

Р.Б. Струтинський, С.М. Пивовар, Р.А. Ровенець,
О.В. Піскун, Л.М.Ягупольський, О.О. Мойбенко

Вплив активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну на функціонування ізольованого серця

В експериментах на ізольованих, перфузованих по Лангендорфу, серцях самців морської свинки досліджено вплив нового фторсодержащого активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих (K_{ATP}) каналів флокаліна. Показано, що в залежності від дози цей препарат розширює коронарні судини, зменшує кінцеве діастолічне тиск в лівому шлуночку та екстрасистолю. Флокалін практично не впливає на розвиваєме тиск в лівому шлуночку, dP/dt_{max} та dP/dt_{min} , а також на частоту серцевих скорочень. Блокатор K_{ATP} -каналів мітохондріальних мембран – 5-гідроксидеканоїнова кислота (5-ГД) збільшує розвиваєме тиск в лівому шлуночку, dP/dt_{max} та dP/dt_{min} , перфузійне тиск в коронарних судинах. При цьому зменшується кінцеве діастолічне тиск. Блокада K_{ATP} -каналів мітохондріальних мембран не впливає на вазодилаторні ефекти флокаліна в коронарних судинах, що, при допущенні про специфічний вплив 5-ГД, дозволяє нам передбачити участь в цих процесах саме сарколемальних K_{ATP} -каналів. Показано, що угнетення мітохондріальних K_{ATP} -каналів призводить до зменшення кінцево-діастолічного тиску в лівому шлуночку та може сприяти посиленню на нього ефектів флокаліна, що говорить про можливої вільної ролі в цих процесах K_{ATP} -каналів саркоплазматичної мембрани.

ВСТУП

Перспективним підходом до профілактики та лікування серцево-судинних захворювань, які займають одне з перших місць у смертності населення, є фармакологічна активація аденозинтрифосфатзалежних калієвих каналів (K_{ATP} -каналів). Відомо, що K_{ATP} -канали відіграють значну роль у регулюванні судинного тонуусу і беруть участь у патогенезі серцево-судинних захворювань, які супроводжуються гіпоксією та ішемією тканин [9], а в основі одного з ключових природних механізмів кардіопротекції – ішемічного прекодиціювання – лежить активація K_{ATP} -каналів [20], блокатори цих каналів – глібенкламід і 5-гідроксидеканоїнова кислота (5-ГД) також попереджують

такий важливий протекторний механізм, як ішемічне посткодиціювання [23]. Виявляється, що протекторний вплив активації K_{ATP} -каналів можна викликати й за допомогою фармакологічних препаратів, синтетичних активаторів цих каналів [12, 17].

Слід зазначити, що введення атома фтору чи фторвмісної групи в молекулу лікувального препарату дуже часто підвищує його стабільність і стійкість, зменшуючи при цьому токсичність; специфічна активність препарату при цьому не змінюється, а інколи навіть підвищується [22].

Усі ці фактори пояснюють особливий інтерес до фармакологічних агентів – активаторів K_{ATP} -калієвих каналів, а також спроби підвищення їх специфічної дії та зменшення

© Р.Б. Струтинський, С.М. Пивовар, Р.А. Ровенець, О.В. Піскун, Л.М.Ягупольський, О.О. Мойбенко

токсичності за допомогою введення в їх структуру атома фтору або фторвмісної групи.

Одним із перспективних нових активаторів $K_{\text{ATФ}}$ -каналів є флокалін – фторвмісний аналог відомого активатора цих каналів пінацидилу [1]. Він є досить потужним вазодилатором, розслаблює аорту і периферичні судини, як в дослідах *in vitro*, так і *in vivo* [3–6]. Крім того, потужні вазодилаторні ефекти флокаліну в експериментах зі щурами з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією дозволяють припустити можливість застосування цього препарату в медичній практиці як перспективного гіпотензивного лікарського засобу [4]. Досить потужні, хоч і дещо зменшені порівняно з контролем, вазодилаторні властивості флокалін проявляв і в експериментах на тваринах з цукровим діабетом, що був викликаний стрептозотоцином [5]. Усі ці факти про вазодилаторні властивості флокаліну, разом з досить низькою його токсичністю ($LD_{50} = 2150$ мг/кг порівняно з токсичністю ($LD_{50} = 600$ мг/кг) пінацидилу [1,3]) спонукали нас до більш глибокого вивчення властивостей флокаліну.

