

2-ЭТИЛТИОБЕНЗИМИДАЗОЛА ГИДРОБРОМИД АКТИВИРУЕТ BK_{Ca}-КАНАЛЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК АОРТЫ КРЫС

ЛАЗУКО С.С.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.

Целью исследования было продемонстрировать вазодилаторный эффект 2-этилтиобензимидазола гидробромида, реализующийся через активацию кальцием активируемых калиевых каналов большой проводимости (BK_{Ca}-каналов) гладкомышечных клеток аорты крыс.

Исследование проводилось на белых нелинейных крысах-самках. Кольца аорты шириной 3 мм иссекали из средней трети грудной аорты и помещали в термостатируемые ванночки, наполненные раствором Krebs-Хензелейта, аэрированном карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂), температура перфузата 37°C. Эксперимент проводили на приборе Schuler Organ bath Type 809 (Hugo Sachs Elektronik, ФРГ). Кольца аорты сокращались в изометрическом режиме (датчик силы F30 Type372 (Hugo Sachs Elektronik, ФРГ).

Дилатацию вызывали возрастающими концентрациями 2-этилтиобензимидазола гидробромида (от 10⁻¹⁵ до 10⁻³ М) или возрастающими концентрациями NS-1619 (от 10⁻¹⁰ до 10⁻³ М), после предсокращения кольца аорты фенилэфрином (10⁻⁶ М). Блокаду кальцием активируемых калиевых каналов гладкомышечных клеток аорты осуществляли тетраэтиламмонием (ТЭА, 1 мМ).

В экспериментах на изолированных сегментах аорты крыс было продемонстрировано, что 2-этилтиобензимидазола гидробромид оказывает вазодилаторный эффект через активацию кальцием активируемых калиевых каналов гладкомышечных клеток артериальных сосудов, в равной степени, что и активатор BK_{Ca}-каналов NS-1619.

Результаты, полученные в данной работе, могут быть положены в основу предложений по применению 2-этилтиобензимидазола гидробромида как вазоактивного вещества, а также для формирования предложений по разработке новых лекарственных препаратов со структурой, подобной бемитилу, способных оказывать влияние на функциональное состояние эндотелия и калиевых каналов артериальных сосудов.

Ключевые слова: 2-этилтиобензимидазола гидробромид, BK_{Ca}-каналы, тонус сосудов.

Abstract.

The aim of this study was to show vasodilative effect of 2-ethylthiobenzimidazol hydrobromide, which is realized through the activation of calcium-activated potassium channels of high conductivity (BK_{Ca}-channels) of smooth muscle cells of rats' aorta.

The study was conducted on white non-linear female rats. Aortic rings with the width of 3 mm were excised from the middle third of the thoracic aorta and were placed in the thermostatic baths filled with Krebs-Henseleit solution, aerated with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂) at the temperature of 37°C. The experiment was performed on the Schuler Organ bath Type 809 (Hugo Sachs Elektronik, Germany). The aortic rings were contracted in an isometric mode (force sensor F30 Type372 (Hugo Sachs Elektronik, Germany)).

Dilatation was caused by increasing concentrations of 2-ethylthiobenzimidazol hydrobromide (from 10⁻¹⁵ to 10⁻³ M) or increasing concentrations of NS-1619 (from 10⁻¹⁰ to 10⁻³ M). Calcium-activated potassium channels of smooth muscle aortal cells were blocked by tetraethylammonium (TEA, 1 mM).

The fact that 2-ethylthiobenzimidazol hydrobromide affects the value of vasodilatation response of vessels through the activation of calcium-activated potassium channels of smooth muscle cells of arterial vessels to the same extent as an activator of BK_{Ca}-channels NS-1619 was demonstrated in experiments on isolated aortal segments of rats.

The results, obtained in this study may be taken as the basis for proposals concerning the use of 2-ethylthiobenzimidazol hydrobromide as a vasoactive substance and also for those concerning the development of new drugs with the structure similar to bemytil, which are able to exert influence on the functional state of the endothelium and potassium channels of arterial vessels.

Key words: 2-ethylthiobenzimidazol hydrobromide, BK_{Ca}-channels, vascular tone.

