

**МОДУЛЯЦИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОЧЕВОГО
ПУЗЫРЯ И СОСУДОВ НОВЫМИ ФТОР-СОДЕРЖАЩИМИ АНАЛОГАМИ
ПИНАЦИДИЛА.**

**1. Мохорт Николай Антонович – проф., д.м.н., зав. отделом фармакологии
сердечно-сосудистых средств Института фармакологии и токсикологии АМН
Украины.**

**Ягупольский Лев Моисеевич- проф., д.х.н., главный научный сотрудник
отдела №9 медико-биологических исследований Института органической химии
НАН Украины.**

**Лимаренко Ирина Васильевна – аспирант отдела фармакологии сердечно-
сосудистых средств института фармакологии и токсикологии АМН Украины.**

**2. Работа выполнена в отделе фармакологии сердечно-сосудистых средств
Института фармакологии и токсикологии АМН Украины.**

3. Автор для переписки: Лимаренко Ирина Васильевна samarskaya@ukr.net

Киев, ул.Эжена Потье,14, ИФТ АМН Украины

Тел. (044) 4568290, 4567833, 5136635

Новые фторированные аналоги пинацидила.

Резюме. Влияние новых фторсодержащих аналогов пинацидила на сократительную активность мочевого пузыря было исследовано *in vitro* и *in vivo*, а также на тонус сосудов-*in vitro*. Все четыре вещества концентрационно-зависимым образом угнетали сократительную активность изолированных полосок мочевого пузыря и изолированных колец аорты. Эффект вещества PF-5 уменьшался после предварительной перфузии глибенкламидом. Это вещество выражено угнетало сократительную функцию мочевого пузыря *in vivo*.

Ключевые слова: пинацидил, новые фтор-содержащие аналоги пинацидила, мочевого пузырь.

Введение. Гиперактивность мочевого пузыря, заболевание которое характеризуется наличием частого мочеиспускания, императивных позывов с ургентным недержанием мочи или без него, является одной из наиболее частых причин нарушений мочеиспускания [6,7]. Данное состояние уродинамично сопровождается некоординированными сокращениями детрузора во время фазы наполнения. Для лечения гиперактивности мочевого пузыря используют различные фармакологические препараты, однако из-за наличия большого количества выраженных побочных эффектов поиск новых средств ведется непрерывно[3,8]. Особенно перспективными в данном направлении считаются активаторы калиевых каналов. Они представляют собой относительно новый класс антигипертензивных, противоишемических и антиангинальных препаратов[9]. В публикациях последних лет имеет место большое количество данных относительно влияния этих средств не только на гладкомышечные элементы сосудов, но и на гладкомышечные элементы мочевого пузыря, кишечника, матки и других органов [1,8,10]. Активируя определенные виды калиевых каналов в клеточных мембранах, они увеличивают выход ионов калия из клеток, что вызывает ее стойкую гиперполяризацию. При этом увеличивается пороговый потенциал клеточной мембраны и снижается возбудимость клеток. Это приводит к релаксации гладкомышечных клеток и снижению их сократительной активности[2,4]. Пинацидил, активатор калиевых каналов 1-го поколения, показал высокую эффективность в опытах *in vitro* и *in vivo*, но при клинических исследованиях не было выявлено его выраженного влияния на симптомы гиперактивности мочевого пузыря в дозах, которые не потенцируют снижение артериального давления до недопустимых величин [5,12]. С учетом вышесказанного поиск и изучение новых детрузороселективных активаторов калиевых каналов продолжается[1]. Это обусловлено с одной стороны выраженными миотропными свойствами таких средств, а с другой-результатами последних научных

исследований в этой области, которые свидетельствуют, что активация менее 1% АТФ-зависимых калиевых каналов мочевого пузыря приводит к выраженному его расслаблению[11].