Метою нашої роботи було дослідження впливу флокаліну на функціонування міокарда та на перфузійний тиск у коронарних судинах.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на ізольованих, перфузованих за Лангендорфом, серцях самців морської свинки масою 250–350 гр. Тварин анестезували уретаном (140–160 мг на 100 г маси) за 10 хв до вилучення серця. Грудну порожнину відкривали на рівні з'єднання ребер і грудини та видаляли серце, яке одразу поміщали в льодовий розчин Кребса–Хензелейта, який містив (ммоль/л): $NaCl - 18,2$, $NaHCO_3 - 25$, $KCl - 4,8$, $MgSO_4 - 1,2$, $KH_2PO_4 - 1,2$, $CaCl_2 - 1,7$, глюкози – 12. Швидкість перфузійного потоку контролювали перистальтичним насосом при підтриманні постійного об'єму перфузії в коронарних судинах ($9,2$ мл/хв $\pm 0,5$ мл/хв). Розчин

фільтрували за допомогою фільтра Sinpore (діаметр пори – 2,0 мкм) і насичували киснем за допомогою карбогену (газовою сумішшю 95 % O_2 і 5 % CO_2). За допомогою автоматичного термостата температуру системи підтримували на рівні $37^\circ C$ з точністю до $\pm 0,5^\circ C$. Реєстрували такі показники: динаміку перфузійного тиску та проток у коронарних судинах за умов постійної об'ємної швидкості перфузії (метод резистографії); зміну скоротливої діяльності серця та кінцевий діастолічний тиск, які визначали за змінами тиску в латексному балончику, який вводили в лівий шлуночок; частоту серцевих скорочень (ЧСС). Реєстрацію здійснювали за допомогою приладу Mingograf 34 (“Elema”, Швеція).

Флокалін розчиняли в диметилацетаміді, кінцева концентрація якого в перфузуючому розчині не перевищувала 0,02 % і не впливала на функціональну діяльність серця та перфузійний тиск у коронарних судинах. Солі, використані для приготування розчину Кребса–Хензелейта та 5-ГД були виробництва фірми “Sigma Chemical” (США). Флокалін і диметилацетамід були синтезовані співробітниками Інституту органічної хімії НАН України.

Досліджували вплив флокаліну (I серія), а також вплив флокаліну при блокуванні $K_{\text{ATФ}}$ -каналів мітохондріальних мембран за допомогою 5-ГД (II серія).

У I серії ізольоване серце перфузували флокаліном протягом 5 хв, використовували концентрації 1–10 мкмоль/л. У II серії – попередньо, за 5 хв до введення флокаліну (5 хв – 10 мкмоль/л) в експериментальну камеру починали подавати 5-ГД (200 мкмоль/л) і продовжували його подачу разом з флокаліном, ще протягом 5 хв.

Отримані результати обробляли математично за методом варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Origin 6.0. Достовірність результатів визначали за критерієм *t* Стьюдента. Значення $P < 0,05$ розглядали як статистично достовірні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У I серії експериментів показано, що флокалін проявляє дозозалежні вазодилаторні властивості. Максимальні ефекти розслаблення коронарних судин (зменшення перфузійного тиску в коронарних судинах у середньому на 19,43 мм рт.ст. \pm 5,65 мм рт.ст., $n=10$, $P<0,008$ від вихідного рівня) відбувалися при його концентрації в перфузуючому розчині 10 мкмоль/л і становили в середньому 22,09 % \pm 4,69 % від вихідного рівня (рис. 1, а). При використанні флокаліну в концентраціях 1 і 5 мкмоль/л перфузійний тиск у коронарних судинах відповідно зменшувався у середньому на 11,94 % \pm 2,16 % ($n=5$, $P<0,006$) та на 20,23 % \pm 2,14 % ($n=5$, $P<0,01$) від вихідного рівня. Зміну перфузійного тиску при дії флокаліну (10 мкмоль/л) відображено на рис. 2. Це є досить близьким до отриманих нами раніше даних про вазодилаторні ефекти іншого фторвмісного активатора K_{ATP} -каналів – ПФ-10 [3, 7]. Швидкість кровотоку коронарних судин при цьому практично не змінювався і становив $9,35 \pm 0,54$ порівняно з $9,15$ мл/хв \pm 0,54 мл/хв ($n=12$) у контролі.