Разработка антигипоксантов, а также данные о антигипоксических свойствах дибазола [1] послужили основой для поиска активных соединений в ряду бензимидазола и созданию веществ с той же функциональной группой, что и в аминотиолах, но в составе имидазольного ядра 2-тиомеркаптобензимидазола. Так, были синтезированы бемитил (этилтиоимидазол), алмид (аллилтиобензимидазол) и этомерзол (этилтиобензимидазола гидрохлорид). Эти препараты оказывают сходные с аминотиолами по характеру и выраженности эффекты при гипоксии [2]. На первых этапах экспериментального изучения бемитила внимание уделялось его способности сохранять физическую выносливость в осложненных ситуациях, благодаря его способности снижать потребление митохондриями кислорода, а также существенно ускорять восстановление дееспособности после предельных нагрузок, в стрессовых ситуациях, после отравления ФОС и т.д. [3, 4]. Благодаря механизмам действия, состоящих в быстроразвивающейся активации синтеза РНК, структурных и ферментативных белков в различных органах и тканях, стабилизации мембран и подавлению процессов свободнорадикального окисления, бемитил и его аналоги объединили в особый класс актопротекторов. Однако дальнейшие исследования актопротектора бемитила показали, что он характеризуется более широким спектром фармакологической активности.

Бемитил способен воздействовать на к-опиодные рецепторы и тем самым влиять на натриевые, кальциевые, калиевые ионные токи нейрональной мембраны за счет их непосредственного взаимодействия с канальными структурами [5]. Кроме того, уменьшает площадь ишемического повреждения сердца, стимулирует репаративные процессы в миокарде [6]. В основе последнего эффекта лежит его способность действовать подобно фармакологическому прекодиционированию, активируя K_{ATP} -калиевые каналы [7]. Бемитил стимулирует цитохром P-450 [8] – фермент, стимуляция которого в эндотелиоцитах приводит к образованию эпоксиэйкозотриеновой кислоты (EET), активирующей VCa -каналы гладкомышечных клеток. Бемитил имеет общие черты строения с NS1619 (также производное бензимидазола), являющийся золотым

эталонном активаторов VCa -каналов гладкомышечных клеток.

Кроме того, бемитил также как и дибазол относится к производным бензимидазола. Ранее нами было показано, что дибазол обладает способностью усиливать эндотелийзависимое расслабление и стимулировать калиевые каналы [9]. Все эти факты дают нам возможность предположить, что бемитил, как производное бензимидазола, может обладать способностью оказывать воздействие на эндотелийзависимую дилатацию и различные семейства калиевых каналов гладкомышечных клеток, и тем самым влиять на тонус артериальных сосудов.

В данной работе в качестве производного бензимидазола использовалась субстанция, зарегистрированная Министерством здравоохранения республики Беларусь 2-этилтиобензимидазола гидробромид (регистрационное удостоверение №10/07/1767 выдано институту физико-органической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь).

В связи с этим, целью исследования было продемонстрировать вазодилаторный эффект 2-этилтиобензимидазола гидробромида, реализующийся через активацию кальцием активируемых калиевых каналов большой проводимости гладкомышечных клеток аорты крыс.

Методы

Исследование проведено на 49 белых нелинейных крысах-самках массой 180-220 г. Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. Для устранения влияния сезонной и циркадной зависимости на исследуемые показатели эксперименты проводились в весенне-летний период в первой половине дня. Эксперименты проводились в соответствии с требованиями Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990).

Кольца аорты шириной 3 мм иссекали из средней трети грудной аорты и помещали их в термостатируемые ванночки, наполненные раствором Кребса-Хензелейта следующего состава (мм/л): NaCl – 118; KCl – 4,8; $MgSO_4$ 1,18; KH_2PO_4 -1,2; $CaCl_2$ – 2,5; $NaHCO_3$ – 25,0; глюкоза - 11; pH – 7,4; аэрированном карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2), температура перфузата

37°C. В течение периода стабилизации, который составлял 2 часа, каждые 15 минут обновляли раствор, омывающий препарат аорты. Эксперимент проводили на приборе Schuler Organ bath Type 809 (Hugo Sachs Elektronik, ФРГ). Кольца аорты сокращались в изометрическом режиме (датчик силы F30 Type372 (Hugo Sachs Elektronik, ФРГ)).

Вазодилатацию оценивали классическим способом (предсокращали гладкомышечные клетки кольца аорты фенилэфрином, 10^{-6} М) с последующим кумулятивным добавлением в перфузионный раствор одно из исследуемых веществ либо 2-этилтиобензидазола гидробромид от 10^{-15} до 10^{-3} М, либо NS-1619 от 10^{-10} до 10^{-3} М.

Для выяснения роли VK_{Ca} -каналов в вазодилатации использовали блокатор тетраэтиламмоний (ТЭА). Была выбрана его концентрация 1 мМ, как избирательно блокирующая VK_{Ca} -каналы [10].

Обработка полученных результатов проводилась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STATISTICA 6.0, а также программного обеспечения GraphPad Prism (San Diego, California, USA).

