

Akademia Medyczna w Gdańsku



Marta Gruchała-Niedoszytko

**Wpływ estrogenu na farmakologiczną aktywację
kanałów K⁺ zależnych od ATP w sercu i mięśniach
gładkich naczyń świnki morskiej**

Promotor pracy

Dr hab. med. Ivan Kocič

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych wykonana
w Katedrze i Zakładzie Farmakologii
Akademii Medycznej w Gdańsku

Kierownik Katedry

Prof. dr hab. Jacek Petruszewicz

1.	Wstęp	
1.1.	Kanały potasowe ATP zależne w mięśniu sercowym i mięśniach gładkich naczyń: budowa i funkcja.....	4
1.2.	Różnice w funkcjonowaniu układu krążenia w zależności od płci.....	15
2.	Cel pracy	19
3.	Materiał i metody	
3.1.	Materiał.....	21
3.2.	Metody.....	22
3.2.1.	Pomiary częstości pracy serca.....	23
3.2.2.	Pomiary kurczliwości serca.....	23
3.2.3.	Pomiary kurczliwości naczyń tętnicznych.....	23
3.2.4.	Pomiary enzymatyczne.....	24
3.3.	Badane związki.....	24
3.4.	Analiza statystyczna.....	25
4.	Wyniki	26
4.1.	Wpływ aktywacji farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na siłę skurczu mięśnia sercowego i częstość pracy serca w zależności od płci.....	26
4.2.	Wpływ blokady farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na siłę skurczu mięśnia sercowego i akcję serca w zależności od płci.....	32
4.3.	Wpływ aktywacji farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na siłę skurczu mięśnia sercowego i częstość pracy serca w obecności estrogenu i tamoksyfenu.....	33

4.4.	Stężenia dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i jej izoenzymu; sercowej dehydrogenazy mleczanowej (H-LDH) w zależności od płci i obecności estrogeny i tamoksifenu.....	37
4.5.	Wpływ aktywacji farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na kurczliwość mięśni gładkich aorty w zależności od płci.....	39
4.6.	Wpływ aktywacji farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na kurczliwość mięśni gładkich aorty w obecności estrogeny i tamoksifenu.....	43
5.	Dyskusja.....	50
6.	Wnioski.....	57
7.	Streszczenie.....	59
8.	Summary.....	60
9.	Piśmiennictwo.....	63

1. Wstęp

1.1 Kanały potasowe ATP zależne w mięśniu sercowym i mięśniach gładkich naczyń: budowa i funkcja

1.1.1. Wprowadzenie

Kanały K^+ ATP- zależne (K_{ATP}) są obecne w wielu tkankach i narządach min: w komórkach beta trzustki, mięśniu sercowym, mięśniach gładkich naczyń, mięśniach szkieletowych, ośrodkowym układzie nerwowym i nerkach [76, 101]. Kanał potasowy K_{ATP} składa się z podjednostki Kir6.x (Kir6.1, Kir6.2), formującej światło kanału w błonie komórkowej dla prądu potasowego i podjednostki regulatorowej SURx (SUR1, SUR2A, SUR2B), stanowiącej tzw. receptor dla pochodnych sulfonilomocznika. Podjednostki Kir6.x i SURx tworzą heterooktameryczny kompleks. Kombinacje połączeń różnych podjednostek Kir6.x i SURx w stosunku 4:4, oraz jego rozmieszczenie w różnych tkankach organizmu warunkują odmienne właściwości elektrofizjologiczne i farmakologiczne kanału potasowego ATP-zależnego [57, 76, 77] (tabela 1).

Kanał dla prądu potasowego ATP-zależnego po raz pierwszy odkryto w 1983 roku w komórkach mięśnia sercowego a sklonowano w 1995 roku [39, 63]. Kanały K^+ ATP odgrywają ważną rolę w odpowiedzi komórki na stres metaboliczny taki jak hiperglikemia, hipoglikemia, niedotlenienie i niedokrwienie, oraz pełnią rolę ochronną w trakcie niedotlenienia i niedokrwienia w układzie sercowo- naczyniowym [76, 77, 101].

Kanały potasowe ATP- zależne zostały również odkryte w wewnętrznej błonie mitochondriów i nazwane mitochondrialnymi kanałami potasowymi ATP-zależnymi (mito- K^+ ATP). Zostały odkryte w 1991 roku w trakcie elektrofizjologicznych eksperymentów wykonywanych na mitochondriach hepatocytów szczurów [41]. Budowa molekularna mitochondrialnego kanału potasowego nie została do tej pory wyjaśniona [75, 80, 102]. Właściwości mito- K_{ATP} są podobne do kanału K_{ATP} z błony

plazmatycznej. Kanał mitochondrialny jest hamowany przez pochodne sulfonamocznika – glibenklamid, adenozynotrójfosforan (ATP), oraz swoiście przez kwas hydroksydekanowy (5-HD) [41]. Wykazano także, że diazoksyd stosunkowo selektywnie i skutecznie aktywuje mitoK_{ATP}. Funkcja kanału mito-K_{ATP} nie jest w pełni poznana.

Tabela 1. Typy kanałów K⁺_{ATP}

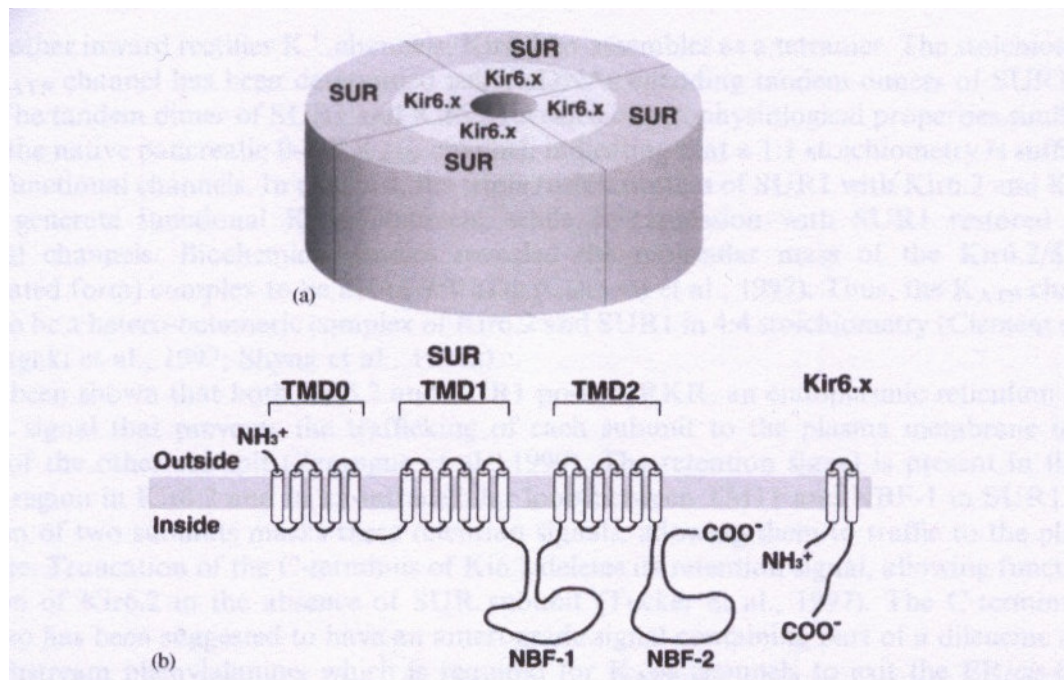
TYPY KANAŁÓW K ⁺ _{ATP} SURx / Kir6x	LOKALIZACJA KANAŁU K ⁺ _{ATP}
Kir6.2/ SUR2A	Kardiomiocyt
Kir6.1/ SUR2B	Mięśnie gładkie naczyń
Kir6.2/ SUR2B	Mięśnie gładkie
Kir6.2/ SUR1	Komórka beta trzustki

1.1.2. Struktura molekularna kanałów K⁺ ATP- zależnych w mięśniu sercowym i w mięśniach gładkich naczyń

Kanał K⁺ ATP- zależny składa się z dwóch podjednostek: (1) formującej światło kanału dla prądu $I_{K_{ATP}}$ Kir6.x (Kir6.1, Kir6.2) oraz (2) regulatorowej SURx (SUR1, SUR2A, SUR2B) będącej tzw. receptorem dla pochodnych sulfonilomocznika, stosowanych w terapii cukrzycy typu II (rys. 1). Podjednostka Kir6.x posiada dwie domeny, które w przypadku Kir6.1 i Kir6.2 w 71% zawierają identyczny skład aminokwasowy [18, 39, 76, 77]. Podjednostka SUR należy do grupy białek zawierających domenę wiążącą adenozynotrójfosforan [18, 39, 77]. Składa się ona z trzech domen TMD0, TMD1 i TMD2 [18, 39]. Podjednostka SUR posiada dwie domeny wiążące nukleotydy NBF1 i NBF2 zlokalizowane od strony cytoplazmatycznej, pomiędzy TMD1 i TMD2 oraz końcem COO⁻ [18, 39]. Podjednostki Kir6.x i SURx łączą się w stosunku stechiometrycznym 4:4, tworząc heterooktameryczny kompleks [18, 39, 52, 76, 77].

Kanał K_{ATP} w błonie komórki mięśnia sercowego składa się z podjednostek Kir6.2 i SUR2A. Badania na transgenicznym myszom pozbawionych genu kodującego podjednostkę Kir6.2 (*Kir6.2*^{-/-}),

potwierdzają strukturę molekularną błonowego kanału K^+_{ATP} kardiomiocyta [79]. W mięśniach gładkich naczyń kanał K_{ATP} składa się z podjednostek Kir6.1 i SUR2B [18, 100]. Podjednostka Kir6.1 znajduje się najprawdopodobniej w ścisłym kontakcie z cyklazą adenylanową w półkolistym zagłębieniu błony cytoplazmatycznej – caveoli [72].



Rys. 1 Molekularna struktura kanału K^+_{ATP} wg. S.Seino i wsp.[76]

Heterooktameryczny kompleks składający się z dwóch podjednostek:

- a) Formującej światło kanału Kir6.x i podjednostki regulatorowej SUR (SUR1 lub SUR2), połączone w stosunku stechiometrycznym 4:4
- b) Podjednostka SUR składa się z trzech przezbłonowych domen TMD0, TMD1 i TMD2, każda składa się kolejno z pięciu, sześciu, sześciu scalających błonę cytoplazmatyczną regionów. Podjednostka Kir6.x zawiera dwie przezbłonowe domeny.

1.1.3. Regulacja kanałów K⁺ ATP- zależnych w mięśniu sercowym i w mięśniach gładkich naczyń za pośrednictwem nukleotydów

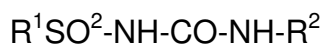
Kanał K_{ATP} stanowi swoisty sensor cytoplazmatycznego adenozynotójfosforanu (ATP). Wysokie stężenie cytoplazmatycznego ATP powoduje zablokowanie kanału i depolaryzację błony cytoplazmatycznej komórki. Niskie stężenie ATP powoduje aktywację kanału K_{ATP} i hiperpolaryzację błony. Wiązanie ATP z podjednostką Kir6.2 prowadzi do zamknięcia kanału. Zarówno końce NH₃⁺ jak i COO⁻ podjednostki Kir6.2 biorą udział w wiązaniu ATP [83]. W kanale K⁺ ATP kardiomiocyta znajdują się cztery miejsca wiążące ATP, jedna podjednostka Kir6.2 wiąże jedną cząsteczkę ATP. Stwierdzono, że związanie ATP tylko przez jedną podjednostkę Kir6.2 wywołuje zamknięcie kanału [54]. Kir6.1 jest znacznie mniej wrażliwa na hamujące działanie ATP (K_i~ 1 mmol/l) w porównaniu do Kir6.2 (K_i~ 100 umol/l). Zatem kanały K⁺ ATP kardiomiocytów są szybciej blokowane przez ATP w porównaniu do kanałów mięśni gładkich naczyń.

Domena NBF-2 (Rys. 1) wykazuje aktywność ATP-azy natomiast NBF-1 takiej aktywności nie posiada albo posiada w bardzo małym stopniu. Kiedy stosunek ATP/ADP maleje, NBF-1 wiąże ATP a NBF-2 wiąże MgADP co powoduje zmniejszenie powinowactwa podjednostki Kir6.x do ATP i otwarcie kanału [18]. Odwrotnie, kiedy stosunek ATP/ADP rośnie, zmniejszone stężenie MgADP powoduje uwolnienie MgADP z NBF-2 co prowadzi do odłączenia ATP z NBF-1 i połączenia się ATP z Kir6.x a w konsekwencji do zamknięcia kanału [18, 92]. Do aktywacji kanału potasowego ATP-zależnego w mięśniach gładkich naczyń wymagana jest obecność wewnątrz komórki nukleotydów dwufosforanowych jak i zmniejszenie stężenia wewnątrzkomórkowego ATP [18, 45, 93].

1.1.4. Regulacja kanałów K⁺ ATP- zależnych w mięśniu sercowym i w mięśniach gładkich naczyń za pośrednictwem pochodnych sulfonylomocznika

Pochodne sulfonylomocznika są szeroko stosowane w leczeniu cukrzycy typu II. Zamykają one kanały K⁺ ATP w błonie komórkowej komórki beta trzustki prowadząc do jej depolaryzacji i pobudzenia wydzielania

insuliny [68]. Spośród około 12000 pochodnych sulfonilomocznika o działaniu hipoglikemizującym, w leczeniu cukrzycy praktyczne znaczenie znalazło zaledwie kilkanaście z nich, o wzorze



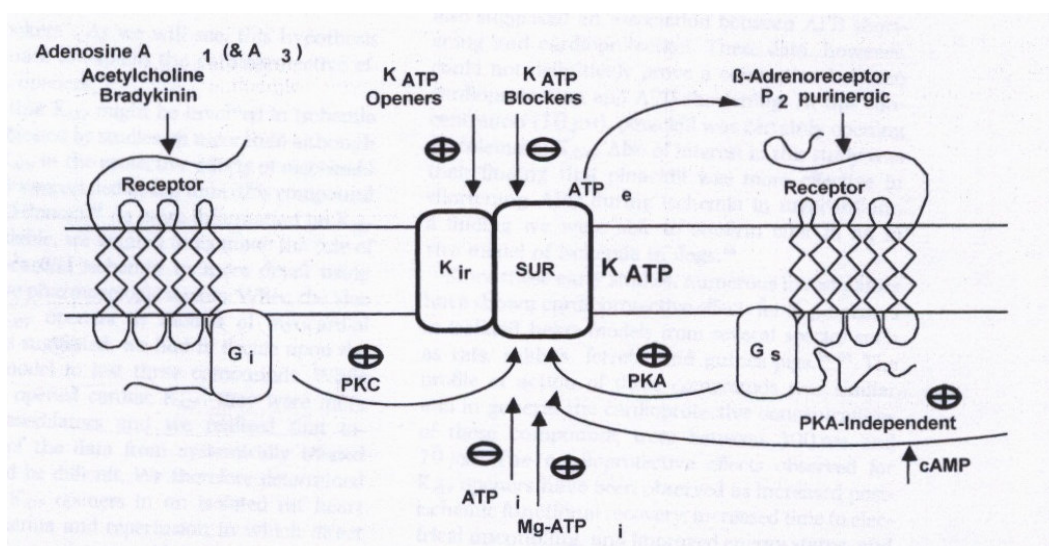
Budowa rodników R^1 i R^2 decyduje o stopniu i czasie działania hipoglikemizującego. Pochodne sulfonilomocznika I generacji (tolbutamid) mają proste rodniki R^1 (zbudowane z pierścienia fenyłowego) i R^2 (zbudowane z pierścienia alifatycznego). W preparatach o rozbudowanych rodnikach łańcuch alifatyczny zamieniono grupą cykloheksylową i dodano np. pierścień naftyłowy lub difenyłowy połączony z glicyną. Działają one silniej hipoglikemizująco i zaliczane są do pochodnych II generacji (glibenklamid, glipizyd, gliklazyd, glikwidon). Wprowadzony w ostatnich latach glimepiryd należy do III generacji i ma 1000 X większe powinowactwo do podjednostki SUR1 kanału K_{ATP} komórki β trzustki w porównaniu z tolbutamidem i gliklazydem [68]. Kanały K_{ATP} komórek β wysp trzustkowych składają się z Kir6.2 i SUR1. Różne typy kanałów K_{ATP} mają odmienną selektywność w stosunku do poszczególnych pochodnych sulfonilomocznika. Brak selektywności i różny stopień odwracalności wiązania z podjednostką SUR1 kanałów K_{ATP} komórek β wysp trzustkowych poszczególnych pochodnych sulfonilomocznika może mieć implikacje terapeutyczne, szczególnie u chorych na cukrzycę ze współistniejącą chorobą niedokrwienną serca. Region wiążący pochodne sulfonilomocznika został zlokalizowany w obrębie domeny przezłonowej TMD2, dokładnie w regionie między TM15 a TM16 podjednostki SUR [4, 5]. Podjednostka SUR2A kanału K_{ATP} kardiomiocyta zawiera jedynie miejsce wiążące reszty benzamidowe a podjednostka SUR2B kanału K_{ATP} mięśni gładkich naczyń zarówno miejsca wiążące reszty benzamidowe i sulfonilomocznikowe. Glibenklamid, który posiada resztę benzamidową i sulfonilomocznikową wiąże się z SUR2A i SUR2B. Glibenklamid w wielu badaniach na zwierzętach zapobiega zjawisku hartowania mięśnia sercowego (ang. *ischemic preconditioning* IPC), czyli zmniejszeniu uszkodzenia mięśnia sercowego związanego z niedokrwieniem i reperfuzją [38]. Dożylnie podanie glibenklamidu pacjentom w trakcie

koronaroplastyki również upośledzało hartowanie mięśnia sercowego, czego nie obserwowano w trakcie podania najnowszej pochodnej sulfonylomocznika glimepirydu [38]. Dodać jednak należy, że zamknięcie kanałów potasowych w kardiomiocytach przez pochodne sulfonylomocznika i utrudnienie wypływu jonów potasowych może mieć działanie korzystne i przyczyniać się do zmniejszenia ryzyka zaburzeń rytmu serca powstałych w wyniku jego niedokrwienia [38]. Jednak ich stosowanie może wywołać niebezpieczny skurcz mięśni gładkich naczyń wieńcowych w trakcie hipoksji jak i w warunkach fizjologicznych, dlatego powinny być bardzo ostrożnie stosowane u chorych na cukrzycę i jednocześnie chorobę niedokrwienną mięśnia sercowego [30, 68]. Ponadto podawanie glibenklamidu może spowodować niewystępowanie uniesienia odcinka ST w EKG w trakcie niedokrwienia mięśnia sercowego i przez to trudności w diagnostyce pacjentów cierpiących jednocześnie na cukrzycę typu 2 i chorobę wieńcową [13, 68].

1.1.5. Aktywatory kanałów K^+ ATP- zależnych w mięśniu sercowym i w mięśniach gładkich naczyń wiążące się z podjednostką SUR

Aktywatory kanałów K^+ ATP- zależnych stanowią zróżnicowaną pod względem strukturalnym grupę związków, do której należą min.: diazoksyd, pinacidil, rilmakalim kromakalim, aprikalim, bimakalim, nikorandil, minoksidil. Wykazano, że podjednostki SUR charakteryzują się różnym powinowactwem do aktywatorów kanałów K^+_{ATP} . Kanał Kir6.2/ SUR2A jest otwierany przez pinacidil, kromakalim i aprikalim, jest natomiast mało wrażliwy na działanie diazoksydu [24, 40, 79, 101]. Wrażliwość kanału Kir6.2/SUR2A na diazoksyd wzrasta w obecności MgADP [24]. Kanał Kir6.1/ SUR2B jest aktywowany zarówno przez pinacidil, kromakalim, nikorandil, minoksidil jak i diazoksyd, powodując relaksację mięśni gładkich naczyń [14, 23, 24, 62, 79, 101]. Nikorandil aktywuje kanał potasowy ATP zależny tylko wtedy gdy przyłączony do kanału jest dinukleotyd czemu sprzyja obniżone pH w komórce [43]. Nikorandil poza zdolnością otwierania kanału K^+_{ATP} , jest donorem tlenu azotu i stosowany jest w chorobie niedokrwienną mięśnia sercowego [33, 101]. Pinacidil nie wymaga specjalnych warunków do

aktywacji kanału. Pobudza on hydrolizę ATP przez NBF-2 i stabilizuje wiązanie MgADP z NBF-2 otwierając w ten sposób kanał [76]. Zatem aktywatory kanałów K^+_{ATP} działają za pośrednictwem interakcji z nukleotydami. Pinacidil wiąże się z podjednostką SUR2A w regionie domeny TMD2 pomiędzy TM13 a TM14 i pomiędzy TM16 a TM17 [23]. Dokładna lokalizacja miejsca wiązania diazoksydu z podjednostką SUR nie jest znana. Diazoksyd uznawany jest za relatywnie swoisty aktywator mitochondrialnych kanałów potasowych ATP-zależnych (mito- K^+_{ATP}) [97]. Wykazuje on około 1000 – 2000 razy większe powinowactwo do mito- K^+_{ATP} kanałów w porównaniu do błonowych kanałów potasowych [66]. Rilmakalim aktywuje kanały K^+_{ATP} poprzez kompetencyjne współzawodnictwo o miejsce wiążące ATP, a zatem działa on tylko w obecności ATP w komórce [63].



Rys. 2 Schematyczne przedstawienie mechanizmów kontroli błonowych kanałów K^+_{ATP} wg. Grover G i wsp. [33]

PKA – kinaza białkowa A, PKC – kinaza białkowa C, G_i – białko G_i, G_s – białko G_s

1.1.6. Regulacja aktywności kanałów K^+_{ATP} -zależnych w mięśniu sercowym i w mięśniach gładkich naczyń przez inne czynniki

Aktywność kanałów K^+_{ATP} jest regulowana przez liczne wewnątrzkomórkowe sygnały. Jednym z nich jest kinaza proteinowa A (PKA). Podjednostka Kir6.2 ulega fosforylacji bezpośrednio przez kinazę

proteinową A, bądź za pośrednictwem receptorowego białka Gs. Fosforylacja Kir6.2 prowadzi do aktywacji kanału K^+_{ATP} . Również podjednostka SUR1 ulega fosforylacji, która prowadzi min. do zwiększenia liczby aktywnych kanałów na powierzchni komórki.

