

Р. Б. Струтинський, О. О. Мойбенко, Л. М. Ягупольський

Дослідження вазомоторних ефектів нових фторвмісних синтетичних активаторів АТФ-залежних калієвих каналів

Изучено влияние новых фторсодержащих активаторов калиевых каналов на тонус сосудов морской свинки in vitro. Проведена идентификация механизмов действия этих активаторов с помощью известного ингибитора АТФ-зависимых калиевых каналов — глибенкламида. Показано, что новые фторсодержащие активаторы калиевых каналов — ПФ-5 и ПФ-10 являются достаточно сильными вазодилататорами, а также описано отношение доза — эффект. Установлено, что при концентрации ПФ-5 больше 0,1 ммоль/л происходит изменение реакции на вазоконстрикцию.

Вступ

Одним із важливих напрямків сучасної експериментальної та клінічної кардіології є дослідження АТФ-залежних калієвих каналів, відкритих Нота в кардіоміоцитах [22]. Ці канали мають велике значення в регуляції судинного тону та діяльності серця за фізіологічних та, особливо, патологічних умов [4, 10, 11, 18, 20, 21, 24]. Особливістю іонних каналів даного типу є те, що дефіцит енергії — зменшення АТФ — спричиняє не пригнічення функції каналів, а навпаки, їх активацію — відкриття каналу та збільшення іонного потоку [17]. Це призводить до гіперполяризації мембран ефекторних клітин судин, їх розширення та до збільшення кровопостачання тканин і, як наслідок, збільшення постачання кисню та енергоресурсів до органів і тканин. Тобто це один з фундаментальних механізмів гомеостазу, направлений на оптимізацію енергетичного забезпечення організму при гіпоксичних та ішемічних станах. Відомо, що такі важливі вазодилататори, як оксид азоту та арахідонова кислота частково реалізують свої ефекти через АТФ-залежні калієві канали [2, 19]. Виходячи з цього, ймовірна особлива роль АТФ-залежних калієвих каналів при гіпоксії та ішемії в серці та мозку, коли дефіцит енергії (АТФ) при гіпоксії повинен бути компенсований у найкоротші строки. Дійсно, як виявляється, блокада АТФ-залежних калієвих каналів змінює реакції серця на гіпоксію та ішемію, а також пригнічує механізми адаптації організму до патологічних чинників [6, 8, 11, 27].

Як виявилось, відкриття АТФ-залежних калієвих каналів можливе і фармакологічним шляхом. У 1978 р. були вперше синтезовані й описані Peterson так звані «відкривачі» цих каналів [25], що призвело до розробки нового шляху в терапії серцево-судинних захворювань. Разом з цим при клінічних дослідженнях виявилось, що використання відкривачів АТФ-залежних калієвих каналів може спричинити деякі ускладнення та побічні яви-

ща, зокрема порушення ритму діяльності серця і навіть фібриляцію шлуночків [5, 7, 9, 28], активацію симпатoadреналової системи, гальмування продукції інсуліну та інші негативні явища [12, 15, 29]. Висловлюється думка, що з одного боку протекторний, а з іншого аритмогенний ефекти активаторів АТФ-залежних калієвих каналів певною мірою зумовлені співвідношенням дії того чи іншого активатора переважно на сарколемальні чи на мітохондріальні АТФ-залежні калієві канали [5]. Ці дані стимулювали подальший пошук нових активаторів калієвих каналів, позбавлених згаданих недоліків [5].

Метою нашої роботи було дослідження впливу нових фторвмісних відкривачів калієвих каналів, синтезованих співробітниками Інституту органічної хімії НАН України [1], на судинний тонус та ідентифікація механізму дії цих відкривачів за допомогою відомого інгібітора АТФ-залежних калієвих каналів — глібенкламиду.