Целью нашего исследования было изучение влияния новых фтор-содержащих аналогов пинацидила, синтезированных в Институте органической химии НАН Украины под руководством проф. Л.М. Ягупольского, на сократительную активность мочевого пузыря и тонус сосудов *in vitro*. Кроме того, эффективность наиболее детрузороселективного соединения была изучена *in vivo*. По результатам предварительных исследований данные фтор-содержащие аналоги пинацидила обладают меньшей токсичностью по сравнению с препаратом-прототипом.

Методика.

Исследования in vitro. Эксперименты проводились на изолированных полосках мочевого пузыря и на изолированных сосудистых кольцах крыс-самок линии Wistar, массой 250-350 г. Полоски были выделены из дна мочевого пузыря, имели длину приблизительно 10мм и ширину 4-5мм. Изолированные сосудистые кольца выделялись из грудной аорты и имели диаметр 2 мм, ширину 1,5 мм. Перед исследованиями препараты, закрепленные в экспериментальной камере, перфузировались на протяжении 30 мин при 37°C солевым раствором Кребса-Хенселита следующего состава (моль/л): NaCl (118,4), KCl (4,7), CaCl₂ (2,5), MgSO₄ (1,2), KH₂PO₄ (1,2), NaHCO₃ (24,9), глюкоза (11,1), потом еще 90 мин солевым раствором с концентрацией хлорида калия 60 или 15 ммоль/л, в зависимости от цели эксперимента. Рабочие растворы насыщали газовой смесью 95%O₂ и 5% CO₂. Автоматический термостат позволял поддерживать температуру раствора в камере 37°C±0,5 °C. Все опыты проводились в изометрическом режиме. Фтор-содержащие соединения и пинацидил подавались непосредственно в экспериментальную камеру в концентрациях от 10нмоль/л до 100 мкмоль/л. В качестве референтного соединения использовали пинацидил. Исследуемые соединения растворяли в диметилацетамиде, концентрация которого в экспериментальной камере не превышала рекомендованные уровни и практически не влияла на тонус полосок мочевого пузыря [6].

Исследования in vivo. Эксперименты проведены на крысах-самках линии Wistar(300-400г), анестезированных уретаном (1,2г/кг). Внутрипузырное давление измерялось через интрауретральный катетер. Этот катетер был подключен через трехходовой переключатель к трансдюсеру давления и перфузионному насосу, который инфузировав солевой раствор в мочевой пузырь. Система была заполнена физиологическим раствором. Объем инфузировав солевого раствора составлял 0,1-

0,15 мл и не вызывал рефлекса мочеиспускания. Максимальные эффекты исследуемых веществ фиксировались через 20 мин после внутривентриального введения.[6]

Величины реакций представлены как $M \pm m$ для количества экспериментов (n).

Достоверность расхождений между значениями определяли по критерию t Стьюдента.

Различия считались статистически достоверными при $P < 0,05$.

Результаты.

В первой серии экспериментов–полоски мочевых пузырей перфузировались на протяжении 90мин в гиперкалиевом растворе с молярностью 15 ммоль/л или 60 ммоль/л, в зависимости от цели эксперимента. Считаем необходимым подчеркнуть, что при перфузии препаратов солевым раствором с концентрацией хлорида калия 15ммоль/л наблюдалось увеличение амплитуды и частоты волн спонтанной сократительной активности полосок мочевых пузырей, а при перфузии их солевым раствором с концентрацией хлорида калия 60 ммоль/л наблюдалось повышение тонуса полосок мочевых пузырей. Нами установлено, что новые фтор-содержащие производные гуанидина (аналоги пинацидила) уменьшают тонус полосок мочевого пузыря, индуцированный солевым раствором с концентрацией хлорида калия 60ммоль/л концентрационно-зависимым способом. Полученные результаты позволяют экспериментальные вещества записать в ряд по мере снижения их эффективности

(-LogEC₅₀): PF-5(-7,59±0,99)>Pinacidil (-6,9±0,49)> PF-10(-3.87±0,29)> PF-20(-1,04±0,58)> PF-15(-0,85±0,79).

