

УДК 611.31:613.84

DOI: 10.18413/2313-8955-2015-1-4-40-44

Даниленко Л. М.

**РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АТФ-ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В КАРДИОПРОТЕКТОРНОМ ЭФФЕКТЕ НИКОРАНДИЛА НА МОДЕЛИ КОРОНАРООКЛЮЗИОННОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА**

доцент кафедры фармакологии. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ БелГУ»), ул. Победы, 85, Белгород, 308015, Россия; E-mail: Danilenko\_L@bsu.edu.ru

**Резюме.** В работе приведены результаты исследования противоишемической эффективности никорандила (1,8 мг/кг) на модели коронароокклюзионного инфаркта миокарда у кроликов. Коронароокклюзию нисходящей ветви левой коронарной артерии у наркотизированных животных осуществляли путем наложения лигатуры на 60 минут с последующей реперфузией в течении 90 минут. Кардиопротекторное действие выражалось в ограничении зоны некроза в 2,5 раза, предотвращении повышении уровня Тропонина I в 3 раза, а также улучшение показателей сократимости при реперфузии. Блокатор АТФ-зависимых калиевых каналов глибенкломид (0,4 мг/кг) практически полностью нивелировал кардиопротекторные эффекты никорандила в дозе 1,8 мг/кг. Ингибитор индуцибельной NO-синтазы аминогуанидин (100 мг/кг) не вызывал полной отмены протективных эффектов никорандила. Обсуждается приоритетный вклад АТФ-зависимых калиевых («первое окно» прекондиционирования) каналов в реализации кардиопротекторных эффектов никорандила (в малых и средних терапевтических дозах), наряду с отсутствием отрицательных гемодинамических эффектов, характерных для донаторов NO. Последнее позволяет обсуждать возможность снижения дозы никорандила для кардиопротекции в клинических исследованиях.

**Ключевые слова:** никорандил, АТФ-зависимые калиевые каналы, ишемия/реперфузия, прекондиционирование.

Danilenko L. M.

**THE ROLE OF MITOCHONDRIAL ATP-DEPENDENT POTASSIUM CHANNELS IN THE CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF NICORANDIL ON THE MODEL OF CORONARY OCCLUSIVE MYOCARDIAL INFARCTION**

Associate Prifessor. Department of Pharmacology. Belgorod State National Research University 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia. E-mail: Danilenko\_L@bsu.edu.ru

**Abstract.** The paper presents the results of a study of the antiischemic effectiveness of nicorandil (1,8 mg/kg) on the model of coronary occlusive myocardial infarction in rabbits. The coronary occlusion in the descending branch of the left coronary artery in anesthetized animals was carried out with a 60 minutes ligation followed by a 90 minutes reperfusion. The cardioprotective effect was expressed in 2.5 times restriction of the areas of necrosis, prevention of the increase in the level of Troponin I in 3 times, and the improvement of contractility during the reperfusion. The blocker of ATP-sensitive potassium channels glibenclamide (0.4 mg/kg) almost completely nullified the cardioprotective effects of nicorandil in a dose of 1.8 mg/kg. The inhibitor of inducible NO synthase, aminoguanidine (100 mg/kg), did not cause a complete abolition of the protective effects of nicorandil. The author discusses the priority contribution of ATP-sensitive potassium («first window» of preconditioning) channels in the realization of cardioprotective effects of nicorandil (small and middle dosage), along with no negative hemodynamic effects characteristic of the donor of NO. The latter allows to discuss the possibility of reducing the dose of nicorandil for cardioprotection in clinical studies.

**Keywords:** nicorandil; ATP-dependent potassium channel; ischemic preconditioning; pharmacological preconditioning.

Изучение ишемического preconditionирования – одно из перспективнейших направлений экспериментальной медицины. Исследование механизма этого феномена дало начало фармакологическому preconditionированию. С клинической точки зрения preconditionирование фармакологическими средствами выглядит предпочтительнее, так как технологически проще и лишено потенциальной опасности ишемических эпизодов для патологически измененных тканей.

Никорандил – производное никотинамида, состоит из остатка амида никотиновой кислоты и нитратной группы, поэтому обладает свойствами активаторов АТФ-зависимых калиевых каналов ( $K_{ATP}$ -каналы) и органических нитратов [5, 6, 7, 8, 10]. Доминирующим эффектом высоких концентраций никорандила является укорочение потенциала действия и рефрактерного периода, т.е. влияние на противоритмические факторы [6]. Известно, что применение никорандила в остром периоде ишемии миокарда значительно уменьшает частоту развития желудочковой тахикардии, оказывает эндотелиопротекторное и кардиопротекторное действие на модели L-NAME индуцированного дефицита оксида азота [4, 11].