Fosfolipidy błonowe takie jak difosforan fosfatydyloinozytolu (PIP_2) dramatycznie zmniejszają wrażliwość kanału K^+_{ATP} na adenylozotryfosforan (ATP) oraz hamuje blokujące działanie tolbutamidu na kanał. Najprawdopodobniej PIP_2 wywiera działanie poprzez interakcję z podjednostką Kir6.2.

Fizjologicznymi modulatorami kanałów K^+_{ATP} w mięśniu sercowym są długo łańcuchowe kwasy tłuszczowe. W trakcie niedotlenienia rośnie ich stężenie i wiążą się one z podjednostką Kir prowadząc do zmniejszenia wrażliwości kanału na ATP i pochodne sulfonilomocznika. Podjednostka SUR prawdopodobnie również bierze w tym mechanizmie udział.

Ponadto, wolne rodniki, pH, tlenek azotu, różne nukleotydy, białko G, adenylozyna, acetylocholina, kinaza białkowa C (PKC) modulują aktywność kanałów K^+_{ATP} [20, 33].

1.1.7. Funkcja kanałów K^+_{ATP} - zależnych w mięśniu sercowym

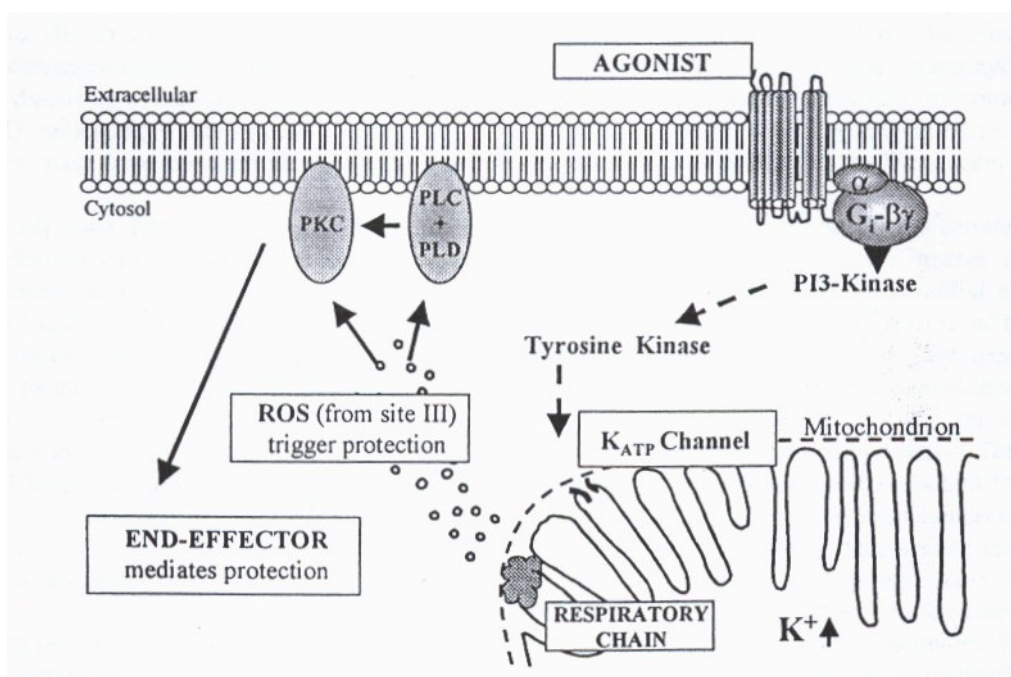
Błonowe kanały potasowe ATP- zależne (sarc- K^+_{ATP}) kardiomiocytów ulegają aktywacji w trakcie niedokrwienia. Otwarcie kanału prowadzi do wzrostu wypływu z komórki jonów K^+ i skrócenia czasu trwania potencjału czynnościowego (APD-*action potential duration*). Skrócenie APD powoduje zmniejszenie napływu do komórki jonów Ca^{2+} , co najprawdopodobniej chroni komórkę przed uszkodzeniem w wyniku niedokrwienia.

Błonowe kanały K^+_{ATP} - zależne kardiomiocytów biorą udział w procesie hartowania mięśnia sercowego (ang. *ischemic preconditioning* IPC). Poprzez zjawisko hartowania rozumiemy zmniejszenie uszkodzenia mięśnia związanego z niedokrwieniem i reperfuzją w następstwie krótkich incydentów niedokrwienia i reperfuzji poprzedzających właściwy incydent niedokrwienia. Zasadniczą rolę w mechanizmie IPC odgrywiają kanały potasowe znajdujące się w błonie komórkowej (sarc- K^+_{ATP}) kardiomiocytów. Ich otwarcie powoduje skrócenie czasu trwania potencjału czynnościowego i zmniejsza napływ toksycznych jonów wapnia do kardiomiocytów. Aktywatory kanałów

K^+_{ATP} ; kromakalim, bimakalim, pinacidil powodowały w trakcie eksperymentów efekty analogiczne do hartowania, a ich kardioprotekcyjne działanie było hamowane przez glibenklamid oraz swoisty bloker błonowych kanałów potasowych HMR1098 [58, 66, 79, 80]. Jednak nie zawsze kardioprotekcyjne działanie kanałów sarc- K^+_{ATP} było związane ze skróceniem APD [66, 102]. Dlatego coraz częściej istotną rolę w hartowaniu mięśnia sercowego zaczęto przypisywać mitochondrialnym kanałom potasowym ATP- zależnym (mito- K^+_{ATP}). Otwarcie mito- K^+_{ATP} zmniejsza wewnątrzmitochondrialne stężenie Ca^{2+} . Otwarcie kanałów mito- K^+_{ATP} pozwala na wypływ jonów H^+ i napływ jonów K^+ do mitochondrium, prowadząc do alkalizacji i wzrostu produkcji wolnych rodników (ROS) [25, 64]. ROS prowadzą do aktywacji kinazy białkowej C, która przekazuje sygnał prowadzący do końcowego efektu – kardioprotekcji [86]. Wzrost produkcji ROS za pośrednictwem diazoksydu prowadzi również do intropowo dodatniego efektu [86]. Diazoksyd, swoisty aktywator mito- K^+_{ATP} zmniejsza stężenie wewnątrz mitochondrialnego Ca^{2+} w wyniku zmniejszenia wychwytu z cytozolu oraz zwiększenia uwalniania jonów wapnia z mitochondriów do cytozolu [37, 65, 66, 102]. Swoisty bloker mito- K^+_{ATP} – kwas 5-hydroksydekanowy hamuje te działania [37, 65, 66, 73, 91, 102]. Aktualnie uważa się, że najprawdopodobniej zarówno mitochondrialne jak i błonowe kanały potasowe pełnią ważną funkcję w hartowaniu mięśnia sercowego i mechanizmach kardioprotekcyjnych w trakcie niedokrwienia.

Kanały potasowe ATP zależne pełnią kluczową rolę w adaptacji do stresu, do sytuacji związanych ze zwiększonym uwalnianiem katecholamin. Diazoksyd osłabia wzrost akcji serca w trakcie stymulacji współczulnego układu nerwowego [59]. Zaobserwowano, że myszy *Kir6.2^{-/-}* giną w wyniku zaburzeń rytmu w czasie intensywnej stymulacji układu współczulnego [68, 103]. Przedłużające się otwarcie kanału K^+_{ATP} w kardiomiocycie powoduje gromadzenie się K^+ w przestrzeni pozakomórkowej w obszarze niedokrwienia, depolaryzację komórki i pobudza wpływ do komórki toksycznego Ca^{2+} co może prowadzić do powstania zaburzeń rytmu [68, 77, 85]. Jednoznacznie nie wykazano proarytmicznego i antyarytmicznego działania aktywatorów i blokerów kanałów K^+_{ATP} . W trakcie wieloletniego stosowania nikorandilu u chorych z chorobą niedokrwinną mięśnia

sercowego nie obserwowano poważnych zaburzeń rytmu [102], natomiast pinacidil powoduje zwiększone występowanie komorowych zaburzeń rytmu w doświadczeniach na modelach zwierzęcych *in vitro* [31]. Glibenklamid i selektywny bloker sarc- K^+_{ATP} HMR-1098 zmniejszają ryzyko komorowych zaburzeń rytmu w trakcie niedokrwienia i reperfuzji a tolbutamid zwiększa ryzyko niebezpiecznych arytmii [3, 12, 38, 66, 68, 182]. Obecnie efekt proarytmiczny przypisuje się aktywacji kanałów sarc- K^+_{ATP} a antyarytmiczny aktywacji kanałów mito- K^+_{ATP} [21, 31].



Rys. 3 Schematyczne przedstawienie procesów zachodzących w komórce w wyniku aktywacji mitochondrialnych kanałów K^+_{ATP} wg. Oldenburg O i wsp. [64]

PI3-kinase – kinaza trzyfosfatydyloinozytolu, Respiratory chain – łańcuch oddechowy, ROS – wolne rodniki, PLC – fosfolipaza C, PLD – fosfolipaza D, PKC – kinaza białkowa C

1.1.8. Funkcja kanałów K^+_{ATP} - zależnych w mięśniach gładkich naczyń

Kanały K^+_{ATP} - zależne w mięśniach gładkich naczyń biorą udział w regulacji napięcia naczyń zarówno w spoczynku jak i w trakcie niedokrwienia

[18, 57, 59, 76, 101]. Otwarcie kanałów potasowych Kir6.1 /SUR2B w trakcie niedokrwienia w mięśniach gładkich naczyń wieńcowych jest odpowiedzialne za rozszerzenie tych naczyń [76]. Kanały potasowe w naczyniach wieńcowych są aktywne także w spoczynku i regulują napięcie naczyń wieńcowych w normoksji [14]. Większość aktywatorów kanałów potasowych minoxidil, diazoksyd, nikorandil wywołuje relaksację mięśni gładkich naczyń i są one stosowane w terapii nadciśnienia tętniczego i choroby wieńcowej [14, 18]. Wyniki badań na genetycznie modyfikowanych myszach *Kir6.1*^{-/-} oraz *SUR2*^{-/-}, pozbawionych kanałów potasowych ATP-zależnych mięśni gładkich naczyń, potwierdziły ich udział w rozszerzeniu naczyń [15, 56]. Transgeniczne myszy *Kir6.1*^{-/-} giną przed okresem dojrzewania w mechanizmie nagłej śmierci sercowej [57, 77]. Obserwuje się u takich osobników spontaniczne uniesienia odcinka ST z następującymi blokami przedsionkowo-komorowymi różnego stopnia [57, 77]. Przyczyną nagłej śmierci sercowej myszy *Kir6.1*^{-/-} są zaburzenia rytmu spowodowane niedokrwieniem w następstwie skurczu naczyń wieńcowych [57]. Transgeniczne myszy pozbawione genu kodującego podjednostkę Kir6.1 (*Kir6.1*^{-/-}) lub SUR2 (*SUR2*^{-/-}) stanowią doświadczalny model dławicy Prinzmetala [15, 77]. Transgeniczne myszy *SUR2*^{-/-} manifestowały zarówno epizody obkurczenia naczyń wieńcowych jak i nadciśnienie tętnicze [15, 72]. Podanie ludziom, w spoczynku, bezpośrednio do naczyń wieńcowych glibenklamidu powoduje wzrost napięcia naczyń wieńcowych i zmniejszenie przepływu wieńcowego [30]. Obserwacje na powyższych modelach doświadczalnych jednoznacznie potwierdzają udział kanałów Kir6.1 /SUR2B K⁺ ATP- zależnych w regulacji napięcia naczyń wieńcowych w spoczynku jak i w trakcie niedotlenienia.

Kanały potasowe ATP-zależne w mięśniach gładkich naczyń są aktywowane w trakcie kwasicy i wstrząsu septycznego i odpowiedzialne są za rozszerzenie naczyń w tych stanach patologicznych [14].

Kanały K⁺_{ATP} w mięśniach gładkich naczyń biorą udział w mechanizmie działania niektórych endogennych wazodylatorów i wazokonstryktorów. Aktywacja kanałów K⁺_{ATP} w mięśniach gładkich naczyń pośredniczy w rozkurczu mięśni gładkich w wyniku działania wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP), śródbłonkowego czynnika hyperpolaryzującego

(EDHF), tlenku azotu, prostacykliny (PGI₂) i adenozyliny [14, 18]. Prawdopodobnie blokowanie naczyniowych kanałów potasowych ATP-zależnych bierze udział w wazokonstrykcyjnym działaniu angiotensyny II, endoteliny-1, serotoniny (5-HT), histaminy i wazopresyny [14, 18].

Hormon wzrostu zwiększa ekspresję mRNA zarówno podjednostki Kir6.1 jak i SUR2B, wpływając tym samym na ilość kanałów potasowych ATP zależnych w mięśniach gładkich naczyń i obniżając w ten sposób ciśnienie tętnicze [87]. Potwierdza to znaną hipotezę, że niedobór hormonu wzrostu jest związany z nadreaktywnością naczyń i przyspieszonym rozwojem zmian miażdżycowych.

Kanały K^{+}_{ATP} w mięśniach gładkich naczyń wykazują ochronne działanie na śródbłonek w trakcie niedokrwienia. Aktualnie uważa się, że zarówno błonowe jak i mitochondrialne kanały potasowe biorą udział w ochronie funkcji śródbłonka naczyń w trakcie niedotlenienia. Diazoksyd zmniejsza produkcję uszkadzających śródbłonek nadtlenuków w trakcie niedokrwienia oraz działa wazodylatacyjnie [7, 55].

1.2 Różnice w funkcjonowaniu układu krążenia w zależności od płci

Serca kobiet i mężczyzn nie różnią się pod względem wielkości, natomiast masa serc mężczyzn jest o około 15-30% większa od serc kobiet [50]. Zarówno męskie i żeńskie serca od początku mają taką samą ilość kardiomiocytów o identycznej wielkości [50]. Komórki mięśnia sercowego mężczyzn są bardziej wrażliwe i ulegają szybciej przerostowi w trakcie upływu lat w porównaniu z kardiomiocytami kobiet, o czym świadczy większa zapadalność na choroby układu sercowo - naczyniowego u mężczyzn oraz, że rokowanie w niewydolności mięśnia sercowego jest lepsze u kobiet w porównaniu z mężczyznami [98]. Badania autopsyjne zarówno zdrowego jak i niewydolnego mięśnia sercowego wykazały, że u kobiet apoptoza kardiomiocytów jest mniej nasilona w porównaniu z mężczyznami, co może tłumaczyć łagodniejszy przebieg choroby w tej grupie [98]. Wiadomo, że estrogen hamuje apoptozę kardiomiocytów, co potwierdza lepsze rokowanie u kobiet ale i znamienny wzrost występowania niewydolności mięśnia

sercowego w miarę starzenia się kobiet, kiedy dramatycznie obniża się poziom hormonu we krwi [42, 91, 98, 101].

Badania kliniczne dowodzą, że zdrowe kobiety w wieku przedmenopauzalnym mają szybszą podstawową akcję serca w porównaniu ze zdrowymi, młodymi mężczyznami [2, 10]. Podobne wyniki uzyskano na modelach zwierzęcych, głównie szczurach [53]. Porównując rytm serca kobiet i mężczyzn w czasie blokady układu autonomicznego, stwierdza się szybszą akcję serca u kobiet [6]. Napięcie układu autonomicznego nie wpływa zatem na różnicę podstawowej akcji serca w zależności od płci. Akcja serca kobiet jest zróżnicowana w zależności od fazy cyklu menstruacyjnego, w której wykonywany jest jej pomiar. W momencie kiedy podwyższony jest poziom endogennego estrogenu akcja serca jest szybsza w porównaniu do okresu w którym poziom estrogenu maleje [6].

Różnice w częstości występowania chorób układu krążenia wśród kobiet i mężczyzn zaobserwowano już pół wieku temu. Ryzyko chorób naczyniowo -sercowych u mężczyzn rośnie stopniowo wraz ze wzrostem wieku w przeciwieństwie do kobiet, u których ryzyko gwałtownie wzrasta po menopauzie. Śmiertelność z powodu chorób układu krążenia jest większa wśród mężczyzn w porównaniu do kobiet w wieku od 45- 64 lat [50]. Po 65 roku życia wskaźnik śmiertelności kobiet i mężczyzn wyrównuje się [50]. Przyczyna tego zjawiska do końca nie jest znana. Tradycyjnie estrogenowi przypisuje się kardioprotekcyjną rolę u kobiet w wieku reprodukcyjnym. Niewiele jest badań porównujących wpływ estrogenu na mięśniówkę gładką naczyń kobiet i mężczyzn. Dotychczasowe wyniki pozwalają wnioskować, że młodzi mężczyźni wykazują się mniejszą reaktywnością naczyń na takie czynniki jak estrogen, czy też czynniki fizyczne jak zimno i ciepło w porównaniu z młodymi kobietami [11]. Z dużym prawdopodobieństwem możemy stwierdzić, że reaktywność naczyń u młodych kobiet różni się od reaktywności naczyń kobiet po menopauzie. Ostatnio coraz częściej spotykamy się z dowodami potwierdzającymi różnice w wrażliwości mięśnia sercowego na stres metaboliczny i różnice w aktywności endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych w zależności od płci. Jednym z endogennych mechanizmów odgrywających ważną rolę kardioprotekcyjną jest aktywacja kanałów K^+ ATP zależnych w mięśniu sercowym. Ich otwarcie

chroni komórki mięśnia sercowego w trakcie niedotlenienia. W wielu badaniach stwierdzono, że leki otwierające te kanały zmniejszają obszar zawału oraz wykazują działanie analogiczne do hartowania mięśnia sercowego. Jovanović jako pierwszy dowiódł, że w błonie komórkowej kardiomiocytów samic jest większa gęstość kanałów K^+ ATP w porównaniu z samcami świnek morskich [70]. Związane jest to z większą ekspresją mRNA białka podjednostki regulatorowej SUR2A kanału u samic [70]. Podjednostka SUR2A decyduje o ilości aktywnych kanałów K^+ ATP zależnych w mięśniu sercowym [70]. Również badania tego autora dowodzą, że estrogen powoduje wzrost ekspresji mRNA białka podjednostki SUR2A w kardiomiocytach samic świnek morskich [69]. Zatem estrogen zwiększa liczbę aktywnych kanałów K^+ ATP zależnych w mięśniu sercowym [69]. Obserwacje te mogą tłumaczyć występowanie u kobiet w wieku reprodukcyjnym mniejszego ryzyka chorób układu krążenia w porównaniu do młodych mężczyzn. Badania wykonane wśród ludzi jak i na zwierzętach dowodzą, że mięsień sercowy starych osobników jest mniej odporny na niedokrwienie w porównaniu do młodych osobników [42, 74]. Większa wrażliwość mięśnia sercowego na niedokrwienie, mniejsza zdolność hartowania związana jest z wieloma zmianami strukturalnymi i funkcjonalnymi zachodzącymi w kardiomiocytach w miarę starzenia się. U samic świnek morskich stwierdzano zmniejszenie liczby podjednostek SUR2A i Kir6.2 kanałów K^+ ATP zależnych w mięśniu sercowym z upływem wieku [44, 71]. U samców upływ czasu nie ma wpływu na poziom podjednostek kanałów K^+ ATP-zależnych [44, 71]. W badaniach molekularnych stwierdzono, że u samic w miarę starzenia się ulega zmniejszeniu ekspresja mRNA jedynie podjednostki SUR2A [71]. Zatem jest to kolejny dowód, że podjednostka SUR2A determinuje ilość funkcjonalnych kanałów K^+ ATP zależnych w mięśniu sercowym. Powyższe stwierdzenia dowodzą, że starzenie się związane jest ze zmniejszeniem liczby kanałów K^+ ATP zależnych w mięśniu sercowym samic. Gęstość kanałów jest ściśle związana z malejącym w miarę starzenia się poziomem estrogenu u samic. Zatem w ten sposób można by wytłumaczyć dramatyczny wzrost ryzyka chorób naczyniowo-sercowych u kobiet po menopauzie.

Kobiety charakteryzują się dłuższym odstępem QT i wśród kobiet więcej występuje przypadków wrodzonego zespołu długiego QT (LQTS) w porównaniu do mężczyzn [27, 98]. Płeć żeńska jest niezależnym czynnikiem ryzyka występowania nagłej śmierci sercowej w przypadku występowania wrodzonego zespołu długiego QT [67]. Kobiety wykazują również znamienne większe wydłużenie odstępu QT w trakcie zwolnienia rytmu serca oraz dłuższym skorygowanym odstępem QT (QTc) [1, 2]. W badaniach wykonanych na zwierzętach wykazano, że różnice długości odstępu QT związane ze zwolnieniem akcji serca mogą być wynikiem odmiennej gęstości szybkiej składowej repolaryzującego prądu potasowego I_{Kr} w zależności od płci [1, 52].

