

ACȚIUNEA RAVITENULUI ASUPRA TONUSULUI INELELOR DE AORTĂ PE FONDAL DE BLOCARE A CANALELOR IONICE ÎN PERFUZAT

¹Ecaterina Stratu, ¹Victor Ghicavii, ²Mihai Todiraș, ¹Ianoș Corețchi
¹Catedra farmacologie și farmacologie clinică USMF "N.Testemițanu"
²Institutul Oncologic din R.Moldova

Summary

The action of raviten upon the aortal rings tonus in case of blockage of L-type calcium channels and Ca⁺⁺ modification in perfusion

Raviten stimulates the influx of Ca⁺⁺ ions into the cell of vascular smooth muscle in the presence of specific inhibitors of Ca⁺⁺ L-type channels.

Rezumat

Raviten stimulează influxul ionilor de Ca²⁺ în interiorul celulelor musculaturii netede vasculare în prezența inhibitorilor specifici ai canalelor lente de Ca²⁺, factor absolut necesar în desfășurarea contracțiilor tonice.

Actualitatea temei

Mecanismul contractil a mușchiului neted se explică prin existența unei proteine cu o funcție asemănătoare celei a troponinei C, numită leiotonina (2). Apoi s-a constatat cantități mari de calmodulină, precum și izolarea unei enzime specifice ATP-aza. Pe baza acestor observații s-a fundamentat un model simplu al contracției mușchiului neted: creșterea concentrației calciului în celula musculară netedă conduce la formarea complexului Ca²⁺- calmodulina (CaM 4 Ca²⁺). Aceasta activează kinaza lanțului ușor al miozinei, conferindu-i activitate ATP-azică, consecința fiind formarea punților acto-miozinice. Ionul de calciu reprezintă un mesager ce reglează o varietate de funcții fundamentale ca: creșterea celulară și diferențierea, sinteza și secreția de neuromediatorii; contracția mușchilor cardiaci, scheletali și netezi, percepție senzorială, comunicarea neuronală și plasticitatea sinaptică, expresia genelor și răspunsul imun.

Simultan calciul este extrem de toxic pentru celulă. O serie de stări patologice sunt cauzate de dereglarea proceselor de semnalizare dependente de calciu: hipertensiunea, malignizarea, ateroscleroza, hipertermia malignă și diferite dereglări nervoase în particular sindromul maniaco-depresiv. În condiții extremale concentrația de calciu liber în citozol (Ca²⁺⁺) inițiază apoptoza.

Sursele de calciu pentru celulă servesc: lichidul interstițial (2,5 mM Ca²⁺), reticulul endoplasmatic și mitocondriile (~0,5 mM). Reticulul endoplasmatic e o sursă enormă de calciu ionic în țesutul muscular striat, cardiac, neted și în epiteliul glandular (1).

Un alt candidat pentru menținerea contracției mușchiului neted este proteinkinaza C, activată de inozitol 1, 4, 5, trifosfat și 1,2-diacilglicerol (3).

Material și metode

În calitate de model experimental au fost folosite inele de aortă izolată de șobolan (Меерсон Ф.3, и соавт., 1989; Todiraș M., 1996). Animalele rasa Wistar, masculi cu masa corporală 200-220g, au fost decapitate și exanghinate. După deschiderea cutiei toracice, aorta a fost prelevată și tăiată în inele cu lățime de 2-3mm. Preparatele astfel obținute au fost montate în baia de organ (10ml volum), activitatea mecanică fiind evidențiată cu ajutorul unui traductor izometric și înregistrată de către un inductor cu peniță (Linseis L-650).

Baia de organ a conținut ser Grebs-Henseleit cu următoarea componență (mM): Na Cl-118; LCl-4,8; CaCl₂-2,5; KH₂PO₄-1,2; MgSO₄-1,6; NaHCO₃-25,0; glucoză – 5,55. Soluția a fost ținută la temperatura de 37°C și barbotată continuu cu 95% O₂+5%CO₂.