**Целью настоящего исследования являлось** изучение вклада  $K_{ATP}$ -каналов в реализацию кардиопротекторного эффекта никорандила на модели коронарооклюзионного инфаркта миокарда у кроликов.

#### **Материалы и методы.**

Изучение выживаемости ишемизированного миокарда было проведено на 42-х лабораторных кроликах массой 2-2,5 кг. Влияние никорандила на размер зоны некроза проводили на модели коронарооклюзионного инфаркта миокарда. Инфаркт миокарда воспроизводился на наркотизированных животных (хлоралгидрат 300 мг/кг), находящихся на управляемом дыхании, путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на уровне нижнего края ушка левого предсердия (60 мин) с последующей реперфузией (90 мин). Поперечные срезы миокарда производили через каждые 0,8 см, начиная с уровня 0,8 см ниже места наложенной лигатуры. Срезы миокарда помещали в емкость содержащую фосфатный буфер (рН 7,4) и 1 мг/мл трифенилтетразолия хлорид для образования красного формазана [2, 3]. Подсчет площадей интактного и некротизированного миокарда левого

желудочка производили на каждом из четырех срезов с помощью попиксельного анализа в программе Adobe Photoshop 9.0. Уровень Тропонин I (TnI) определяли на иммунофлуоресцентном приборе Triage MeterPro (Biosite, США).

Дистантное ишемическое preconditionирование осуществляли путем наложения жгута на верхнюю треть бедра на 10 минут, с последующей 20 минутной реперфузией и воспроизведением модели инфаркта на 60 минут.

Фармакологическое preconditionирование осуществляли с помощью внутривенного введения в маргинальную вену уха кролика никорандила в дозе 1,8 мг/кг («Коронель», производство ООО «ПИК-ФАРМА», Россия). С целью подтверждения роли  $K_{ATP}$ -каналов в реализации кардиопротекторных эффектов никорандила, животным вводили глибенкламид (блокатор  $K_{ATP}$ -каналы) в дозе 0,4 мг/кг. Ингибитор индуцибельной NO-синтазы амингуанидин 100 мг/кг вводили внутривенно за 30 минут до введения никорандила [1, 2, 3].

#### **Результаты и обсуждение**

Моделирование коронароокклюзии с последующей реперфузией приводило к формированию зоны некроза составляющей  $27,3 \pm 1,2\%$ . Одновременно на 90 минуте реперфузии обнаружено увеличение уровня Тропонина I, значение которого составили  $16,26 \pm 1,9$  нг/мл.

Применение дистантного preconditionирования приводит к снижению величины зоны некроза в 3 раза и предотвращения повышения уровня Тропонина I в 4 раза (таблица).

Использование никорандила в дозе 1,8 мг/кг за 30 минут до коронарооклюзионного инфаркта миокарда оказывало кардиопротективное действие, выражающееся в ограничении зоны некроза и уменьшении значения Тропонина I, соответственно, до  $10,7 \pm 0,8\%$  и  $5,2 \pm 1,1$  нг/мл (табл.).

Введение никорандила в дозе 1,8 мг/кг на фоне глибенкламида 0,4 мг/кг оказалось неэффективным и значение размеров зоны некроза и уровня Тропонина I не отличались от группы контроля (табл.). Аналогично глибенкламид полностью предотвращал кардиопротективный эффект дистантного preconditionирования (табл.). Последнее указывает на общий механизм реализации кардиопротективного эффекта

реализующийся с участием АТФ-зависимых калиевых каналов.

Предварительное введение аминогуанидина 100 мг/кг нивелировало на 50 % защитное действие никорандила в дозе 1,8 мг/кг и в меньшей степени (30%) предотвращало кардиопротективные эффекты

дистантного прекодиционирования (табл.). Это свидетельствует о том, что ингибирование iNOS аминогуанидином 100 мг/кг не в полной мере предотвращает реализацию «второго окна» прекодиционирования.

