

УДК 615.225.2:661.982:612.17]-092.9

СРАВНЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ АДЕНОЗИНА И АТФ В КОРОНАРНОМ РУСЛЕ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА МОРСКОЙ СВИНКИ

В.И. КОЗЛОВСКИЙ¹, К.М.Н.; В.В. ЗИНЧУК¹, Д.М.Н., профессор;С. ХЛОПЦКИЙ², Д.М.Н., профессор

1 – УО «Гродненский государственный медицинский университет»

2 – Ягеллонский университет, г. Краков, Польша

Исследованы механизмы коронарорасширяющего действия аденозина и АТФ в изолированном сердце морской свинки. Соединения вызывают дозозависимое увеличение коронарного потока. Коронарорасширяющий эффект аденозина и АТФ значительно уменьшается в присутствии ингибитора NO-синтазы метилового эфира L-N^G-нитроаргинина (L-NAME, 10⁻⁴ M). Кроме того, коронарная вазодилатация под действием аденозина и АТФ ингибировалась антагонистом пуриновых P₁ (аденозиновых) рецепторов 8-сульфофенил-теофиллином (10⁻⁵ M). В то же время, антагонист пуриновых P₂ рецепторов сурамин (10⁻⁵ M) существенно не изменял коронарорасширяющий ответ на АТФ. Таким образом, как аденозин, так и АТФ обладают NO-зависимыми коронарорасширяющими свойствами в изолированном сердце морской свинки; коронарная вазодилатация под действием обоих соединений опосредована пуриновыми P₁ (аденозиновыми) рецепторами. Предположительно, действие АТФ может быть обусловлено быстрым дефосфорилированием его с образованием аденозина.

Ключевые слова: аденозин, АТФ, изолированное сердце морской свинки, коронарорасширяющий эффект, оксид азота, пуриновые рецепторы.

Mechanisms of the coronary vasodilator action of adenosine and ATP in the isolated guinea pig heart were studied. Both compounds cause dose-dependent increase of the coronary flow. The coronary vasodilator effect of adenosine and ATP is significantly reduced in the presence of NO-synthase inhibitor L-NG-nitroarginine methyl ester (LNAME, 10⁻⁴ M). Furthermore, the coronary vasodilation induced by adenosine and ATP was inhibited by purine P₁ (adenosine) receptor antagonist 8-sulphophenyl-theophylline (10⁻⁵ M). On the other hand, purine P₂ receptor antagonist suramin (10⁻⁵ M) did not change significantly the coronary vasodilator response to ATP. Thus, both adenosine and ATP possess NO-dependent coronary vasodilator properties in the isolated heart of guinea pig; the coronary vasodilation induced by both compounds is mediated via purine P₁ (adenosine) receptors. Probably, the effect of ATP can be explained by its rapid dephosphorylation with formation of adenosine.

Key words: adenosine, ATP, isolated guinea pig heart, coronary vasodilator effect, nitric oxide, purine receptors.

Введение

Среди эндогенных пуринов особую роль играют аденозин и АТФ, которые участвуют в регуляции функций различных органов и систем организма. Данные соединения являются лигандами пуриновых рецепторов. Действие аденозина реализуется через пуриновые P₁ рецепторы (аденозиновые рецепторы), АТФ является лигандом пуриновых P₂ рецепторов [20]. В то же время, эффекты АТФ могут быть связаны с быстрым дефосфорилированием его до аденозина, который, соответственно, активирует пуриновые P₁ рецепторы [11].

Особый интерес привлекают сосудистые эффекты пуринов. Ещё в 1929 Drury и Szent-Gyorgyi обнаружили, что аденозин снижает артериальное давление и расширяет коронарные сосуды [5]. Имеются противоречивые данные о роли эндотелия в сосудорасширяющем эффекте аденозина. Ряд авторов сообщают об эндотелий-независимом характере вазодилатации, вызванной аденозином [7, 9, 18]. В то же время, показана возможность участия эндотелиального оксида азота (NO) в механизме сосудорасширяющей реакции на аденозин [14, 23].