Pretensionarea s-a efectuat la 2g, preparatul fiind ținut la echilibrare timp de 2 ore.

Dezendentelizarea a fost efectuată prin răzăluirea blândă cu hârtie de filtru umectată. Absența endoteliului funcțional a fost verificată farmacologic prin testul cu carbocol 10⁻⁵M (absența relaxării inelelor de aortă precontractate cu fenilefrină, în platoul contracției), efect

obținut în prezența endoteliului (Furchgott R.F., Zawadzki J.V.1980). Soluția în prealabil încălzită, a fost administrată cu ajutorul seringii automate. Având în vedere tahifilaxia musculaturii netede vasculare față de unele substanțe medicamentoase (Carvajal A., et al., 1995; Hăulică I.,1990) administrările succesive au fost efectuate la interval de 45-50 minute.

Mediul fără calciu prezintă aceeași compoziție cu serul Grebs-Henseleit cu două deosebiri: prima constă în substituirea clorurii de calciu cu NaCl (echimolar), cea de-a doua – în adăugarea de EDTA-2,5mM.

Pentru controlul activității contractile a preparatului izolat s-a efectuat depolarizarea membranei celulare cu KCl (120mM), iar pentru compararea acțiunii posibile vasoactive a preparatelor cercetate asupra organului izolat a fost folosit adrenomimeticul fenilefrina (10^{-5} M)

Efectele s-au urmărit pe inele de aortă endotelizate, cât și dezendotelizate, pe fondal de blocare a structurilor adrenergice selective α_1 -adrenergice cu prazosin (10^{-6} M), α_2 cu iohimbina (10^{-5} M); pe fondalul blocării angiotenzinoreceptorilor, pe fondalul blocării canalelor lente de calciu, cât și în diferite alte situații.

Rezultate și discuții

Contrația inelelor de aortă realizată prin depolarizarea membranei musculaturii netede vasculare nu include întreagă gamă de mesageri secundari rezultată de la excitarea receptorilor. Astfel contrația indusă de KCl se datorează deteriorării schimbului de K^+ la nivelul membranei.

Inițial s-a testat contractilitatea inelelor la aplicarea KCl (120mM). După înlăturarea depolarizantului din mediu, inelele au revenit la tonusul bazal. (fig.1). Ulterior a fost administrată KCl (30 mM), care a realizat o contrație de $38,97 \pm 3,23\%$ comparativ cu efectul maxim. Cu 15 minute înainte de administrarea repetată a KCl (30mM), inelele au fost pretratate cu raviten (10^{-4} M). S-a constatat, că în prezența derivatului izotiocianic KCl (30 mM) a provocat efecte vasoconstrictoare cu $147,66 \pm 12,32\%$ mai mari în comparație cu răspunsul primar la KCl (30 mM), sau $57,61 \pm 4,48\%$ din contrația maximă indusă de depolarizant (120 mM), (fig. 5.9).