Результаты

Влияние 2-этилтиобензидазола гидробромид на выраженность дилатации сегмента аорты. Исходное напряжение сегмента аорты в группах животных с интактным и удаленным эндотелием в присутствии и отсутствии блокатора VK_{Ca} -каналов ТЭА составляло в среднем 1790 ± 48 мН и 1802 ± 52 мН соответственно. Сократительный ответ сегмента аорты на фенилэфрин не отличался между исследуемыми группами и составлял в среднем $3460 \pm 115,1$ мН. Таким образом, исходные условия для действия 2-этилтиобензидазола гидробромид были одинаковые.

Добавление в ванночку для перфузии 2-этилтиобензидазола гидробромид в возрастающей концентрации приводило к дозозависимому расслаблению гладкой мышцы сегмента аорты крысы с интактным эндотелием. Дилатация начиналась при концентрации 2-этилтиобензидазола гидробромид 10^{-9} М, при этом максимальная дилатация достигалась при концентрации исследуемого препарата 10^{-3} М и составляла 38% от прироста напряжения сегмента аорты, вызванного фенилэфрином. На фоне удаленного эндотелия

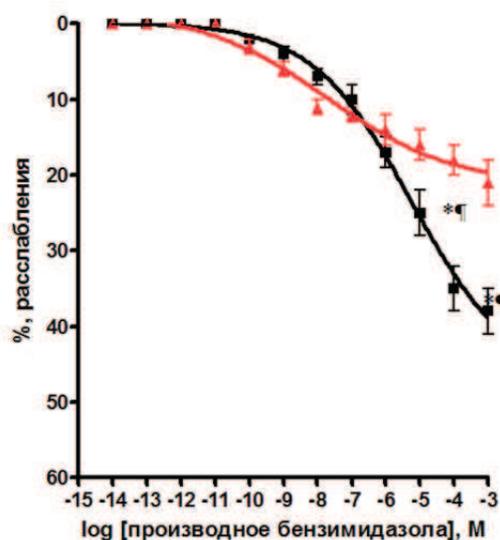


Рисунок 1 - Влияние возрастающих концентраций 2-этилтиобензидазола гидробромид на величину дилататорного ответа изолированного кольца аорты, выраженное в процентах, на фоне интактного и удаленного эндотелия.

Примечание: по оси абсцисс – log концентрации 2-этилтиобензидазола гидробромид (М); по оси ординат – процент расслабления, развившегося в ответ на введение в перфузионный раствор 2-этилтиобензидазола гидробромид. Цифровые данные представлены как $M \pm m$.

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем в условиях интактного эндотелия.

■ – группа животных с интактным эндотелием, ▲ – группа животных с удаленным эндотелием.

вазодилатация изолированного сегмента аорты начиналась при концентрации ацетилхолина 10^{-8} М, достигала максимума при концентрации 10^{-3} М и составляла 22% от прироста напряжения сегмента, вызванного фенилэфрином (рис. 1).

Добавление в перфузионный раствор блокатора $ВК_{Ca}$ -каналов тетраэтиламмония аннулировало вазорелаксирующий эффект 2-этилтиобензимидазола гидробромида как в условиях интактного, так и удаленного эндотелия (рис. 2).

Таким образом, можно заключить, что вызванная 2-этилтиобензимидазолом гидробромидом вазодилатация изолированного сегмента аорты формируется за счет активации $ВК_{Ca}$ -каналов гладкомышечных клеток сосуда.

Влияние NS-1619 на выраженность дилатации сегмента аорты. Исходное напряжение сегмента аорты в группе животных с интактным эндотелием составляло в среднем 1860 ± 44 мН. В группе животных с интактным эндотелием прирост напряжения после введения в перфузионный раствор фенилэфрина составлял 3124 ± 38 мН. Под влиянием кумулятивного введения в ванночку активатора

$ВК_{Ca}$ -каналов NS-1619 (10^{-8} – 10^{-3} М) релаксация сегмента аорты не наблюдалась. Так, при концентрации активатора в ванночке 10^{-3} М расслабление составляло всего лишь 8% от величины прироста, вызываемого введением фенилэфрина (рис. 3).

Исходя из полученных данных, можно предположить, что действие активатора $ВК_{Ca}$ -каналов NS-1619 экранируется метаболитами эндотелиального происхождения, предположительно монооксидом азота (NO). Поэтому на следующем этапе эндотелий аккуратно удаляли хлопковой нитью путем однократного прокручивания его по внутренней стенке подготовленного сегмента аорты. Исходное напряжение сегмента аорты с удаленным эндотелием контрольной группы животных и прирост в ответ на введение фенилэфрина были выражены в той же степени, что и в группе животных с интактным эндотелием.