Таким образом, мы установили, что новые фтор-содержащие аналоги пинацидила угнетают сократительную активность детрузора крыс *in vitro*. Вещество PF-5 имеет более выраженную спазмолитическую активность, чем пинацидил и прочие исследованные вещества.

Также установлено, что все экспериментальные вещества, включая пинацидил, концентрационно-зависимым образом уменьшают амплитуду волн спонтанной сократительной активности полосок мочевых пузырей, индуцированной при перфузии их солевым раствором с концентрацией хлорида калия 15ммоль/л. Полученные результаты разрешают экспериментальные вещества записать в ряд по мере снижения их эффективности (-LogEC₅₀): PF-5(-8,51± 0,07)> Pinacidil (-7,21 ±0,06)> PF-15(-6,01±0,48)> PF-20(-5,89±0,58)> PF-10(-5,79 ± 0,46).

Для выяснения механизма действия наиболее активного вещества PF-5 мы использовали глибенкламид-специфический блокатор АТФ-зависимых калиевых каналов. Для этого полоски мочевых пузырей предварительно (перед введением исследуемых веществ) перфузировались на протяжении 10мин глибенкламидом (3мкмоль/л). При последующей перфузии исследуемым веществом наблюдалось уменьшение его спазмолитического эффекта и сдвиг прямой концентрация-эффект вправо.

Все новые фтор-содержащие аналоги пинацидила уменьшают сократительную активность изолированных сосудистых колец концентрационно-зависимым способом. Полученные результаты разрешают экспериментальные вещества записать в ряд по мере снижения их эффективности (увеличения $-\text{LogEC}_{50}$):

пинацидил ($-5,3 \pm 0,07$) > PF-15 ($-4,99 \pm 0,03$) > PF-10 ($-4,91 \pm 0,16$) > PF-20 ($-4,83 \pm 0,4$) > PF-5 ($-3,75 \pm 0,14$)

Соединение PF-5 и пинацидил *in vivo* уменьшают внутривузырное давление после внутривузырного их введения концентрационно-зависимым способом. EC_{50} составляют $3,5 \text{ мг/кг} \pm 0,4 \text{ мг/кг}$ ($n=21$) и $5,5 \text{ мг/кг} \pm 0,7 \text{ мг/кг}$ ($n=24$), соответственно.

Обсуждение. Результаты свидетельствуют, что соединение PF-5 было приблизительно в 2-80 раз более активнее, чем другие соединения, как релаксант гладкомышечных элементов мочевого пузыря, и было приблизительно в 2-8 раз менее активнее, чем другие соединения как релаксант гладкомышечных элементов сосудистых колец. Глибенкламид существенно уменьшал спазмолитический эффект PF-5 и обуславливал сдвиг прямой концентрация-эффект вправо, на основании чего можно предположить, что в механизм действия этого соединения вовлечена активация АТФ-зависимых калиевых каналов. Было установлено, что PF-5 в 2,2-раз активнее, чем пинацидил, как релаксант гладкомышечных элементов мочевого пузыря и в 11 раз менее активен, чем пинацидил как релаксант гладкомышечных элементов сосудистых колец. Внутривентрикулярное введение соединения PF-5 и пинацидила дозо-зависимым способом уменьшало внутрипузырное давление *in vivo*. Соединение PF-5 более активное, чем пинацидил приблизительно в 1,7-раз (EC_{50} составляют $3,5 \text{ мг/кг} \pm 0,4 \text{ мг/кг}$ ($n=21$) и $5,5 \text{ мг/кг} \pm 0,7 \text{ мг/кг}$ ($n=24$), соответственно). Различие между уровнями EC_{50} для соединения PF-5 в релаксации детрузора и EC_{50} для релаксации сосудов показывает, что это соединение более селективное относительно детрузора, чем сосудов. Изолированные сосудистые кольца в 77 раз менее чувствительные к этому соединению, чем детрузор.