Известно, что АТФ может оказывать как вазоконстрикторное действие посредством активации пуриновых P_{2x} рецепторов гладкой мускулатуры, так и вазодилатационное действие через эндотелиальные P_{2y} рецепторы [15] либо P₁ рецепторы [11]. В ряде работ было показано, что сосудорасширяющее действие АТФ опосредовано эндотелиальным NO [6, 19, 25]. В то же время отдельные авто-

ры сообщают об отсутствии роли NO в механизме вазодилатации, вызванной АТФ [21, 22].

Цель настоящего исследования – оценить роль NO и основных подтипов пуриновых рецепторов в механизмах влияния аденозина и АТФ на коронарные сосуды изолированного сердца морской свинки.

Материалы и методы

Модель изолированного сердца морской свинки (метод Лангендорфа). Детали метода описаны ранее [1]. Морские свинки обоих полов, массой тела 300 – 400 г, наркотизировались пентобарбиталом (30 – 40 мг кг⁻¹ массы тела). После вскрытия грудной клетки сердца изолировались, промывались в холодном физиологическом растворе, затем коронарное русло изолированного сердца перфузировалось ретроградно через аорту под постоянным перфузионным давлением 60 мм рт. ст. с использованием аппарата Лангендорфа (Hugo Sachs Electronics) раствором Кребса – Ханзеляйта следующего состава (mM): NaCl 118, CaCl₂ 2,52, MgSO₄ 1,64, NaHCO₃ 24,88, K₂HPO₄ 1,18, глюкоза 5,55, натрия пируват 2,0. Перфузионный раствор оксигенировался смесью 95 % O₂ + 5 % CO₂ при 37°C. Сердца стимулировались с частотой 273 Гц двумя платиновыми электродами, введенными в правое предсердие. Объем жидкости, протекавший в единицу времени, соответствовал величине коронарного потока. Величина коронарного потока измерялась с помощью ультразвукового датчика (Hugo Sachs Electronics), записывалась в течение

всего эксперимента, а затем анализировалась с помощью специальной программы (PSCF – IGEL, Польша).

Для изучения влияния аденозина и АТФ на коронарный поток изолированного сердца морской свинки соединения вводились путём внутрикороарной инфузии в различных концентрациях в диапазоне $3 \times 10^{-7} - 10^{-5}$ М. Для оценки роли NO, пуриновых P_1 и P_2 рецепторов в механизме сосудорасширяющего действия аденозина и АТФ соединения вводились повторно в присутствии ингибитора синтазы оксида азота (NO-синтазы) метилового эфира L-NG-нитроаргина (L-NAME, 10^{-4} М), антагониста пуриновых P_1 рецепторов 8-сульфофенил-теофиллина (10^{-5} М) и антагониста пуриновых P_2 рецепторов сурамина (10^{-5} М). В контрольных опытах (без использования фармакологических антагонистов) эффекты аденозина и АТФ были повторяемы и не изменялись существенно в течение эксперимента.

Статистическая обработка данных проводилась непараметрическими методами с использованием критерия Манна – Уитни. Данные выражались как среднее значение (М) ± стандартная ошибка (m). Статистически достоверным различие между группами считалось при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Средняя величина базального коронарного потока в изолированном сердце составляла $11,4 \pm 0,6$ мл/мин ($n=27$). L-NAME незначительно уменьшал коронарный поток ($12,0 \pm 1,2$ мл/мин до применения L-NAME и $8,9 \pm 0,9$ мл/мин в присутствии L-NAME, $n=11$, $p < 0,05$). Антагонисты пуриновых P_1 и P_2 рецепторов 8-сульфофенилтеофиллин и сурамин существенно не изменяли коронарный поток изолированного сердца морской свинки ($10,2 \pm 0,7$ мл/мин до применения 8-сульфофенилтеофиллина и $10,2 \pm 1,0$ в присутствии 8-сульфофенилтеофиллина, $n=10$, $p > 0,05$; $12,0 \pm 1,4$ мл/мин до применения сурамина и $14,5 \pm 1,6$ мл/мин в присутствии сурамина, $n=6$, $p < 0,05$).

Аденозин и АТФ вызывали дозозависимое увеличение коронарного потока изолированного сердца морской свинки, начиная с концентрации 3×10^{-7} М, что свидетельствует о коронарорасширяющем действии данных соединений. При этом аденозин вызывал более выраженную вазодилатацию, по сравнению с АТФ.