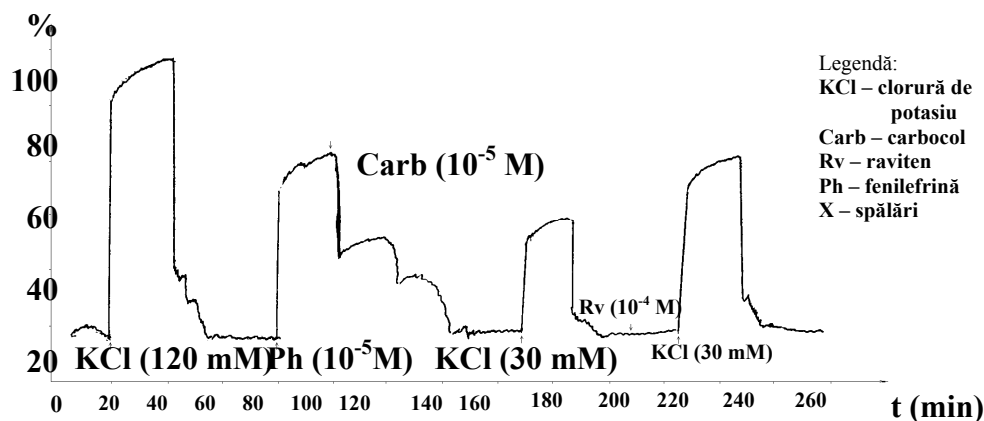


Fig.1 Sporirea de către raviten a contrației vasculare indusă prin depolarizarea membranei KCl (120mM)

Un alt protocol experimental a fost și cercetarea efectele fenilefrinei în mediu fără ionii de Ca^{++} (înlocuirea lor cu concentrații echimolare de Na^+). Inițial s-a testat contractilitatea maximă a inelelor la KCl (120mM) în mediu cu Ca^{++} (fig.2). Ulterior mediul a fost înlocuit cu ser fără Ca^{++} . Pe acest fondal a fost utilizată fenilefrina (10^{-5} M), care a indus contrație cu mult mai redusă ($11,27 \pm 1,15\%$) în comparație cu cea realizată în serul obișnuit. De menționat, că efectul a fost de scurtă durată (1-2 minute), după care vasele s-au relaxat de sine stătător.

Aceste date ne denotă, că contrația adrenergică s-a datorat rezervelor de Ca^{2+} intracelular, dar deoarece nu a avut loc influxul de Ca^{++} extracelular, ea a fost abolită.

Administrarea repetată de fenilefrină (10^{-5} M) nu a realizat nici un efect, fapt ce ne sugerează că la un moment a fost epuizat și stocul intracelular. Aplicarea ravitenului (10^{-4} M) pe

asemenea fondal nu a restabilit contractilitatea. Injectarea de CaCl^2 (2,5 mM) în mediul menționat (în prezența fenilefrinei și ravitenului) a restabilit contractibilitatea vasculară realizând $71,68 \pm 7,25\%$ din valorile maxime (fig. 2).

Astfel devine cert că în lipsa Ca^{++} extracelular, efectele ravitenului și fenilefrinei sunt anihilate.

În continuare a urmat o serie de experiențe cu utilizarea verapamilului – blocant selectiv al canalelor lente de Ca^{2+} (fig. 3).