Выводы: 1. Новый фторсодержащий аналог пинацидила PF-5 проявляет выраженную детрузороселективную способность уменьшать сократительную активность мочевого пузыря *in vitro* и *in vivo*. 2. Вещество PF-5 обладает более выраженной детрузороселективной спазмолитической активностью по сравнению с пинацидилом. 3. В механизм действия PF-5 вовлечена активация АТФ-зависимых калиевых каналов. 4. Результаты исследований позволяют предположить, что данное вещество может быть перспективным для лечения гиперактивности мочевого пузыря.

Список литературы:

1. Мохорт Н.А., Самарская И.В. Фармакодинамическая активность активаторов калиевых каналов. Укр.мед.часопис.2003,6(38):26-38.
2. Мохорт Н.А., Лимаренко И.В. Аденозинтрифосфатзависимые калиевые каналы: классификация, структура и функции. Физиол.журн. 2005, 1(51):109-121.
3. Butera J.A., Antane M.M., Antane S.A., Argentieri T.M., Freedden C., Graceffa R.F. et al. Design and SAR of novel potassium channel openers targeted for urge urinary incontinence. 1.N-Cyanoguanidine bioisosteres possessing in vivo bladder selectivity. J. Med.Chem.2000,**43**:1187-1202.
4. Christ G.J., Day N.S., Day M., Santizo C., Zhao W., Sclafani T. et al. Bladder injection of ""naked"" hSlo/pcDNA3 ameliorates detrusor hyperactivity in obstructed rats in vivo. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 2001, 281(5):R1699 - 1709.
5. Fovaeus M, Andersson K.E. and Hedlund H. The action of pinacidil in the isolated human bladder. J Urol 1989, 141(Suppl 3): 637-640.
6. Gopalakrishnan S.M., Buckner S.A., Milicic I., Groebe D.R., Whiteaker K.L., Burns D.J. et al. Functional Characterization of Adenosine Receptors and Coupling to ATP-Sensitive K⁺ Channels in Guinea Pig Urinary Bladder Smooth Muscle. J Pharmacol Exp Ther 2002, 300(3): 910 - 917.
7. Gopalakrishnan M., Buckner S.A., Whiteaker K.L., Shieh C-C., Molinari E.J., Milicic I. et al. (-)-(9S)-9-(3-Bromo-4-fluorophenyl)-2,3,5,6,7,9-hexahydrothieno[3,2-b]quinolin-8(4H)-one 1,1-Dioxide (A-278637): A Novel ATP-Sensitive Potassium Channel Opener Efficacious in Suppressing Urinary Bladder Contractions. I. In Vitro Characterization. J Pharmacol Exp Ther 2002,303(1): 379 - 386.
8. Gopalakrishnan M., Whiteaker K.L., Molinari E.J., Davis-Taber R., Scott V.E., Shieh C-C. et al. Characterization of the ATP-Sensitive Potassium Channels (K_{ATP}) Expressed in Guinea Pig Bladder Smooth Muscle Cells. J Pharmacol Exp Ther 1999, 289(1): 551-558.
9. Gross I., Toman A., Uhde I., Schwanstecher C., Schwanstecher M. Stoichiometry of potassium channel opener action. Mol Pharmacol 1999, 56(6): 1370-1373.
10. Herrera G.M., Pozo M.J., Zvara P., Petkov G.V., Bond C.T., Adelman J.P. et al. Urinary bladder instability induced by selective suppression of the murine small conductance calcium-activated potassium (SK3) channel. J Physiol 2003, 551(3): 893-903.

11. Petkov G. V., Heppner T. J., Bonev A. D., Herrera G. M., Nelson M. T. Low levels of KATP channel activation decrease excitability and contractility of urinary bladder. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2001, 280(5): R1427 - 1433.
12. Rizk D.E., Arafat K., El-Sharkawy T.Y. Comparison of the inhibitory effects of cromakalim and pinacidil (potassium channel openers) with those of oxybutynin on stimulated guinea pig and rabbit detrusor muscle strips. *Arch Gynecol Obstet* 2001, 265(3):141-147.