Коронарная вазодилатация, вызванная аденозином и АТФ, существенно уменьшалась в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME (10^{-4} М, рис 1А, 1Б). Исключением являются высокие концентрации аденозина и АТФ (10^{-5} М), коронарорасширяющий эффект которых существенно не изменялся в присутствии L-NAME.

Антагонист пуриновых P_1 рецепторов 8-сульфофенил-теофиллин (10^{-5} М) значительно снижал сосудорасширяющий ответ как на аденозин, так и на АТФ (рис. 2А, 2Б). В то же время коронарная вазодилатация, вызванная АТФ, существенно не изменялась в присутствии антагониста пуриновых P_2 рецепторов сурамина (10^{-5} М, рис. 3).

Наши данные продемонстрировали, что в коронарном кровообращении морской свинки как аде-

нозин, так и АТФ обладают NO-зависимым коронарорасширяющим действием. В то же время, как следует из результатов проведённых экспериментов, сосудорасширяющий эффект высоких концентраций аденозина в основном не зависит от NO. Подобное наблюдение было сделано на изолированных коронарных артериях свиньи [8]. Среди возможных механизмов NO-независимого компонента сосудорасширяющего действия аденозина можно отметить активацию АТФ-зависимых калиевых каналов [17], Ca^{2+} зависимых калиевых каналов [4], стимуляцию продукции цАМФ [12].

Наши результаты не согласуются с данными Keef с соавт., которые сообщали ранее об эндоте-

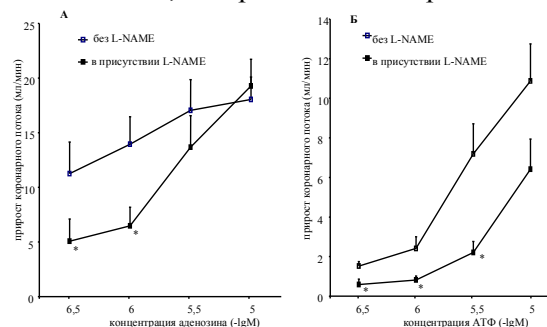


Рисунок 1 - Влияние L-NAME (10^{-4} М) на коронарную вазодилатацию, вызванную аденозином (А) и АТФ (Б) в изолированном сердце морской свинки. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка, $n = 4 - 5$; * - статистически достоверное отличие по сравнению с данными без L-NAME, $p < 0,05$

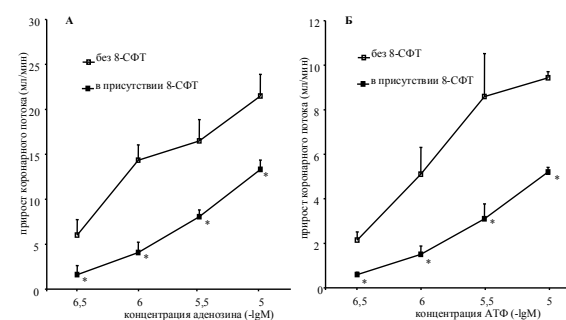


Рисунок 2 - Влияние 8-сульфофенил-теофиллина (8-СФТ, 10^{-5} М) на коронарную вазодилатацию, вызванную аденозином (А) и АТФ (Б) в изолированном сердце морской свинки. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка, $n = 3 - 4$;

* - статистически достоверное отличие по сравнению с данными без 8-сульфофенил-теофиллина, $p < 0,05$

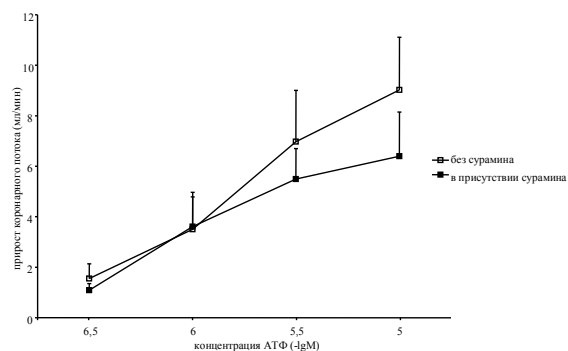


Рисунок 3 - Влияние сурамина (10^{-5} М) на коронарную вазодилатацию, вызванную АТФ в изолированном сердце морской свинки. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка, $n = 4 - 5$;