Kobiety charakteryzują się większym ryzykiem wystąpienia *torsades de pointes* (TdP) w trakcie terapii lekami wydłużającymi odstęp QT w porównaniu do mężczyzn [2, 60]. Wyniki badań na myszach, królikach i psach wykazują także znamienne dłuższy czas trwania potencjału czynnościowego w warunkach spoczynkowych i dłuższy odstęp QT u samic w porównaniu z samcami [1, 27, 88, 94, 99]. Sugeruje się, że może to wynikać z różnicy w ekspresji repolaryzujących prądów K^+ (I_{Kr} , I_{Ks}) w zależności od płci i ich modulacji za pośrednictwem hormonów płciowych. Potwierdzono mniejszą gęstość prądu I_{Kr} w kardiomiocytach królików samic w porównaniu do samców [2, 27]. Stwierdzono również mniejszą gęstość ultraszybkiej składowej prądu potasowego I_{Kur} oraz obniżoną ekspresję mRNA białek kanału tego prądu w kardiomiocytach samic mysich w porównaniu do samców [88]. Żeński hormon płciowy, estradiol zmniejsza poziom mRNA dla białek kanałów prądów I_{Kr} i I_{Ks} [2, 26] a męski hormon płciowy; dihydrotestosteron zwiększa odpowiednio ich gęstość [2, 67]. Odstęp QT u chłopców i dziewcząt przed okresem dojrzewania nie różni się długością [2, 6]. U mężczyzn po okresie dojrzewania odstęp QT ma tendencję do skracania się, co związane jest ze wzrostem poziomu krążących androgenów [2, 98]. Boggodia zaobserwował, że u mężczyzn po kastracji odstęp QT zbliżał się długością do odstępu QT zdrowych dorosłych kobiet, natomiast podanie testosteronu badanym mężczyznom ponownie skracало odstęp QT do wartości wyjściowych przed kastracją [8]. Wykazano również, że podawanie dihydrotestosteronu kastrowanym królikom płci

męskiej zwiększa gęstość prądów I_{Kr} i I_{Ks} [2]. Zależne od płci różnice w funkcjonowaniu kanałów jonowych odgrywają znaczącą rolę w wrażliwości mięśnia sercowego na niedotlenienie i efekty arytmogenne. W opisanych zjawiskach wiodącą rolę odgrywa estrogen. Estrogen zmniejsza gęstość kanałów potasowych Kr i Ks odpowiedzialnych za repolaryzację w kardiomiocytach. W ten sposób tłumaczyć można większą wrażliwość mięśnia sercowego na niedotlenienie kobiet po menopauzie i większe ryzyko wystąpienia TdP w trakcie terapii lekami wydłużającymi odstęp QT.

Estrogen także zwiększa ekspresję podjednostki SUR2A, prowadząc do wzrostu gęstości kanałów K^+ ATP zależnych w mięśniu sercowym samic. Jednak, dokładny wpływ estrogenu na funkcje kanałów K^+ ATP zależnych nie jest wystarczająco poznany i wymaga dalszych badań.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było porównanie efektów aktywacji kanałów potasowych ATP-zależnych w mięśniu sercowym i mięśniach gładkich aorty u samic i samców świnki morskiej i próba wyjaśnienia stwierdzonych różnic.

Praca składa się z następujących części:

1. Badanie wpływu aktywacji farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na siłę skurczu mięśnia sercowego i częstość pracy serca w zależności od płci, w obecności estrogenu i tamoksifenu.
2. Określenie stężenia niektórych parametrów biochemicznych biorących udział w regulacji pracy kanałów K^+_{ATP} (dehydrogenazy mleczanowej, sercowej dehydrogenazy mleczanowej).
3. Badanie wpływu aktywacji farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na kurczliwość mięśni gładkich aorty w zależności od płci, w obecności estrogenu i tamoksifenu.

3. Materiał i metody

3.1 Materiał

a) Zwierzęta doświadczalne

Doświadczenie przeprowadzono na świnkach morskich obojga płci o masie ciała 400-500g. Zwierzęta trzymane w kontrolowanych warunkach otoczenia; temperatura 22 - 24 °C, wilgotność względna 50 %, 12- godzinny cykl oświetleniowy. Karmione były standardową paszą laboratoryjną. Przed przystąpieniem do eksperymentu zwierzęta przechodziły okres 7 – dniowej adaptacji do warunków otoczenia.

b) Protokół doświadczenia

Eksperymenty wykonywano w dwóch etapach.

W pierwszym etapie zwierzęta podzielono na dwie grupy: samce i samice. W wymienionych grupach obserwowano wpływ badanych związków na siłę skurczu i akcję serca izolowanych przedsionków oraz rozkurcz aorty piersiowej. Wszystkie doświadczenia przeprowadzone zostały jesienią i wiosną. Wiosną, kiedy świnki morskie wykazują zwiększoną aktywność prokreacyjną, w grupie samic rozpoznawano fazę cyklu menstruacyjnego na podstawie obserwacji zewnętrznych narządów płciowych i zachowania zwierząt. Objawami ruji były zaczerwienienie i obrzęk sromu, otwarcie przedsionka pochwy i nadmierna pobudliwość zwierzęcia [78, 95]. Do eksperymentu w grupie samic wybierano zwierzęta w trakcie ruji, której towarzyszy zwiększone wydzielanie estrogenu.

W drugim etapie samice podzielono na grupę kontrolną i grupę, która otrzymywała przez 14 dni, podskórnie, tamoksifen w dawce dobowej 0,133 mg/ 100 g masy ciała. Samce podzielono na 3 grupy: kontrolną, oraz dwie grupy, które otrzymywały przez 14 dni, podskórnie 17-β- estradiol w dawce dobowej 0,132 mg/ 100 g masy ciała lub w dawce dobowej 0,066 mg / 100 g masy ciała. Zwierzęta w grupach

kontrolnych otrzymywały podskórną, w tym samym czasie, i w tej samej objętości i dawce (0,05 ml / 100 g masy ciała) rozpuszczalnik (etanol) stosowany do rozpuszczenia podawanych związków. Wiosną w grupie kontrolnej samic, analogicznie jak w pierwszym etapie badania, rozpoznawano cykl menstruacyjny i do eksperymentu wybierano zwierzęta w trakcie ruj. W opisanych grupach obserwowano wpływ badanych związków na akcję serca i rozkurcz aorty piersiowej oraz wykonano pomiar dehydrogenazy mleczanowej i jej izoenzymu; sercowej dehydrogenazy mleczanowej w surowicy krwi.

3.2 Metody

3.2.1. Pomiary częstości pracy serca

Pomiary akcji serca wykonywano na izolowanym spontanicznie bijącym prawym uszku serca. Zwierzęta usypiano podając dootrzewnowo pentobarbital (30 mg/ kg masy ciała) lub tiopental (50 mg/ kg masy ciała). Następnie natychmiast otwierano klatkę piersiową na wysokości wyrostka mieczykowatego i pobierano bijące serce. Serce umieszczano w naczyniu zawierającym zmodyfikowany płyn Krebsa-Henseleita o następującym składzie (mM): NaCl 115, KCl 5.7, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ x 7H₂O 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glukoza 10, kwas pirogronowy 2. Roztwór wysycano mieszaniną gazową zawierającą 95% O₂ i 5% CO₂. Z kolei jak najszybciej wypreparowywano stale i spontanicznie bijące prawe uszko i zawieszano je w naczynku inkubacyjnym o objętości 50 ml, zawierającym ten sam roztwór Krebsa-Henselaita. Przez cały czas trwania doświadczenia płyn znajdujący się w naczynku inkubacyjnym nasycano karbogenem, a temperaturę jego utrzymywano na stałym poziomie 37⁰ C, za pomocą termostatu. Szybkość przepływu płynu wynosiła 5 ml/ min. Akcja serca mierzona była za pomocą izometrycznego przetwornika (F-30, HSE, March-Hugstetten, Niemcy), do którego był podłączony jeden koniec preparatu a zapisywana była przez rejestrator liniowy (TZ 4200, LPP). Każde doświadczenie rozpoczynano po wstępnej inkubacji preparatu trwającej około 60 min. Jeśli kontrolna akcja serca wynosiła około 180 ± 20

uderzeń na minutę, była stabilna i miarowa rozpoczynano podawanie do naczynka inkubacyjnego, we wzrastających stężeniach badane związki. Po 4 minutach od podania określonego stężenia związku, każdorazowo zapisywano akcję serca i siłę skurczu na rejestratorze.

W przypadku stosowania glibenklamidu i kwasu 5-hydroksydekanowego stosowano godziną reperfuzję w trakcie, której częstotliwość i siła skurczu przedsionka wracała do wartości wyjściowej. Następnie rozpuszczone w odpowiednim stężeniu, bezpośrednio w zmodyfikowanym płynie Krebsa- Henselaita związki podawano w przepływie z szybkością 5 ml / min do naczynka inkubacyjnego. Po 30 min. zamykano przepływ i do wysyconego glibenklamidem lub 5-hydroksydekanote preparatu podawano we wzrastających stężeniach aktywatory kanałów K^+_{ATP} , mierząc każdorazowo akcję serca i siłę skurczu.

3.2.2. Pomiary kurczliwości serca

Pomiary siły skurczu mięśnia sercowego zostały wykonane na wyżej opisanym, spontanicznie bijącym prawym uszku serca. Spontanicznie bijące prawe uszko nie jest idealnym modelem do pomiarów siły skurczu mięśnia sercowego, ze względu na ścisły związek akcji serca na siłę skurczu oraz na nieregularne ułożenie wiązek mięśniowych w preparacie. Mimo to zdecydowano się na wykonanie za pośrednictwem izometrycznego przetwornika, pomiarów amplitud skurczu w trakcie rejestracji liczby uderzeń serca spontanicznie bijącego prawego uszka w celu dodatkowego sprawdzenia wpływu aktywatorów kanałów K^+_{ATP} na pracę serca. Siłę skurczu wyrażono w milimetrach amplitudy skurczu, po odpowiedniej kalibracji, gdzie 1 mm odpowiadał 0,05 mN (1 mN = 100 mg).

3.2.3 Pomiary kurczliwości naczyń tętniczych

Pomiary kurczliwości naczyń wykonywane były na izolowanej aorcie piersiowej. Zwierzęta usypiano podając dootrzewnowo tiopental. Następnie otwierano klatkę piersiową, odsuwano bijące serce i pobierano aortę piersiową. Aortę umieszczano w naczyniu

zawierającym zmodyfikowany płyn Krebsa-Henseleita o następującym składzie (mM): NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ x 7H₂O 1.2, NaHCO₃ 25.0, glukoza 11. Roztwór wysycano mieszaniną gazową zawierającą 95% O₂ i 5% CO₂. Aorta następnie była oczyszczana z tłuszczu i tkanki łącznej a następnie cięta na 3-4 mm pierścionki. Preparaty zawieszano w naczynkach inkubacyjnych o objętości 5 ml, zawierających płyn Krebsa-Henselaita, o stałej temperaturze 37⁰ C, nasycanym karbogenem. Pierścionek rozwieszony był pomiędzy dwa metalowe haczyki; jednym przytwierdzonym do dna naczynka inkubacyjnego a drugim połączonym z przetwornikiem izometrycznym. Skurcz preparatu mierzony był za pomocą izometrycznego przetwornika (F-30, HSE, March-Hugstetten, Niemcy), a zapisywany przez rejestrator. Każdy pierścionek przed doświadczeniem rozciągany był do napięcia spoczynkowego równego 1g a następnie inkubowany przez około 60 min przed rozpoczęciem doświadczenia. Aby wykonać pomiary rozkurczu aorty, pierścionki obkurczano fenylefryną w stężeniu 30 µM a następnie w fazie stabilizacji skurczu, dodawano do naczynka inkubacyjnego wzrastające stężenia badanych związków.

3.2.3 Pomiary enzymatyczne

Pomiary stężenia dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz jej izoenzymu; sercowej dehydrogenazy mleczanowej (H-LDH) wykonywano w surowicy krwi. Krew pobierano zaraz po otwarciu klatki piersiowej, bezpośrednio z bijącego serca. Następnie krew odwirowywano uzyskując surowicę, którą zamrażano w temp -4,0°C. Stężenie LDH i H-LDH mierzone było za pomocą automatycznego spektrofotometru (Hitach 911, Boehringer Mannheim, Niemcy) o długości fali 340 nm, używając buforu fosforanowego w pH 7.5.

3.3 Badane związki

- Pinacidil – (Pinacidil, Sigma)
- Diazoksyd – (Diazoxide, Sigma)
- Rilimakalim –(dar od dr.Englerta, z Aventis Pharma, Frankfurt, Niemcy)
- Tamoksifen – (Tamoxifen, RBI)

- Estrogen – (17beta-estradiol, RBI)
- Glibenklamid – (Glibenclamid, dar firmy Polfa, Stargard)
- Kwas 5- hydroksydekanowy - (5 hydroxydecanote, Sigma)

Do rozpuszczenia pinacidilu, diazoksydu i rilimakalimu stosowano rozpuszczalnik organiczny DMSO (dimetylosulfotlenek). Stężenie DMSO w naczynku inkubacyjnym nie przekraczało 0,2% i nie wpływało na pracę prawego przedsionka i aorty. Tamoksifen i estrogen zostały rozpuszczone w etanolu. Objętość etanolu w jednorazowej dawce dobowej podawanej zwierzętom wynosiła 0,05 ml/ 100g masy ciała.

Odczynniki do sporządzania zmodyfikowanego płynu Krebsa – Henseleita zakupiono w P.P.H. Polskie Odczynniki Chemiczne (Gliwice, Polska).

3.4 Analiza statystyczna

Dane zebrane w badaniu zapisano w arkuszu kalkulacyjnym Statistica 7,1 (StatSoft USA). Za pomocą tego programu dokonano również obliczeń statystycznych. Do opisu statystycznego zebranego materiału użyto w przypadku cech ilościowych podstawowych miar położenia i rozproszenia. Oceniano rozkład zmiennych ciągłych pod kątem jego zgodności z rozkładem normalnym stosując test Komłogorowa-Smirnowa. Do analizy statystycznej uzyskanych wyników stosowano Test ANOVA (analiza wariancji) uzupełniany testem post-hoc (test Newmana-Keulsa). Wartości EC_{50} opracowano na podstawie programu komputerowego: Pharmacological Calculation System-Pharm/ PCS wersja 4.0. Porównanie średnich wartości cech ilościowych powiązanych w grupach przed i po terapii hormonalnej przeprowadzono za pomocą testu T Studenta. W przypadku braku normalności rozkładu stosowano test U Manna-Whitneya. Za statystycznie istotne przyjęto wartości przy $p < 0,05$.

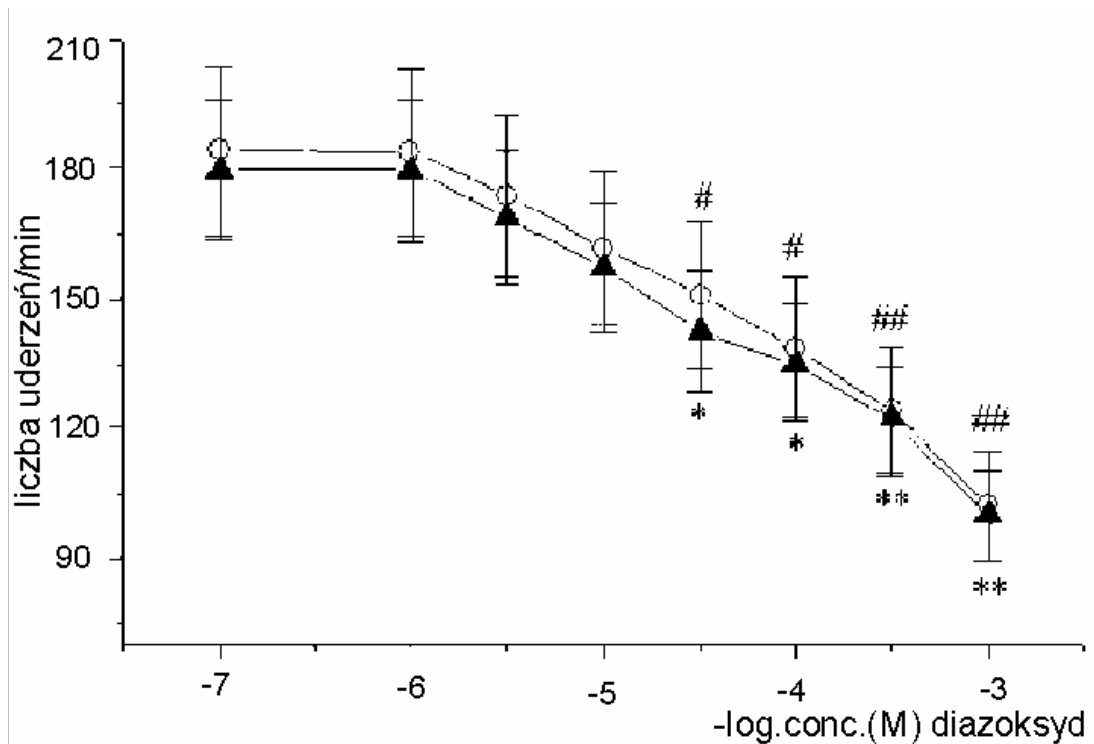
Na prowadzone badania uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy AMG Nr 5/ 05

4. Wyniki

4.1 Wpływ aktywacji farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na siłę skurczu mięśnia sercowego i akcję serca w zależności od płci

Efekt diazoksydu na automatyzm spontanicznie bijącego prawego uszka serca samic i samców świnek morskich

Wzrastające stężenia diazoksydu wywoływały zmniejszenie akcji serca zarówno w grupie samic jak i samców (rys.4). Począwszy od stężenia 30 μM i wyższych, efekt diazoksydu zarówno w grupie samic jak i samców, wykazywał statystyczną znamienność w porównaniu do wartości wyjściowych. Nie zaobserwowano w badanych grupach żadnych statystycznych różnic w chronotropowym ujemnym działaniu diazoksydu wiosną i jesienią.



Rys.4 Chronotropowy ujemny efekt diazoksydu na prawy przedsionek samic i samców świnek morskich. O samice ▲ samce

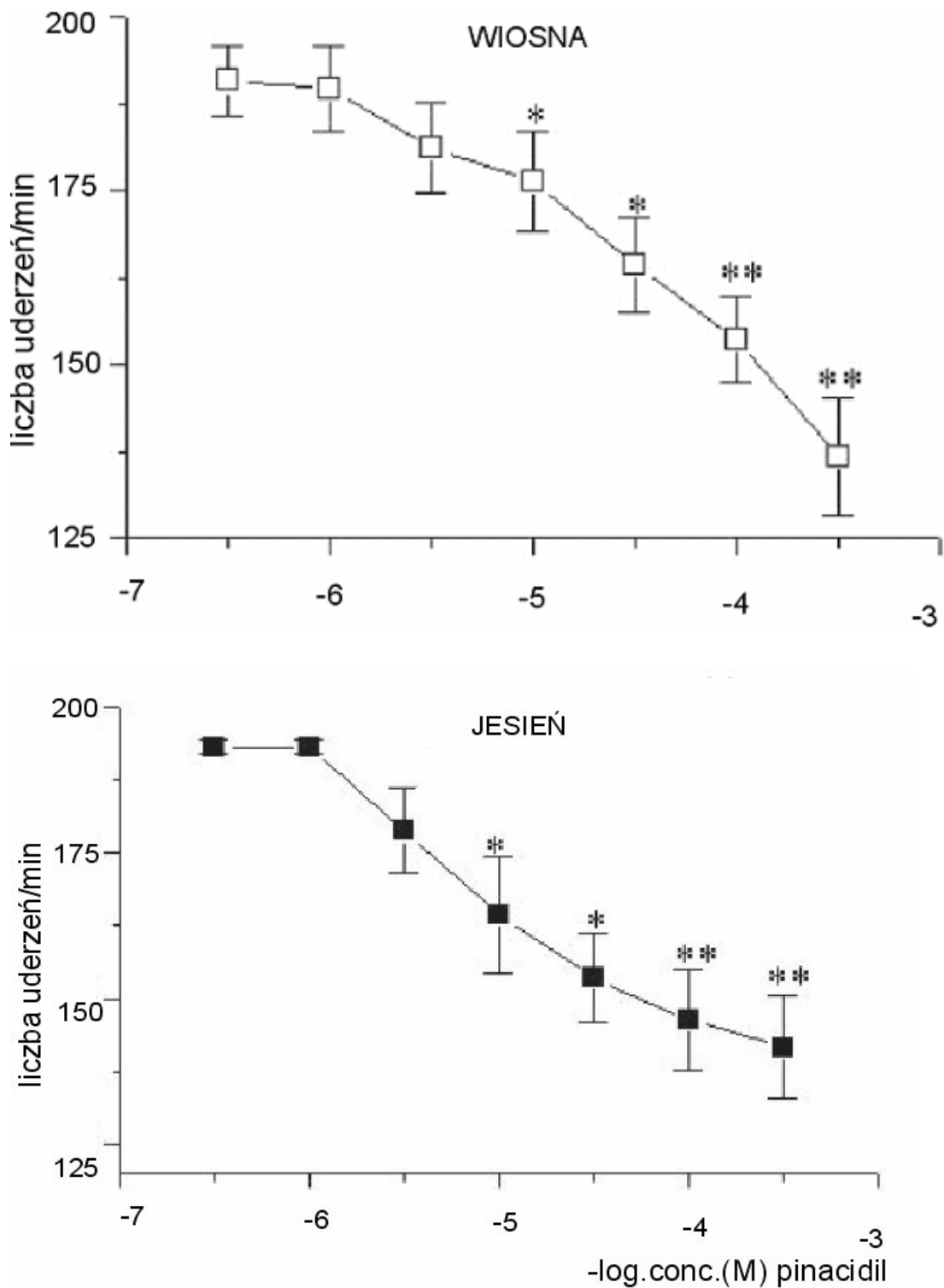
Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 6-11 eksperymentów

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ Wyniki znamienne w porównaniu do wartości wyjściowych w grupie samców.

$p < 0,05$ ## $p < 0,01$ Wyniki znamienne w porównaniu do wartości wyjściowych w grupie samic. (ANOVA jednoczynnikowa, test Newman-Keuls)

Efekt pinacidilu na automatyzm spontanicznie bijącego prawego uszka serca samic i samców świnek morskich

Pinacidil, w sposób zależny od stężenia wywoływał zwolnienie akcji serca w grupie samców zarówno wiosną jak i jesienią (rys.5). Znamiennej statystycznie efekt chronotropowy ujemny w porównaniu do wartości wyjściowych występował począwszy od stężenia pinacidilu $10 \mu\text{M}$ i wyższych. Efekt pinacidilu wiosną i jesienią był porównywalny i nie zaobserwowano żadnych statystycznie znamienych różnic w sile i efektywności działania pinacidilu w trakcie obu pór roku (tabela 5). Pinacidil jednak wykazywał statystycznie mniejszą efektywność ($E_{\text{max}} = -63 \pm 5$) w porównaniu do diazoksydu ($E_{\text{max}} = -91 \pm 6$) w grupie samców ($p < 0,01$, $n = 6-11$) (tabela 5).