Методика

Досліди проведені на ізольованих, перфузованих при 37 °С нормальним розчином Кребса, кільцевих смужках аорти морської свинки, попередньо скорочених норадреналіном (10 мкмоль/л). Використовували тварин масою 0,2–0,25 кг. Ізольовані судинні кільця мали діаметр 2 мм і ширину 1,5 мм. Усі тестування судинних смужок проводили в ізометричному режимі при початково заданій напруженості, при якій вони генерували максимальну силу в відповідь на інфузію норадреналіну. Напруженість судинної смужки розраховували у Ньютонах на 1 м². Автоматичний термостат дозволяв підтримувати температуру розчину в камері 37 °С з точністю до ±0,5 °С. 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): NaCl — 120,4; KCl — 5,9; NaHCO₃ — 15,5; NaH₂PO₄ — 1,2; MgCl₂ — 1,2; CaCl₂ — 2,5; глюкоза — 11,5. Солі, використані для приготування нормального розчину Кребса, а також норадреналін, ацетилхолін, аденозин, глібенкламід і диметилсульфоксид (ДМСО) були виробництва фірми «Sigma Chemical» (США). Пінацедил (ПФ-1), його фторпохідні ПФ-5, ПФ-10 та їх розчинник диметилацетамід (ДМАА) були синтезовані співробітниками Інституту органічної хімії НАН України.

Глібенкламід розчиняли в суміші ДМСО та етилового спирту (1:1). Концентрація цієї суміші в експериментальній камері не перевищувала 0,02 % і викликала зменшення напруження судинного препарату від вихідного рівня у середньому на 3,0 % ± 0,1 % (n = 12, P < 0,05). Відкривачі калієвих каналів розчиняли в ДМАА, концентрація якого в експериментальній камері не перевищувала 0,1 % і зменшувала напруження судинного препарату у середньому на 2,7 % ± 0,2 % (n = 12, P < 0,05) від вихідного рівня. Досліджувані відкривачі калієвих каналів подавали в експериментальну камеру в концентрації від 0,05 мкмоль/л до 0,5 ммоль/л. Як контрольний препарат використовували пінацедил. Цілісність судинного ендотеліального шару клітин визначали за наявністю ендотелійзалежних тестових реакцій на ацетилхолін.

Результати та їх обговорення

Виявлено, що обидва нові фторвмісні препарати проявляють добре виражені дозозалежні вазодилаторні властивості (рис. 1). Порогові концентрації ПФ-5 (0,1 мкмоль/л) і ПФ-10 (0,5 мкмоль/л) викликали зменшення напруження судинних смужок у середньому на $2,53 \pm 0,2$ ($n = 12$, $P < 0,05$) та $2,57 \% \pm 0,2 \%$ ($n = 9$, $P < 0,05$) відповідно. Максимальний ефект зменшення напруження судинної смужки новими активаторами калієвих каналів спостерігався при концентрації 0,1 ммоль/л (ПФ-5) і 0,5 ммоль/л (ПФ-10) і був у середньому $28,39 \pm 3,2$ ($n = 9$, $P < 0,05$) та $48,98 \% \pm 6,1 \%$ ($n = 9$, $P < 0,05$) від вихідного рівня відповідно. Однак при збільшенні