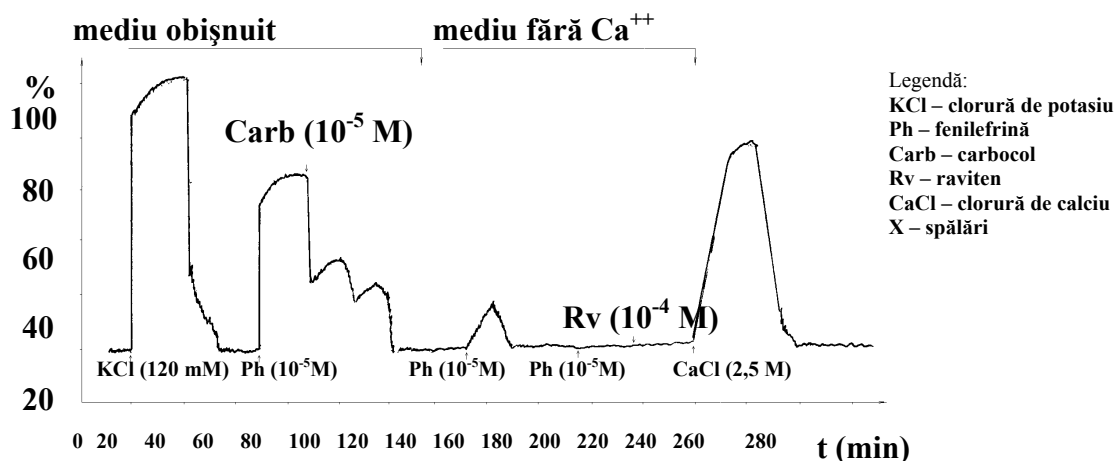


Fig. 2. Micșorarea efectelor ravitenului în lipsa Ca^{++} extracelular

Inițial s-a testat contractilitatea maximă a inelelor la aplicare KCl (120 mM) și reactivitatea vasculară la fenilefrină (10^{-5}M). Cu 15 minute înainte de administrarea repetată a adrenomimeticului (10^{-5}M), inelele au fost pretratate cu verapamil (10^{-4}M).

S-a constatat că în prezența inhibitorului canalelor de Ca^{2+} , vasoconstricția realizată de simpatomimetic a constituit $21,33 \pm 1,57\%$ comparativ cu prima contracție adrenergică, sau $16,0 \pm 1,25\%$ din răspunsul maxim (fig. 3). Presupunem că reacția s-a datorat rezervelor intracelulare de Ca^{2+} .

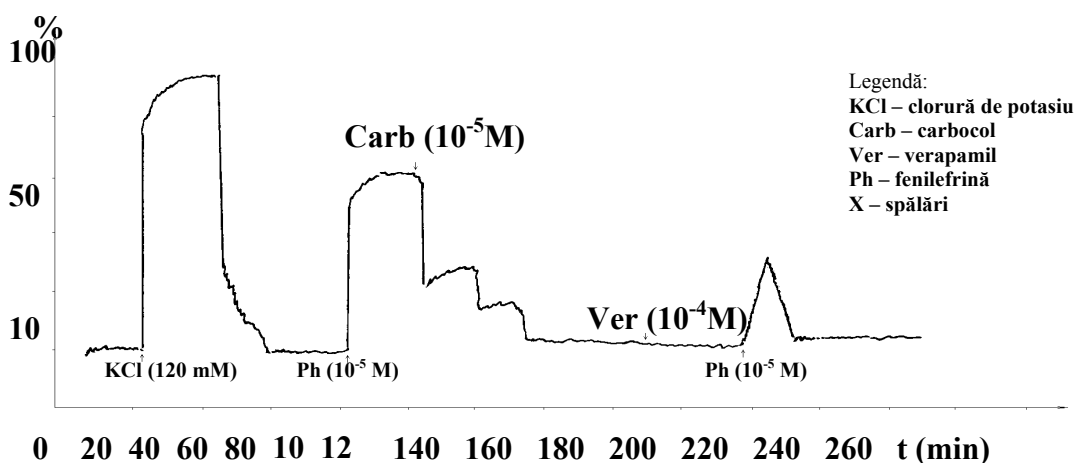


Fig. 3. Efectele fenilefrinei pe fondal de blocare a canalelor lente Ca^{++} cu verapamil

Utilizarea concomitentă a verapamilului (10^{-4}M) și ravitenului (10^{-4}M) cu 15 minute înainte de infuzia repetată de fenilefrină a reprezentat un alt nivel experimental. (fig.4). S-a constatat, că contracția fenilefrinică secundară a constituit $47,64 \pm 3,85\%$ din răspunsul maxim sau $74,60 \pm 6,17\%$ în comparație cu contracția adrenergică primară (fig. 4). Astfel s-a stabilit că în prezența verapamilului, raviten a potențat efectul vasoconstrictor al fenilefrinei.