Блокатор K_{ATP} -каналів мітохондріальних мембран – 5-ГД мав тенденцію до збільшення перфузійного тиску в коронарних судинах у середньому на 4,3 % \pm 0,46 % від вихідного рівня (див. рис. 1, а; 2, б). При дії 5-ГД перфузійний тиск становив у середньому $88,74 \pm 17,39$ порівняно з $84,79$ мм рт.ст. \pm 16,42 мм рт.ст. у контролі 5-хвилинна інфузія флокаліну на фоні блокади мітохондріальних K_{ATP} -каналів за допомогою 5-ГД знижувала перфузійний коронарний тиск від вихідного рівня у середньому на 24,34 % \pm 1,97 % ($n=5$; $P<0,01$), перфузійний тиск знижувався у середньому до $64,47 \pm 15,12$ порівняно з $84,79$ мм рт.ст. \pm 16,42 мм рт.ст. у контролі (див. рис. 1, а).

Порівняння ефектів флокаліну з блокадою та без блокади мітохондріальних K_{ATP} -каналів (24,34 порівняно з 22,09 % відповідно) дозволяє припустити, що його вазодила-

таторні ефекти в коронарних судинах відбуваються безпосередньо завдяки активуванню сарколемальних K_{ATP} -каналів. Так, відомо останні, аденозин, NO тощо призводять до розслаблення коронарних судин,

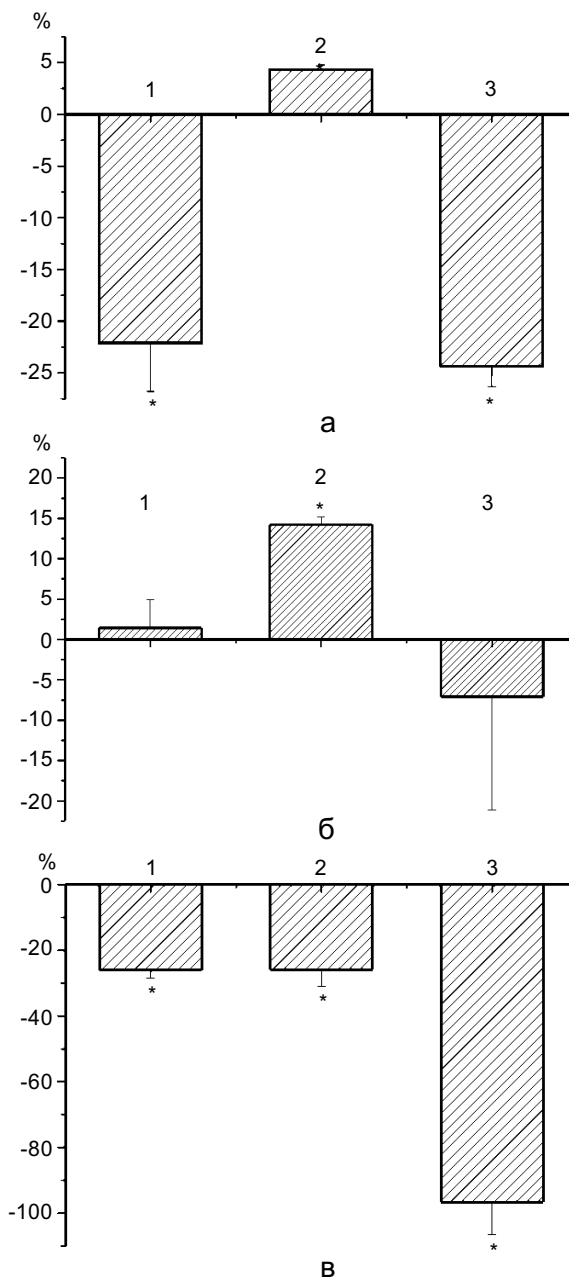


Рис. 1. Зміна перфузійного коронарного тиску (а), тиску в лівому шлуночку (б), кінцево-діастолічного тиску (в) при дії модуляторів активності аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів: 1 – флокалін, 2 – 5-гідроксидеканоїнової кислоти, 3 – гідроксидеканоїнової кислоти та флокаліну