* - статистически достоверное отличие по сравнению с данными без 8-сульфофенил-теофиллина, $p < 0,05$

лий-независимом механизме вазодилатации, вызванной агонистами аденозиновых рецепторов на изолированных коронарных артериях морской свинки [9], что, возможно, обусловлено различием экспериментальных моделей. На изолированных коронарных артериях оцениваются сосуды крупного калибра, в то время как на изолированном сердце величина коронарного потока определяется преимущественно тонусом мелких артерий. Кроме того, на модели изолированного сердца коронарные сосуды перфузируются, и имеет место так называемое напряжение сдвига (shear stress), являющееся важнейшим физиологическим стимулятором эндотелиальной системы L-аргинин-NO [Boo 2003]. По нашему мнению, модель изолированного сердца более соответствует реальным физиологическим условиям, чем изолированные коронарные сосуды.

Также следует отметить, что коронарорасширяющее действие как аденозина, так и АТФ в изолированном сердце морской свинки реализуется через пуриновые P_1 (аденозиновые) рецепторы. В то же время мы не подтвердили существенного вклада пуриновых P_2 рецепторов в механизм сосудорасширяющего действия АТФ. Это может свидетельствовать о превращении АТФ в аденозин, который и оказывает сосудорасширяющее действие. АТФ может расщепляться сосудистым эндотелием с образованием АМФ, а затем аденозина при помощи энзимов, называемых эктонуклеотидазами [24]. Ранее сообщалось, что АТФ при однократном прохождении через изолированное сердце почти полностью расщепляется с образованием АМФ и аденозина [2].

Дефосфорилирование АТФ до аденозина под действием эндотелиальных эктонуклеотидаз может иметь определенное физиологическое значение. Показано, что аденозиновые рецепторы играют ключевую роль в механизме так называемого ишемического preconditionирования, т. е. развития резистентности миокарда к ишемии после серии кратковременных эпизодов ишемии [13]. Известно также, что аденозин обладает антиагрегантным действием [16], что также способствует улучшению кровообращения миокарда и предупреждает развитие гипоксии.

Таким образом, мы установили, что аденозин и АТФ обладают NO-зависимым коронарорасширяющим действием на модели изолированного сердца морской свинки. Вазодилатация под влиянием обоих соединений реализуется через пуриновые P_1 (аденозиновые) рецепторы, в то же время пуриновые P_2 рецепторы не имеют существенного значения для сосудорасширяющего эффекта АТФ. Эти данные свидетельствуют о возможном дефосфорилировании АТФ до аденозина в эндотелии коронарных сосудов, что может служить механизмом, направленным на оптимизацию доставки кислорода к сердцу.

Выводы

1. Аденозин и АТФ вызывают коронарную вазодилатацию, реализующуюся через NO-зависимые механизмы в изолированном сердце морской свинки.

2. Коронарорасширяющее действие как аденозина, так и АТФ опосредовано пуриновыми P_1 (аденозиновыми) рецепторами; предположительно, эффект АТФ обусловлен быстрым дефосфорилированием его до аденозина.