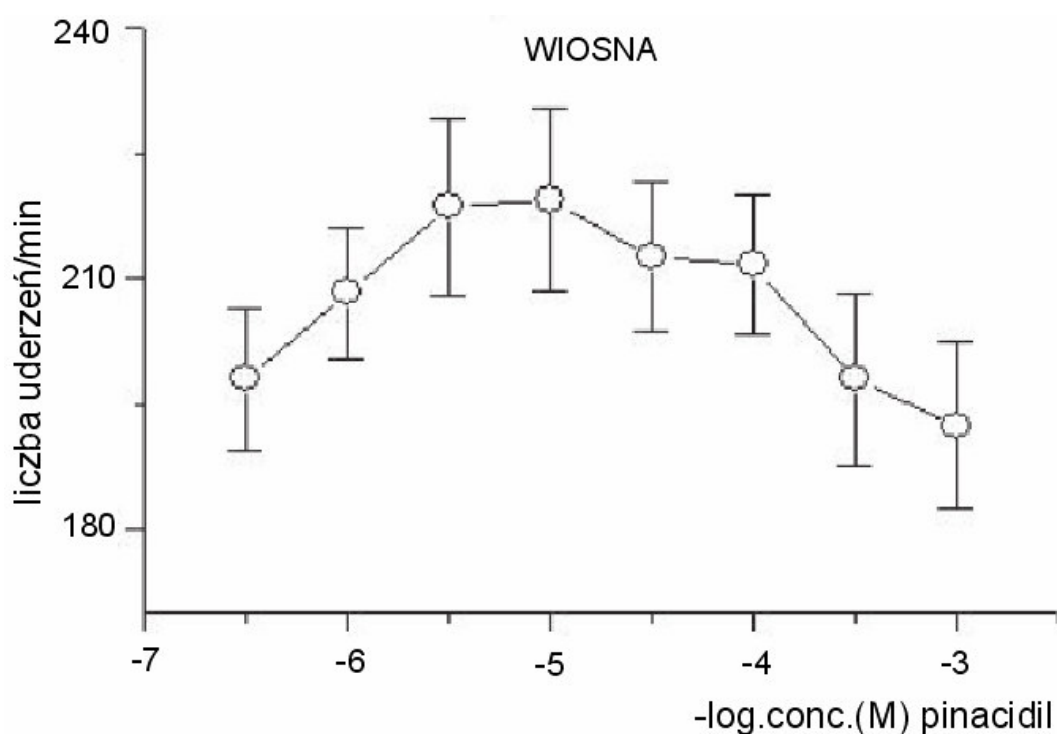


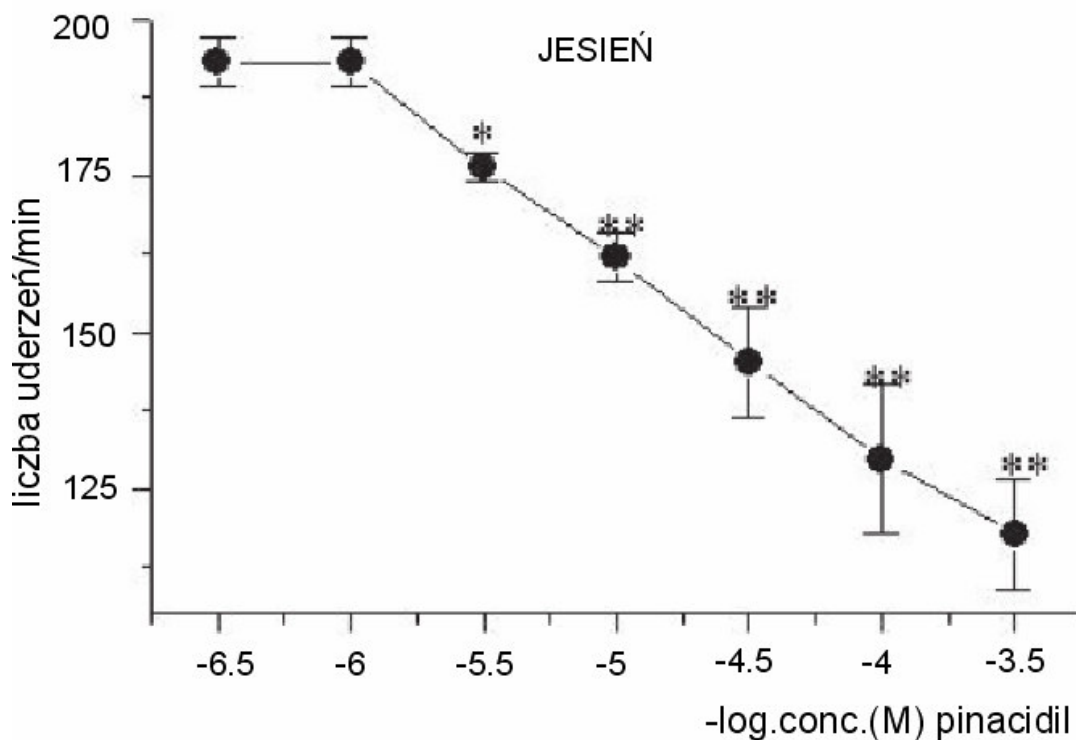
Rys.5 Chronotropowo ujemny efekt pinacidilu na prawy przedsionek serca w grupie samców wiosną i jesienią. □ samce wiosna, ■ samce jesień

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 7-11 eksperymentów

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ Wyniki znamienne w porównaniu do wartości wyjściowych (ANOVA jednoczynnikowa, test Newman-Keuls)

W grupie samic jesienią, również zaobserwowano zależne od stężenia statystycznie znaczne zmniejszenie akcji serca w porównaniu do wartości wyjściowej (ryc.6). Jesienią podobnie jak w grupie samców tak i u samic pinacidil ($E_{max} = -77 \pm 9$) wykazał statystycznie znacznie mniejszą efektywność w porównaniu do diazoksydu ($E_{max} = -90 \pm 6$), $p < 0,05$, $n = 6 - 11$ (tabela 5). Przeciwnie, wiosną nie zaobserwowano chronotropowego ujemnego działania pinacidilu w grupie samic (ryc.6). Stwierdzono nawet niewielką tendencję do wzrostu akcji serca u samic pod wpływem pinacidilu w stężeniach od $1 \mu\text{M}$ do $30 \mu\text{M}$ w porównaniu do wartości wyjściowej (ryc.6).





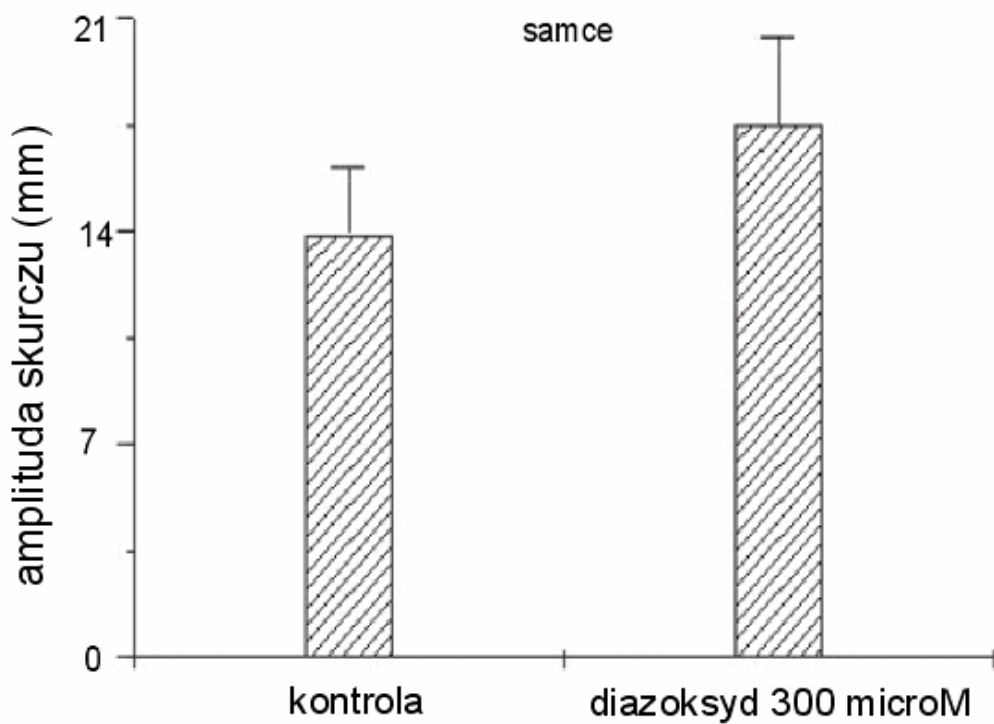
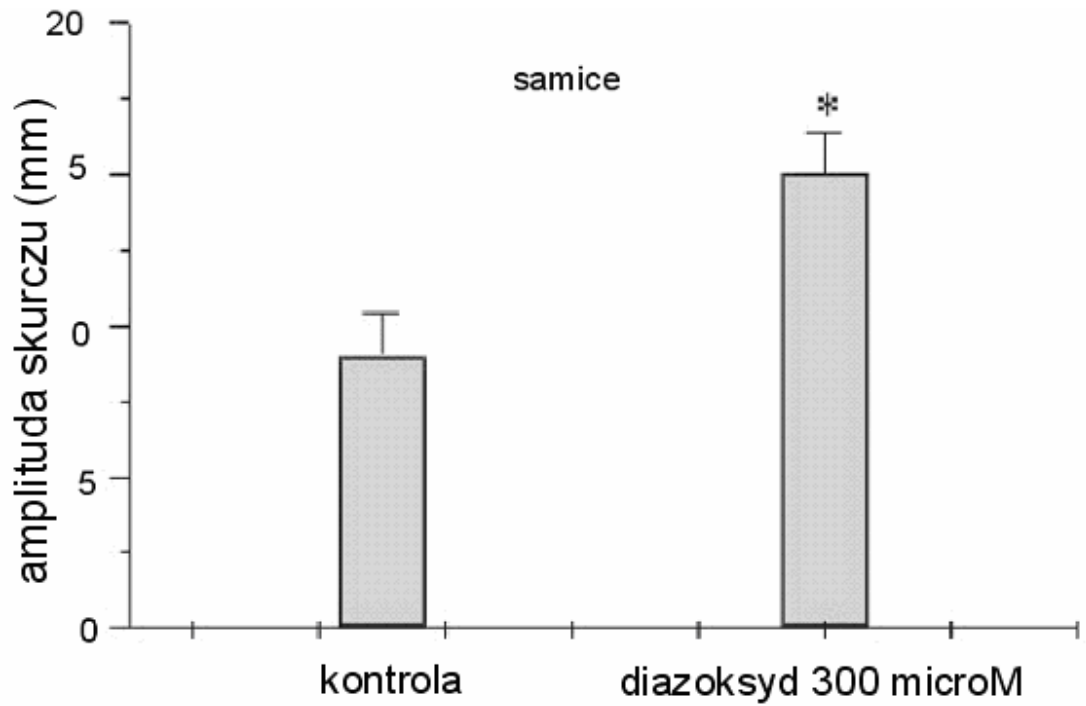
Rys. 6 Chronotropowo ujemny efekt pinacidilu na prawy przedsionek serca w grupie samic wiosną i jesienią. ○ samice wiosna, ● samice jesień

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 6-9 eksperymentów

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ Wyniki znamienne w porównaniu do wartości wyjściowych (ANOVA jednoczynnikowa, test Newman-Keuls)

Efekt diazoksydu na siłę skurczu spontanicznie bijącego prawego uszka serca samic i samców świnek morskich

Diazoksyd w stężeniu 300 μ M wywoływał statystycznie znamienne zwiększenie amplitudy siły skurczu w porównaniu do wartości wyjściowej w grupie samców (ryc.7). W grupie samic również obserwowano tendencję do wzrostu siły skurczu pod wpływem diazoksydu w stężeniu 300 μ M w porównaniu do wartości wyjściowej (ryc.7).



Rys. 7 Inotropowo dodatni efekt diazoksydu na prawy przedsionek serca w grupie samic i samców świnek morskich. ■ samce ▨ samice

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 6 eksperymentów

* $p < 0,05$ Wyniki znamienne w porównaniu do wartości wyjściowych

(test T Studenta)

Efekt pinacidilu na siłę skurczu spontanicznie bijącego prawego uszka serca samic i samców świnek morskich

Przeciwnie do diazoksydu, nie zaobserwowano wpływu pinacidilu na siłę skurczu mięśnia sercowego zarówno u samic jak i u samców. W grupie samic, kontrolna siła skurczu wynosiła 17.2 ± 1.7 mm a w obecności pinacidilu w stężeniu $300 \mu\text{M}$ wynosiła 17.3 ± 1.6 mm ($n = 10$, NS). W grupie samców, wartość kontrolnej amplitudy siły skurczu mięśnia sercowego wynosiła 11.6 ± 1.2 a pod wpływem pinacidilu w stężeniu $300 \mu\text{M}$ wzrosła zaledwie do 11.7 ± 1.2 mm ($n = 11$, NS).

4.2 Wpływ blokady farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na siłę skurczu mięśnia sercowego i akcję serca w zależności od płci.

Wpływ glibenklamid i kwasu 5 – hydroksydekanowego (5-HD) na efekty wywołane przez pinacidil i diazoksyd na spontanicznie bijącym prawym uszku serca świnek morskich

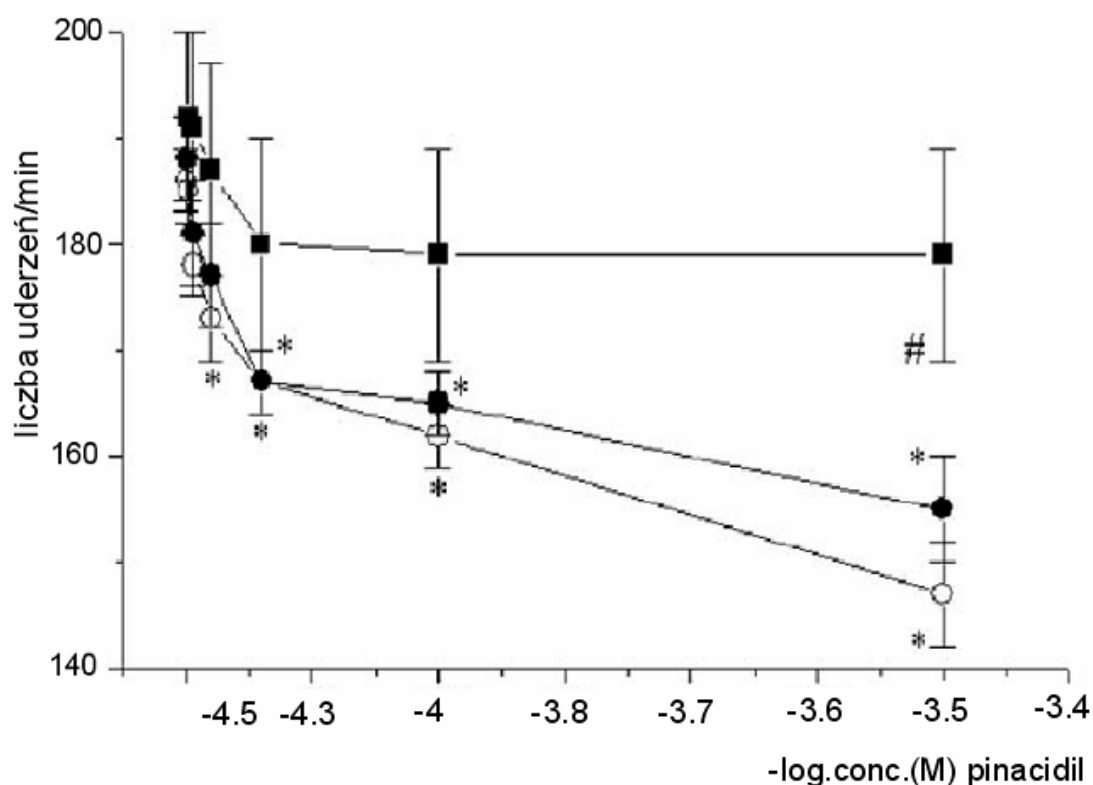
Glibenklamid w sposób zależny od stężenia zahamował chronotropowo ujemne działanie zarówno pinacidilu jak i diazoksydu w grupie samic i samców. W stężeniu $10 \mu\text{M}$ glibenklamid całkowicie zapobiegł efektom pinacidilu i diazoksydu. Przeciwnie, 5 – HD w stężeniach $100 \mu\text{M}$ i $300 \mu\text{M}$ ($n = 5$) nie wykazywał żadnego wpływu na chronotropowe ujemne działanie diazoksydu w badanych grupach.

Natomiast inotropowo dodatni efekt diazoksydu był hamowany zarówno przez glibenklamid ($n = 7$) jak i 5 – HD ($n = 4$) w grupie samców.

4.3. Wpływ aktywacji farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na akcję serca w obecności estrogenu i tamoksifenu

Efekt pinacidilu na automatyzm spontanicznie bijącego prawego uszka serca samców świnek morskich otrzymujących estrogen w porównaniu do grupy kontrolnej.

Pinacidil, w sposób zależny od stężenia wywołał zwolnienie akcji serca w grupie kontrolnej samców (ryc.8). Maksymalny efekt (-40 ± 5 uderzeń min^{-1} , $n=7$) pinacidil wywołał w stężeniu $300 \mu\text{M}$ (ryc.8). Kontrolna akcja serca, zarejestrowana przed podaniem pinacidilu wynosiła 186 ± 3 , $n=7$. W grupie otrzymującej 17- β estradiol zaobserwowano tendencję do niewielkiego wzrostu podstawowej akcji serca, która wynosiła 188 ± 4 uderzeń min^{-1} , $n=7$ (różnica nieznamienne statystycznie w porównaniu do podstawowej akcji serca w grupie kontrolnej). 17- β estradiol podawany samcom, w dawce dobowej $0,132 \text{ mg}/100 \text{ g}$ masy ciała praktycznie całkowicie zablokował chronotropowo ujemne działanie pinacidilu (ryc.8). W grupie tej maksymalny efekt pinacidilu wynosił -13 ± 10 uderzeń min^{-1} i nie różnił się on znamienne statystycznie od podstawowej akcji serca, zanotowanej przed podaniem pinacidilu ($n=7$). Pinacidil w grupie kontrolnej wykazywał statystycznie znamienne większą siłę działania ($\text{pD}_2 (-\log \text{EC}_{50}) = 4,5 \pm 0,2$) w porównaniu do grupy samców otrzymujących estrogen ($\text{pD}_2 (-\log \text{EC}_{50}) = 4,7 \pm 0,3$) ($p < 0.05$, $n=6$) (tabela 4).



Rys. 8 Wpływ 17 beta-estradiolu na chronotropowo ujemny efekt pinacidilu na prawy przedsionek serca w grupie samców świnek morskich ○ kontrola ● grupa otrzymująca 17 beta-estradiol w dawce 0,066 mg/100 g masy ciała ■ grupa otrzymująca 17 beta-estradiol w dawce 0,132 mg/100 g masy ciała
Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 7 eksperymentów

* $p < 0,05$ Wyniki znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej # $p < 0,05$

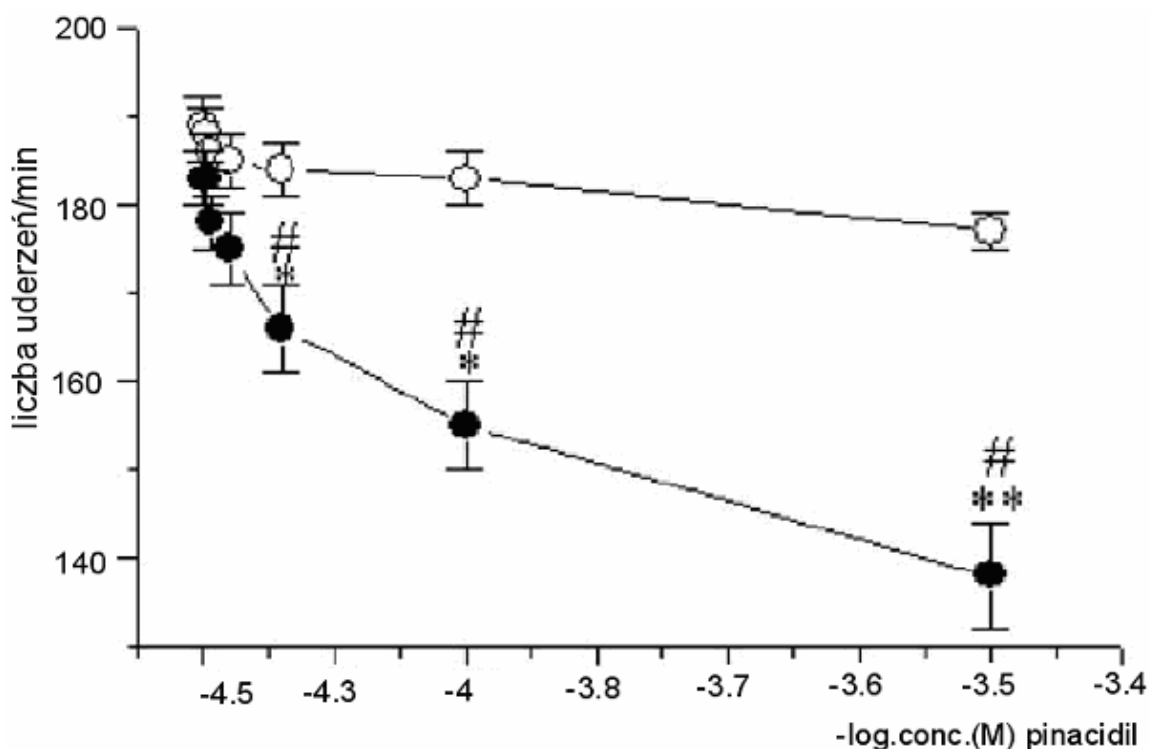
Różnica między maksymalnym efektem pinacidilu w grupie kontrolnej i w grupie otrzymującej 17 beta-estradiol

(ANOVA jednoczynnikowa, test Newman-Keuls)

Efekt pinacidilu na automatyzm spontanicznie bijącego prawego uszka serca samic świnek morskich otrzymujących tamoksifen w porównaniu do grupy kontrolnej.