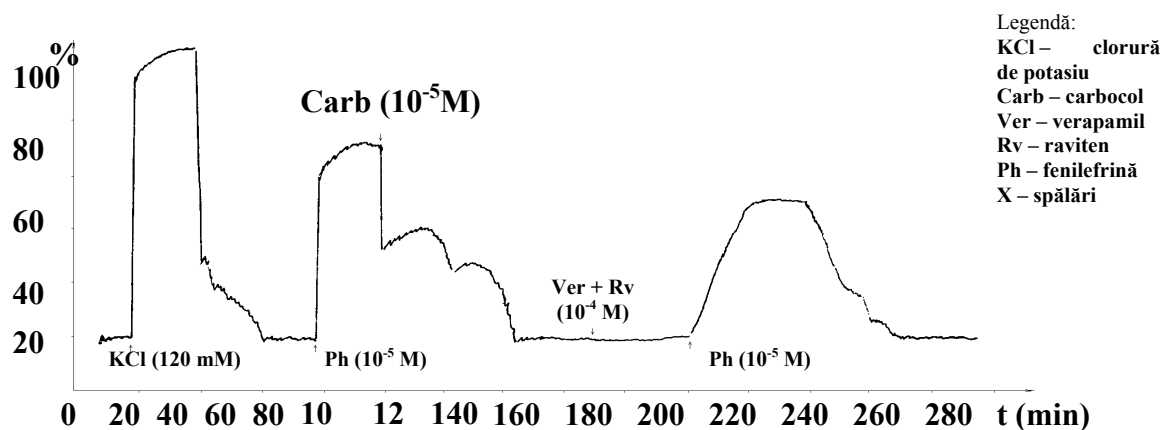


Fig. 4 Acțiunea fenilefrinei la blocarea canalelor lente de Ca^{++} cu verapamil și pe fondal de raviten

O altă serie de experiențe a avut ca scop utilizarea verapamilului în platoul de contracție adrenergică. (fig. 5). Inițial s-a testat reactivitatea maximă la KCl (120mM), ulterior mediul s-a spălat de substanța depolarizantă, iar vasele s-au relaxat. Administrarea fenilefrinei (10^{-5}M) a indus o vasoconstricție care a constituit $63,44 \pm 5,19\%$ din efectul constrictor al KCl (120mM). În platoul de contracție realizat de fenilefrină s-a utilizat verapamilul (10^{-4}M), care a anihilat treptat spasmul adrenergic, readucând tonusul vaselor la valorile bazale timp de 20-25 min.

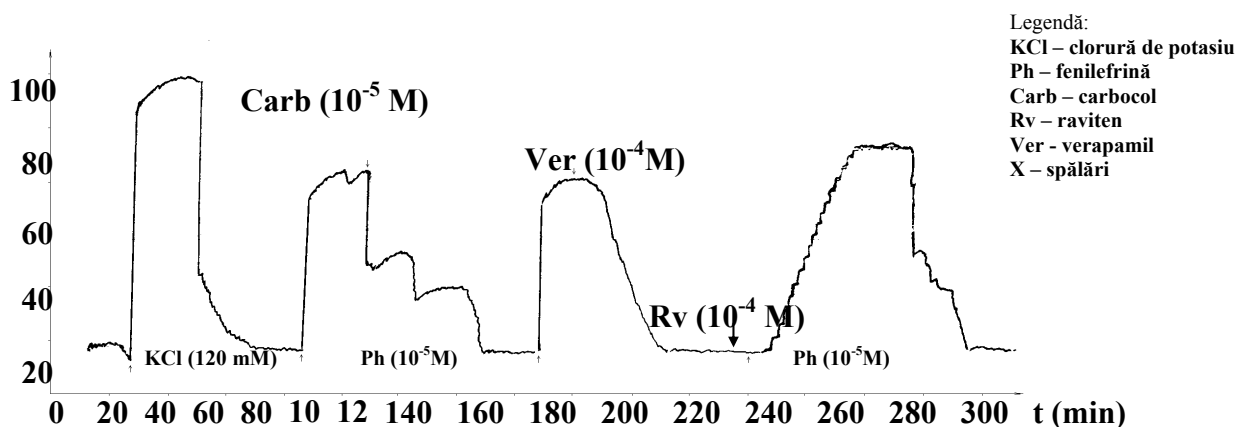


Fig. 5. Efectele ravitenului la plasarea verapamilului în platoul de contracție al fenilefrinei

Ravitenul (10^{-4}M), administrat pe asemenea fondal a restabilit contractilitatea vasculară, inducând un efect constrictor treptat (în scară), platoul cărui a constituit $67,43 \pm 5,57\%$ din efectul adrenergic primar, sau $42,76 \pm 4,61\%$ comparativ cu KCl (120 mM), (fig. 5). Menționăm că efectul a fost de lungă durată și s-a anihilat numai la înlăturarea preparatelor din mediu.