збільшення коронарного кровотоку та посилення постачання кисню та енергоресурсів до тканин, що особливо важливо за умов гіпоксії [16, 18]. Щодо питання про участь K_{ATP} -каналів мітохондріальних мембран у коронарорітичних процесах, то воно ще залишається відкритим. Слід зауважити, що активування мітохондріальних K_{ATP} -каналів ізольованих смужок аорти призводить до їх розслаблення, що вказує їх на участь у вазодилаторних ефектах активаторів K_{ATP} -каналів у аорті [2]. Таким чином, є певна відмінність у функціонуванні K_{ATP} -каналів мітохондріальних мембран у коронарних та інших судинах. Можливо, в коронарних судинах мі-

то K_{ATP} -канали можуть мати пріоритетні функції, пов'язані з процесами окисного фосфорилування в мітохондріях і збереженням нормального функціонування мітохондрій, особливо при розвитку патологічних процесів, пов'язаних з гіпоксією й ішемією міокарда [10].

Флокалін має деякий вплив і на скоротливу діяльність серця – у середньому менше ніж на 1,5 % (n=18, див. рис. 1,б). Незалежно від концентрації, в окремих випадках відбувалась її недостовірна зміна, як у бік збільшення, так і у бік зменшення тиску в лівому шлуночку (див. рис. 2). Практично не було впливу флокаліну на dP/dt_{max} і dP/dt_{min} . Наші результати дещо збігаються з описаним

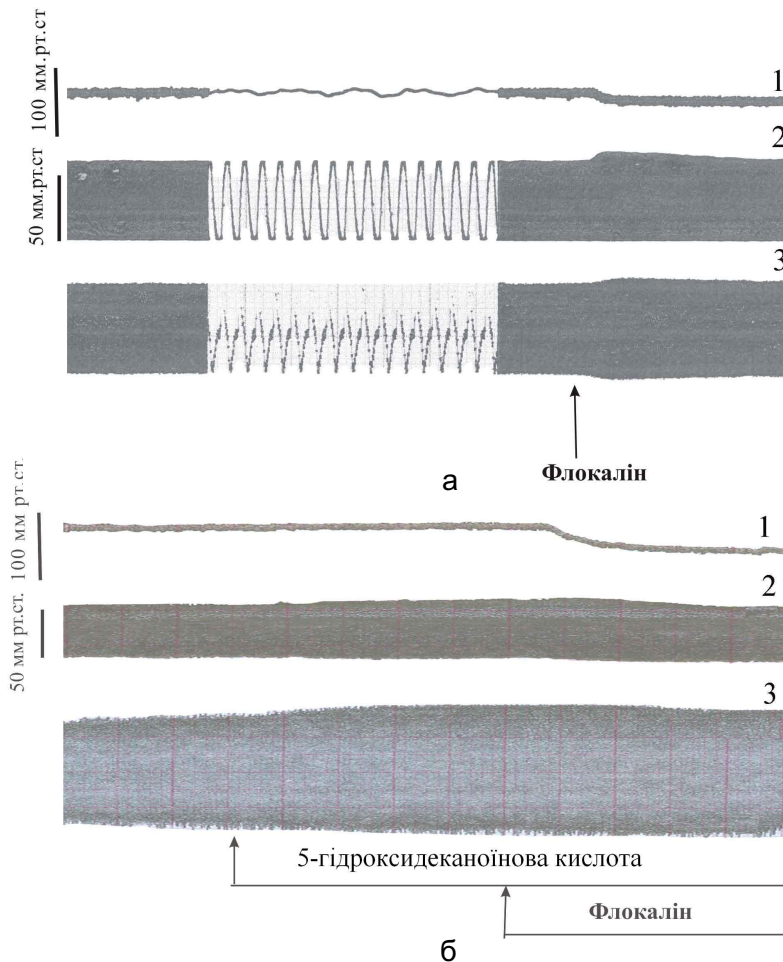


Рис. 2. Вплив активатора (а) та інгібітора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів (б) на функціонування серця: 1 – перфузійний тиск у коронарних судинах, 2 – тиск, що розвиває лівий шлуночок, 3 – перша похідна тиску в лівому шлуночку