Nie zaobserwowano praktycznie chronotropowo ujemnego działania pinacidilu w grupie kontrolnej samic (rys.9). W grupie samic otrzymujących przez dwa tygodnie tamoksifen w dawce 0,133 mg / 100 g masy ciała

zaobserwowano zwiększenie wrażliwości mięśnia sercowego samic na pinacidil (rys.9). Akcja serca w tej grupie zmniejszyła się pod wpływem pinacidilu o 45 ± 6 uderzeń min^{-1} a siła działania pinacidilu (pD_2 ($-\log \text{EC}_{50}$) = $4,3 \pm 0,16$) nie różniła się statystycznie w porównaniu do siły z jaką działał w grupie kontrolnej samców (tabela 4). Nie stwierdzono także znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy podstawową akcją serca samic i samców. Podanie tamoksifenu samicom nie wpływało na kontrolną akcję serca (rys.9).



Rys. 9 Wpływ tamoksifenu na chronotropowo ujemny efekt pinacidilu na prawy przedsionek serca w grupie samic świnek morskich ○ kontrola ● grupa otrzymująca tamoksifen w dawce 0,133 mg/100 g masy ciała

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 7 eksperymentów

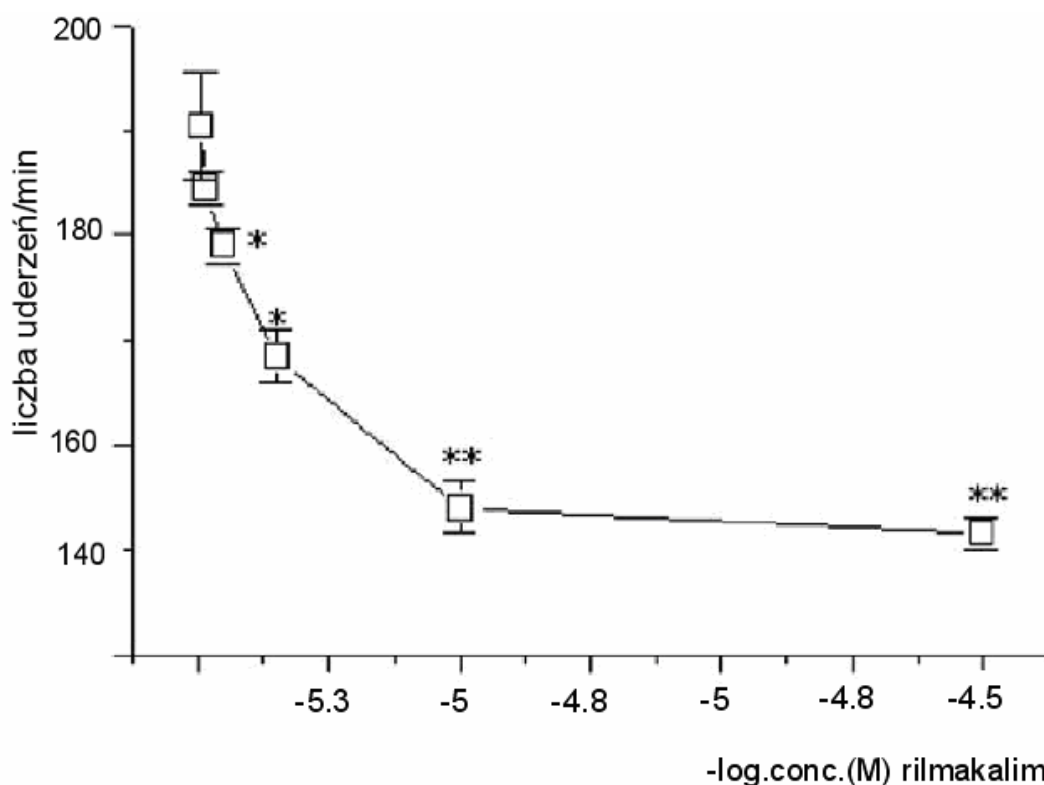
* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ Wyniki znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej

$p < 0,05$ Różnica między efektami jednakowych stężeń pinacidilu w grupie kontrolnej i w grupie otrzymującej tamoksifen

(ANOVA jednoczynnikowa, test Newman-Keuls)

Efekt rilimakalimu na automatyzm spontanicznie bijącego prawego uszka serca samic świnek morskich, w grupie których nie uzyskano chronotropowo ujemnego efektu pinacidilu.

Rilmakalim, w sposób zależny od stężenia statystycznie znamienne w porównaniu do wartości wyjściowej zmniejsza akcję serca w grupie samic świnek morskich, w której wcześniej nie uzyskano efektu pinacidilu (rys.10).



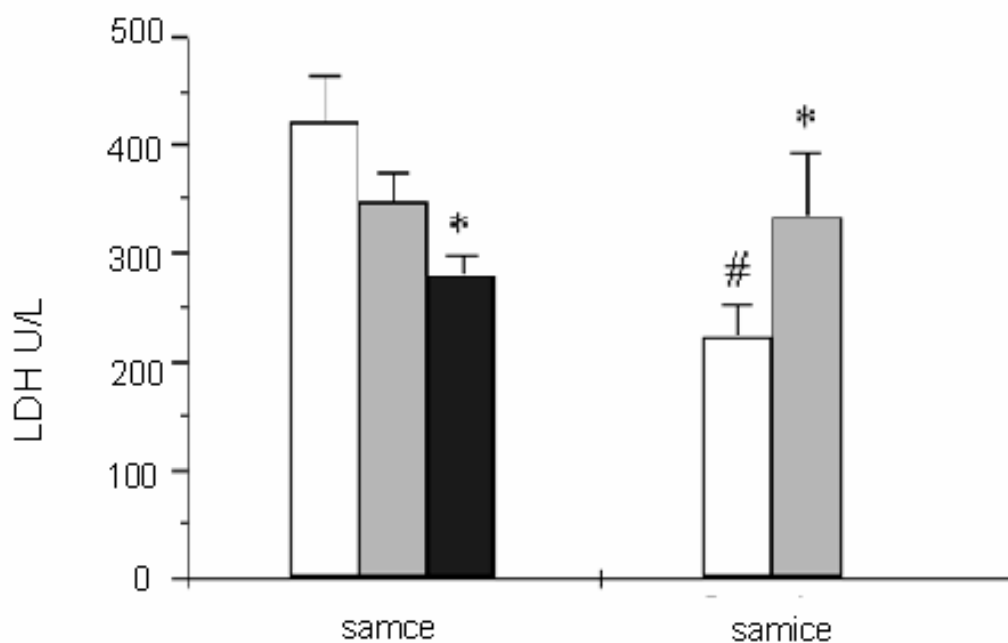
Rys. 10. Chronotropowo ujemny efekt rilimakalimu na prawy przedsionek serca w grupie samic świnek morskich, w której nie uzyskano chronotropowo ujemnego efektu pinacidilu. □ samice niewrażliwe na pinacidil

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 7 eksperymentów

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ Wyniki znamienne w porównaniu do wartości wyjściowych (ANOVA jednoczynnikowa, test Newman-Keuls)

4.4 Stężenia dehydrogenazy mleczanowej LDH i jej izoenzymu; sercowej dehydrogenazy mleczanowej H-LDH w zależności od płci i obecności estrogeny i tamoksifenu

W grupie kontrolnej samców stwierdzono większe stężenie zarówno LDH (419 ± 44 U/L) jak i H-LDH (58 ± 8 U/L) w porównaniu do grupy kontrolnej samic (LDH= 222 ± 32 U/L, H-LDH= $29,6 \pm 4$ U/L) ($p < 0,05$, $n = 6$) (ryc.11, ryc.12). 17- β estradiol w dawce 0,132 mg/ 100 g masy ciała samców, statystycznie znamienne obniżał stężenie LDH i H-LDH do wartości kolejno 278 ± 19 U/L i 34 ± 8 U/L w porównaniu do grupy kontrolnej samców ($p < 0,05$, $n = 6$). Przeciwnie tamoksifen w grupie samic zwiększał stężenie zarówno LDH do wartości 334 ± 60 U/L, jak i H-LDH do wartości 46 ± 9 U/L w porównaniu do grupy kontrolnej samic ($p < 0,05$, $n = 6$). Stężenia LDH i H-LDH w grupie samic otrzymującej tamoksifen osiągnęły bardzo zbliżoną wartość do stężeń w grupie kontrolnej samców.



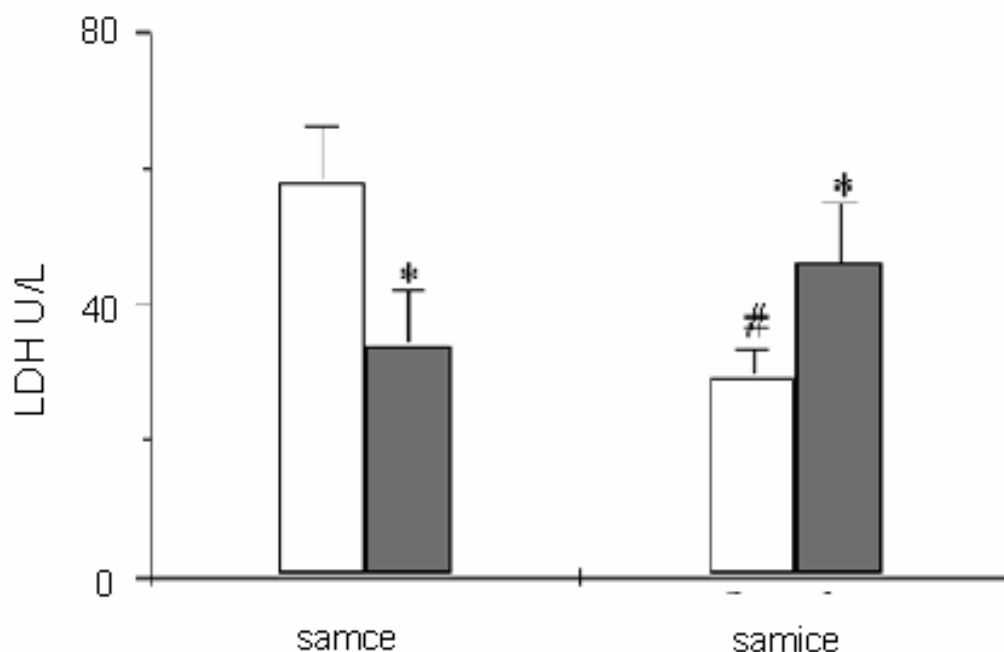
Rys. 11 Stężenie LDH w surowicy samic i samców świnek morskich. □ grupy kontrolne, ■ grupa samców otrzymująca 17 beta-estradiol w dawce 0,132 mg/100 g masy ciała, ▨ grupa samców otrzymująca 17 beta-estradiol w dawce 0,066 mg/100 g masy ciała i grupa samic otrzymująca tamoksifen w dawce 0,133 mg/100 g masy ciała □ grupy kontrolne

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 6 eksperymentów

* $p < 0,05$ wyniki znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej

$p < 0,05$ wyniki znamienne w grupie samic w porównaniu do samców

(ANOVA jednoczynnikowa, test Newman-Keuls)



Rys. 12 Stężenie H-LDH w surowicy samic i samców świnek morskich. □ grupy kontrolne, ■ grupa samców otrzymująca 17 beta-estradiol w dawce 0,132 mg/100 g masy ciała i ■ grupa samic otrzymująca tamoksifen w dawce 0,133 mg/100 g masy ciała.

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 6 eksperymentów

* $p < 0,05$ wyniki znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej

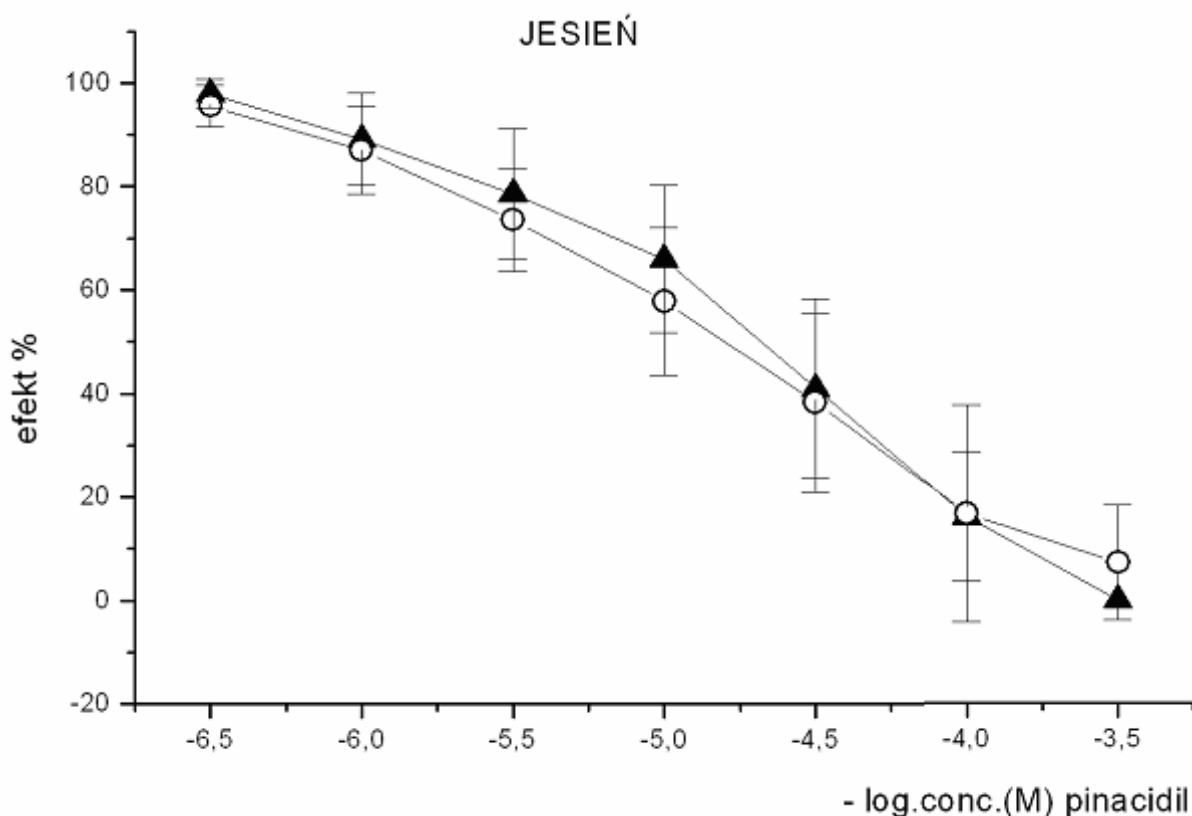
$p < 0,05$ wyniki znamienne w grupie samic w porównaniu do samców

(ANOVA jednoczynnikowa, test Newman-Keuls)

4.5. Wpływ aktywacji farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na kurczliwość mięśni gładkich aorty w zależności od płci.

Efekt działania pinacidilu na obkurzoną aortę piersiową samic i samców świnek morskich

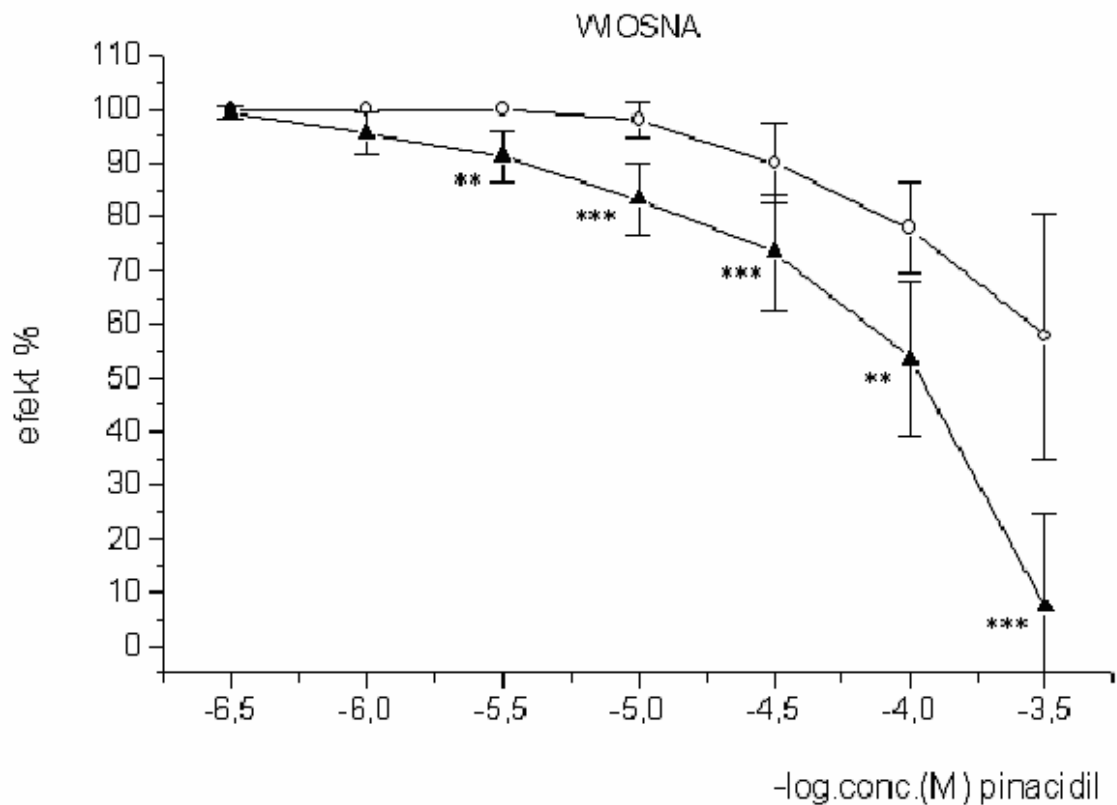
Rysunki 13 i 14 przedstawiają krzywe zależności stężenie – efekt dla pinacidilu w grupach samic i samców wiosną i jesienią. Jesienią pinacidil w sposób zależny od dawki, rozkurczał mięśnie gładkie aorty zarówno w grupie samic jak i samców i nie stwierdzono w działaniu pinacidilu statystycznie znamiennej różnicy w badanych grupach (rys.13). Wiosną pinacidil prawie nie wywoływał efektu rozkurczowego na aortę w grupie samic w przeciwieństwie do grupy samców, w której w sposób wprost proporcjonalny do stężenia rozkurczał aortę (rys.14). Różnice w efekcie działania pinacidilu w badanych grupach wiosną wykazywały znamienność statystyczną ($p < 0,01$, $p < 0,001$ $n = 5-11$) (rys.14). Siła działania pinacidilu w grupie samic wiosną pD_2 ($-\log EC_{50}$) = $3,68 \pm 0,2$ była statystycznie znacznie mniejsza w porównaniu do siły działania pD_2 ($-\log EC_{50}$) = $4,84 \pm 0,85$ w grupie samic jesienią ($p < 0,01$, $n = 5$) (tabela 3).