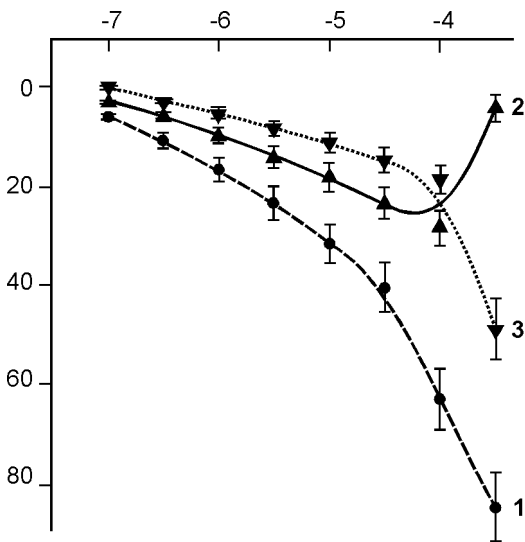


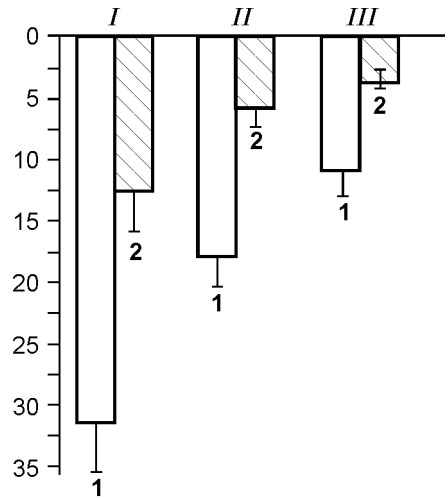
Рис. 1. Залежність вазодилаторної реакції від діючої концентрації різних «відкривачів» АТФ-залежних калієвих каналів. По осі ординат: зменшення напруженості судинної смужки, (ΔP , %); по осі абсцис: логарифм концентрації активаторів калієвих каналів ($\lg C$, моль/л); 100 % — максимальне зменшення напруженості судинної смужки при дії аденозину (1 ммоль/л), 1 — ПФ-1, 2 — ПФ-5, 3 — ПФ-10.

(пінацедил, левкромаркалім тощо), а також інгібування сульфонілуреатичними препаратами такими, як тольбутамід і глібенкламід [3, 13, 17, 26]. Але одним із основних тестів для дослідження калієвих каналів на належність до АТФ-чутливих є їх інгібування глібенкламідом — специфічним блокатором саме АТФ-залежних калієвих каналів [3, 14, 16, 22, 23]. Тому, з метою ідентифікації та визначення їх відношення до родини відкривачів АТФ-залежних калієвих каналів ми використовували глібенкламід. Для цього судинні смужки попередньо перфузували глібенкламідом (10 мкмоль/л) протягом 5 хв. Як видно з рис. 2, при подальшій перфузії

концентрації ПФ-5 в експериментальній камері до 0,5 ммоль/л, його вазодилаторні властивості майже втрачались і зменшення напруження судинної смужки становило у середньому $4,22 \% \pm 2,8 \%$ ($n = 15$, $P < 0,05$) від вихідного рівня. Напівмаксимальне розслаблення судинних смужок при перфузії ПФ-5 і ПФ-10 відбувалося при їх концентрації в експериментальній камері 6 і 210 мкмоль/л відповідно. Отже, ми встановили, що нові фторпохідні відомого відкривача АТФ-залежних калієвих каналів — пінацедилу, ПФ-5 та ПФ-10, дійсно проявляють вазодилаторні властивості.

Як відомо, характерною рисою АТФ-залежних калієвих каналів є їх інгібування підвищеним вмістом внутрішньоклітинного АТФ, моделювання каналної активності АТФ та іншими нуклеотид фосфатами, активування специфічними відкривачами АТФ-залежних калієвих каналів

Рис. 2. Зміна напруженості (ΔP , %) препаратів аорти морської свинки активаторами калієвих каналів (концентрація всіх активаторів 10 мкмоль/л) до і після блокади АТФ-залежних калієвих каналів глібенкламідом (10 мкмоль/л); 100 % — максимальне зменшення напруженості судинної смужки при дії аденозину (1 ммоль/л), 1 — контроль, 2 — глібенкламід, I — ПФ-1, II — ПФ-5, 3 — ПФ-10.