Mohort N.A., Yagupolsky L.M., Limarenko I.V.

The effects of a novel fluorine-containing pinacidil's analogues on bladder contractile function were examined in vitro and in vivo and on vessel tone in vitro. All four compounds produced a concentration-dependent relaxation of isolated rat detrusor strips and isolated aorta rings. Contractile inhibition by compound PF-5 was decreased by glibenclamid. This compound also effectively inhibited bladder contractile function in vivo.

Key words: pinacidil, novel fluorine-containing pinacidil's analogues, urinary bladder.

Fig.1. Влияние новых фторсодержащих аналогов пинацидила на сократительную активность мочевого пузыря *in vitro*. Концентрация калия хлорида 60ммоль/л.

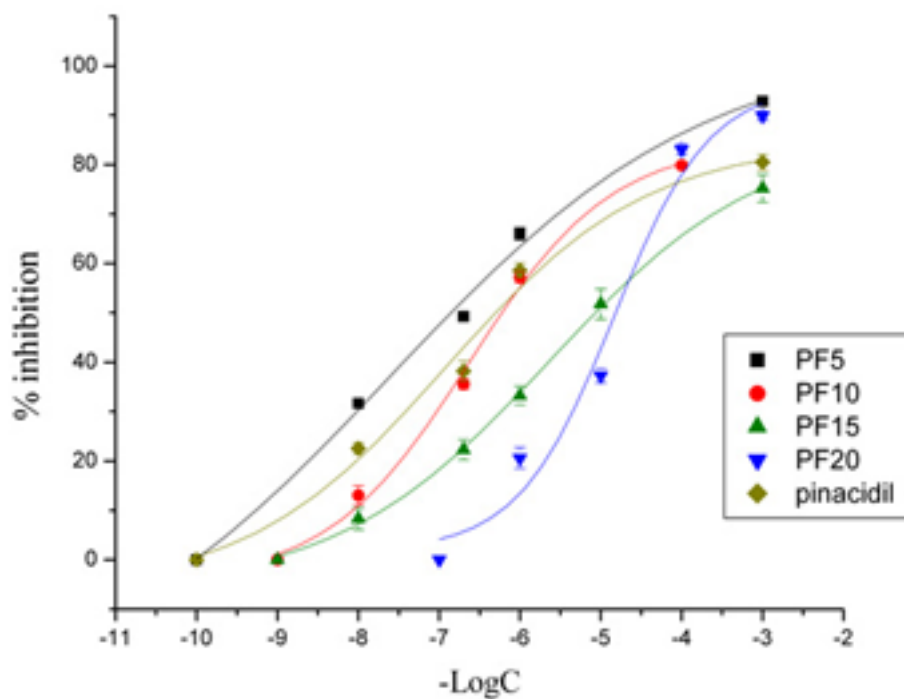


Fig.2. Влияние новых фторсодержащих аналогов пинацидила на сократительную активность мочевого пузыря *in vitro*. Концентрация калия хлорида 15 ммоль/л.