раніше впливом активаторів K_{ATP} -каналів на скоротливу активність міокарда. Відомо, що ці активатори не змінюють або посилюють скоротливу діяльність міокарда [3, 7, 9, 13], пригнічення спостерігається лише при досить високих дозах активаторів K_{ATP} -каналів, коли відбувається надто сильне зменшення тривалості потенціалу дії [3, 13]. Водночас відсутність дозозалежності впливу активаторів K_{ATP} -каналів на скоротливу активність міокарда вже була описана нами раніше [3, 7].

Блокатор K_{ATP} -каналів мітохондріальних мембран – 5-ГД підвищував скоротливу активність міокарда (див. рис. 2,б) від вихідного рівня у середньому на $14,2\% \pm 1,01\%$ ($n=5$, $P<0,05$; див. рис. 1,б). Тиск у лівому шлуночку при цьому підвищувався у середньому до $75,47 \pm 19,03$ порівняно з $66,25$ мм рт.ст. ± 17 мм рт.ст. у контролі ($P<0,05$). 5-хвилинна інфузія флокаліну на фоні блокади мітохондріальних K_{ATP} -каналів за допомогою 5-ГД призводила до зниження скоротливої активності міокарда від вихідного рівня (див. рис. 1,б, 2,б). Тобто, якщо сама блокада цих каналів призводить до посилення скоротливої активності міокарда, то активування K_{ATP} -каналів, принаймні, флокаліном при інгібуванні мітохондріальних K_{ATP} -каналів має тенденцію до її зменшення.

У той же час флокалін знижував кінцевий діастолічний тиск, який становив у середньому $1,96 \pm 0,64$ порівняно з $2,65$ мм рт.ст. $\pm 0,67$ мм рт.ст. ($n=9$) у контролі (див. рис. 1,в). Блокатор мітохондріальних K_{ATP} -каналів – 5-ГД також мав тенденцію до його зниження – $2,18 \pm 1,72$ ($n=5$) порівняно з $2,94$ мм рт.ст. $\pm 2,09$ мм рт.ст. ($n=9$) у контролі. При 5-хвилинній інфузії флокаліну на фоні блокади мітохондріальних K_{ATP} -каналів за допомогою 5-ГД спостерігалася тенденція до ще більшого зниження порівняно з контролем кінцевого діастолічного тиску, який наближався до нуля ($n=5$; див. рис. 1,в).

Показано, що флокалін практично не впливає на ЧСС, яка становить у середньому $138,5 \pm 4,95$ порівняно з 139 $xv^{-1} \pm 4,67$ xv^{-1} ($n=12$) у контролі, що підтверджує літературні дані [9, 19].

Таким чином, флокалін дозозалежно розслаблює коронарні судини та зменшує кінцевий діастолічний тиск, що може посилювати кровопостачання киснем і енергоресурсами працюючого серцевого м'яза, сприяти більшому заповненню серця кров'ю під час діастолі. Водночас флокалін практично не змінює тиск у лівому шлуночку, dP/dt_{max} і dP/dt_{min} , не впливає на ЧСС і зменшує екстрасистолію.

5-ГД підвищує тиск у лівому шлуночку, dP/dt_{max} і dP/dt_{min} та має тенденцію до збільшення перфузійного тиску в коронарних судинах, при цьому зменшується кінцевий діастолічний тиск. Цілком можливо, що позитивний інотропний вплив 5-ГД може не бути пов'язаний з його здатністю інгібувати K_{ATP} -канали мітохондріальних мембран, а є наслідком прямого включення 5-ГД у процеси окисного фосфорилування в електронно-транспортному ланцюзі мітохондрій і пов'язаного з цим посилення процесів β -окиснення [14, 15]. Відомо також, що 5-ГД дещо збільшував системний артеріальний тиск в експериментах *in situ* [8] і практично не змінював скоротливу активність міокарда та коронарну протоку в ізольованому серці кроля [21].