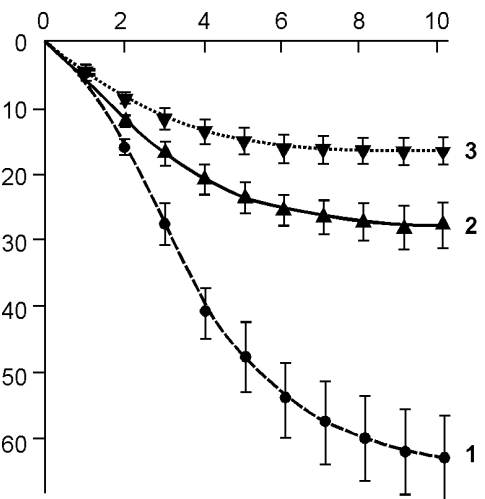


смужок усіма активаторами калієвих каналів, ми спостерігали зменшення вазодилататорних реакцій судинних смужок порівняно з контролем. Інгібування вазомоторного ефекту ПФ-1, ПФ-5 і ПФ-10 становило у середньому $59,53 \pm 3,2$ ($n = 7$, $P < 0,05$), $67,07 \pm 1,45$ ($n = 9$, $P < 0,05$) і $65,59\% \pm 0,51\%$ ($n = 9$, $P < 0,05$) відповідно. При відмиванні судинних смужок протягом 60 хв після дії глібенкламїду нормальним розчином Кребса, вазодилататорні реакції судин на активатори калієвих каналів відновлювалися до вихідного рівня. Додавання глібенкламїду в експериментальну камеру вже після розслаблення судин новими активаторами (ПФ-5 і ПФ-10) калієвих каналів (10 мкмоль/л) повністю знімало їх дію та повертало судинний тонус до вихідного рівня. А як відомо, глібенкламід діє безпосередньо на SUR субодиницю АТФ-залежного калієвого каналу, яка виступає регулятором каналної активності, відповідаючи за чутливість каналу до його відкривачів і сульфонілуреатичних препаратів. Тоді як друга структурна субодиниця АТФ-залежного калієвого каналу — $K_{IR6,x}$ — відповідає за провідні властивості каналу [17].

Отримані результати дозволяють припустити, що нові фторвмісні препарати можна ідентифікувати як відкривачі АТФ-залежних калієвих каналів.

Аналізуючи криві (рис. 3), які відображують вазомоторні відповіді судин при їх перфузії фторвмісними активаторами калієвих каналів, можна виділити дві особливості: швидкість судинної відповіді та відсутність певних перегинів. Такий

Рис. 3. Зменшення напруженості (ΔP , %) судинних препаратів різними «відкривачами» АТФ-залежних калієвих каналів (концентрація всіх відкривачів 0,1 ммоль/л) протягом 10 хв; 100 % — максимальне зменшення напруженості судинної смужки при дії аденозину (1 ммоль/л), 1 — ПФ-1, 2 — ПФ-5, 3 — ПФ-10.



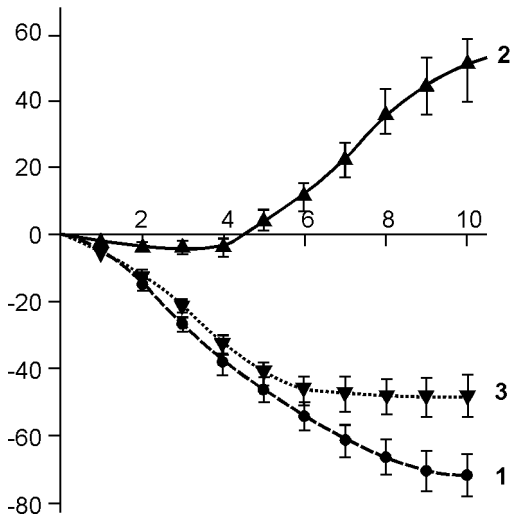


Рис. 4. Зміна напруженості (ΔP , %) судинних препаратів різними відкривачами АТФ-залежних калієвих каналів (концентрація всіх відкривачів 0,5 ммоль/л) протягом 10 хв; 100 % – максимальна зміна напруженості судинної смужки при дії аденозину (1 ммоль/л), 1 – ПФ-1, 2 – ПФ-5, 3 – ПФ-10.

характер судинної реакції відповідає впливу тільки одного шляху вазодилатації. У нашому випадку – активування АТФ-залежних калієвих каналів, яке викликає калієвий струм і, як наслідок цього, мембранну гіперполяризацію та

розслаблення гладенько-м'язових клітин. Подібний характер мають вазодилаторні відповіді при використанні різної концентрації активаторів калієвих каналів (від 0,5 мкмоль/л до 0,5 ммоль/л), за винятком надто високих доз ПФ-5 (більших ніж 0,1 ммоль/л). Як уже вище згадувалося, при концентрації 0,5 ммоль/л ПФ-5 майже втрачає свої вазодилаторні властивості – зменшення напруженості судинної смужки від вихідного рівня становило у середньому $4,22\% \pm 2,8\%$ ($n = 15$, $P < 0,05$), а подовжена більш як на 4 хв перфузія призводила до зміни ефекту – розвивалася вазоконстрикція (рис. 4), яка на 10-ту хвилину була $51,04\% \pm 11,8\%$ ($n = 15$, $P < 0,05$). Можливо, що ця вазоконстрикція є наслідком метаболічних змін безпосередньо в цитозолі гладенько-м'язових клітин, або в їх зовнішньому оточенні, можливо завдяки звільненню вазоконстрикторних речовин з ендотеліального судинного шару клітин.

