

EKSPERIMENTINIAI TYRIMAI

2-aminopiridino ir jo sulfonilkarbamidinių analogų anticholinerginis poveikis jūrų kiaulytės prieširdžių elektromechaniniam aktyvumui

Vida Gendvilienė, Danguolė Zablockaitė, Irma Martišienė, Herta Gurskaitė, Antanas Stankevičius
Kauno medicinos universiteto Kardiologijos institutas

Raktažodžiai: jūrų kiaulytės prieširdžiai, karbacholas, 2-aminopiridinas, 2-aminopiridino dariniai, veikimo potencialų trukmė, susitraukimo jėga.

Santrauka. Darbo tikslas. Ištirti 2-aminopiridino (2-AP) ir naujų jo sulfonilkarbamidinių darinių: 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26 ir 2-AP27 poveikį jūrų kiaulyčių prieširdžio veikimo potencialų trukmei bei susitraukimo jėgai karbacholu stimuliuotų muskarino receptorių sąlygomis.

Eksperimentiniai tyrimai atlikti naudojant standartinę miokardo elektromechaninio aktyvumo registravimo metodiką. Perfuzuojant prieširdžio raumenėlius Tyrodė fiziologiniu tirpalu (kontrolė), veikimo potencialų trukmės, esant 90 proc. (VP_{90}) ir 50 proc. (VP_{50}) repoliarizacijos lygiams, atitinkamai buvo $112,32 \pm 6,07$ ms ir $50,21 \pm 3,25$ ms ($n=19$), susitraukimo jėga – $1,42 \pm 0,28$ mN ($n=20$). Muskarino receptorių agonistas ir K_{Ach} kanalų aktyviklis karbacholas ($10^{-6}M$) mažino VP_{90} iki $35,31 \pm 4,21$ proc., VP_{50} – iki $26,42 \pm 2,66$ proc. ($n=19$) ($p < 0,001$), o susitraukimo jėgą – iki $24,23 \pm 2,0$ proc. ($n=20$) ($p < 0,001$) palyginus su kontrole.

2-aminopiridino struktūros modifikavimas, pakeitus 2-amino grupę 4-toluolsulfonilkarbamido fragmentu ir kvaternizavus piridino žiedo azotą, didino karbacholu sumažintas veikimo potencialų trukmes bei susitraukimo jėgą. Pagal maksimalias veikimo potencialų trukmės VP_{90} padidėjimo reikšmes nustatyta tirtų junginių efektyvumo eilė: 2-AP27 >> 2-AP26 > 2-AP22 ≥ 2-AP > 2-AP21. Efektyviausiu anticholinerginiu poveikiu ($936,60 \pm 178,23$ proc.) pasižymėjo junginys 2-AP27, turintis 4-toluolsulfonilkarbamido fragmentą ir 4-nitrobenzilo radikalą prie kvaternizuoto piridino azoto. Žymiai mažesnį anticholinerginį poveikį sukėlė junginiai 2-AP22 ($231,39 \pm 28,48$ proc.) ir 2-AP26 ($318,25 \pm 63,81$ proc.), kurie prie piridino kvaternizuoto azoto turi atitinkamai metilo ir alilo radikalus. Silpniausiu anticholinerginiu veikimu pasižymėjo junginys 2-AP21 ($63,59 \pm 34,38$ proc.), kurio piridino žiedo azotas buvo nekvaternizuotas.

Įvadas

Klinikiniai ir eksperimentiniai tyrimai rodo, kad dažniausiai pasitaikantys ir net mirtį sąlygojantys širdies ritmo sutrikimai yra prieširdžių virpėjimas ir tachiaritmijos (1–4). Vieni svarbiausių šias aritmijas sukeliančių veiksnių yra miokardo ląstelių veikimo potencialų (VP) trukmės ir efektyviojo refrakterinio periodo sutrumpėjimas. Miokardo ląstelių veikimo potencialų repoliarizaciją (1, 2, 3 ir 4 fazes) bei efektyviojo refrakterinio periodo trukmes lemia K^+ jonų srovės per įvairių rūšių K^+ kanalus, taip pat Ca^{2+} jonų srovė per L-tipo Ca^{2+} kanalus (5–8).

Miokardo ląstelių K^+ kanalai yra svarbūs ne tik veikimo potencialų (VP) trukmės bei formos, ramybės potencialo, peismeikerinių ląstelių automatizmo, širdies ritmo, nervinio impulso sklidimo reguliatoriai,

bet ir miokardo funkciją keičiančių neurotransmiterių, neurohormonų, viduląstelių mediatorių bei įvairių vaistų taikiniai (6, 9).

Žinduolių miokardo K^+ kanalai skirstomi į įtampa ir ligandų valdomus K^+ srovių kanalus (10). Pirmosios grupės kanalams priklauso greitos aktyvacijos ir inaktyvacijos trumpalaikės išeinančios (I_{to}), uždelsto išlyginimo (I_{Kr}) ir vidinio išlyginimo „bazinės“ K^+ srovės kanalai (I_{K1}). Antrosios grupės kanalams priskiriami muskarino receptorių valdomi K^+ kanalai (K_{Ach}), viduląstelinio ATF-u reguliuojami K^+ kanalai (K_{ATF}) ir viduląstelinio Ca^{2+} ar Na^+ aktyvuojami K^+ kanalai (K_{Ca} , K_{Na}) (9, 10).

Nuo ligandų valdomų vidinio išlyginimo K^+ jonų srovės kanalų (K_{Ach} ir K_{ATF}) aktyvumo labiausiai priklauso trečiosios (galutinės greitosios repoliariza-

cijos) VP fazės, o kartu ir VP trukmė. Tam tikrais atvejais, ypač padidėjus šių kanalų aktyvumui, gali atsirasti širdies ritmo sutrikimų.

