$ ($n = 12$; $P < 0,03$) відповідно.

В двох інших серіях дослідів вивчали вазодилаторні ефекти флокаліну на фоні ангіотензинової вазоконстрикції на препаратах аорти спонтанно гіпертензивних і нормотензивних щурів. Як і в досліджах на аорті морської свинки за тією ж схемою експерименту, в аорті щурів також виявлено пригнічення вазодилаторних ефектів флокаліну ангіотензином II, порівняно з вазодилаторними реакціями на флокалін на фоні калієвої деполяризації. Часткове пригнічення ефектів флокаліну ангіотензином II становило у середньому $40,04 \pm 2,8$ ($n = 9$; $P < 0,005$) та $49,09\% \pm 1,85\%$ ($n = 9$;

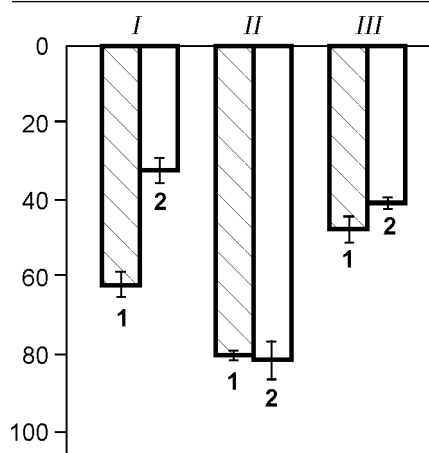


Рис. 2. Залежність напруженості судинної смужки (ΔP , %) в аорті нормотензивних (1) і гіпертензивних (2) щурів від типу попередньої вазоконстрикції: I – гіперкальцевий розчин Кребса та ацетилхолін; II – гіперкальцевий розчин Кребса і флокалін; III – ангіотензин II і флокалін. $P < 0,05$.

$P < 0,002$) на препаратах аорти нормотензивних і спонтанно гіпертензивних щурів відповідно (рис. 2), тобто інгібування вазодилаторних ефектів при спонтанній гіпертензії було більше на 22,6 %.

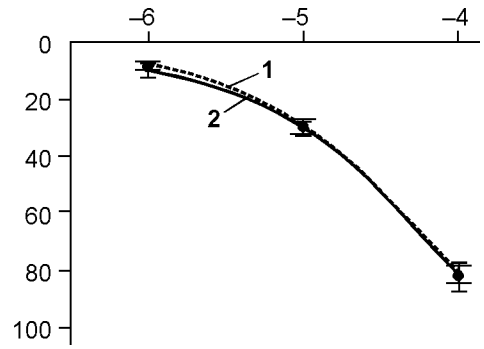
Слід зауважити, що вазодилаторні реакції у спонтанно гіпертензивних щурів були істотно зміненими; так, вазоконстрикторна дія ангіотензину II посилювалась в аорті спонтанно гіпертензивних щурів у середньому на $54,5\% \pm 1,58\%$ ($n = 17$; $P < 0,001$), в той же час, вазодилаторні реакції на ацетилхолін значно (в два рази), зменшувалися порівняно з реакціями на ацетилхолін у нормотензивних щурів і становили у середньому $32,5 \pm 3,48$ ($n = 13$; $P < 0,05$) проти $62,28\% \pm 2,9\%$ ($n = 16$; $P < 0,01$) у контролі (див. рис. 2). Ці результати збігаються з уявленнями про порушення синтетичної функції ендотелію за умов спонтанної гіпертензії, що призводять до зменшення продукції оксиду азоту і відповідно до зменшення вазодилаторних реакцій [9].

Виникає питання – чи справді збільшення ангіотензинового пригнічення ефектів активації АТФ-залежних калієвих каналів у гіпертензивних тварин є наслідком більш потужної дії ангіотензину II, чи може це збільшення початково зумовлено погіршеною здатністю цих каналів до активування або їх меншою кількістю в аорті гіпертензивних тварин? Для відповіді на це питання нами було проведено порівняльне дослідження вазодилаторних ефектів флокаліну на фоні калієвої деполяризації в аорті нормотензивних і спонтанно гіпертензивних щурів з побудовою кривих доза – ефект (рис. 3). Криві практично збігаються – розбіжність між ними не перевищує 1,67 % і це при тому, що вазодилаторний ефект флокаліну при концентрації 0,1 ммоль/л сягає 82 % ($P < 0,02$; $n = 7$).

Отже, виявлено, що дія флокаліну на аорту спонтанно гіпертензивних щурів є не меншою за вазодилаторну дію на аорту нормотензивних щурів. Це може свідчити про те, що здатність АТФ-залежних калієвих каналів активуватися та їх кількість за умов артеріальної гіпертензії практично не змінюється, що в свою чергу зумовлює можливість застосування їх активаторів у терапевтичних цілях.