Rys. 13 Efekt działania pinacidilu na obkurzoną aortę samic i samców świnek morskich jesienią. ○ samice, ▲ samce

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 5-11 eksperymentów

Wyniki nieznamienne statystycznie w grupie samic w porównaniu do samców (ANOVA)

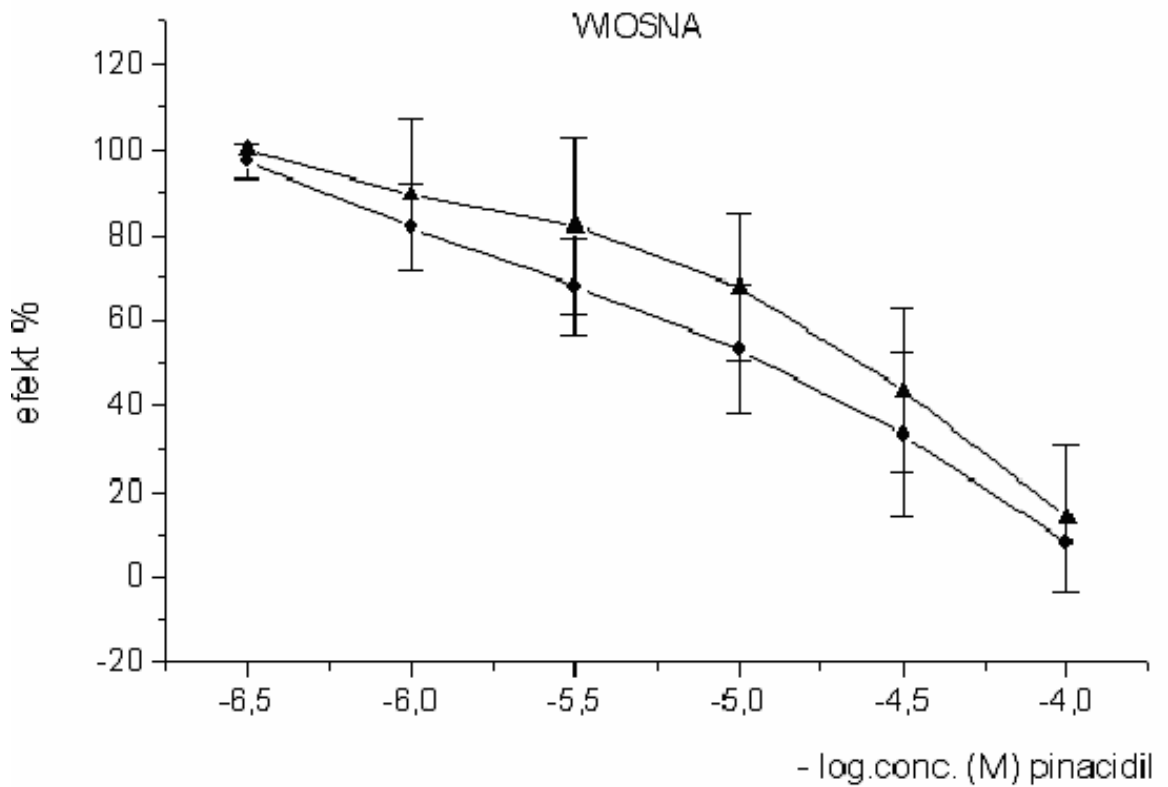


Rys. 14 Efekt działania pinacidilu na obkurzoną aortę samic i samców świnek morskich wiosną. ○ samice, ▲ samce
 Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 5-11 eksperymentów
 ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ Wyniki znamienne w porównaniu do wartości w grupie samców (ANOVA jednoczynnikowa)

Efekt działania diazoksydu na obkurzoną aortę piersiową samic i samców świnek morskich

Diazoksyd w sposób zależny od dawki, rozkurczał mięśnie gładkie aorty w grupie samców zarówno wiosną jak i jesienią i nie stwierdzono w działaniu diazoksydu statystycznie znamiennych różnic w badanych grupach (ryc.15). W grupie samic natomiast diazoksyd w stężeniu $1\mu\text{M}$ i 30 mM znamienne statystycznie silniej rozkurczał aortę wiosną w porównaniu do

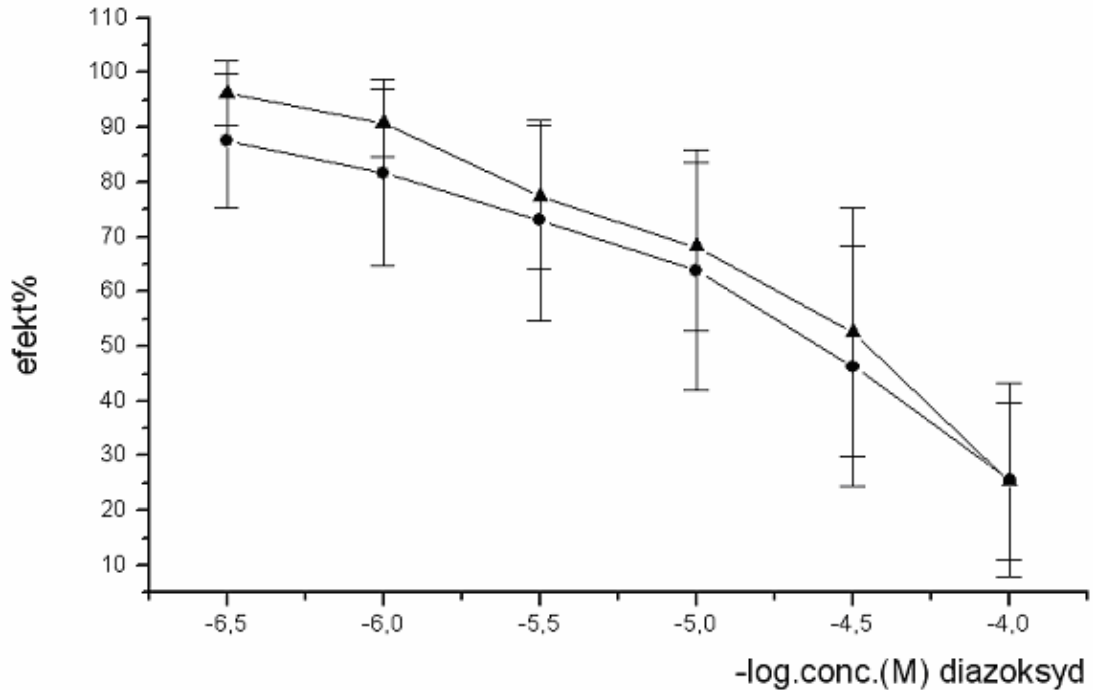
jesieni ($p < 0,005$, $n = 7-13$). Nie stwierdzono znamiennej różnicy w efekcie działania diazoksydu w grupie samic wiosną i jesienią w porównaniu do samców.



Rys. 15 Efekt działania diazoksydu na obkurzoną aortę samców i samic świnek morskich wiosną ●samice ▲ samce

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 7-9 eksperymentów

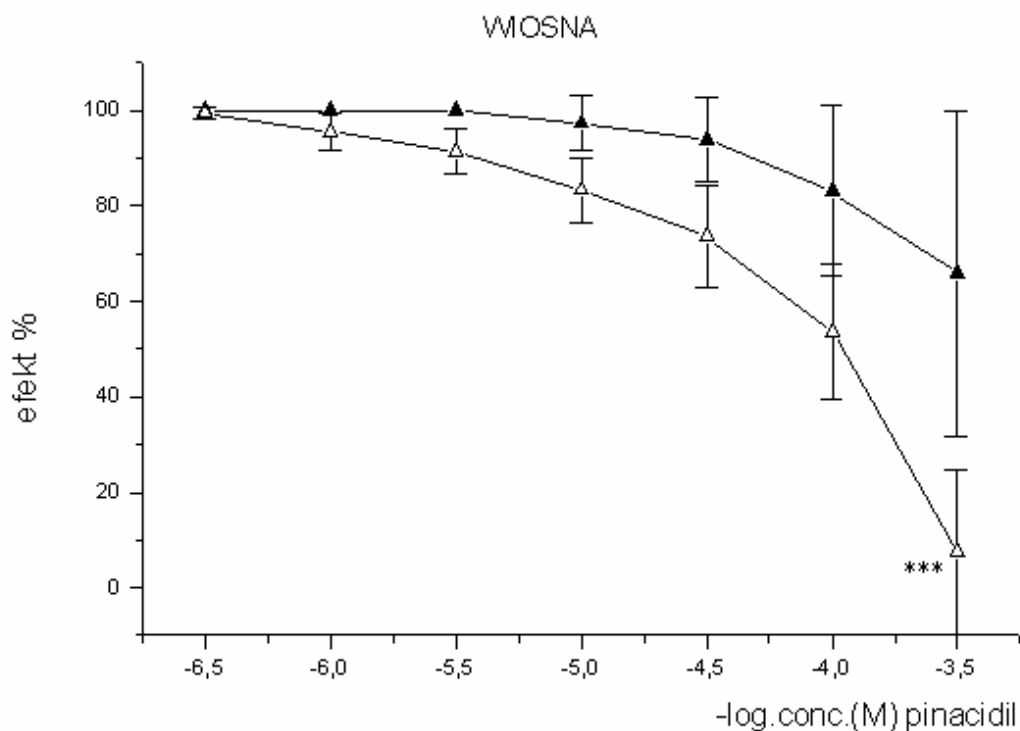
Wyniki nieznamienne statystycznie w grupie samic w porównaniu do samców (test U Manna-Whitneya)



Rys. 16 Efekt działania diazoksydu na obkurzoną aortę samców i samic świnek morskich jesienią ● samice ▲ samce
 Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 12-13 eksperymentów
 Wyniki nieznacznie statystycznie w grupie samic w porównaniu do samców (test U Manna-Whitney)

4.6. Wpływ aktywacji farmakologicznej kanałów K^+_{ATP} na kurczliwość mięśni gładkich aorty w obecności estrogeny i tamoksifenu

17- β estradiol podawany samcom, w dawce dobowej 0,132 mg/ 100 g masy ciała silnie hamował rozkurczające działanie pinacidilu na aortę w porównaniu do grupy kontrolnej samców (rys.17). Maksymalny rozkurczający efekt pinacidilu w obecności estrogeny wynosił $E_{max} = 44\% \pm 34$ i był statystycznie znacznie mniejszy w porównaniu do maksymalnego efektu w grupie kontrolnej wynoszącego $E_{max} = 88\% \pm 5$. Pinacidil w grupie kontrolnej wykazywał statystycznie znacznie większą siłę działania (pD_2 (-log EC_{50}) = $4,62 \pm 0,1$) w porównaniu do grupy samców otrzymujących estrogen (pD_2 (-log EC_{50}) = $2,27 \pm 0,57$) ($p < 0,05$, $n = 6$) (tabela 2) .



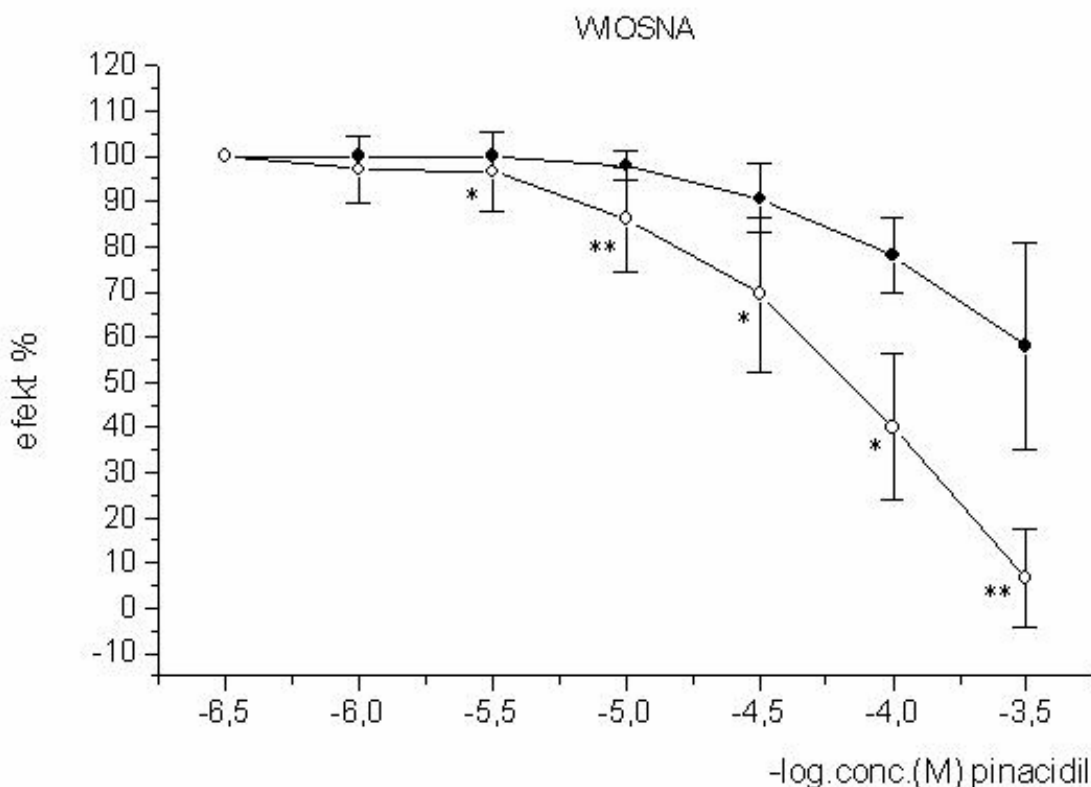
Rys. 17 Efekt działania pinacidilu na obkurzoną aortę w grupie samców świnek morskich otrzymujących estradiol i w grupie kontrolnej. Δ samce kontrola, ▲ samce otrzymujące estradiol

Wartości przedstawione są jako średnie ± SEM z 5-6 eksperymentów

$p < 0,001$ Wyniki znamienne w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej samców (Test T Studenta)

Tamoksifen podawany samicom, w dawce 0,133 mg/ 100 g masy ciała statystycznie znamienne wzmacniał rozkurczające działanie pinacidilu na aortę w porównaniu do grupy kontrolnej samic (rys.18). Maksymalny rozkurczający efekt pinacidilu w obecności tamoksifenu wynosił $93\% \pm 11$ i był statystycznie znamienne większy w porównaniu do efektu uzyskanego w grupie kontrolnej wynoszącego $42\% \pm 23$. Efekt maksymalny pinacidilu w grupie samic otrzymujących tamoksifen był bardzo zbliżony do efektu maksymalnego jaki pinacidil uzyskał w grupie kontrolnej samców. Pinacidil w grupie samic otrzymujących tamoksifen wykazywał tendencję do większej siły działania (pD_2 ($-\log EC_{50}$) = $3,86 \pm 0,3$) w porównaniu do grupy kontrolnej

(pD_2 ($-\log EC_{50}$) = $3,68 \pm 0,2$) (wyniki nie różnią się statystycznie znacząco, $n= 5$) (tabela 2) . Doświadczenia wykonywane były wiosną. Wśród samic z grupy kontrolnej były wybierane do eksperymentu zwierzęta w trakcie rujki.



Ryc. 18 Efekt działania pinacidilu na obkurzoną aortę w grupie samic świnek morskich otrzymujących tamoksifen i w grupie kontrolnej.

● samice kontrola, ○ samice otrzymujące tamoksifen

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 5-6 eksperymentów

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ Wyniki znamienne w porównaniu do wartości w grupie

kontrolnej (test T Studenta)

Tabela. 2 Siła rozkurczającego działania pinacidilu na aortę samców i samic świnek morskich otrzymujących estrogen lub tamoksifen i grup kontrolnych.

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 5-6 eksperymentów.

Test różnic pomiędzy średnimi;

$p < 0,05$ – wynik znamieny statystycznie w porównaniu do efektu w grupie samców kontrola

	SAMICE ♀	SAMCE ♂
	pD ₂ (-log IC ₅₀)	pD ₂ (-log IC ₅₀)
PINACIDIL KONTROLA	3,68 \pm 0,2	4,62 \pm 0,1
PINACIDIL & ESTROGEN	–	2,27 \pm 0,57 #
PINACIDIL & TAMOKSIFEN	3,86 \pm 0,3	–

Tabela 3 Siła rozkurczającego działania pinacidilu i diazoksydu na aortę samic i samców świnek morskich wiosną i jesienią.

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 5 -13 eksperymentów.

Test różnic między dwiema średnimi;

** $p < 0,01$ wynik znamieny statystycznie w porównaniu do efektu w grupie samic jesienią

$p < 0,001$ wynik znamieny statystycznie w porównaniu do grupy samic jesienią

	SAMICE ♀	SAMCE ♂
	pD ₂ (-log IC ₅₀)	pD ₂ (-log IC ₅₀)
DIAZOKSYD WIOSNA	4,75 \pm 0,15 ###	4,3 \pm 0,23
DIAZOKSYD JESIEŃ	3,5 \pm 0,37	3,86 \pm 0,28
PINACIDIL WIOSNA	3,68 \pm 0,2 **	4,62 \pm 0,1
PINACIDIL JESIEŃ	4,84 \pm 0,85	4,83 \pm 0,83

Tabela 4 Siła chronotropowo ujemnego działania pinacidilu na prawy przedsionek samic i samców otrzymujących estrogen lub tamoksifen i grup kontrolnych świnek morskich.

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 6 – 7 eksperymentów.

$p < 0,05$ wynik znamieny statystycznie w porównaniu do efektu w grupie samców otrzymujących estrogen

	SAMICE ♀	SAMCE ♂
	pD ₂ (-log IC ₅₀)	pD ₂ (-log IC ₅₀)
PINACIDIL KONTROLA	BRAK EFEKTU	4,5 \pm 0,2 [#]
PINACIDIL & ESTROGEN	–	4,7 \pm 0,3
PINACIDIL & TAMOKSIFEN	4,3 \pm 0,56	–

Tabela 5 Siła i skuteczność chronotropowo ujemnego działania pinacidilu i diazoksydu na prawy przedsionek samic i samców świnek morskich.

Wartości przedstawione są jako średnie \pm SEM z 6 – 11 eksperymentów.

** $p < 0,01$ wynik znamieny statystycznie w porównaniu do efektu diazoksydu w grupie samców

$p < 0,05$ wynik znamieny statystycznie w porównaniu do efektu diazoksydu w grupie samic

	SAMICE ♀		SAMCE ♂	
	pD ₂ (-log IC ₅₀)	E _{max} (liczba skurczów min ⁻¹)	pD ₂ (-log IC ₅₀)	E _{max} (liczba skurczów min ⁻¹)
DIAZOKSYD	4,34 \pm 0,05	- 90 \pm 6	4,42 \pm 0,1	- 91 \pm 6
PINACIDIL WIOSNA	BRAK EFEKTU		4,53 \pm 0,12	- 63 \pm 5 **
PINACIDIL JESIEŃ	4,79 \pm 0,15	- 77 \pm 9 #	4,75 \pm 0,2	- 59 \pm 8

5. Dyskusja

Od lat obserwowane są różnice w epidemiologii chorób układu sercowo- naczyniowego wśród kobiet i mężczyzn. Poznanie przyczyny tego zjawiska wzbudza zainteresowanie zarówno klinicystów jak i przedstawicieli nauk podstawowych. Ostatnio coraz częściej spotykamy się z dowodami potwierdzającymi różnice w fizjologii serca, wrażliwości mięśnia sercowego na stres metaboliczny oraz różnice w aktywności endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych w zależności od płci. Wiadomo, że kobiety w wieku przedmenopauzalnym mają szybszą podstawową akcję serca, wśród nich występuje więcej przypadków wrodzonego zespołu długiego QT (LQTS), jak i większe ryzyko wystąpienia *torsades de pointes* (TdP) w trakcie terapii lekami wydłużającymi odstęp QT w porównaniu z mężczyznami [2, 10, 27, 60, 98]. Przyczyny tych zjawisk dopatruje się w wpływie estrogenu na funkcjonowanie układu krążenia zarówno w warunkach fizjologicznych jak i stresu metabolicznego. 17β -estradiol zmniejsza liczbę incydentów migotania komór w trakcie zawału mięśnia sercowego oraz znamienne skraca czas trwania arytmii i obszar zawału mięśnia sercowego w trakcie reperfuzji [9, 47, 49, 90]. Efekt antyarytmiczny estrogenu jak i zmniejszenie obszaru martwicy zachodzi w wyniku aktywacji odpowiednio błonowych i mitochondrialnych kanałów K^+ ATP zależnych w mięśniu sercowym. Otwarcie kanałów K^+ ATP zależnych w mięśniu sercowym jest jednym z endogennych mechanizmów odgrywających ważną rolę kardioprotekcyjną. Ich aktywacja chroni komórki mięśnia sercowego w trakcie niedotlenienia. Do tej pory jest bardzo mało danych i nie ma wystarczających informacji na temat różnic w funkcjonowaniu kanałów K^+ ATP w zależności od płci.

W przedstawionej pracy wykazano różnice w efektach inotropowo ujemnym i rozkurczającym aktywatorów kanałów potasowych ATP- zależnych w mięśniu sercowym i mięśniach gładkich aorty w zależności od płci. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że aktywatory kanałów potasowych ATP- zależnych pinacidil, diazoksyd i rilmakalim mają różny

wpływ na automatyzm i siłę skurczu serca świnek morskich. Wiosną, kiedy występuje intensywnie okres reprodukcyjny u świnek morskich pinacidil tracił zdolność aktywacji kanałów K^+ ATP zależnych w grupie samic. Wytłumaczyć tą obserwację można wpływem żeńskich hormonów płciowych. Pinacidil wiąże się z podjednostką SUR2A kanałów potasowych ATP- zależnych w regionie domeny TMD2 pomiędzy TM13 a TM14 i pomiędzy TM16 a TM17 [23, 71]. Jovanović i wsp. Stwierdzili, że 17beta-estradiol powoduje wzrost ekspresji mRNA podjednostki SUR2A w kardiomiocytach świnek morskich [69]. Zatem brak efektu działania pinacidilu w grupie samic świnek morskich wiosną może być związany z występowaniem w tym okresie podwyższonego stężenia estrogenu i w związku z tym wzrostem ilości podjednostki SUR2A. Mogło dojść do nadmiaru liczby podjednostek SUR2A w porównaniu do Kir6.2. Pinacidil został związany z podjednostkami SUR2A, które nie były połączone z podjednostkami Kir6.2 w funkcjonalny kanał potasowy i w ten sposób aktywator został unieczyniony. Obserwowana, po wstępnym chronotropowo dodatnim efekcie, tendencja do zmniejszenia akcji serca pod wpływem wyższych stężeń pinacidilu w grupie samic wiosną potwierdza powyższą hipotezę (ryc.6). Ponadto, nasze wyniki wskazują, że chronotropowo ujemny efekt diazoksydu zarówno w grupie samic jak i samców był wywołany za pośrednictwem aktywacji błonowych kanałów K^+ ATP, ponieważ na efekt ten nie wpływał selektywny inhibitor mitochondrialnych kanałów K^+ ATP (5-HD) w przeciwieństwie do glibenklamidu. Hipotezę tę potwierdzają wyniki Suzuki i wsp., którzy wykazali kardioprotekcyjne działanie diazoksydu za pośrednictwem aktywacji błonowych kanałów K^+ ATP a nie mitochondrialnych [81]. Wiadomo również, że wrażliwość błonowego kanału potasowego ATP zależnego kardiomiocyta na diazoksyd rośnie wraz ze wzrostem stężenia w środowisku MgADP [24, 34]. Dokładna lokalizacja miejsca wiązania diazoksydu z podjednostką SUR nie jest znana. Wydaje się na podstawie wyżej przedstawionych wyników, że diazoksyd i pinacidil mają różne miejsca wiązania, ponieważ tylko pinacidil nie wywołał chronotropowo ujemnego działania w grupie samic wiosną, kiedy to jest wyższe stężenie estrogenu i większa liczba podjednostek SUR2A. Warto dodać, że pinacidil w doświadczeniach na królikach *in vitro*, w niskich stężeniach (1,25 μ M) powodował zwiększone występowanie komorowych

zaburzeń rytmu w trakcie hipoksji i reperfuzji [31]. Jest to zgodne z wynikami niniejszej pracy, w której pinacidil w stężeniach od 1 do 10 μ M wywoływał przyspieszenie akcji serca u samic świnek morskich wiosną i wykazywał statystycznie mniejszą efektywność w porównaniu do diazoksydu w grupie samców (tabela 5). Obecnie efekt proarytmiczny przypisuje się aktywacji kanałów sarc-K⁺_{ATP} i sugeruje się zachowanie dużej ostrożności w trakcie niespecyficznego aktywacji kanałów K⁺_{ATP} w przebiegu hipoksji i reperfuzji [31].