Tokios sąlygos susidaro, padidėjus parasimpatinės nervų sistemos tonusui arba dirginant klajoklį nervą, kai iš poganglinių skaidulų išsiskyręs acetilcholinis jungiasi su miokardo ląstelių membranoje esančiais M_2 muskarino receptoriais ir, dalyvaujant G_i baltymams, aktyvuoja šių receptorių valdomus K_{ACh} kanalus bei padidina K^+ jonų srovę iš ląstelės. Be to, G_i baltymų aktyvinimas šių receptorių agonistais slopina fermentą adenilatciklazę, todėl mažėja cAMF-o susidarymas, Ca^{2+} srovė per L-tipo kanalus. Dėl to mažėja VP trukmė, susitraukimo jėga, greitėja miokardo ląstelių repoliarizacija, trumpėja efektyvusis refrakterinis periodas ir susidaro sąlygos prieširdžių virpėjimui pasireikšti (11, 12).

Šiems aritmijoms pašalinti vartojami antiaritminiai preparatai, kurie reguluoja joninių kanalų, lemiančių miokardo veikimo potencialų repoliarizaciją, jų trukmę bei refrakterinį periodą, aktyvumus.

Daugelį metų širdies ritmui reguliuoti vartojami III klasės antiaritmikai *d,l*-sotalolas, amiodaronas, aminopiridiniai, kurie slopina K^+ jonų sroves per įtampa valdomus kalio kanalus. Be to, nustatyta, kad šie preparatai pasižymi ir silpnomis anticholinerginėmis, t. y. K_{ACh} kanalus blokuojančiomis savybėmis (13, 14). Tačiau šie vaistai aritmijas ne tik šalina, bet, ilgindami VP trukmę, repoliarizacijos fazes bei QT intervalą ir lėtindami laidumą, gali sukelti net *reentry* tipo aritmijas ir polimorfinę skilvelių tachikardiją (*torsades de pointes*) (15–17). Be to, dėl neselektyviai blokuojamų įvairių rūšių K^+ kanalų jie sukelia daug kitų nepageidaujamų reakcijų (18).

Pastaraisiais metais, įvertinus didelės grupės sulfonilkarbamidinių antidiabetinių junginių (glibenklamido, tolbutamido) cheminę struktūrą bei savybes slopinti aritmijas, kylančias išeminiame miokarde dėl K^+ srovės per ATF reguliuojamus K^+ kanalus padidėjimo, buvo susintetinti (KMU Kardiologijos instituto Kardiotropinių medžiagų tyrimo grupės) nauji sulfonilkarbamidiniai 2-aminopiridino dariniai. Juose 2-aminopiridino (2-AP) žiedo amino grupė buvo pakeista 4-toluolsulfonilkarbamido fragmentu. Be to, trijuose 2-AP analoguose (išskyrus 2-AP21) piridino žiedo azotas buvo kvaternizuotas metilo (junginys 2-AP22), alilo (junginys 2-AP26) ir nitrobenzilo radikalais (junginys 2-AP27). Mūsų ankstesni 2-AP ir šių naujų jo darinių poveikio miokardo veikimo potencialų trukmei bei susitraukimo jėgai, kai pinacidilu buvo aktyvuoti K_{ATF} kanalai (modeliuojant miokardo išemiją), tyrimai parodė, kad tokie 2-AP struktūros modifikavimai suteikė

šioms junginiams K_{ATF} kanalus slopinančių savybių (19).

Šio tyrimo tikslas – ištirti 2-aminopiridino ir jo sulfonilkarbamidinių darinių (2-AP21, 2-AP22, 2-AP26, 2-AP27) poveikį jūrų kiaulytės prieširdžių elektromechaninio aktyvumo parametrams (veikimo potencialų trukmei ir susitraukimo jėgai), esant aktyvuotiems K_{ACh} kanalams (modeliuojant padidėjusį parasimpatinės nervų sistemos aktyvumą).