Возрастающие концентрации NS-1619 в сегментах аорты с удаленным эндотелием приводили к дозозависимому расслаблению. При концентрации NS-1619 в перфузионном растворе 10^{-3} М расслабление составляло 45%, что не отличалось от вазодилататорного эффекта 2-этилтиобензимидазола гидробромида (рис. 3).

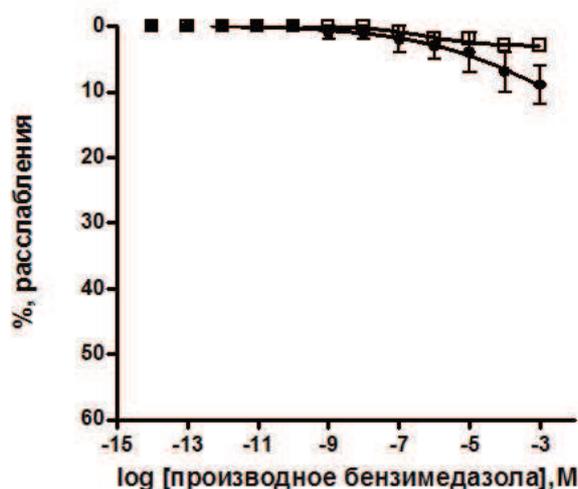


Рисунок 2 - Влияние возрастающих концентраций 2-этилтиобензимидазола гидробромида на величину дилататорного ответа изолированного кольца аорты, выраженное в процентах, на фоне интактного и удаленного эндотелия, в условиях блокады $ВК_{Ca}$ -каналов тетраэтиламмонием.

Примечание: по оси абсцисс – log концентрации 2-этилтиобензимидазола гидробромида (М); по оси ординат – процент расслабления, развившегося в ответ на введение в перфузионный раствор 2-этилтиобензимидазола гидробромида. Цифровые данные представлены как $M \pm m$.

- – группа животных с удаленным эндотелием на фоне блокады $ВК_{Ca}$ -каналов тетраэтиламмонием;
- – группа животных с интактным эндотелием на фоне блокады $ВК_{Ca}$ -каналов тетраэтиламмонием.

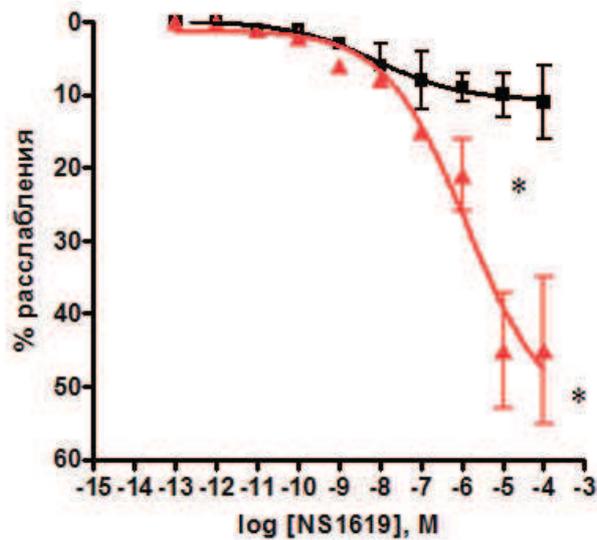


Рисунок 3 - Влияние возрастающих концентраций NS1619 на величину дилататорного ответа изолированного кольца аорты, выраженное в процентах, на фоне интактного и удаленного эндотелия. Примечание: по оси абсцисс – log концентрации NS1619 (M); по оси ординат – процент расслабления, развившегося в ответ на введение в перфузионный раствор NS1619. Цифровые данные представлены как $M \pm m$. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем в условиях интактного эндотелия; ■ – группа животных с интактным эндотелием; ▲ – группа животных с удаленным эндотелием.