Таблица

**Влияние никорандила (1,8 мг/кг) в/в и дистантного ишемического прекодиционирования на размер зоны некроза и уровень Тропонина I при острой коронароокклюзии (60 мин) с последующей реперфузией (90 мин) у наркотизированных кроликов (M± m; в % от массы левого желудочка; n=6)**

Table

**The influence of nicorandil (1,8 mg/kg, I.V.) and the distant ischemic preconditioning on the size of the necrosis zone and the level of Troponin I in a acute coronary occlusion (60 min.) with subsequent reperfusion (90 min.) in anesthetized rabbits (M± m; in % of the mass of the left ventricle; n=6)**

Группа	% некроза	Уровень Тропонина I, нг/мл
Контроль (инфаркта миокарда)	27,3±1,2	16,26±1,9
КО/реперфузия + дистантное ишемическое прекодиционирование	9,4±0,5*	4,6±1,3*
КО/реперфузия + никорандила (1,8 мг/кг)	10,7±0,8*	5,2±1,1*
КО/реперфузия + глибенкламид (0,4 мг/кг) + дистантное прекодиционирование	24,2±1,5	15,3±1,8
КО/реперфузия + глибенкламид (0,4 мг/кг) + никорандила (1,8 мг/кг)	22,1±1,3	13,2±1,8
КО/реперфузия + аминогуанидин (100 мг/кг) + дистантное прекодиционирование	21,1±1,1	13,7±1,1
КО/реперфузия + аминогуанидин (100 мг/кг) + никорандила (1,8 мг/кг)	15,4±0,8*	8,2±1,1*

Примечание: КО/реперфузия – коронароокклюзия нисходящей ветви левой коронарной артерии на уровне ушка (60 мин) с последующей реперфузией (90 мин); ДИП-дистантное ишемическое прекодиционирование (10 мин) верхней трети бедра;

\*p < 0,05 – в сравнении с контролем.

Прекодиционирование феномен повышения устойчивости клеток к повторному воздействию ишемии, возникающей после одного или нескольких кратковременных эпизодов ишемии-реперфузии. Прекодиционирование имеет раннюю фазу «первое окно», начинающуюся через 5 мин после первого короткого эпизода ишемии и продолжающуюся до 1-3 ч. и позднюю фазу «второе окно», которая эффективно «работает» с 24 до 72 и даже 96 ч. от первого эпизода ишемии. Чтобы запустить защитный эффект прекодиционирования, требуется достичь минимального порогового времени ишемии (5 мин) до начала реперфузии. Однако, с увеличением продолжительности ишемии миокарда прогрессивно уменьшается кардиопротективная эффективности, (представленного тремя пятиминутными эпизодами ишемии-реперфузии), предшествующие тестовой ишемии.

Механизмы поздней фазы прекодиционирования. Основное отличие механизмов поздней фазы ИПК или «второго окна защиты» от ранней фазы или классического прекодиционирования заключаются в реализации защитного эффекта через активацию белкового синтеза и/или модификацию функциональной активности белков на посттрансляционном уровне. Помимо инфарктлимитирующего, антиаритмического эффектов, снижения степени апоптоза поздняя

фаза ИПК способна предупреждать развитие обратимой постишемической дисфункции миокарда (станнинг) и снижать интенсивность воспалительной реакции через модуляцию синтеза противовоспалительных факторов. Механизмы «второго окна защиты» могут быть также разделены на триггерный, сигнальный и эффекторный компоненты. Триггерами поздней фазы ИПК признаны аденозин, опиоиды, катехоламины, АФК и NO. Согласно «гипотезе оксида азота» в отношении поздней фазы ИПК против станнига, NO играет ключевую роль в инициации и в опосредовании феномена «второго защитного окна», осуществляя своё действие через активацию тех же внутриклеточных посредников (ε-ПКС, тирозинкиназа, МАПК транскрипционный фактор NF-kB-nucleus factor-kappa b), что и при ранней фазе ИПК. Однако, точный механизм реализации кардиопротективного действия NO неизвестен. Можно лишь с долей вероятности предположить участие К (АТФ)-каналов, уменьшения кальциевой перегрузки, угнетение сократимости и другие механизмы. Таким образом, после первичного ишемического эпизода начинается фенотипический репрограмминг, вследствие которого включается синтез NO и клетки экспрессируют индуцибельные ферменты, признанные медиаторами отсроченной

