

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. КОЗЛОВСКИЙ<sup>1</sup>, К.М.Н.; В.В. ЗИНЧУК<sup>1</sup>, Д.М.Н., профессор;С. ХЛОПЦКИЙ<sup>2</sup>, 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<sup>G</sup>-нитроаргинина (L-NAME, 10<sup>-4</sup> M). Кроме того, коронарная вазодилатация под действием аденозина и АТФ ингибировалась антагонистом пуриновых P<sub>1</sub> (аденозиновых) рецепторов 8-сульфофенил-теофиллином (10<sup>-5</sup> M). В то же время, антагонист пуриновых P<sub>2</sub> рецепторов сурамин (10<sup>-5</sup> 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 P<sub>1</sub> (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<sup>-4</sup> M). Furthermore, the coronary vasodilation induced by adenosine and ATP was inhibited by purine P<sub>1</sub> (adenosine) receptor antagonist 8-sulphophenyl-theophylline (10<sup>-5</sup> M). On the other hand, purine P<sub>2</sub> receptor antagonist suramin (10<sup>-5</sup> 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 P<sub>1</sub> (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 P<sub>1</sub> рецепторы (аденозиновые рецепторы), АТФ является лигандом пуриновых P<sub>2</sub> рецепторов [20]. В то же время, эффекты АТФ могут быть связаны с быстрым дефосфорилированием его до аденозина, который, соответственно, активирует пуриновые P<sub>1</sub> 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<sub>2x</sub> рецепторов гладкой мускулатуры, так и вазодилатационное действие через эндотелиальные P<sub>2y</sub> рецепторы [15] либо P<sub>1</sub> 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<sup>-1</sup> 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, CaCl<sub>2</sub> 2,52, MgSO<sub>4</sub> 1,64, NaHCO<sub>3</sub> 24,88, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,18, глюкоза 5,55, натрия пируват 2,0. Перфузионный раствор оксигенировался смесью 95 % O<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub> 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-N<sup>G</sup>-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  $3 \times 10^{-7}$  М, что свидетельствует о коронарорасширяющем действии данных соединений. При этом аденозин вызывал более выраженную вазодилатацию, по сравнению с АТФ.

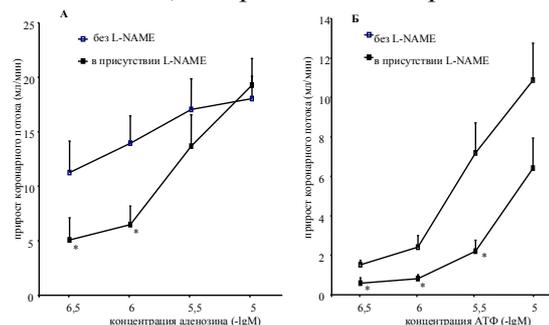
Коронарная вазодилатация, вызванная аденозином и АТФ, существенно уменьшалась в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME ( $10^{-4}$  М, рис 1А, 1Б). Исключением являются высокие концентрации аденозина и АТФ ( $10^{-5}$  М), коронарорасширяющий эффект которых существенно не изменялся в присутствии L-NAME.

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).

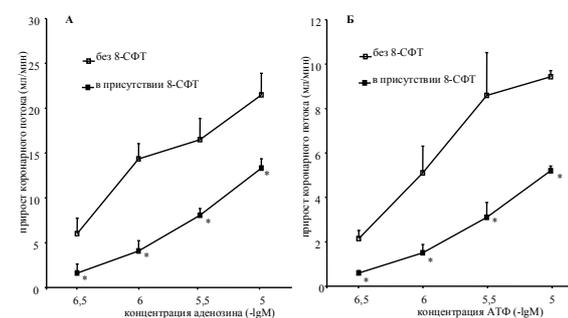
Наши данные продемонстрировали, что в коронарном кровообращении морской свинки как аде-

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<sup>2+</sup> зависимых калиевых каналов [4], стимуляцию продукции цАМФ [12].

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

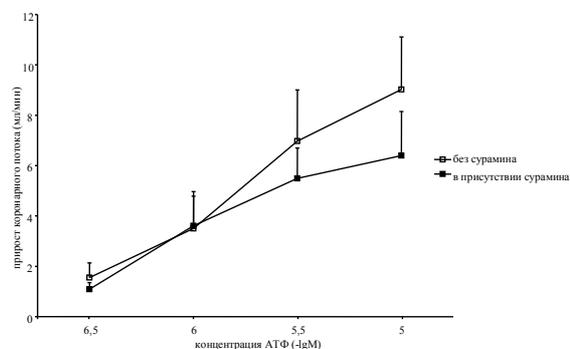


**Рисунок 1 - Влияние L-NAME ( $10^{-4}$  М) на коронарную вазодилатацию, вызванную аденозином (А) и АТФ (Б) в изолированном сердце морской свинки. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка,  $n = 4 - 5$ ; \* - статистически достоверное отличие по сравнению с данными без L-NAME, 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



**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