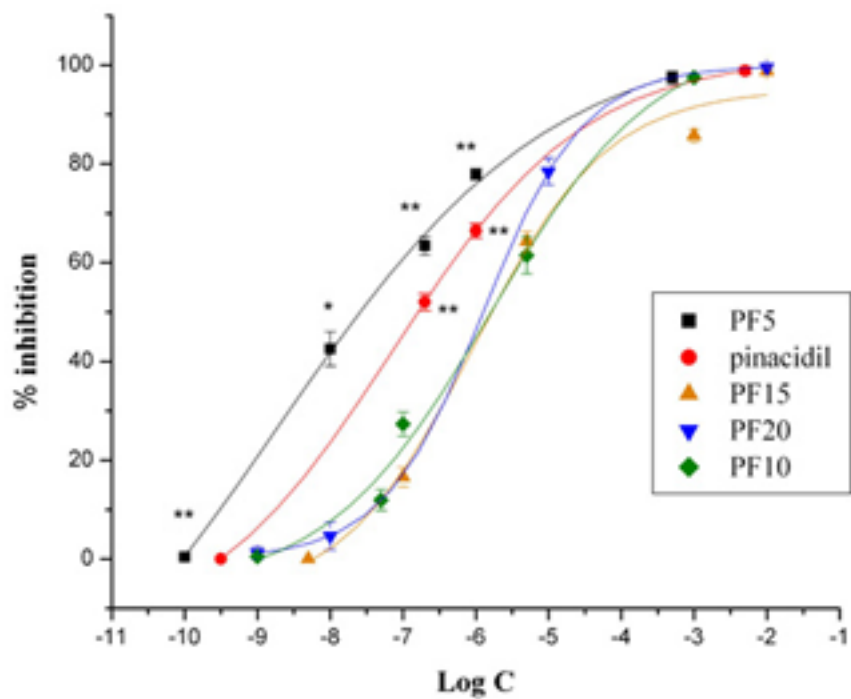
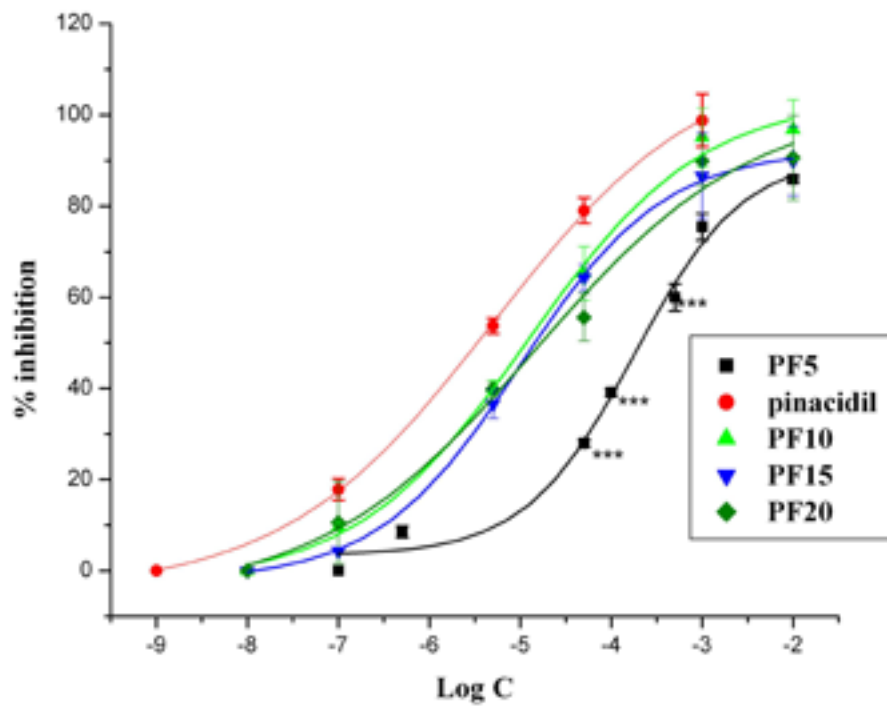


Fig.3. Влияние нового фторсодержащего аналога пинацидила на тонус сосудов in vitro

A.



В.