Na uwagę zasługuje zaobserwowany efekt inotropowo dodatni diazoksydu w prawym przedsionku serca świnki morskiej. Wiadomo, że u świnek morskich występuje wprost proporcjonalna zależność między akcją serca a siłą skurczu [36]. Zatem chronotropowo ujemny efekt powinien być związany ze zmniejszeniem siły skurczu. Jednak w przedstawionej pracy obserwowano inotropowo dodatni efekt diazoksydu. Działanie to było hamowane zarówno przez glibenklamid jak i selektywny bloker mitochondrialnych kanałów K⁺_{ATP} co sugeruje, że w tym mechanizmie pośredniczy otwarcie kanałów mito- K⁺_{ATP}. Diazoksyd otwierając mito- K⁺_{ATP} kanał, zwiększa stężenie jonów Ca²⁺ wewnątrz kardiomiocyta w wyniku zmniejszenia wychwytu z cytozolu oraz zwiększenia uwalniania jonów wapnia z mitochondriów do cytoplazmy [37, 65, 66, 102]. Zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych powoduje wzrost siły skurczu. Zastanawiająca jest obserwacja, że diazoksyd wywołał efekt inotropowo dodatni tylko w grupie samców. Wytłumaczeniem może być większa średnica por dla wypływających jonów Ca²⁺ w błonie mitochondriów w grupie samców w porównaniu z samicami. Diazoksyd w różnych modelach doświadczalnych wykazuje zarówno inotropowo dodatnie jak i ujemne działanie w wyniku aktywacji mito- K⁺_{ATP} [22, 86]. Deja i wsp. wykazali, że diazoksyd wywołuje inotropowo ujemny efekt na beleczkę przedsionka serca ludzkiego [22]. Działanie to obserwowano przy stosunkowo wysokich stężeniach diazoksydu, EC₅₀ wynosiło 110 μ M [22]. Najprawdopodobniej przyczyny w różnym działaniu diazoksydu można dopatrywać się w odmiennościach gatunkowych badanych grup. W kolejnej pracy zaobserwowano, że diazoksyd zwiększył siłę skurczu serca w wyniku wzrostu produkcji wolnych rodników [86]. Otwarcie mito- K⁺_{ATP} pozwala na

wypływ jonów H^+ i napływ jonów K^+ do mitochondrium, prowadząc do alkalizacji i wzrostu produkcji wolnych rodników (ROS) [25, 64]. ROS prowadzą do aktywacji kinazy białkowej C, która przekazuje sygnał prowadzący do końcowego efektu – kardioprotekcji [64]. Zatem wzrost produkcji ROS może brać udział w mechanizmie zwiększenia siły skurczu przez diazoksyd. Hipotezę tę potwierdza obserwowany brak znamiennego wpływu pinacidilu na siłę skurczu zarówno u samic jak i samców. Do tej pory nie opisano wpływu pinacidilu na produkcję ROS. Pinacidil działał w wyniku aktywacji błonowych kanałów K^+_{ATP} , których otwarcie prowadzi do zmniejszenia stężenia jonów Ca^{2+} w kardiomiocycie, co sprzyja zmniejszeniu siły skurczu. W doświadczeniach na izolowanych sercach mysich pinacidil powodował efekt inotropowy ujemny, który był odwracany przez glibenklamid [79]. Obserwacja ta jest zgodna z hipotezą zmniejszenia stężenia jonów wapnia w cytoplazmie kardiomiocytów w wyniku otwarcia sarc- K^+_{ATP} . Wyniki uzyskane na modelu mysim powinno się bardzo ostrożnie odnosić do wyników uzyskanych w badaniach na większych ssakach ze względu na dużą różnicę w podstawowej akcji serca, która u myszy jest 10 razy szybsza w porównaniu do ludzi.

Podobne różnice jak wyżej opisane stwierdzono również w efektach aktywatorów kanałów potasowych ATP- zależnych na mięśniach gładkich naczyń tętnicznych. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że pinacidil w odróżnieniu od diazoksydu wywierał różny wpływ na mięśnie gładkie aorty świnek morskich w zależności od płci. Pinacidil wywołuje relaksację aorty za pośrednictwem aktywacji kanałów K^+_{ATP} występujących w mięśniach gładkich naczyń [62, 79, 101]. W skład tego kanału wchodzi podjednostki Kir6.1 i SUR2B [100, 101]. Pinacidil podawany dożylnie genetycznie zmodyfikowanym myszom *Kir6.1^{+/+}* obniża średnie ciśnienie tętnicze w przeciwieństwie do myszy *Kir6.1^{-/-}*, u których takiego efektu nie zaobserwowano [77]. Znamienne osłabione działanie pinacidilu w grupie samic wiosną, zarówno na akcję serca jak i rozkurcz aorty nasuwa i w tym przypadku podobne wytłumaczenie polegające na wpływie estrogenu na mechanizm działania pinacidilu. Wiosną, kiedy występuje okres reprodukcyjny świnek morskich, we krwi samic wzrasta poziom 17-beta-estradiolu. Jednak, do tej pory nie ma badań stwierdzających wpływ tego

hormonu na ekspresję białek podjednostek kanałów K^+_{ATP} występujących w mięśniach gładkich naczyń. Badania molekularne określające wpływ estrogenu na ekspresję kanałów K^+_{ATP} w mięśniach gładkich naczyń mogłyby wyjaśnić powyższą hipotezę. Wydaje się możliwe, że wyższy endogenny poziom estrogenu w okresie reprodukcyjnym u samic świnek morskich zmniejsza reaktywność naczyń poprzez wpływ na śródbłonek. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że 17β -estradiol upośledza funkcję śródbłonek, który w doświadczeniach nie był usuwany i w ten sposób upośledzał rozkurcz naczyń. Sprzeczne z powyższą hipotezą są badania Bowyer'a, w których nie wykazano wpływu zmian stężenia endogennego estrogenu na reaktywność naczyń u kobiet w wieku reprodukcyjnym [11]. Również nie potwierdzają tej hipotezy szeroko rozpowszechnione opinie o antyoksydacyjnej, ochronnej roli estrogenu na śródbłonek, wzroście uwalniania NO ze śródbłonek oraz wzroście ekspresji i aktywności śródbłonkowej syntazy tlenu azotu eNOS przez estrogen [28, 47, 96]. Jednak inna praca donosi, że 17β -estradiol zwiększał remodeling mięśnia sercowego i śmiertelność w wyniku nagłej śmierci sercowej [29]. Ryzyko nagłej śmierci sercowej rośnie wraz z wzrostem przebudowy mięśnia sercowego. Spekulować można, że estrogen spowodował zmniejszenie podatności naczyń wieńcowych, niedokrwienie i zaburzenia rytmu prowadzące do nagłej śmierci sercowej. Sprzeczne obserwacje dotyczące wpływu estrogenu na naczynia skłaniają do stwierdzenia, że wyniki uzyskane w tej pracy są efektem działania nie poznanych do tej pory mechanizmów, które wymagają dalszych badań.

Potwierdzenie wpływu estrogenu na funkcję kanałów K^+_{ATP} w mięśniu sercowym i mięśniach gładkich naczyń dokonano badając efekty estrogenu u samców oraz zablokowania receptorów estrogenowych u samic za pomocą tamoksifenu.

Należy dodać, że podobne wyniki uzyskał Tsang w badaniach na szczurach, w których 17β -estradiol w stężeniach bliskim fizjologicznym hamował rozkurcz aorty wywołany pinacidilem i kromakalimem [89]. 17β -estradiol moduluje zatem nie tylko zdolność pinacidilu ale i innych aktywatorów (PCOs) do otwarcia kanałów K^+_{ATP} w naczyniach. Istnieją sprzeczne doniesienia z wcześniej opisanymi, w których 17β -estradiol w

fizjologicznych stężeniach nasilał rozkurcz naczyń wieńcowych u świń powodowany przez kromakalim i pinacidil [84]. Różnica może wynikać z różnej wrażliwości na hormon w zależności od gatunku zwierzęcia i skłania do bardzo ostrożnej interpretacji wyników. Obserwacje te są zgodne i potwierdzają szeroko opisaną relaksacyjną rolę 17β-estradiolu na naczynia poprzez bezpośrednią aktywację kanałów K^+_{ATP} w mięśniach gładkich naczyń oraz zmniejszenie wydzielania endoteliny-1 [35, 48]. Estrogen podnosi poziom adenozyliny, bradykininu, tlenku azotu związków biorących aktywny udział w otwieraniu kanałów K^+_{ATP} zależnych oraz zwiększa wrażliwość komórki na opioidy i w ten sposób pośredniczy w aktywacji kanałów potasowych ATP zależnych [35]. Zapobieganie skurczowi naczyń wieńcowych związany ze zmniejszeniem uwalniania endoteliny -1 zachodzi z pominięciem receptora estrogenowego [48]. Dlatego wydaje się być oczywiste, że estrogen zarówno u kobiet jak i u mężczyzn efektywnie hamuje skurcz naczyń wieńcowych w trakcie koronaroplastyki [48]. W naszej pracy 17β-estradiol podawany samcom oraz endogenny podwyższony poziom tego hormonu wiosną u samic zmniejszał rozkurcz naczyń pod wpływem pinacidilu. Efekt wywierany przez endogenny estrogen u samic hamowany był przez bloker receptorów estrogenowych; tamoksifen. Wydaje się, że mechanizm działania 17β-estradiolu na rozkurcz naczyń pod wpływem pinacidilu zachodzi za pośrednictwem receptora estrogenowego jak i bezpośrednio przez wpływ na kanał potasowy ATP- zależny w mięśniach gładkich aorty.

W kolejnej pracy, tym razem wykonanej na psach, które otrzymywały 17beta-estradiol przez dwa tygodnie tętnice wieńcowe znamiennie lepiej rozkurczały się po epizodzie niedokrwienia, pod wpływem acetylocholiny (ACh) w porównaniu do grupy kontrolnej [47]. Należy zwrócić uwagę, że estrogen wykazał się w powyższej pracy działaniem ochronnym na naczynia w trakcie niedokrwienia. Estrogen charakteryzuje się właściwościami antyoksydacyjnymi prowadzącymi do zmiatania wolnych rodników oraz zapobiegania utlenianiu LDL co w konsekwencji daje poprawę funkcji śródbłonna w trakcie niedokrwienia i właściwości wazodylatacyjnych naczyń [57]. W naszych doświadczeniach badano wpływ estrogenu na reaktywność naczyń pod wpływem pinacidilu w warunkach fizjologicznych.

Stwierdzono, że estrogen zmniejsza zdolność pinacidilu do relaksacji mięśni gładkich aorty świnek morskich. Działanie to jest odwracane przez tamoksifen. Na podstawie uzyskanych przez nas wyników możemy przypuszczać, że 17β -estradiol reguluje łączenie się pinacidilu z miejscem wiążącym na podjednostce SUR2B kanału K^+_{ATP} w mięśniach gładkich aorty, lub wywiera nieznane działanie zależne od receptora estrogenowego, czy wpływa na do tej pory nieznane nam mechanizmy pochodzenia śródbłonkowego prowadzące do zmniejszenia rozkurczu naczynia pod wpływem pinacidilu. Wydaje się, że enzym dehydrogenaza mleczanowa (LDH) może w tej interakcji estrogenu z kanałami K^+_{ATP} w sercu i naczyniach odgrywać istotną rolę. Mianowicie, Crawford i wsp. wykazali, że mięśniowa dehydrogenaza mleczanowa (M-LDH) stanowi integralną część kanału K^+_{ATP} kardiomiocyta [20]. Związana jest ona zarówno z podjednostką białkową Kir6.2 jak i SUR2A. M-LDH ma zdolność regulowania aktywności kanału Kir6.2 / SUR2A [20]. Enzym zwiększa aktywność kanałów K^+_{ATP} w trakcie niedokrwienia i chroni komórki mięśnia sercowego przed uszkodzeniem [20]. Na podstawie naszych badań stwierdzono, że 17β -estradiol podawany samcom zmniejszał a tamoksifen w grupie samic zwiększał zarówno stężenie dehydrogenazy mleczanowej jak i H-LDH (ryc.11, ryc.12). Hamowanie produkcji LDH pod wpływem estradiolu zostało już wcześniej zaobserwowane [16, 46]. Wykazano, że estrogen zapobiega uszkodzeniu kardiomiocytów w trakcie nadmiernej aktywacji układu adrenergicznego w przebiegu niedokrwienia, co manifestuje się znamienym zmniejszeniem poziomu LDH w surowicy krwi [46]. Na podstawie przeprowadzonych badań, stwierdzono także znamienne mniejsze stężenie zarówno LDH jak i H-LDH w grupie kontrolnej samic w porównaniu z grupą kontrolną samców. Pomiary w grupie kontrolnej samic dokonywane były w trakcie ruj, w którym odnotowuje się wyższy poziom endogennego estrogenu. Zatem wydaje się, że endogenne stężenie estrogenu moduluje stężenie LDH u osobników płci żeńskiej. W naszych badaniach także podawanie estradiolu samcom obniżało poziom LDH. Zatem 17β -estradiol moduluje poziom dehydrogenazy mleczanowej niezależnie od płci i działanie to wydaje się odbywać za pośrednictwem receptora estrogenowego. Niższemu poziomowi H-LDH w grupie samic jednocześnie towarzyszył brak chronotropowo ujemnego

działania pinacidilu. Obserwowana korelacja między brakiem chronotropowo ujemnego efektu pinacidilu a niskim poziomem H-LDH sugeruje wpływ tego enzymu na podjednostkę SUR2A warunkującą prawidłową reakcję badanego aktywatora z kanałem K^+_{ATP} . Uzyskane wyniki wymagają dalszych wnikliwych eksperymentów oceniających wzajemny wpływ zarówno pinacidilu, 17β -estradiolu jak i enzymu H-LDH.

Reasumując, wydaje się, że jednym z najbardziej zasadniczych mechanizmów różniących funkcję układu krążenia i wpływających na zapadalność na choroby u samic i samców (jak i u kobiet i mężczyzn) to funkcja kanałów K^+_{ATP} - zależnych w sercu i w mięśniach gładkich naczyń. Pomimo coraz większych zasobów wiedzy o regulacji pracy i roli tych kanałów, dalsze badania w tej dziedzinie są konieczne. Na podstawie naszych obserwacji możemy stwierdzić, że 17β -estradiol zmniejsza poziom LDH i H- LDH oraz aktywność pinacidilu względem kanałów K^+_{ATP} w mięśniu sercowym i w mięśniach gładkich naczyń świnek morskich, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia złożonych mechanizmów interakcji estrogeny z kanałami jonowymi i w przyszłości może doprowadzić do bardziej skutecznego leczenia chorób układu krążenia u kobiet.

6. WNIOSKI

1. Aktywacja farmakologiczna kanałów K^+_{ATP} wywiera różny wpływ na pracę serca u samic i samców. Diazoksyd zmniejsza częstość pracy serca samic i samców i zwiększa siłę skurczu u samców. Pinacidil zmniejsza częstość pracy serca u samic tylko jesienią. Nie wpływa istotnie na częstość pracy serca samic wiosną, kiedy jest wysokie stężenie endogenego estrogenu. Pinacidil u samców nie wpływał istotnie na siłę skurczu.

17 β -estradiol całkowicie hamuje chronotropowo ujemny efekt pinacidilu u samców. Tamoksyfen przywraca wrażliwość mięśnia sercowego samic na pinacidil.

2. Stężenia dehydrogenazy mleczanowej i sercowej dehydrogenazy mleczanowej są wyższe u samców w porównaniu do samic.

17 β -estradiol podawany samcom obniża stężenie LDH i H-LDH.

3. Aktywacja farmakologiczna kanałów K^+_{ATP} wywiera różny wpływ na kurczliwość mięśni gładkich aorty u samic i samców. Diazoksyd rozkurcza mięśnie gładkie aorty u samic i samców. Pinacidil rozkurcza mięśnie gładkie aorty u samic tylko jesienią. Nie wpływa istotnie na rozkurcz aorty samic wiosną, kiedy jest wysokie stężenie endogenego estrogenu. Pinacidil u samców rozkurcza aortę zarówno wiosną jak i jesienią.

17 β -estradiol hamuje rozkurczające działanie pinacidilu u samców.

Tamoksyfen zwiększa rozkurcz aorty pod wpływem pinacidilu u samic.

7. STRESZCZENIE

Różnice w częstości występowania chorób układu krążenia wśród kobiet i mężczyzn zaobserwowano już pół wieku temu. Ryzyko chorób naczyniowo sercowych u mężczyzn rośnie stopniowo wraz ze starzeniem się organizmu, w przeciwieństwie do kobiet, u których ryzyko gwałtownie wzrasta po menopauzie.

Ostatnio coraz częściej spotykamy się z dowodami potwierdzającymi różnice w wrażliwości mięśnia sercowego na stres metaboliczny i różnice w aktywności endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych w zależności od płci. Jednym z endogennych mechanizmów odgrywających ważną rolę kardioprotekcyjną jest aktywacja kanałów K^+_{ATP} zależnych w mięśniu sercowym. Ich otwarcie chroni komórki mięśnia sercowego w trakcie niedotlenienia. Estrogen zwiększa liczbę aktywnych kanałów K^+_{ATP} zależnych w mięśniu sercowym samic świnek morskich.

Wiadomo że, gęstość kanałów K^+_{ATP} zależnych w mięśniu sercowym samic jest ściśle związana z malejącym w miarę starzenia się poziomem estrogenu. Wydaje się, że jednym z najbardziej zasadniczych mechanizmów różniących funkcję układu krążenia i wpływających na zapadalność na choroby układu krążenia u samic i samców (jak i u kobiet i mężczyzn) to funkcja kanałów K^+_{ATP} zależnych w sercu i w mięśniach gładkich naczyń. Dlatego celem pracy było porównanie efektów aktywacji kanałów K^+_{ATP} zależnych w mięśniu sercowym i mięśniach gładkich aorty u samic i samców świnki morskiej oraz w obecności 17β -estradiolu i tamoksyfenu. Określono także stężenia dehydrogenazy mleczanowej i sercowej dehydrogenazy mleczanowej u samic i samców świnek morskich i zbadano wpływ 17β -estradiolu i tamoksyfenu na poziom wymienionych enzymów.

Doświadczenia przeprowadzono na świnkach morskich obojga płci. Samice podzielono na grupę kontrolną i grupę, która otrzymywała podskórną, tamoksifen. Samce podzielono na grupę kontrolną i grupę otrzymującą podskórną 17β -estradiol. W wymienionych grupach obserwowano wpływ aktywatorów kanałów K^+_{ATP} zależnych (pinacidilu, diazoksydu, rilmakalimu) na siłę skurczu i akcję serca oraz rozkurcz mięśni gładkich aorty piersiowej. Pomiar siły skurczu i akcji serca wykonywano na

izolowanym spontanicznie bijącym prawym uszku serca. Pomiary kurczliwości naczyń wykonywane były na izolowanej aorcie piersiowej. Wykonano pomiary stężenia dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz sercowej dehydrogenazy mleczanowej (H-LDH) w surowicy krwi. Stężenie LDH i H-LDH mierzone było za pomocą automatycznego spektrofotometru.

Na podstawie wykonanych eksperymentów stwierdzono, że aktywacja farmakologiczna kanałów K^+_{ATP} wywiera różny wpływ na pracę serca i rozkurcz mięśni gładkich aorty u samic i samców. Diazoksyd rozkurcza mięśnie gładkie aorty, zmniejsza częstość pracy serca u samic i samców i zwiększa siłę skurczu u samców. Pinacidil rozkurcza aortę i zmniejsza częstość pracy serca u samic tylko jesienią. Nie wpływa istotnie na rozkurcz aorty i częstość pracy serca samic wiosną, kiedy jest wysokie stężenie endogennego estrogenu. 17β -estradiol hamuje rozkurczający i chronotropowo ujemny efekt pinacidilu u samców. Tamoksyfen przywraca wrażliwość mięśnia sercowego samic na pinacidil. U samców stwierdzono wyższe stężenie dehydrogenazy mleczanowej i sercowej dehydrogenazy mleczanowej w porównaniu do samic. 17β -estradiol u samców znamienne obniża stężenie LDH i H-LDH. Wyniki badań sugerują zależność między 17β -estradiolem, LDH i aktywacją kanałów K^+_{ATP} przez pinacidil.

17β -estradiol zmniejsza poziom LDH i H-LDH oraz aktywność pinacidilu względem kanałów K^+_{ATP} w mięśniu sercowym i mięśniach gładkich naczyń świnek morskich. Wyjaśnienie wszystkich mechanizmów wpływu estrogenu na funkcję i pracę tych kanałów, z pewnością przyczyni się do bardziej skutecznej i zależnej od płci terapii chorób układu krążenia.

8. SUMMARY

Gender-specific differences in incidence of cardiovascular diseases were first recognized for more than half a century ago. The risk of heart disease in male increases constantly with age, premenopausal women have a significantly lower risk that rapidly increases after menopause. Recently some evidence has been provided that there are gender-based differences in cardiac response to a metabolic stress and in efficiency of endogenous cardioprotective mechanisms.

The activation of K^+_{ATP} sensitive channels in cardiac myocytes is one of the most important cardioprotective mechanisms in heart. The opening of K^+_{ATP} sensitive channels protects the heart against injury during ischaemia. Estradiol increases the level of active K^+_{ATP} sensitive channels in cardiac cells. It is known that ageing is associated with decrease in numbers of K^+_{ATP} sensitive channels in female hearts and with age-dependent decrease in concentration of circulating estrogens. It seems that gender-specific differences in function of K^+_{ATP} sensitive channels in cardiac myocytes and vascular smooth muscles play one of the most important role in prevalence and incidence of cardiovascular diseases. That is why the aim of this study was to compare the effects of the opening of K^+_{ATP} sensitive channels in cardiac myocytes and vascular smooth muscles in male and female guinea pigs and in presence of 17β - estradiol and tamoxifen. Additionally, we measured concentration of total lactate dehydrogenase (LDH) and heart form of lactate dehydrogenase (H-LDH) in males and females and we investigated the influence of 17β - estradiol and tamoxifen on the level of LDH and H-LDH. Experiments were performed on guinea pigs of both genders. Females were divided into control group and experimental group pretreated by tamoxifen. Males were divided into control group and experimental group pretreated by 17β - estradiol. We observed the effects of activators (pinacidil, diazoxid, rilmakalim) of K^+_{ATP} sensitive channels in cardiac myocytes and vascular smooth muscles in control and experimental groups. We used spontaneously beating right atria to measure heart rate and force of contraction. Vasorelaxant effects were examined on the isolated thoracic aorta. Total and

heart form of lactate dehydrogenase were measured in serum by automatic spectrophotometer analyzer.