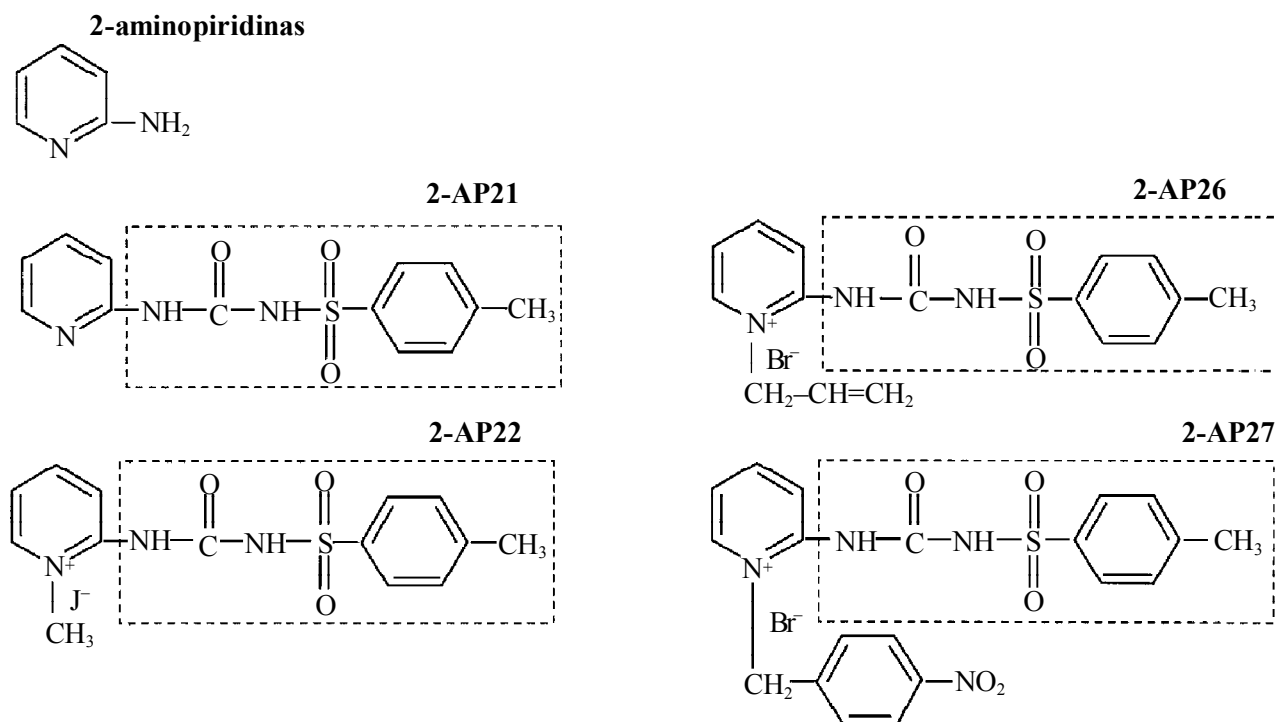
Tyrimo medžiaga ir metodai

Ekspirimentiniai tyrimai atlikti su jūrų kiaulyčių (250–350 g) kairiojo prieširdžio raumenėliais. Tyrimams su jūrų kiaulyčių širdies preparatais gautas Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos (2004 m. gruodžio 3 d. įsakymas Nr. B1-1047) leidimas Nr. 122. Izoliuoti prieširdžio raumenėliai (4–5 mm ilgio) talpinami į termostatuojamą kamerą ir perfuzuojami oksigenuotu (pO_2 580–600 mmHg) Tyrodė fiziologiniu tirpalu (mM): NaCl 144, $CaCl_2$ 1,8, $MgCl_2$ 1,0, gliukoze 5, HEPES 10, pH 7,4, 36°C temperatūroje. Izometrinis raumenėlio susitraukimas registruojamas mechanoelektriniu davikliu („Harvard Apparatus“, JAV), veikimo potencialai – 2,5 M KCl tirpalu užpildytais mikroelektrodais. Raumenėlis dirginamas chloruotais sidabriniais elektrodais (dirginimo dažnis – 1 Hz, trukmė – 2–5 ms, amplitudė 3–4 kartus didesnė už slenkstinę). Veikimo potencialų trukmė, esant 90 proc. (VP_{90}) ir 50 proc. (VP_{50}) repoliarizacijos lygiams, ir susitraukimo jėga buvo registruojami ir analizuojami kompiuteriu naudojant specializuotą programą.

Tirtas 2-aminopiridino (pasižymintio III klasės antiaritminių preparatų savybėmis) („Sigma“, Vokietija) ir jo sulfonilkarbamidinių analogu: 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26, 2-AP27 poveikis jūrų kiaulyčių prieširdžių veikimo potencialų trukmei ir susitraukimo jėgai karbacholu („Sigma“, Vokietija) aktyvuotu muskarino receptorių sąlygomis (1 pav. pateikiamos struktūrinės tirtų junginių formulės).

Ekspirimentų eiga: po 50–60 min. prieširdžio raumenėlio perfuzijos Tyrodė fiziologiniu tirpalu, nusišalvėjus stacionarioms susitraukimo jėgos ir veikimo potencialų reikšmėms, raumenėlis 15 min. perfuzuojamas fiziologiniu tirpalu su muskarino M_2 receptorių agonistu karbacholu (10^{-6} M), po to 15 min. fiziologiniu tirpalu su tiriamųjų medžiagų, t. y. 2-aminopiridino arba jo darinių: 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26, 2-AP27 atitinkamomis koncentracijomis, pradedant nuo 10^{-5} M ir didinant jas iki 10^{-4} M, 10^{-3} M.

Veikimo potencialų trukmės ir susitraukimo jėgos kitimas, veikiant karbacholu, apskaičiuotas procentais palyginus su kontrole, o 2-aminopiridino ir jo analogų



1 pav. Struktūrinės 2-aminopiridino ir jo sulfonilkarbamidinių darinių formulės

Punktyrine linija pažymėtas 4-toluolsulfonilkarbamidinis fragmentas.

poveikis apskaičiuotas procentais palyginus su karbacholo poveikiu. Taikant Michaelio-Menten lygtį, nustatytos tirtų medžiagų koncentracijos, 50 proc. padidinančios karbacholų sumažintas VP_{90} trukmės (EC_{50}) (20). Eksperimentiniai duomenys vertinti taikant Stjudento (*t*) kriterijų, skirtumas tarp tiriamųjų dydžių statistiškai reikšmingas, kai $p < 0,05$.

Rezultatai

Jūrų kiaulytės prieširdžio preparatus perfuzuojant fiziologiniu Tyrodė tirpalu (kontrolė), VP_{90} trukmė buvo $112,32 \pm 6,07$ ms, $VP_{50} = 50,21 \pm 3,25$ ms, ($n=19$), susitraukimo jėga – $1,42 \pm 0,28$ mN ($n=20$). Muskarino receptorių agonistas ir K_{ACh} kanalų aktyviklis karbacholas (10^{-6} M) mažino VP_{90} trukmę iki $35,31 \pm 4,21$ proc., VP_{50} – iki $26,42 \pm 2,66$ proc. ($n=19$), ($p < 0,001$), o susitraukimo jėgą – iki $24,23 \pm 2,0$ proc. ($n=20$), ($p < 0,001$) palyginus su kontrole.

Antrame paveiksle parodytas 2-aminopiridino (1 kreivė) ir sulfonilkarbamidinių jo darinių: 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26 ir 2-AP27 (atitinkamai – 2, 3, 4 ir 5 kreivės) poveikis karbacholu (10^{-6} M) sumažintai VP_{90} trukmei.