Литература

1. Козловский В.И. Исследование механизма коронарорасширяющего эффекта карведилола в изолированном сердце морской свинки / В. И. Козловский, С. Хлопицкий, Р. Е. Грыглевский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2005. – № 1. – С. 56–60.
2. Belardinelli L., Shryock J.C., Snowdy S. Effects of adenosine and adenine nucleotides on the atrioventricular node of isolated guinea pig hearts // *Circulation*. – 1984. – Vol. 70, № 6. – P. 1083–1091.
3. Boo Y.C., Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2003. – Vol. 285, № 3. – P. 499–508.
4. Cabell F., Weiss D.S., Price J.M. Inhibition of adenosine-induced coronary vasodilation by block of large-conductance $Ca(2+)$ -activated K^+ channels // *Am. J. Physiol.* – 1994. – Vol. 267. – P. 1455–1460.
5. Drury A.N., Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon mammalian heart // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1929. – Vol. 68. – P. 213–237.
6. Hansmann G., Ihling C., Pieske B., Blytmann R. Nucleotide-evoked relaxation of human coronary artery // *Eur. J. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 359, № 1. – P. 59–67.
7. Heaps C.L., Bowles D.K. Gender-specific K^+ -channel contribution to adenosine-induced relaxation in coronary arterioles // *J. Appl. Physiol.* – 2002. – Vol. 92. – P. 550–558.
8. Hein T.W., Kuo L. cAMP-independent dilation of coronary arterioles to adenosine: role of nitric oxide, G proteins, and $K(ATP)$ channels // *Circ. Res.* – 1999. – Vol. 85, № 7. – P. 634–642.
9. Keef K.D., Pasco J.S., Eckman D.M. Purinergic relaxation and hyperpolarization in guinea pig and rabbit coronary artery: role of the endothelium // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1992. – Vol. 260. – P. 592–600.
10. Kemp B.K., Cocks T.M. Adenosine mediates relaxation of human small resistance-like coronary arteries via A_{2B} receptors // *Br. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 126. – P. 1796–1800.
11. Korchazhkina O., Wright G., Exley C. Intravascular ATP and coronary vasodilation in the isolated working rat heart // *Br. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 127, № 3. – P. 701–708.
12. Kroll K., Schrader J. Myocardial adenosine stimulates release of cyclic adenosine monophosphate from capillary endothelial cells in guinea pig heart // *Pflügers Arch.* – 1993. – Vol. 423, № 3–4. – P. 330–337.
13. Liu G.S., Thornton J., Van Winkle D.M. et al. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A_1 adenosine receptors in rabbit heart // *Circulation*. – 1991. – Vol. 84. – P. 350–356.
14. Lynch F.M., Austin C., Heagerty A.M., Izzard A.S. Adenosine and hypoxic dilation of rat coronary small arteries: roles of the ATP-sensitive potassium channel, endothelium, and nitric oxide // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 290. – P. 1145–1150.
15. Matsumoto T., Nakane T., Chiba S. Pharmacological analysis of responses to ATP in the isolated and perfused canine coronary artery // *Eur. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 334. – P. 173–180.
16. Minamino T., Kitakaze M., Asanuma H. et al. Endogenous adenosine inhibits P-selectin-dependent formation of coronary thrombi during hypoperfusion in dogs // *J. Clin. Invest.* – 1998. – Vol. 101. – P. 1643–1653.
17. Nakhostine N., Lamontagne D. Adenosine contributes to hypoxia-induced vasodilation through ATP-sensitive K^+ channel activation // *Am. J. Physiol.* – 1993. – Vol. 265. – P. 1289–293.
18. Radenkovic M., Grbovic L., Pesic S., Stojic D. Isolated rat inferior mesenteric artery response to adenosine: possible participation of Na^+/K^+ -ATPase and potassium channels // *Pharmacological Reports*. – 2005. – Vol. 57. – P. 824–832.
19. Ralevic V., Burnstock G. Effects of purines and pyrimidines on the rat mesenteric arterial bed // *Circ. Res.* – 1991. – Vol. 69. – P. 1583–1590.
20. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines // *Pharmacol. Rev.* – 1998. – Vol. 50, № 3. – P. 413–492.
21. Rongen G.A., Smits P., Thien T. Characterization of ATP-induced vasodilation in the human forearm vascular bed // *Circulation*. – 1994. – Vol. 90, № 4. – P. 1891–1898.
22. Shah M.K., Bivalacqua T.J., Champion H.C., Kadowitz P.J. Vasodilator responses to ATP and UTP are cAMP dependent in the mesenteric vascular bed of the cat // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2001. – Vol. 6, № 3. – P. 287–295.
23. Yada T., Hiramatsu O., Tachibana H. et al. Role of NO and $K^+(ATP)$ channels in adenosine-induced vasodilation on in vivo canine subendocardial arterioles // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 277. – P. 1931–1939.
24. Yegutkin G.G., Hentinen Y., Samburski S.S. et al. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells // *Biochem. J.* – 2002. – Vol. 367. – P. 121–128.
25. You J., Johnson T.D., Childres W.F., Bryan Jr. R.M. Endothelial-mediated dilations of rat middle cerebral arteries by ATP and ADP // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 273. – P. 1472–1477.

Поступила 31.03.09