Блокада мітохондріальних K_{ATP} -каналів не впливає на коронаролітичні ефекти флокаліну та може посилювати його дію на кінцевий діастолічний тиск, що дозволяє нам припустити участь у процесах коронаророзслаблення сарколемальних K_{ATP} -каналів.

ВИСНОВКИ

1. Новий фторвмісний активатор K_{ATP} -каналів – флокалін дозозалежно розслаблює коронарні судини, зменшує кінцевий

діастолічний тиск та екстрасистолю. Водночас він практично не впливає на скоротливу активність міокарда та ЧСС.

2. Блокатор K_{ATP} -каналів мітохондріальних мембран – 5-ГД підвищує тиск у лівому шлуночку, dP/dt_{max} і dP/dt_{min} та зменшує кінцевий діастолічний тиск.

3. Блокада мітохондріальних K_{ATP} -каналів не впливає на коронаролітичні властивості флокаліну та посилює його дію на кінцевий діастолічний тиск, що дозволяє відвести головну роль у цих процесах саме активуванню сарколемальних K_{ATP} -каналів.

R.B. Strutyński, S.N. Pyvovar, Rovenets R.A., O.V. Piskun L.M. Yagupolskii, A.A. Moibenko

EFFECT OF FLOKALIN, K_{ATP} SENSITIVE CHANNEL OPENER UPON THE FUNCTIONING OF ISOLATED HEART

In the experiments, using isolated, perfused according to Langendorff heart of guinea pig, was investigated the effect of flokalin, a new fluor-containing opener of ATP sensitive channels (K_{ATP}), upon the functioning of the heart. It was shown, that flokalin in a dose dependent manner dilates coronary vessels, decreases final diastolic pressure in the left ventricle and the rate of extrasystoles. Flokalin does not significantly affect the developing pressure in the left ventricle, max and min dP/dt , the frequency of cardiac contractions. 5-hydroxydecanoic acid (5-HD), an inhibitor of K_{ATP} in the mitochondrial membranes, increases the developing pressure in the left ventricle, max and min dP/dt , perfusion pressure in the coronary vessels. Simultaneously the final diastolic pressure in the left ventricle is decreased. Inhibition of K_{ATP} channels in the mitochondrial membrane does not affect the vasodilatory effects of flokalin in the coronary vessels. This data, under the condition of specific action of 5-HD, permits us to suppose the participation of sarcolemmal K_{ATP} channels in the mentioned processes. It was shown that inhibition of mitochondrial K_{ATP} channels results in decrease of the final diastolic pressure in the left ventricle and can enhance the effect of flokalin upon the final diastolic pressure, thus urging the idea of the leading role of sarcolemmal K_{ATP} channels in the mentioned above processes.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Клебанов Б.М., І.І. Малетіна, Л.М. Ягупольський та ін. Пат. 17071А Україна, МПК⁶ А 61 К 31/03. N-(1,2,2-триметилпропіл)-N''-ціано-N'-арилгуа-

нідини з фторовмісними замісниками в ароматичному ядрі, які проявляють гіпотензивну та кардіотонічну дію – № 95041977; Заяв. 26.04.95; Опубл. 31.10.97. – Промислова власність. – 1997. – №5. – С. 3.1.76.