Šiomis sąlygomis, didėjant 2-AP ir sulfonilkarbamidinių jo darinių: 2-AP22, 2-AP26, 2-AP27 koncentracijoms nuo 10^{-5} M iki 10^{-3} M, VP_{90} trukmė didėjo skirtingu laipsniu.

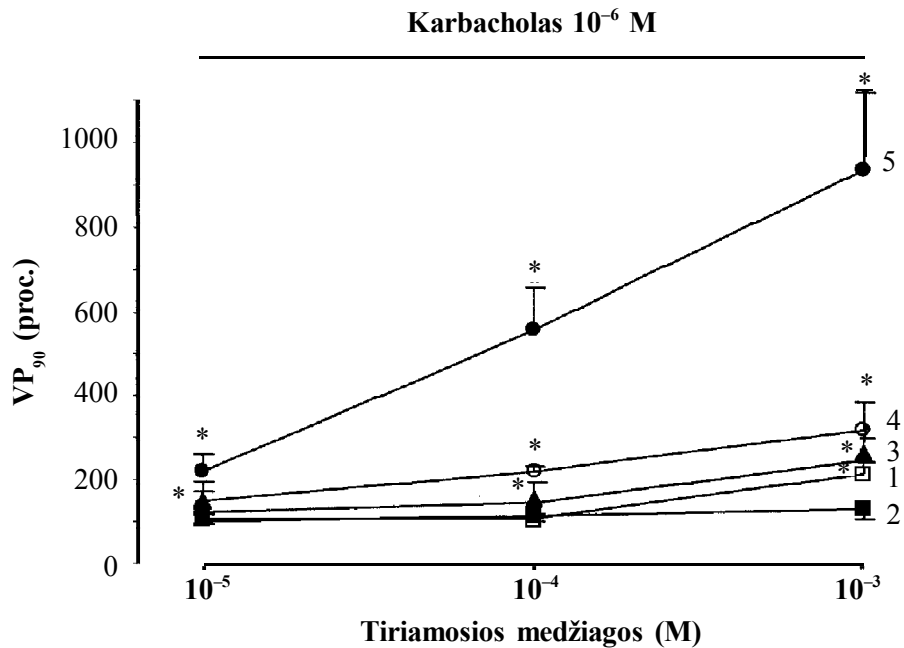
Didžiausias VP_{90} trukmės prailgėjimas, t. y. iki

$936,60 \pm 178,23$ proc. ($n=4$) ($p < 0,05$), registruotas veikiant junginiui 2-AP27 (10^{-3} M) palyginus su karbacholo poveikiu (5 kreivė). 2-aminopiridinas ir jo dariniai 2-AP22 ir 2-AP26 karbacholo sumažintą VP_{90} trukmę padidino žymiai mažiau, atitinkamai iki $212,84 \pm 32,06$ proc. ($n=4$), $231,39 \pm 28,48$ proc. ($n=3$), $318,25 \pm 63,81$ proc. ($n=3$) $p < 0,05$, esant 10^{-3} M koncentracijai palyginus su karbacholo poveikiu (1, 3, 4 kreivės). Junginys 2-AP21 karbacholu sumažintą VP_{90} trukmę padidino nežymiai, t. y. iki $128,53 \pm 20,87$ proc. ($n=4$) ($p > 0,05$) palyginus su karbacholo poveikiu (2 kreivė).

Taikant Michaelio-Menten lygtį, nustatytos tirtų medžiagų EC_{50} reikšmės, kurios, veikiant 2-AP, buvo atitinkamai $(1,99 \pm 1,02) \times 10^{-3}$ M, junginiams 2-AP21 – $(3,59 \pm 2,40) \times 10^{-4}$ M, 2-AP22 – $(7,68 \pm 2,85) \times 10^{-4}$ M, 2-AP26 – $(1,10 \pm 0,51) \times 10^{-4}$ M ir 2-AP27 – $(1,01 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ M.

Standartinis muskarino receptorių slopiklis atropinas (2×10^{-6} M) karbacholo sumažintą VP_{90} trukmę padidino iki $442,36 \pm 104,49$ proc. ($n=8$) ($p < 0,05$). Tai rodo, kad efektyviausio 2-AP darinio 2-AP27 poveikis VP_{90} buvo žymiai didesnis, o 2-AP ir junginių 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26 mažesnis nei muskarino receptorių slopiklio atropino.

2-AP ir sulfonilkarbamidinių jo darinių: 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26 bei 2-AP27 (atitinkamai – 1, 2, 3, 4, 5 kreivės) poveikis karbacholu (10^{-6} M) sumažintai