Таким чином, беручи до уваги практично нормальне функціонування АТФ-залежних калієвих каналів у судинах спонтанно гіпертензивних щурів, та їх потужніше пригнічення ангіотензином II, ми можемо припустити, що підвищення судинного тону та внаслідок цього збільшення кров'яного тиску при спонтанній артеріальній гіпертензії відбувається не лише через погіршення дії такого важливого вазодилатора, як ацетилхолін (внаслідок

Рис. 3. Залежність вазодилататорних реакцій аорти щурів від діючої концентрації флокаліну на фоні калієвої деполяризації: 1 – нормотензивні щури; 2 – гіпертензивні щури. По осі ординат – зменшення напруженості судинної смужки (ΔP , %); по осі абсцис – логарифм концентрації флокаліну ($\lg C$, моль/л).



док можливого ураження судинного ендотеліального шару), але й за ра-

хунок більшого інгібування АТФ-залежних калієвих каналів таким вазоконстриктором, як ангіотензин II і посиленням його вазоконстрикторної дії в спонтанно гіпертензивних тварин. Разом з цим, досить інтенсивні реакції на активацію АТФ-залежних калієвих каналів в аорті гіпертензивних щурів – вазодилататорна дія флокаліну на фоні ангіотензинової вазоконстрикції становила у середньому $41,88\% \pm 1,58\%$ ($n = 9$; $P < 0,002$) – дають нам підстави сподіватися на можливе використання активаторів цих каналів у клініці, що в свою чергу зумовлює до пошуку нових активаторів згаданих каналів.

Як ми вже раніше повідомляли [1], флокалін (ПФ-5) є представником нового типу активаторів АТФ-залежних калієвих каналів – фторвмісних аналогів пінацедилу, який, як відомо, є активатором сарколемальних і мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів [3]. Досить потужні вазодилататорні реакції на флокалін на фоні калієвої деполяризації свідчать про можливість флокаліну досить сильно активувати саме мітохондріальні АТФ-залежні калієві канали, та на можливе використання флокаліну і подібних йому фторвмісних аналогів пінацедилу не тільки як гіпотензивного препарату, але можливо і як нового кардіопротектора, імітуючого ефект ішемічного прекодиціювання (*precondition*), адже все більше є даних про то, що кардіопротекторний ефект ішемічного прекодиціювання залежить від активування саме мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів у кардіоміоцитах [8].

Висновки

1. На смужках аорти морських свинок і щурів досліджено вазодилататорні реакції нового фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів – флокаліну – при підвищенні судинного тонуусу різного генезу (калієва деполяризація, норадреналін, ангіотензин II).

2. Норадреналін та ще більшою мірою ангіотензин II в аорті морських свинок та ангіотензин II в аорті щурів частково інгібують вазодилататорний ефект флокаліну. В аорті гіпертензивних щурів інгібування ангіотензином цього ефекту порівняно з аналогічним в аорті нормотензивних щурів, збільшується на 22,6%.

3. Вазодилататорні реакції флокаліну на активацію АТФ-залежних калієвих каналів аорти щура на фоні калієвої деполяризації суттєво не відрізняються в дослідгах на спонтанно гіпертензивних і нормотензивних тваринах, тоді як сила реакції на ацетилхолін при гіпертензії різко зменшена.

R. B. Strutinskii, A. A. Moibenko

MODULATION OF K_{ATP} CHANNEL ACTIVITY IN NORMOTENSIVE AND HYPERTENSIVE ANIMALS

It was shown that vasodilatory effects of ATP-sensitive potassium channels opener — flocalin — depend from character of increase of initial vessel tone. Norepinephrine and angiotensin II partially inhibit effects of flocalin, thus they depressed of K_{ATP} channel activity. The inhibitory effect of angiotensin II increases under arterial hypertension conditions. It was shown that vasodilatory effects of flocalin significantly do not distinguish in experiments on normotensive and hypertensive rats under K^+ -depolarization conditions. While the vasodilatory effects acetylcholine on hypertensive rats are significantly diminished. These data suggests that flocalin could be a perspective substance for treatment of hypertension.