Обсуждение

Известны некоторые механизмы активации $ВК_{Ca}$ -каналов NS-1619. Во-первых, NS-1619 может непосредственно действовать на $ВК_{Ca}$ -калиевый канал, через рецепторы G-белка или за счет фосфорилирования субъединиц канала [11]. Во-вторых, активация канала NS-1619 является частично следствием ограниченного увеличения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , что влечет за собой активацию $ВК_{Ca}$ -каналов, увеличение выхода ионов калия и, как следствие, гиперполяризацию мембраны гладкомышечных клеток [11]. От того, что вызванное NS-1619 увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция активирует $ВК_{Ca}$ -каналы, но не вызывает сокращения клетки, может быть тот факт, что NS-1619 очень хорошо растворим в липидах и поэтому может избирательно распределиться в плазмолемме и субплазмолеммальных участках мембран, в том числе и кавеоллах мембран. Этот пул Ca^{2+} представляет собой так называемый «несократительный компармент», так как депонированный в мембране Ca^{2+} не участвует в генерации сокращения, а выполняет другие внутриклеточные функции. Кроме того, NS-1619 также ингибирует потен-

циал-зависимые Ca^{2+} -каналы, потенциал-зависимые K^+ -каналы, K_{ATP} -калиевые каналы. Подобные свойства активаторов $ВК_{Ca}$ -каналов позволяют предполагать возможность применения селективных активаторов $ВК_{Ca}$ -каналов для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

Впервые в работе показано, что 2-этилтиобензимидазола гидробромид оказывает вазодилататорный эффект через активацию $ВК_{Ca}$ -каналов гладкомышечных клеток. Обращает на себя внимание и тот факт, что действие 2-этилтиобензимидазола гидробромид на калиевые каналы реализуется в присутствии эндотелия сосудов и частично в денудированных сосудах. Напротив, NS1619 реализует свой эффект только в отсутствие эндотелия. Этот факт наводит на мысль о том, что действие исследуемого вещества реализуется через иные механизмы, отличные от механизма действия NS1619, и требует дальнейшего изучения. Выявленное действие 2-этилтиобензимидазола гидробромид на калиевые каналы гладкомышечных клеток артериальных сосудов позволит применять его не только как препарат для коррекции гомеостаза организма в условиях воздействия экстремальных факторов различного генеза, но и как средство, вызывающее

дилатацию артериальных сосудов через активацию VK_{Ca} -каналов, в частности, для профилактики и лечения артериальной гипертензии. Лекарственные препараты, изготовленные на основе отечественного 2-этилтиобензидазола гидробромида, могут быть значительно дешевле зарубежных аналогов.

Исследование выполнено при поддержке ГПНИ Беларуси, по заданию 1.2.49.

Литература

1. Марышева, В. В. Антигипоксанты аминотиолового ряда / В. В. Марышева // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2007. – Т. 5, № 1. – С. 17-27.
2. Зарубина, И. В. Фармакологическая защита мозга, сердца и печени от острой гипоксии / И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов // *Медицинский академический журнал.* – 2003. – Т. 3, № 2. – С. 49-57.
3. Виноградов, В. М. Фармакологическая защита головного мозга от гипоксии / В. М. Виноградов, Б. И. Криворучко // *Психофармакологическая и биологическая наркология.* – 2001. – Т. 1, № 1. – С. 27-37.
4. Фармакокинетика некоторых производных бензимидазола / А. А. Спасов [и др.] // *Вопросы медицинской химии.* – 2002. – № 3. – С. 233-258.
5. Изучение механизмов мембранотропного действия соединения РУ-1203 на ионные каналы нейронов прудовика / О. Ю. Гречко [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2012. – Т. 153, № 3. – С. 276-280.
6. Изучение антиишемического действия «Афобазола» в условиях экспериментального инфаркта миокарда / С. А. Крыжановский [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2010. – Т. 150, № 9. – С. 284-287.
7. Inducible nitric oxide synthase in the myocardium / I. Buchwalow [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* – 2001 Jan. – Vol. 217, N 1/2. – P. 73-82.
8. Сорокина, Е. А. Влияние бемитила на цитохром р-450-зависимые монооксигеназы в печени крыс и лимфоцитах человека / Е. А. Сорокина, С. В. Сибиряк, С. А. Сергеева // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2002. – № 3. – С. 31-34.
9. Дибазол как эндотелийзависимое вазодилатирующее средство / А. П. Солодков [и др.] // *Рецепт.* – 2008. – № 3. – С. 80-84.
10. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions / P. D. Langton [et al.] // *J. Physiol.* – 1991 Mar. – Vol. 260, N 3. – P. 927-934.
11. VK channel activation by NS-1619 is partially mediated by intracellular Ca^{2+} release in smooth muscle cells of porcine coronary artery / H. Yamamura [et al.] // *British Journal of Pharmacology.* – 2001 Feb. – Vol. 132, N 4. – P. 828-834.

Поступила 03.09.2014 г.

Принята в печать 07.10.2014 г.

Сведения об авторах:

Лазуко С.С. – к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра нормальной физиологии. E-mail: lazuko71@mail.ru – Лазуко Светлана Степановна.