Висновки

1. На ізольованих кільцевих смужках аорти досліджено вазомоторну дію нових вітчизняних фторвмісних активаторів АТФ-залежних калієвих каналів – аналогів пінацедилу – ПФ-5 і ПФ-10.

2. Показано дозозалежну вазодилаторну дію активаторів АТФ-залежних калієвих каналів у діапазоні концентрації від 0,1 мкмоль/л до 0,1 ммоль/л для ПФ-5 та від 0,5 мкмоль/л до 0,5 ммоль/л для ПФ-10.

3. Збільшення концентрації ПФ-5 вище ніж 0,1 ммоль/л призводило до різкого зменшення вазодилаторного та появи вазоконстрикторного ефекту.

4. Специфічний блокатор АТФ-залежних калієвих каналів – глібенкламід попереджав вазодилаторний ефект нових фторвмісних активаторів калієвих каналів на 67 (ПФ-5) та 65,6 % (ПФ-10), що збігалось з рівнем блокади ефектів пінацедилу (59,5 %).

R. B. Strutinskii, A. A. Moibenko, L. M. Yagupolskii

**THE INVESTIGATION OF VASOMOTION EFFECTS
OF NEW FLUORINE-CONTAINING OPENERS ATP-SENSITIVE
POTASSIUM CHANNELS**

The influence of new fluorine-containing activators of K⁺ channels on the vascular tone was investigated in vitro experiments on the guinea pig aorta. We exerted the identification of mechanisms of the action of these substances using the well-known ATP-sensitive K⁺ channel inhibitor – glibenclamid – and showed their dose-effect correlation. It was shown that new fluorine-containing activators of K⁺ channels – PF-5 and PF-10 – are powerful vasodilator substances and PF-5 in concentration more than 0.1 mM exerts a distort of vascular reaction on the vasoconstriction.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пат. України, №17071А від 18.03.1997. N-1,2,2,-триметилпропіл-N''-ціано-N'-арілгуанідини з фторвмісними замісниками в арильному ядрі, які проявляють гіпотензивні та кардіотонічні дії / *Клебанов Б.М., Малетіна І.І., Петко К.І., Шаваран С.С., Ягутольський Л.М.* // *Винахідник України.* – 1997.
2. *Adeagbo A.S., Malik K.U.* Contribution of K⁺ channels to arachidonik acid-induced endothelium-dependent vasodilation in rat isolated perfused mesenteric arteries // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1991. – **258**, № 2. – P.452-458.
3. *Brady P.A., Alekseev A.E., Andre Terzic.* Operative condition-dependent response of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels toward sulfonylureas // *Circulat. Res.* – 1998. – **82**. – P.272-278.
4. *Benndorf K., Thierfelder S., Doepner B., Gebhardt C., Hirche H.* Role of cardiac K_{ATP} channels during anoxia and ischemia // *News Physiol. Sci.* – 1997. – **12**. – P.78-83.
5. *Bhatnagar A., Bolli R.* Modulation of K_{ATP} channels to protect the ischemic miocardium: Clinical implications // *Exp. Clin. Cardiol.* – 1999. – **4**. – № 1. – P.20-22.
6. *Cavero I., Djellas Y., Guillon J-M.* Ischemic miocardial cell protection conferred by the opening of ATP-sensitive potassium channels // *Cardiovasc. Drags Ther.* – 1995. – **9**, № 2. – P.245-255.
7. *Chi I., Uprichard A.S., Lucchesi D.R.* Profibrillatory actions of pinacidil in a conscious canine model of sudden coronary death // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1990. – **15**. – P.452-464.
8. *Cyrus S., and J. Daut.* The sensitivity of coronary vascular tone to glibenclamide: a study in the isolated perfused guinea pig heart // *Cardiovasc. Res.* – 1994. – **28**. – P.888-893.
9. *D'Alonzo A.J., Zhu J.I. Darbenzio R.B., Dorso C.R., Groser G.J.* Proarrhythmic effects of pinacidil are partially mediated through enhancement of catecholamine release in isolated perfused guinea-pig heart // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 1998. – **30**. – P.415-423.
10. *Dart C., Standen N.B.* Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery // *J. Physiol (Lond).* – 1993. – **471**. – P.767-786.
11. *Daut J., Maier-Rudolph W., von Beckerath N., Mehrke G., Gunther K., Goedel-Meinen L.* Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels // *Science.* – 1990. – **247**. – P.1341-1344.
12. *Dunne M.J., Illot M.C., Peterson O.H.* Interaction of diazoxide, tolbutamide and ATP⁴⁻ on nucleotide-dependent K⁺ channels in an insulin-secreting cell line // *J. Membr. Biol.* – 1987. – **99**. – P.215-224.
13. *Edwards G., Weston A.,N.* Pharmacology of the potassium channel openers // *Cardiovasc. Drags Ther.* – 1995. – **9**, № 2. – P.185-193.