*A.A.Bogomoletz Institute of Physiology
National Academy of Science of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М. Дослідження вазомоторних ефектів нових фторвмісних синтетичних активаторів АТФ-залежних калієвих каналів // Фізіол. журн. — 2000. — 46, № 4. — С.17-23.
2. Adeagbo A.S., Malik K.U. Contribution of K^+ channels to arachidonic acid-induced endothelium-dependent vasodilation in rat isolated perfused mesenteric arteries // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1991. — 258(2). — P.452-458.
3. Bhatnagar A., Bolli R. Modulation of K_{ATP} channels to protect the ischemic myocardium: clinical implications // Exp. Clin. Cardiol. — 1999. — 4, № 1. — P.20-22.
4. Bonev A.D., and M.T. Nelson. Vasoconstrictors inhibit ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle through protein kinase C // J. Gen. Physiol. — 1996. — 108. — P.315-323.
5. Bouhard J.F., E. Dumont, D. Lamontagne. Evidence that prostaglandins I_2 , E_2 , and D_2 may activate ATP-sensitive potassium channels in the isolated rat heart // Cardiovasc. Res. — 1994. — 28. — P.901-905.
6. Clement-Chomienne O., Walsh M.P., Cole W.C. Angiotensin II activation of protein kinase C decreases delayed rectifier K^+ current in rabbit vascular myocytes // J. Physiol. — 1996. — 495, № 3. — P.689-700.
7. Covan C.L., Palacino J.J., Najibi S., Cohen R.A. Potassium channel mediated relaxation to acetylcholine in rabbit arteries // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1993. — 266. — P.1482-1489.
8. Gross J.G., Fryer R.M. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and myocardial preconditioning // Circulat. Res. — 1999. — 84, №. 9. — P.973-979.
9. Hughes A.D., Bolton T.B. Action of angiotensin II, 5-hydroxytryptamine and adenosine triphosphate on ionic current in single ear artery cell of the rabbit // Brit. J. Pharmacol. — 1995. — 116. — P.2148-2154.
10. Kobayashi S., Nakaya H., Takizawa T., Hara Y., Kimura S., Saito T., Masuda Y. Endothelin-1 partially inhibits ATP-sensitive K^+ current in guinea pig ventricular cells // J. Cardiovasc. Pharmacol. — 1996. — 27, № 1. — P.12-19.
11. Kubo M., J.M. Quayle and N.B. Standen. Angiotensin II inhibition of ATP-sensitive K^+ currents in rat arterial smooth muscle cells through protein kinase C // J. Physiol. — 1997. — 503, № 3. — P.489-496.
12. Miyoshi Y., and Y. Nakaya. Angiotensin II blocks ATP-sensitive K^+ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1991. — 181. — P.700-706.

13. *Miyoshi Y., Nakaya Y., Wakatsuki T., S. Nakaya, K. Fujino, K. Saito and I. Inoue.* Endothelin blocks ATP-sensitive K⁺ channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery // *Circulat. Res.* — 1992. — **70**. — P.612-616.
14. *Murphy M.E., Brayden J.E.* Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels // *J. Physiol.* — 1995. — **486**, № 1. — P.47-58.
15. *Narishige T., Egashira K., Akatsuka Y., Imamura Y., Takahashi T., Kasuya H., Takeshita A.* Glibenclamide prevents coronary vasodilation induced by b₁-adrenoceptor stimulation in dogs // *Amer. J. Physiol.* — 1994. — **266** (Heart Circ. Physiol. 35). — P.H84-H92.
16. *Plane F., Garland C.J.* Differential effects of acetylcholine, nitric oxide and levocabalin on smooth muscle membrane potential and tone in the rabbit basilar artery // *Brit. J. Pharmacol.* — 1993. — **110**. — P.651-656.
17. *Quayle J.M., Nelson M.T., Standen N.B.* ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle // *Physiol. Rev.* — 1997. — **77**, № 4. — P.1165-1232.
18. *Randall M.D.* The involvement of ATP-sensitive potassium channels and adenosine in the regulation of coronary flow in the isolated perfused rat heart // *Brit. J. Pharmacol.* — 1995. — **116**. — P.3068-3074.
19. *Ruschizka F.T., Noll G., Luscher T.F.* The endothelium in coronary artery disease // *Cardiology.* — 1997. — **88**. (suppl 3). — P.3-19.
20. *Toro L., Amador M., Stefani E.* ANG II inhibits calcium-activated potassium channels from coronary smooth muscle in lipid bilayers // *Amer. J. Physiol.* — 1990. — **258**. — P.H912-H915.
21. *Wakatsuki T., Nakaya Y., Inoue I.* Vasopressin modulates K⁺-channel activities of cultured smooth muscle cells from porcine coronary artery // *Ibid.* — 1992. — **263** (Heart Circ. Physiol. 32). — P.H491-H496.
22. *Wellman G.C., Quayle J.M., Standen N.B.* ATP-sensitive K⁺ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle // *J. Physiol.* — 1998. — **507**, № 1. — P.117-129.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця
НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 17.08.2000*