- Пивовар С.М., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мойбенко О.О. Дослідження механізму дії нових фторовмісних аналогів діазоксиду на судинний тонус // Фізіол. журн. – 2004. – **50**, № 2, С. 27–34.
- Струтинський Р.Б. Дослідження впливу нових активаторів АТФ-залежних калієвих каналів на функції серця та вазомоторні реакції в нормальних та патологічних умовах: Автореф. ... дис. канд. біол. наук: 14.03.04 – К., 2002. – 20 с
- Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О. Моделювання активності АТФ-залежних калієвих каналів у аорті нормотензивних та гіпертензивних тварин // Фізіол. журн. – 2000. – **46**, №6. – С. 54–60.
- Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Пивовар С.М. та ін. АТФ-чутливі калієві канали та зміни їх функціональної активності при стрептозототин-викликаному цукровому діабеті // Там само. – 2003. – **49**, №6. – С. 22–31.
- Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М. Дослідження вазомоторних ефектів нових фторовмісних синтетичних активаторів АТФ-залежних калієвих каналів // Там само. – 2000. – **46**, №4. – С. 17–23.
- Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М. та ін. Дослідження кардіопротекторних ефектів нового фтормісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів // Там само. – 2001. – **47**, №2. – С. 16–23.
- Baines C.P., Liu G.S., Birincioglu M. et al. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial K^+ channels and actin cytoskeleton // Amer. J. Physiol. ^{ATP}1999. – **276**, №4. – P. H1361–H1368.
- Eells J.T., Henry M.M., Gross G.J., Baker J.E. Increased mitochondrial K^+ channel activity during chronic myocardial hypoxia^{ATP}. Is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? // Circulat. Res. – 2000. – **87**, №10. – P.915–921.
- Fraye R.M., Eells J.T., Hsu A.K. et al. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K^+ channel in preservation of mitochondrial function ^{ATP}Amer. J. Physiol. – 2000. – **278**, №1. – P.H305–H312.
- Garlid K.D., Pauczek P., Yarov-Yarovoy V. et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels possible mechanism of cardioprotection // Circulat. Res. – 1997. – **81**. – P. 1072–1072.
- Grover G. Pharmacology of ATP-sensitive potassium channel (K^+) openers in models of myocardial ischemia and reperfusion // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1997. – **75**, №4. – P. 309–315.
- Grover G.J., Baird A.J., Slep P.G. Lack of pharmacologic interaction between ATP-sensitive potassium

- channels and adenosine A₁ receptors in ischemic rat hearts // *Cardiovasc Res.* – 1996. – 31, №4. – P. 511–517.
14. Hanley P.J., Drose S., Brandt U. et al. 5-Hydroxydecanoate is metabolised in mitochondria and creates a rate-limiting bottleneck for {beta}-oxidation of fatty acids // *J. Physiol.* – 2004. – **562**, Pt 2. – P. 307–318.
 15. Hanley P.J., Mickel M., Loffler M., Brandt U., Daut J. K^{ATP} channel-independents targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart // *J. Physiology.* – 2002. – **542**, №3. – P. 735–741.
 16. Hein T.W., Lih Kuo. cAMP-independent dilation of coronary arterioles to adenosine. Role of nitric oxide, G proteins, and Katp channels // *Circulat. Res.* – 1999. – **85**, №7. – P. 634–642.
 17. Korge P., Honda H.M., Weiss J.N. Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: Implications for ischemic preconditioning // *PNAS.* – 2002. – **99**, №5. – P. 3312–3317.
 18. Mutafova-Yambolieva V.N., Keef K.D. Adenosine-induced hyperpolarization in guinea pig coronary artery involves A₁ receptors and K⁺ channels // *Amer. J. Physiol.* – 1997. – **273**, №6. – P. H2687–H2695.
 19. Ockaili Ramzi, Venkata R. Emani, Shinji Okubo et al. Opening of mitochondrial KATP channel induces early and delayed cardioprotective effect: role of nitric oxide // *Ibid.* – 1999. – **277**. – P. H2425–H2434.
 20. O'Rourke B. Myocardial K^{ATP} channels in preconditioning // *Circulat. Res.* – 2000. – **87**, №9. – P. 845–855.
 21. Wang s., James Cone, Yongge Liu. Dual roles of mitochondrial K^{ATP} channels in diazoxide mediated protection in isolated rabbit hearts // *Amer. J. Physiol.* – 2001. – **280**. – P. H246–H256.
 22. Yagupolskii L.M., Maletina I.I., Klebanov B.M. Fluorine-containing cardiovascular drugs. – In: *Organofluorine compounds and biomedical application* Elsevier. – 1993. – P. 73–99.
 23. Yang X.M., Proctor J.B., Cui L. et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways // *J. Amer. Coll Cardiol.* – 2004. – **44**, №5. – P. 1103–1110.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 29.04.2005*