14. *Findlay I.* Inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels in cardiac muscle by the sulfonylurea drug glibenclamide // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1992. — **261**. — P.540-545.
15. *Garrino M.J., Plant T.D., Henquin J.C.* Effects of putative activators of K⁺ channels in mouse pancreatic b-cell // *Brit. J. Pharmacol.* — 1989. — **98**. — P.957-965.
16. *Hamada E., Takikawa R., Ito H., Iguchi M., Terano A., Sugimoto T., Kurachi Y.* Glibenclamide specifically blocks ATP-sensitive K⁺ channel current in atrial myocytes of guinea pig heart // *Jpn. J. Pharmacol.* — 1990. — **54**. — P.473-477.
17. *Hiraoka M., Furukawa T.* Functional modulation of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. // *News Physiol. Sci.* — 1998. — **13**. — P.131-137.
18. *Komaru T., Lamping K.G., Eastham C.L., Dellsperger K.C.* Role of ATP-sensitive potassium channels in coronary microvascular autoregulatory responses // *Circulat. Res.* — 1991. — **69**. — P.1146-1151.
19. *Murphy M.E., Brayden J.E.* Nitric oxide hiperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels // *J. Physiol.* — 1995. — **486**, №1. — P.47-58.
20. *Nelson M.T., Quayle J.M.* Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle // *Amer. J. Physiol.* — 1995. — **268**. — P.C799-C822.
21. *Nichols C.G., Lederer W.J.* Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system // *Ibid.* — 1991. — **261**. — P.H1675-H1686.
22. *Noma A.* ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle // *Nature.* — 1983. — **305**. — P.147-148.
23. *Panten U., Schwanstecher M., Schwanstecher C.* Sulfonylurea receptors and mechanism of sulfonylurea action // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* — 1996. — **104**. — P.1-9.
24. *Pavingerova T., Loekeboe J.E., Sundset R., Ytrehus K.* Preconditioning against contractile dysfunction in guinea pig papillary muscle depends on the opening of K_{ATP}-sensitive channels // *Exp. Clin. Cardiol.* — 1998. — **3**. — №3. — P.184-187.
25. *Petersen H.J., Kaergaard-Nielsen C., Arrigoni-Martelli E.* Synthesis and hypotensive activity of N-alkyl-N''-cyano-N''-pyridylguanidines // *J. Med. Chem.* — 1978. — **21**. — P.773-781.
26. *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.
27. *Schultz Jo El J., Zhenhai Yao, Icilio Cavero, Garrett J. Gross.* Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart // *Amer. J. Physiol.* — 1997. — **272**, № 41. — P.H2607-H2615.
28. *Shigematsu S., Toshiaki S., Takaka A., Tetsunori S., Makoto A.* Pharmacological evidence for the persistent activation of ATP-sensitive potassium channels in early phase of reperfusion and its protective role against myocardial stunning // *Circulation.* — 1995. — **92**. — P.2266-2275.
29. *Sturgess N.C., Kozlowski R.Z., Carrington C.A., Hales C.N., Ashford M.L.J.* Effects of sulfonylureas and diazoxide on insulin secretion and nucleotide-sensitive channels in an insulin-secreting cell line // *Brit. J. Pharmacol.* — 1988. — **95**. — P.83-94.

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

*Матеріал надійшов
до редакції 30.11.99*