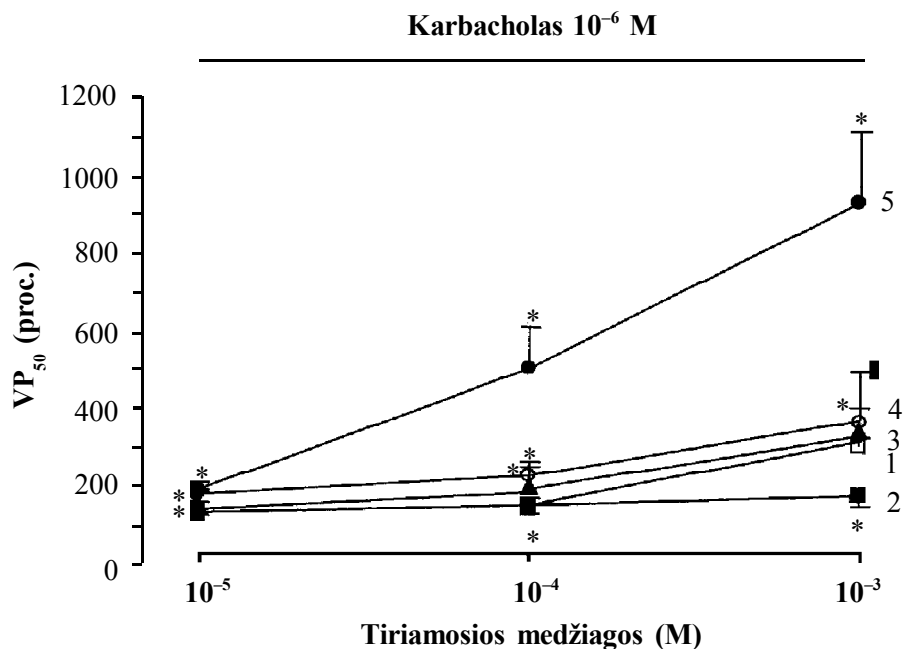
2 pav. 2-aminopiridino ir sulfonilkarbamidinių jo darinių poveikis jūrų kiaulytės prieširdžio veikimo potencialų trukmei, esant 90 proc. repoliarizacijos lygiui, ir fiziologiniame tirpale 10^{-6} M karbacholo

1 kreivė – veikiant 2-aminopiridinui (2-AP), 2 kreivė – junginiui 2-AP21, 3 kreivė – 2-AP22, 4 kreivė – 2-AP26, 5 kreivė – 2-AP27; absčių ašyje – tirtų medžiagų koncentracijos (M), ordinačių – veikimo potencialų trukmė esant 90 proc. repoliarizacijos lygiui (VP_{90}) (apskaičiuota procentais) palyginus su karbacholo poveikiu. * $p < 0,05$.

veikimo potencialų trukmei VP_{50} buvo panašus kaip ir VP_{90} (3 pav., 1–5 kreivės).

Jūrų kiaulytės prieširdžio veikimo potencialų krei-

vių eksperimentiniai pavyzdžiai kontrolės sąlygomis (A, k ir B, k'), veikiant karbacholu (10^{-6} M) (A, a, B, a'), karbacholu ir 2-aminopiridinu (10^{-3} M) (A, b) ar



3 pav. 2-aminopiridino ir sulfonilkarbamidinių jo darinių poveikis jūrų kiaulytės prieširdžio veikimo potencialų trukmei, esant 50 proc. repoliarizacijos lygiui, ir fiziologiniame tirpale 10^{-6} M karbacholo

1 kreivė – veikiant 2-aminopiridinui (2-AP), 2 kreivė – junginiui 2-AP21, 3 kreivė – 2-AP22, 4 kreivė – 2-AP26, 5 kreivė – 2-AP27; absčių ašyje – tirtų medžiagų koncentracijos (M), ordinačių – veikimo potencialų trukmė esant 50 proc. repoliarizacijos lygiui (VP_{50}) (apskaičiuota procentais) palyginus su karbacholo poveikiu. * $p < 0,05$.

karbacholu ir junginiu 2-AP27 (10^{-3} M) (B, b'), pateikiami ketvirtame paveiksle.

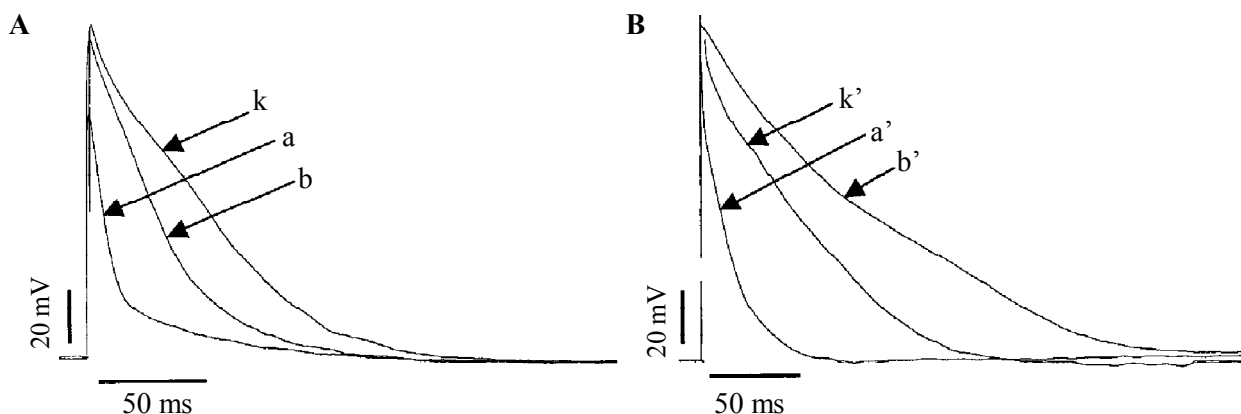
Karbacholu (10^{-6} M) sumažintos susitraukimo jėgos kitimas, veikiant 2-AP ir sulfonilkarbamidiniams jo dariniams: 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26 ir 2-AP27, pateikiamas lentelėje. Susitraukimo jėga efektyviausiai, t. y. iki $274,85 \pm 53,36$ proc. ($n=4$) ($p<0,05$), padidėjo veikiant junginiui 2-AP27, esant 10^{-4} M koncentracijai, palyginus su karbacholo poveikiu. Didinant 2-AP27 koncentraciją iki 10^{-3} M, susitraukimo jėga sumažėjo. Didinant 2-AP ir junginių 2-AP22, 2-AP26 koncentraciją nuo 10^{-5} M iki 10^{-3} M, karbacholu sumažinta susitraukimo jėga didėjo mažesniu laipsniu, o veikiant junginiui 2-AP21, susitraukimo jėga netgi mažėjo.