In the study we showed that there are gender- specific differences in effects of activation of K^+_{ATP} sensitive channels in cardiac myocytes and vascular smooth muscles. Diazoxid induced similar negative chronotropic and vasorelaxant effects in females and males and additionally, positive inotropic effect was noted only in males. On the other hand, pinacidil induced significant decrease in heart rate and vasorelaxation in females only in the fall season. Attenuation of heart rate and vasorelaxation in a presence of pinacidil did not appeared in female guinea pigs in spring when there is high level of endogenous estrogens. 17β - estradiol prevented pinacidil-induced slowing of heart rate and vasorelaxation of aorta in males. On the other hand tamoxifen rendered females' right atria to decrease rate of heart beating and vascular smooth muscle to relaxation in the presence of pinacidil. LDH and H-LDH concentration were significantly higher in the control male group than in the control female group. 17β - estradiol significantly decreased LDH and H-LDH in males. Our data obtained correlation between 17β - estradiol, concentration of LDH and H-LDH and activation of K^+_{ATP} sensitive channels in cardiac myocytes and vascular smooth muscles in the presence of pinacidil.

17β - estradiol increases the level of LDH and H-LDH and prevents pinacidil-induced opening of K^+_{ATP} sensitive channels in cardiac myocytes and vascular smooth muscles. Obviously, further experiments are required to elucidate precise mechanism of interaction between pinacidil, estrogen, LDH and H-LDH.

9. PIŚMIENICTWO

1. Abi-Gerges N., Small B., Lawrence Ch., Hammond T., Valentin J., Pollard Ch.: Evidence for gender differences in elektophysiological properties of canine Purkinje fibres. *Br J Pharmacol.* 2004;142:1255-1264.
2. Abi-Gerges N., Philp K., Pollard Ch., Wakefield I., Hammond T., Valentin J.: Sex differences in ventricular repolarization: from cardiac electrophysiology to Torsades de Pointes. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004; 18: 139-151.
3. Aronson D., Mittleman M., Burger A.: Effects of Sulfonylurea Agents and Adenosine Triphosphate Dependent Potassium Channel Antagonists on Ventricular Arrhythmias in Patients with Decompensated Heart Failure. *PACE.* 2003; 26:1254-1261.
4. Ashfield R., Gribble F., Ashcroft S., Ashcroft F.: Identification of the High-Affinity Tolbutamide Site on the SUR1 Subunit of the K_{ATP} Channel. *Diabetes.* 1999;48:1341-1347.
5. Babenko A.P., Gonzales G., Bryan J.: Two regions of sulfonylurea receptor specify the spontaneous bursting and ATP inhibition of K_{ATP} channel isoforms. *J Biol Chem.* 1999; 274:11587- 11592.
6. Bailey M., Curtis A.: The Effects of Hormones on Arrhythmias in Women. *Curr Womens Health Rep.* 2002; 2: 83-88.
7. Beresewicz A., Maczewski M., Duda M.: Effect of classic preconditioning and diazoxide on endothelial function and O_2^- and NO generation in the post-ischemic guinea-pig heart. *Cardiovasc Res.* 2004; 63:118-129.
8. Biddoglia H., Maciel J., Capalozza J.: Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. *Am Heart J.* 2000; 140: 678-683.
9. Booth E., Marchesi M., Klibourne E., Lucchesi B.: 17-Bestradiol as a Receptor Mediated Cardioprotective Agent. *JPET.* 2003; 307: 395-401.
10. Bowels D.: A radical idea: men and women are different. *Cardiovasc Res.* 2004; 61: 5-6.
11. Bowyer L., Brown M.A., Jones M.: Vascular reactivity in men and women of reproductive age. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185: 88-96.

12. Bozdogan O., Gonca E., Suveren E. i wsp.: Mechanisms of glybenclamide mediated anti-arrhythmia and ischemic conditioning in a rat model of myocardial infarction: role of yohimbine treatment. *Turk J Med Sci.* 2004; 34: 21-27.
13. Brady P., Jovanovic A.: The Sulfonylurea Controversy. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42: 1022-1025.
14. Brayden J.: Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002; 29: 312-316.
15. Chutkow W., Pu J., Wheeler M., Wada T., Makielski J., Burant C., McNally E.: Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K_{ATP} channels. *J Clin Invest.* 2002; 110: 203–208.
16. Claassen H., Schunke M., Kurz B.: Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-damage. *Cell Tissue Res.* 2005; 319: 439-45.
17. Clarkson T.: The New conundrum: do estrogens have any cardiovascular benefit? *Int J Fertil.* 2002; 47: 61-68.
18. Cole W., Clement-Chomienne O.: ATP- Sensitive K^+ Channels of Vascular Smooth Muscle Cells. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2003; 14: 94-103.
19. Collins P., Rosano G., Sarrel P. i wsp.: 17-B- estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation* 1995; 92: 24-30.
20. Crawford R., Budas G., Jovanovic S., Ranki H., Wilson T., Davies A., Jovanovic A.: M-LDH serves as a sarcolemmal K (ATP) channel subunit essential for cell protection against ischemia. *EMBO J.* 2002; 21: 3936-3948.
21. Das B., Sarkar Ch.: Cardiomyocyte mitochondrial K_{ATP} channels participate in the antiarrhythmic and antiinfarct effects of K_{ATP} activators during ischemia and reperfusion in an intact anesthetized rabbit model. *Pol J Pharmacol.* 2003; 55:771-786.
22. Deja M., Golba K., Kolowca M., Widenka K., Biernat J., Wos S.: Diazoxide Provides Protection to Human Myocardium In Vitro That Is Concentration Dependent. *Ann Thorac Surg.* 2004; 77: 226-32.
23. D`Hahan N., Jacquet H., Moreau C., Catty P., Vivaudou M.: A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of

ATP-sensitive K⁺ channels by K⁺ channel openers. *Mol Pharmacol.* 1999; 56: 308-315.

24. D`Hahan N., Moreau C., Prost A., Jacquet H., Alekseev A., Terzic A., Vivaudou M.: Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1999; 96: 12162-12167.

25. Dos Santos P., Kowaltowski A., Laclau M. i wsp.: Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: 284-295.

26. Drici M., Burklow T., Haridasse V., Glazer R., Wooslay R.: Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circulation.* 1996; 94: 1471–1474.

27. Ebert S., Liu X., Wooslay R.: Female gender as a risk factor for drug-induced cardiac arrhythmias: evaluation of clinical and experimental evidence. *J Women Health.* 1998; 7: 547–557.

28. Editorial Dopak K.: Sexual dimorphism and in the aging heart: role of estrogen, nitric oxide and beyond. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 37: 667-669.

29. Eickels M., Patten R., Aronovitz M. i wsp.: 17-beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41: 2084-2092.

30. Farouque H., Worthley S., Meredith I., Skyrme-Jones R., Zhang M.: Effect of ATP-Sensitive Potassium Channel Inhibition on Resting Coronary Vascular Responses in Humans. *Circ Res.* 2002; 90: 231-236.

31. Fischbach P., White A., Barrett T., Lucchesi B.: Risk of Ventricular Proarrhythmia with Selective Opening of the Myocardial Sarcolemmal versus Mitochondrial ATP-Gated Potassium Channel. *Pharmacol Exp Ther.* 2004; 309: 554-559.

32. Gabel S., Walker V., London R., Steenbergen Ch., Korach K., Murphy E.: Estrogen receptor beta mediates gender differences in ischemia/ reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 38: 289-297.

33. Grover G., Garlid K.: ATP-Sensitive Potassium Channels: A Review of their Cardioprotective Pharmacology. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32: 677-695.

34. Hanley P., Mickel M., Loffler M., Brandt U., Daut J.: K(ATP) channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart. *J Physiol.* 2002; 542: 735-741.
35. Herrington D., Reboussin D., Brosnihan K. i wsp.: Effects of estrogen replacement on the progression of coronary artery atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2000; 343: 522-529.
36. Hodis H., Mack W., Lobo R., Shoupe D., Sevanian A., Mahrer P., Selzer R., Liu C., Liu C., Azen P.: Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis. *Ann Intern Med.* 2001; 135: 939-953.
37. Holmuhamedov E., Wang L., Terzic A.: ATP-sensitive K channel openers prevent Ca^{2+} overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol.* 1999; 519: 347–360.
38. Howes L.: Cardiovascular effects of sulphonylureas: role of K(ATP) channels. *Diabetes Obes Metab.* 2000; 2: 67-73.
39. Inagaki N., Gono T., Clement J., Namba N., Inazawa J., Gonzales G., Aguilar-Bryan L., Seino S., Bryan J.: Reconstitution of I_{ATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science.* 1995; 270:1166–1170.
40. Inagaki N., Gono T., Clement J., Wang C., Aguilar- Bryan L., Bryan J., Seino S.: A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K channels. *Neuron.* 1996; 16:1011–1017.
41. Inoue I., Nagase H., Kishi K., Higuti T.: ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature.* 1991; 352:244-247.
42. Jaarsma T.: Are women different than men? Aspects of heart failure in special populations : elderly women. *E J Cardiovasc Nurs.* 2002; 1: 29-31.
43. Jahangir A., Terzic A., Kurachi Y.: Intracellular acidification and ADP enhance nicorandil induction of ATP sensitive potassium channel current in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.*1994; 28: 831–835.
44. Jovanovic S., Jovanovic A.: Sarcolemmal K(ATP) channels in ageing. *Ageing Res Rev.* 2004; 3: 199-214.
45. Kajiooka S., Kitamura K., Kuriyama H.: Guanosine diphosphate activates an adenosine 5`-triphosphatate-sensitive K^+ channel in the rabbit portal vein. *J Physiol.* 1991; 444: 397-418

46. Kam K., Qi J., Chen M., Wong T.: Estrogen Reduces Cardiac Injury and Expression of β 1-Adrenoreceptor upon Ischemic Insult in the Rat Heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:8-15.
47. Kim Y., Chen B., Beauregard J., Kouretas P., Thomas G., Farhat M., Myers A., Lees D.: 17-B-estradiol prevents dysfunction of canine coronary endothelium and myocardium and reperfusion arrhythmias after brief ischemia/reperfusion. *Circulation.* 1996; 94: 2901-2909
48. Lee T., Chou T., Tsai C.: Differential Role of KATP Channels Activated by Conjugated Estrogens in the Regulation of Myocardial and Coronary Protective Effects. *Circulation.* 2003; 107: 49-54.
49. Lee T., Su S., Tsai C., Lee Y., Tsai C.: Cardioprotective Effects of 17 β -Estradiol Produced by Activation of Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels in Canine Hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32: 1147–1158.
50. Leinwand L.: Sex is a potent modifier of the cardiovascular system *J Clin Invest.* 2003; 112: 302-307.
51. Li H., Bian J., Kwan Y., Wong T.: Enhanced responses to 17-B-estradiol in rat heart treated with isoproterenol: involvement of a cyclic AMP-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 293: 592-598.
52. Liu X., Katchman A., Drici M., Ebert S., Ducic I., Morad M., Woosley R.: Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 285: 672–679.
53. Maris M., Melchert R., Joseph J., Kennedy R.: Gender difference in blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive and wistar – kyoto rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005; 32: 35-39.
54. Markworth E., Schwanstecher C., Swanstecher M.: ATP₄-mediates closure of pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. *Diabetes.* 2000; 49: 1413-1418.
55. Maćzewski M., Duda M., Pawlak W., Beręsewicz A.: Endothelial Protection from Reperfusion injury by ischemic preconditioning and diazoxide involves a sod-like anti-O₂⁻ mechanism. *J Physiol Pharmacol.* 2004; 55: 537-50.
56. Miki T., Suzuki M., Shibasaki T., Uemura H., Sato T., Yamaguchi K., Koseki H., Iwanaga T., Nakaya H., Seino S.: Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med.* 2002; 8: 466-472.

57. Minami K., Miki T., Kadowaki T., Seino S.: Roles of ATP-sensitive K⁺ channels as metabolic sensors: studies of Kir6.x null mice. *Diabetes*. 2004; 53: 176-180.
58. Mizumura T., Nithipatikom K., Gross G.: Bimakalim, an ATP-sensitive potassium channel opener, mimics the effects of ischemic preconditioning to reduce infarct size, adenosine release, and neutrophil function in dogs. *Circulation*. 1995; 92: 1236-1245.
59. Mohan R., Peterson D.: Activation of sulphonylurea – sensitive channels and the NO-cGMP pathway decreases the heart rate response to sympathetic nerve stimulation. *Cardiovasc Res*. 2000; 47: 81-89.
60. Nakagawa M., Ooie T., Ou B., Ichinose M., Takahashi N., Hara M., Yonemochi H., Saikawa T.: Gender Differences in Autonomic Modulation of Ventricular Repolarization in Humans. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2005; 16: 278-284.
61. Nichols C., Lederer W.: Adenosine triphosphatesensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Amer J Physiol Heart Circ Phy*. 1991; 261: 1675–1686.
62. Nielsen-Kudsk J., Bang L.: Effects of pinacidil and other cyanoguanidine derivatives on guinea-pig isolated trachea, aorta and pulmonary artery. *Eur J Pharmacol*. 1991; 201: 97- 102.
63. Noma A.: ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*. 1983; 305: 147-148.
64. Oldenburg O., Cohen M., Yellon D., Downey J.: Mitochondrial K_{ATP} channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2002; 55: 429-437.
65. O'Rourke B.: Evidence for Mitochondrial K⁺ Channels and Their Role in Cardioprotection. *Circ Res*. 2004; 94: 420-432.
66. O'Rourke B.: Myocardial K_{ATP} channels in preconditioning. *Circ Res*. 2000; 87: 845-855.
67. Pham T.: Gender differences in cardiac development: are hormones at the heart of the matter? *Cardiovasc Res*. 2003; 57: 591-593.
68. Quast U., Stephan D., Bieger S., Russ U.: The impact of ATP-sensitive K⁺ channel subtype selectivity of insulin secretagogues for the coronary vasculature and the myocardium. *Diabetes*. 2004; 53: 156-164.
69. Ranki H., Budas G., Crawford R., Davies A., Jovanović A.: 17-B

Estradiol regulates expression of K_{ATP} channels in heart-derived H9c2 cells. *J Amer Coll Cardiol.* 2002; 40: 367–374.

70. Ranki H., Budas G., Crawford R., Jovanović A.: Gender-specific difference in cardiac ATP-sensitive K channels. *J Amer Coll Cardiol.* 2001; 38: 906–915.

71. Ranki H., Crawford R., Budas G., Jovanović A.: Ageing is associated with decrease in number of sarcolemmal ATP-sensitive K channels in gender-dependent manner. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123: 695-707.

72. Sampson L., Hayabuchi Y., Standen N., Dart C.: Caveolae Localize Protein Kinase A Signaling to Arterial ATP-Sensitive Potassium Channels. *Circ Res.* 2004; 95: 1012-1018.

73. Sato T., Sasaki N., Seharaseyon J., O'Rourke B., Marban E.: Selective Pharmacological Agents Implicate Mitochondrial but Not Sarcolemmal K_{ATP} Channels in Ischemic Cardioprotection. *Circulation.* 2000; 101: 2418-2423.

74. Schulman D., Latchman D., Yellon D.: Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: 1630-1636.

75. Seharaseyon J. i wsp.: Molecular composition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels probed by viral gene transfer. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32: 1923-1930.

76. Seino S., Miki T.: Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^+ channels. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003; 81: 133–176.

77. Seino S., Miki T.: Gene targeting approach to clarification of ion channel function: studies of Kir6.x null mice. *J Physiol.* 2003; 554: 295-300.

78. Shi F., Ozawa M., Komura H.: Secretion of ovarian inhibin and its physiological roles in the regulation follicle – stimulating hormone secretion during the estrous cycle of the female guinea pig. *Biol Reprod.* 1999; 60: 78-84.

79. Suzuki M., Li R., Miki T., Uemura H., Sakamoto N., Ohmoto-Sekine Y., Tamagawa M., Ogura T., Seino S., Marbán E., Nakaya H.: Functional Roles of Cardiac and Vascular ATP-Sensitive Potassium Channels Clarified by Kir6.2-Knockout Mice. *Circ Res.* 2001; 88: 570- 577.

80. Suzuki M., Sasaki N., Miki T., Sakamoto N., Ohmoto-Sekine Y., Tamagawa M., Seino S., Marbán E., Nakaya H.: Role of sarcolemmal KATP channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest.* 2002; 109: 509–516.
81. Suzuki M., Saito T., Sato T., Tamagawa M., Miki T., Seino S., Nakaya H.: Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in mice. *Circulation.* 2003; 107: 682–85.
82. Tamargo J., Caballero R., Gomez R., Valenzuela C., Delpon E.: Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res.* 2004; 62: 9-33
83. Tanabe K., Tucker S., Ashcroft F., Proks P., Kioka N., Amachi T., Ueda K.: Direct phoyoaffinity labeling of Kir6.2 by [γ -(32)P]ATP-[γ]4-azidoanilide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 272: 316-319.
84. Teoh H., Leung S., Man R.: Short-term exposure to physiological levels of 17-B-estradiol enhances endothelium – independent relaxation in porcine coronary artery. *Cardiovasc Res.* 1999; 42: 224-231.
85. Terzic A., Jahangir A., Kurachi Y.: Cardiac ATPsensitive K channels: regulation by intracellular nucleotides and K channel opening drugs. *Amer J Physiol Cell Physiol.* 1995; 269: 525–545.
86. Tian J., Liu J., Garlid K., Shapiro J., Xie Z.: Involvement of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species in the inotropic action of ouabain on cardiac myocytes. A potential role for mitochondrial K_{ATP} channels. *Mol Cell Biochem.* 2003; 242: 181–187.
87. Tivesten A., Barlind A., Caidhal K., Klintland N., Cittadini A., Ohlsson C., Isgaard J.: Growth hormone – induced blood pressure decrease is associated with increased mRNA levels of the vascular smooth muscle KATP channel. *J Endocrinol.* 2004; 183: 195-202.
88. Trepanier-Boulay V., St-Michel C., Tremblay A., Fiset C.: Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res.* 2001; 89: 437–444.
89. Tsang S., Yao X., Chan H., Chen Z., Ming W., Huang Y.: Effect of 17 β -Estradiol Exposure on Vasorelaxation Induced by K^+ Channel Openers and Ca^{2+} Channel Blockers. *Pharmacology.* 2002; 65: 26–31.

90. Tsai C., Su S., Chou T., Lee T.: Differential Effects of Sarcolemmal and Mitochondrial K_{ATP} Channels Activated by 17β -Estradiol on Reperfusion Arrhythmias and Infarct Sizes in Canine Hearts. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 301: 234-240.
91. Uchiyama Y., Otani H., Wakeno M., Okada T., Uchiyama T., Sumida T. i wsp.: Role of mitochondrial K_{ATP} channels and protein kinase C in ischaemic preconditioning. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003; 30: 426-436.
92. Ueda K., Matsuo M., Tanabe K., Morita K., Kioka N., Amachi T.: Comperative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. *Biochem Biophys Acta.* 1999; 1461: 305-313.
93. Ueda K., Komine J., Matsuo M., Seino S., Amachi T.: Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulphonylurea receptor is modulated by glibenclamid. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96: 1268-1272.
94. Valverde E., Biagetti M., Bertran G., Arini P., Bidoggia H., Quinteiro R.: Developmental changes of cardiac repolarization in rabbits: implications for the role of sex hormones. *Cardiovasc Res.* 2003; 57: 625-631.
95. Vos M., Stallone J., Li M., Cornelussen R., Knuefermann P., Knowlton A.: Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen. *Am J Physiol Heart Cic Physiol.* 2003; 285: 687-692.
96. Wang X., Abdel-Rahman A.: Estrogen modulation of eNOS activity and its association with caveolin-3 and calmodulin in rat hearts. *Am J Heart Circ Physiol.* 2002; 282: 2309-2315.
97. Wang Y., Takashi E., Xu M., Ayub A., Ashraf M.: Downregulation of protein kinase C inhibits activation of mitochondrial K_{ATP} channels by diazoxide. *Circulation.* 2001; 104: 85–90.
98. Wolbrette D.: Gender differences in the proarrhythmic potential of QT-prolonging drugs. *Curr Women Health Rep.* 2002; 2: 105–109.
99. Wu Y., Anderson M.E.: Reduced repolarization reserve in ventricular myocytes from female mice. *Cardiovasc Res.* 2002; 53: 763-769.
100. Yamada M., Isomoto S., Matsumoto S., Kondo C., Shindo T., Horio Y., Kurachi Y.: Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K^+ channel. *J Physiol.* 1997; 499: 715-720.

101. Yokoshiki H., Sunagawa M., Seki T., Sperelakis N.: ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1998; 274: 25-37.
102. Zhuo M., Huang Y., Liu D., Liang C.: K_{ATP} channel: relation with cell metabolism and role in cardiovascular system. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 751-764.
103. Zingman L., Hodgson D., Bast P., Kane G., Perez-Terzic C., Gumina R., Pucar D., Bienengraeber M., Dzeja P., Miki T., Seino S., Alekseev A., Terzic A.: Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13278-13283.
104. Zumoff B., Troxler R.G., O'Connor J., Rosenfeld R.S., Kream J., Levin J., Hickman J.R., Sloadn A.M., Walker W., Cook R.L., Fukushima D.K.: Abnormal hormone levels in men with coronary artery disease. *Arteriosclerosis.* 1982; 2: 58-67.