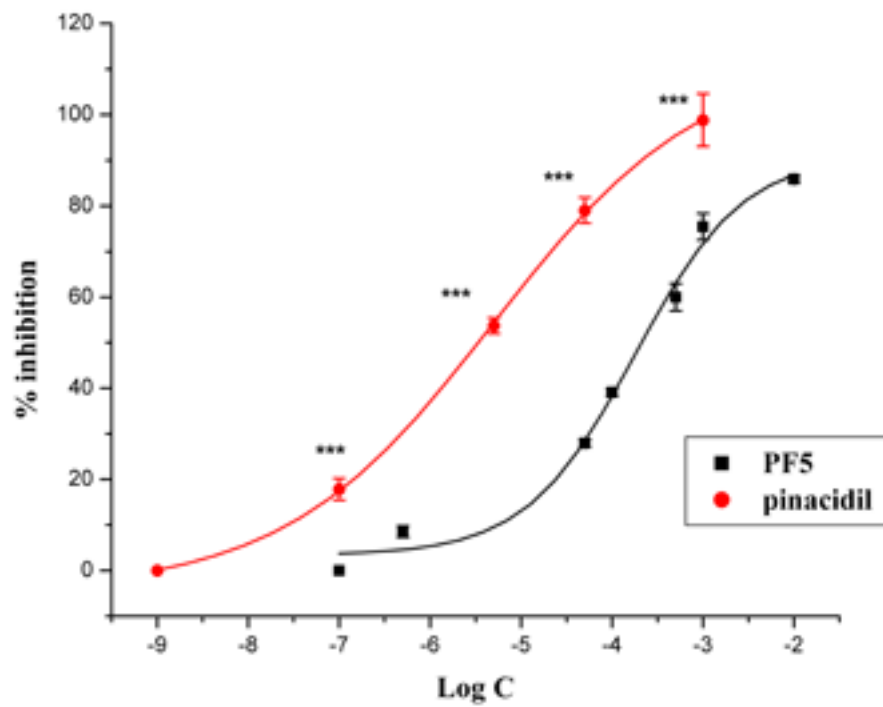


Fig.4. Влияние PF-5 и пинацидила на сократительную активность мочевого пузыря *in vivo*.

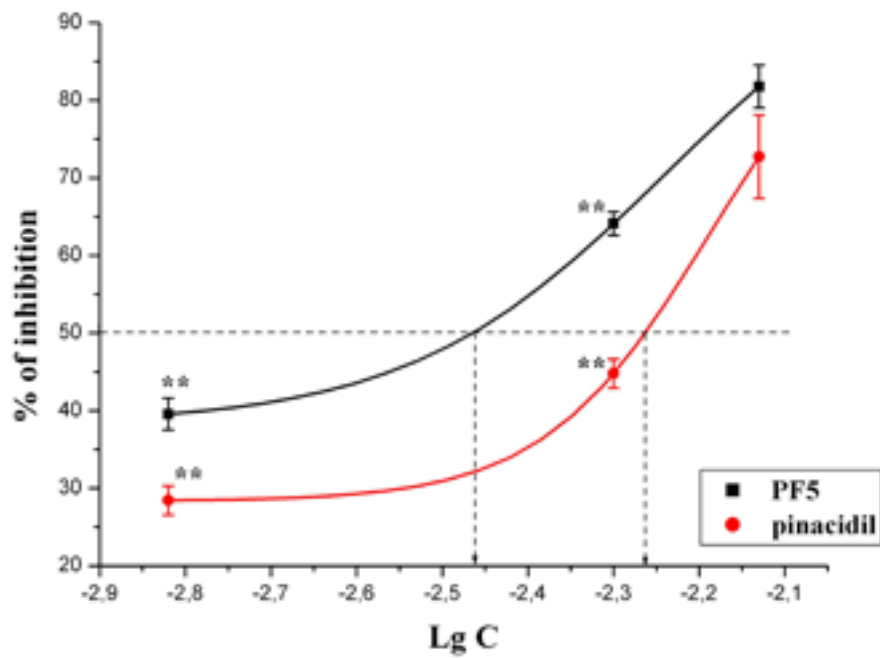


Fig.5. Изменение величины эффектов PF-5 на фоне предварительной перфузии глибенкламидом (3мкмоль/л).