Rezultatų aptarimas

Eksperimentiniais tyrimais nustatėme, kad muskarino receptorių agonistas karbacholas sumažino jūrų kiaulytės prieširdžių veikimo potencialų trukmę ir susitraukimo jėgą. Tyrimai, atlikti su eksperimentinių

gyvūnų ir žmogaus prieširdžio preparatais, parodė, kad tokį karbacholo poveikį veikimo potencialų trukmei sąlygoja šių receptorių valdomų membranų K_{Ach} kanalų atsidarymas ir K^+ jonų srovės iš ląstelės ($I_{K_{Ach}}$) padidėjimas (8, 12, 21). Nustatyta, kad muskarino receptorių agonistas karbacholas arba acetilcholinai, išsiskiriantis iš pogauglių skaidulų dirginant klajoklį nervą, jungiasi su širdies ląstelių membranoje esančiais muskarino receptoriais (M_2) ir, dalyvaujant G_i baltymams, aktyvuoja šių receptorių valdomus K^+ kanalus bei padidina $I_{K_{Ach}}$. Be to, karbacholas, perduodamas signalą per G_i baltymus, slopina adenilatciklazę, todėl mažėja cAMP susidarymas, L-tipo Ca kanalų fosforilinimas ir Ca^{2+} jonų srovė į ląstelę per šiuos kanalus (I_{CaL}) (8, 21). Šie $I_{K_{Ach}}$ ir I_{CaL} srovių pokyčiai sukelia veikimo potencialų trukmės ir susitraukimo jėgos sumažėjimą, prieširdžių repoliarizacijos pagreitėjimą ir efektyviojo refrakterinio periodo sutrumpėjimą, o tai savo ruožtu gali sužadinti prieširdžių fibriliaciją (11, 12, 22).

Taigi, bandoma sukurti efektyvius ir selektyvius



4 pav. Jūrų kiaulytės prieširdžio veikimo potencialų kreivių eksperimentiniai pavyzdžiai

Veikimo potencialų kreivės, registruotos raumenėlius perfuzuojant fiziologiniu Tyrodė tirpalu (A, k, B, k'), veikiant karbacholu (10^{-6} M) (A, a, B, a'), karbacholu ir 2-aminopiridinu (10^{-3} M) (A, b) arba karbacholu ir 2-AP27 (10^{-3} M) (B, b').

Lentelė. Jūrų kiaulytės prieširdžių susitraukimo jėgos kitimas veikiant 2-aminopiridinui (2-AP) ir sulfonilkarbamidiniams jo dariniams: 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26 ir 2-AP27

Koncentracijos (M)	Tiriamosios medžiagos				
	2-AP n=4	2-AP21 n=4	2-AP22 n=3	2-AP26 n=4	2-AP27 n=4
10^{-5}	92,30±4,84	88,40±5,93*	102,81±10,83	113,26±2,55*	134,60±9,24*
10^{-4}	102,61±15,25	80,08±9,82*	109,57±7,56	120,89±10,21*	274,85±53,36*
10^{-3}	172,11±30,18*	72,90±10,66*	183,77±13,59*	159,02±35,72	203,52±43,23*

Susitraukimo jėgos kitimas, veikiant 2-aminopiridinui (2-AP), 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26 ir 2-AP27, pateikiamas procentais, palyginus su karbacholo poveikiu, prilygintu 100 proc. * $p<0,05$.

preparatus, reguliuojančius K^+ kanalų, lemiančių miokardo ląstelių veikimo potencialų depolizaciją, trukmę bei aktyvumą.

Jau seniai žinoma, kad 2-, 3- ar 4-aminopiridiniai blokuoja įtampos valdomus K^+ kanalus ne tik periferiniuose neuronuose, CNS struktūrose (23), bet ir širdies ląstelėse, padidindami VP trukmę ir miokardo susitraukimo jėgą (24). Pastebėta, kad veiklesni yra protonizuoti 2-, 4-aminopiridiniai (25, 26). Nustatyta, kad aminopiridiniai jungiasi prie kelių įtampos valdomų K^+ kanalų receptorinių ryšio vietų. Manoma, kad labai svarbūs veiksniai, lemiantys aminopiridinių sąveika su receptinėmis kanalų vietomis (K^+ kanalo struktūrų aminorūgščių liekanomis), yra piridino žiedas bei protonizuotas šio žiedo azotas (25, 26).

Aminopiridinių poveikis ligandų valdomiems K^+ kanalams (K_{ACh} ir K_{ATP}) yra mažai ištirtas. Pastebėta, kad 4-aminopiridinas silpnai blokuoja muskarino receptorius ir jų valdomus K_{ACh} kanalus (27). Ankstesni 2-aminopiridino ir jo sulfonilkarbamidinių darinių: 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26 ir 2-AP27 tyrimai parodė, kad 2-aminopiridinas neturėjo įtakos, tačiau jo sulfonilkarbamidiniai dariniai padidino jūrų kiaulytės papiliarinių raumenėlių veikimo potencialų trukmę, sumažėjusia dėl išeinančios K^+ srovės pinacidilu aktyvintais K_{ATP} kanalais (19). Efektyviausiu $I_{K_{ATP}}$ slopinančiu ir VP trukmę didinančiu poveikiu pasižymėjo 2-AP sulfonilkarbamidinis darinys 2-AP27, kurio piridino žiedas kvaternizuotas 4-nitrobenzilo bromidu.

Mūsų atlikti eksperimentiniai šių junginių poveikio tyrimai prieširdžių VP trukmei ir susitraukimo jėgai aktyvintų muskarino receptorių ir K_{ACh} kanalų sąlygomis parodė, kad 2-AP pasižymi anticholinerginėmis savybėmis, t. y. didina muskarino receptorių agonisto karbacholo sumažintą prieširdžių VP trukmę ir susitraukimo jėgą. Sulfonilkarbamidiniai 2-AP dariniai, išskyrus 2-AP21, šiomis sąlygomis skirtingu laipsniu padidino VP trukmę bei susitraukimo jėgą, sumažėjusias dėl K^+ srovės per K_{ACh} kanalus padidėjimo.