кардиопротекции: iNOS, MnСОD (марганецсодержащий супероксиддисмутаза), ЦОГ-2 (циклооксигеназа), альдозоредуктаза, а также происходит синтез белков теплового шока (HSP-heat shock protein). Эффект прекондиционирования сопровождается активацией каскадных механизмов внутриклеточной сигнальной трансдукции, ответственных за экспрессию генов и формирование адаптивных признаков. Такая активация протекает на фоне митохондриальной дисфункции, выражающаяся в последовательных фазовых изменениях активности митохондриальных ферментных комплексов (МФК). Так в условиях острой гипоксии в результате срочной адаптации происходит подавление активности МФК I, осуществляющего НАДН-окисление, но при этом усиливается сукцинатоксидазный путь окисления МФК II. Данная биоэнергетическая перестройка вызывает переориентацию метаболических потоков для поддержания энергозависимых процессов клетки, а также способствует индукции фактора, вызванного гипоксией-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ -hypoxia inducible factor).

При продолжающемся дефиците кислорода возникает долгосрочная адаптация, которая связана с восстановлением активности МФК I и утратой значимости МФК II.

Таким образом, небольшие концентрации никорандила оказывают прямой кардиопротективный эффект на сердечную мышцу, который обусловлен селективной активацией митохондриальных K<sub>ATP</sub>-каналов [12]. Представленные результаты исследований указывают на наличие у никорандила эффекта фармакологического прекондиционирования посредством активации митохондриальных K<sub>ATP</sub>-каналов.

### **Заключение**

Дистантное ишемическое прекондиционирование и фармакологическое прекондиционирование никорандилом (в дозе 1,8 мг/кг) выражалось в ограничении зоны некроза / 2,5 раза, предотвращении повышении уровня Тропонина I в 3 раза, а также улучшение показателей сократимости при реперфузии. Блокатор АТФ-зависимых калиевых каналов глибенкломид (0,4 мг/кг) практически полностью нивелировал кардиопротекторные эффекты никорандила. Ингибитор индуцибельной NO-синтазы амингуанидин (100 мг/кг) не вызывал полной отмены протективных эффектов никорандила.

### **Литература**

1. Даниленко Л.М., Покровский М.В., Новиков О.О. Противовосполительные эффекты дистантного ишемического прекондиционирования в сочетании с рекомбинантным эритропоэтином // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. 2011. № 4. вып. 13/2. С. 49-53.
2. Даниленко Л.М., Покровский М.В., Новиков О.О. Триггерный механизм противоишемического действия эритропоэтина и резвератрола // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. 2012. № 10. Вып. 18/2. С. 138-142.
3. Колесник И.М., Покровский М.В., Гудырев О.С. Дистантное и фармакологическое прекондиционирование – новые возможности стимуляции неоваскулогенеза // Кубанский научный медицинский вестник. 2010. № 6. С. 56-58.
4. Покровский М.В., Старосельцева О.А., Алехин С.А. Эндотелиопротективное действие дистантного ишемического прекондиционирования // Научные ведомости БелГУ. 2012. Вып. 17/2, №22(117). С. 238-242.
5. Полтораки В.В. Горбенко Н.И., Горбушинская М.Ю. Блокада K<sub>ATP</sub> каналов препаратами сульфонилмочевины и кардиоваскулярная безопасность у больных сахарным диабетом 2 типа // Украинський медицинський журнал. 2002. Т. 32, № 6. С. 65-68.
6. Abdallah Y., Preconditioning with diazoxide prevents reoxygenation-induced rigor-type hypercontracture / Y Abdallah, C.Wolf, K. Meuter et al. // J. Mol. Cell Cardiol. 2010. Vol. 48 (I). P. 270-6.
7. Hirose M., Mechanisms of preventive effect of nicorandil on ischaemia-induced ventricular tachyarrhythmia in isolated arterially perfused canine left ventricular wedges /M.Hirose, M. Hirose ,N. Tsujino N., T. Nakada . et al // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2008. Vol. 102, №6. P.504-14.
8. Holzmann S. Cyclic GM Pas possible mediator of coronary arterial relaxation by nicorandil (SG-75)/ S. Holzmann //J. Cardiovasc. Pharmacol. 983.Vol. 5, № 3. P. 364-70.
9. Holzmann S., Pharmacological interaction experiments differentiate between glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> channels and cyclic GMP as components of vasodilation by nicorandil/S. Holzmann, W.R. Kukovetz, C. Braida et al. // Eur.J. Pharmacol. 2002. Vol.215,№1.P.1-7.
10. Kukovetz W.R. Dual mechanism of the relaxing effect of nicorandil by stimulation of cyclic GMP formation and by hyperpolarization./ W.R.Kukovetz, S. C. Holzmann., Braida. et al // J. Cardiovasc. Pharmacol. 2001. Vol.17, №4. P.627-33.
11. Kukovetz W.R., Molecular mechanism of action of nicorandil/ W.R. Kukovetz, S.Holzmann., G.Poch // J. Cardiovasc. Pharmacol. 2004. Vol. 20, Suppl. 3. P. 1-7.
12. Ozcan C., Effective pharmacotherapy against oxidative injury: alternative utility of an ATP-sensitive potassium channel opener/C. Ozcan , A. Terzic , M. Bienengraeber// J. Cardiovasc. Pharmacol. 2007. Vol.50, №4. P.411-8.