Pagal maksimalias veikimo potencialų trukmės padidėjimo reikšmes, veikiant tirtiems junginiams ($10^{-3}M$), nustatyta tokia jų efektyvumo eilė: 2-AP27 >> 2-AP26 > 2-AP22 ≥ 2-AP > 2-AP21.

Karbacholu sumažintą VP trukmę ir susitraukimo

jėgą efektyviausiai padidino junginys 2-AP27, t. y. 2-AP darinys su 4-toluolsulfonilkarbamido fragmentu, kuriame piridino žiedo azotas kvaternizuotas 4-nitrobenzilo bromidu gerokai pralenkė 2-AP poveikį šiems parametrams. Silpnėsiu anticholinerginiu poveikiu nei 2-AP27 pasižymėjo junginiai 2-AP22 ir 2-AP26, kurių piridino žiedo azotai kvaternizuoti atitinkamai metilo jodidu ir alilo bromidu. Tuo tarpu junginys 2-AP21 su 4-toluolsulfonilkarbamido fragmentu, tačiau nekvaternizuotu piridino žiedo azotu sukėlė silpniausią anticholinerginį poveikį.

Nustačius 2-AP ir jo darinių: 2-AP21, 2-AP22 ir 2-AP26 silpnėsiu anticholinerginį poveikį veikimo potencialų trukmei nei standartinio M_2 muskarino receptorių slopiklio atropino, galima teigti, kad šie junginiai tik iš dalies blokavo karbacholu aktyvuotą K^+ srovę per K_{ACh} kanalus ($I_{K_{ACh}}$). Žymiai didesni junginio 2-AP27 poveikį karbacholu sumažintai veikimo potencialų trukmei nei atropino galėjo sukelti ne tik $I_{K_{ACh}}$, bet ir kitų joninių srovių slopinimas.

Taigi, 2-aminopiridino sulfonilkarbamidinių darinių tyrimai parodė, kad jų anticholinerginio poveikio efektyvumas jūrų kiaulytės prieširdžių veikimo potencialų trukmei bei susitraukimo jėgai priklauso nuo radikalų prie kvaternizuoto piridino žiedo azoto tapusio keturvalenčiu.

Išvados

1. Muskarino receptorių ir K_{ACh} kanalų aktyvumas karbacholu sumažino jūrų kiaulytės prieširdžio veikimo potencialų trukmę ir susitraukimo jėgą.

2. 2-aminopiridinas ir nauji sulfonilkarbamidiniai jo dariniai: 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26 ir 2-AP27 skirtingu laipsniu didina muskarino receptorių agonisto karbacholo sumažintą jūrų kiaulytės prieširdžių veikimo potencialų trukmę. Nustatyta jų efektyvumo eilė: 2-AP27 >> 2-AP26 ≥ 2-AP22 ≥ 2-AP > 2-AP21.

3. Stipriausią anticholinerginį poveikį sukėlė modifikuotas 2-aminopiridinas, kurio 2-amino grupė pakeista 4-toluolsulfonilkarbamido fragmentu, o piridino azotas kvaternizuotas 4-nitrobenzilo bromidu (junginys 2-AP27). Junginys, kurio piridino žiedo azotas buvo nekvaternizuotas (2-AP21), pasižymėjo silpniausiu anticholinerginiu veikimu.

Anticholinergic effect of 2-aminopyridine and its sulfonylcarbamide derivatives on electromechanical activity in guinea pig atrium

Vida Gendvilienė, Danguolė Zablockaitė, Irma Martišienė, Herta Gurskaitė, Antanas Stankevičius
Institute of Cardiology, Kaunas University of Medicine, Lithuania

Key words: atrium of guinea pig; carbachol; 2-aminopyridine; sulfonylcarbamide derivatives of 2-aminopyridine; action potential duration; contraction force.

Summary. *The aim of the study* was to investigate an action of 2-aminopyridine and its new sulfonylcarbamide derivatives 2-AP21, 2-AP22, 2-AP26, and 2-AP27 (10^{-5} – 10^{-3} M) on carbachol-induced shortening of action potential duration and reduction of contraction force in guinea pig atrial muscles. Experiments were carried out using a standard method of myocardium electromechanical activity registration. Under control conditions (perfusion of atrial strips with Tyrode solution), an average of action potential duration, measured at 90% (AP_{90}) and 50% (AP_{50}) of repolarization, were 112.32 ± 6.07 ms and 50.21 ± 3.25 ms, ($n=19$), respectively, and contraction force was of 1.42 ± 0.28 mN ($n=20$).

Carbachol (10^{-6} M), an agonist of muscarinic acetylcholine receptor and activator of K_{ACh} channels, markedly decreased AP_{90} to $35.31 \pm 4.21\%$, AP_{50} – to $26.42 \pm 2.66\%$ ($n=19$) ($P < 0.001$), and contraction force – to $24.23 \pm 2.0\%$ ($n=20$) ($P < 0.001$) vs. control.

Modification of 2-aminopyridine structure by replacing 2-amino group by 4-toluolsulfonylcarbamide fragment and quaternization of nitrogen in pyridine ring increased anticholinergic effect on action potential duration and contraction force. According to their maximal prolongation of AP at 90% of repolarization, all new drugs ranked as follows: 2-AP27 >> 2-AP26 > 2-AP22 > 2-AP > 2-AP21.

2-aminopyridine derivative 2-AP27, containing 4-toluolsulfonylcarbamide fragment and 4-nitrobenzyl radical at quaternized nitrogen of the pyridine, had the most potent anticholinergic effect on AP_{90} ($936.60 \pm 178.23\%$). 2-AP22 and 2-AP26 (containing methyl or allyl radicals at quaternized nitrogen of the pyridine, respectively) showed a much weaker anticholinergic effect ($231.39 \pm 28.48\%$ and $318.25 \pm 63.81\%$, respectively). The weakest anticholinergic effect ($63.59 \pm 34.38\%$) was induced by 2-aminopyridine derivative 2-AP21, which had non-quaternized nitrogen of the pyridine.

Correspondence to V. Gendvilienė, Institute of Cardiology, Kaunas University of Medicine, Sukilėlių 17, 50161 Kaunas, Lithuania. E-mail: membiof@kmu.lt

Literatūra

- Hagens VE, Rienstra M, Van Veldhuisen DJ, Crijns HJ, Van Gelder IC. Determinants of sudden cardiac deaths in patients with persistent atrial fibrillation in the rate control versus electrical cardioversion (RACE) study. *Am J Cardiol* 2006; 98(7):929-32.
- Siddiquit A, Kower PR. Sudden death secondary to cardiac arrhythmias: mechanisms and treatment strategies. *Curr Opin Cardiol* 2006;21(5):517-25.
- Lomax AE, Rose RA, Wayne RG. Electrophysiological evidence for a gradient of G protein-gated K^+ current in adult mouse atrial. *Br J Pharmacol* 2003;140:576-84.
- Bers DM. Calcium and cardiac rhythms. *Circ Res* 2002;90:4-17.
- Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, et al. The G protein-gated potassium current $I(K_{ACh})$ is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005;112:3697-706.
- Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;85:1205-53.
- Neumann J, Boknik P, Matherne P, Lankford A, Schmitz W. Pertussis toxin sensitive and insensitive effects of adenosine and carbachol in murine atrial overexpressing A1-adenosine receptors. *Br J Pharmacol* 2003;138:209-17.
- Harvey RD, Belevych AE. Muscarinic regulation of cardiac ion channels. *Br J Pharmacol* 2003;139:1074-84.
- Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K^+ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;525:285-98.
- Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999;42:377-90.
- Shi H, Wang H, Li D, Nattel S, Wang Z. Differential alterations of receptor densities of three muscarinic acetylcholine receptor subtypes and current densities of the corresponding K^+ channels in canine atria with atrial fibrillation induced by experimental congestive heart failure. *Cellular Physiol Biochem* 2004;14:31-40.
- Ito H, Hosoya Y, Inanobe A, Tomoike H, Endoh M. Acetylcholine and adenosine activate the G protein-gated muscarinic K^+ channel in ferret ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995;351:610-7.
- Iost N, Virag L, Varro A, Papp JG. Comparison of the effect of class IA antiarrhythmic drugs on transmembrane potassium currents in rabbit ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2003;8(1):31-41.
- Mori K, Hara Y, Saito T, Masuda Y, Nakaya H. Anticholinergic effects of class III antiarrhythmic drugs in guinea pig atrial cells. Different molecular mechanisms. *Circulation* 1995; 91(11):2834-43.
- Brooks RR, Drexler AP, Maynard AE, Al-Khalidi H, Kostreva DR. Proarrhythmia of azimilide and other class III antiarrhythmic agents in the adrenergically stimulated rabbit. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223(2):183-9.
- Pogwizd SM, Bers DM. Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:61-6.
- Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;62:9-33.
- Johnson NC, Morgan MW. An usual case of 4-aminopyridine toxicity. *J Emerg Med* 2006;30(2):175-7.
- Gendvilienė V, Zablockaitė D, Gurskaitė H, Martišienė I, Stankevičius A. ATF-reguliuojamų kalio kanalų moduliatorių, N-(2-piridil)-N'-(4-toluol) sulfonilkarbamidų įtaka jūrų kiaulytės miokardo elektromechanizmui. (Effect of ATP-regulated potassium channels modulators, N-(pyridyl)-N'-(4-toluol) sulfonylcarbamides, on electromechanical activity in guinea pig myocardium.) *Medicina (Kaunas)* 2006; 42(9):1054-60.

20. Cortes A, Cascante M, Cardenas ML, Cornish-Bowden A. Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data. *Biochem J* 2001;357(Pt 1):263-8.
21. Koumi S, Sato R, Nagasawa K, Hayakawa H. Activation of inwardly rectifying potassium channels by muscarinic receptor-linked G protein in isolated human ventricular myocytes. *J Membr Biol* 1997;157(1):71-81.
22. Kovoov P, Wickman K, Maguire CT, Pu W, Germann J, Berul ChI, et al. Evaluation of the role of K_{ACh} in atrial fibrillation using a mouse knockout model. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(8): 2136-43.
23. Robertson BE, Nelson MT. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K^+ currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol* 1994;26:C1589-97.
24. Nand V, Doggrel SA. Effects of tetraethylammonium, 4-aminopyridine and bretylium on cardiovascular tissues from normo- and hypertensive rats. *J Pharm Pharmacol* 1999;51: 631-40.
25. Munoz-Caro C, Nino A. The nature of the receptor site for the reversible K^+ channel blocking by aminopyridines. *Biophys Chem* 2002;96(1):1-14.
26. Nino A, Munoz-Caro C, Carbo-Dorca R, Gironex X. Rational modelling of the voltage-dependent K^+ channel inactivation by aminopyridines. *Biophys Chem* 2003;104(2):417-27.
27. Urquhart RA, Broadley KJ. Blockade by 4-aminopyridine of the muscarinic-receptor-mediated responses of guinea-pig atrial and trachea. *J Pharm Pharmacol* 1991;43: 417-20.

Straipsnis gautas 2007 06 29, priimtas 2007 10 12

Received 29 June 2007, accepted 12 October 2007