13. Taira N. Nicorandil as a hybrid between nitrates and potassium channel activators / N.Taira // *Cardiol.* 1989. Vol.63, №21. P.18-24.

#### References

1. Danilenko L.M., Pokrovsky M.V., Novikov O.O. Anti-inflammatory effects of distant ischemic preconditioning combined with recombinant erythropoietin // *Belgorod State University Scientific bulletin. Medicine. Pharmacy.* 2011. № 4. №. 13/2. P. 49-53.

2. Danilenko L.M., Pokrovsky M.V., Novikov O.O. A toggle mechanism of the anti action of erythropoietin and resveratrol // *Belgorod State University Scientific bulletin. Medicine. Pharmacy.* 2012. № 10, №. 18/2. P. 138-142.

3. Kolesnik I.M., Pokrovsky M.V., Gudyrev O.S. Distant and pharmacological preconditioning – new opportunities for stimulating neovaskulogeneza // *Research Medical Gazette.* 2010. № 6. C. 56-58.

4. Pokrovsky M.V., Staroseltseva O.A., Alehin S.A. Endotelioprotektivnoe distant action of ischemic preconditioning // *Belgorod State University Scientific bulletin. Medicine. Pharmacy.* 2012. Vol. 17/2, №22 (117). P. 238-242.

5. Poltorak V.V., Gorbenko N.I., Gorbushinskaya M.Y. Blockade KATF channels sulfonylureas and cardiovascular safety in patients with type 2 diabetes mellitus /V.V. Poltorak, // *Ukrainsky medical journal.* 2002. T. 32, № 6. P. 65-68.

6. Abdallah Y., Preconditioning with diazoxide prevents reoxygenation-induced rigor-type hypercontracture / Y Abdallah ,C.Wolf , K. Meuter et al. // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2010. Vol. 48 (1). P. 270-6.

7. Hirose M., Mechanisms of preventive effect of nicorandil on ischaemia-induced ventricular tachyarrhythmia in isolated arterially perfused canine left ventricular wedges /M.Hirose, M. Hirose ,N. Tsujino N., T. Nakada . et al // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008. Vol. 102, №6.P.504-14.

8. Holzmann S. Cyclic GM Pas possible mediator of coronary arterial relaxation by nicorandil (SG-75)/ S. Holzmann // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 983.Vol. 5, № 3. P. 364-70.

9. Holzmann S., Pharmacological interaction experiments differentiate between glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> channels and cyclic GMP as components of vasodilation by nicorandil/S. Holzmann, W.R. Kukovetz, C. Braida et al. // *Eur.J. Pharmacol.* 2002. Vol.215, №1. P.1-7.

10. Kukovetz W.R. Dual mechanism of the relaxing effect of nicorandil by stimulation of cyclic GMP formation and by hyperpolarization / W.R.Kukovetz, S. C. Holzmann,. Braida. et al // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2001. Vol.17, №4. P.627-33.

11. Kukovetz W.R., Molecular mechanism of action of nicorandil/ W.R. Kukovetz, S.Holzmann., G.Poch // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004. Vol. 20, Suppl. 3. P. 1-7.

12. Ozcan C., Effective pharmacotherapy against oxidative injury: alternative utility of an ATP-sensitive potassium channel opener/C. Ozcan , A. Terzic, M. Bienengraeber // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2007. Vol.50, №4. P.411-8.

13. Taira N. Nicorandil as a hybrid between nitrates and potassium channel activators / N.Taira // *Cardiol.* 1989. Vol.63, №21. P.18-24.