Analizând acțiunea ravitenului în combinație cu verapamil, blocant al canalelor lente de Ca^{2+} , S-a constatat o potențare a efectelor fenilefrinei. Pe fondal de verapamil, fenilefrina exercită o vasoconstricție nemodificată și de scurtă durată. Acest fapt indică despre abolirea rezervelor intracelulare de Ca^{2+} , iar influxul din mediul extracelular a fost stopat de verapamil. Totodată s-a demonstrat, că efectul vasodilatator al verapamilului a fost contramandat de raviten. Astfel s-a constatat, că în prezența ravitenului, fenilefrina, pe fondal de verapamil, a realizat o vasoconstricție cu platou stabil și îndelungat. Prin urmare, se evidențiază, că ravitenul modifică rezervele de Ca^{2+} intracelulare, element indispensabil în cuplarea proteinelor contractile. Modificând succesiunea remediilor administrate s-a stabilit, că administrarea verapamilului în platoul de contracție indus de fenilefrină a relaxat inelele, iar ravitenul a restabilit treptat vasoconstricția. Particularitatea menționată poate servi ca argument în favoarea ipotezei că raviten modifică influxul ionilor de Ca^{2+} chiar în prezența verapamilului. Cercetarea acțiunii

ravitenului în mediu fără Ca^{2+} a demonstrat, că remediul nu modifică valorile liniei bazale. Remarcabil, că la administrarea de CaCl_2 (2,5mM) efectele ravitenului s-au restabilit.

Așa dar, efectele induse de raviten sunt calciu dependente, iar substanța modifică transportul ionilor de Ca^{2+} la nivelul membranei celulare, posibil prin intermediul altor tipuri de canale implicate în schimbul ionilor de Ca^{2+} . De menționat că raviten a contractat și inele care erau pretratate cu prazosin și verapamil.

Cercetările efectuate de Спасов А.А. (1975; 1977) au demonstrat, că acțiunea constrictoare a ravitenului asupra musculaturii netede vasculare a arteriilor izolate, recoltate de la câine este dependentă de influxul ionilor de Ca^{2+} . La rândul lor, Southan G.L și colab. (1995) au demonstrat pe vase recoltate de la nivelul musculaturii scheletale de purcei, că L-NAME la fel induce vasoconstricție în prezența blocantelor canalelor de Ca^{2+} de tip L. Todiraș M. și colab. (1995) au relatat că inelele izolate de aortă de șobolan s-au contractat la administrarea angiotensinei II în prezența nifedipinei și L-NAME. Totodată, în aceleași lucrări se demonstrează, că nifedipina reduce cu 48,9% efectele L-NAME, dar nu le abolește. Prin urmare, și în experiențele noastre, ravitenul a restabilit vasoconstricția anterior reprodusă de verapamil, dar valorile lor au fost semnificativ reduse comparativ cu rezultatele obținute fără utilizarea inhibitorului canalelor de Ca^{2+} . Creșterea lentă a vasoconstricției produse de raviten în prezența verapamilului indică, că derivatul izotioureic modulează treptat influxul ionilor de Ca^{2+} . Astfel, prin intermediul unor metode experimentale de studiu a tonusului vaselor izolate s-a constatat, că ravitenul a modificat reactivitatea vasculară indusă de fenilefrină atât pe fondalul blocării receptorilor adrenergici, cât și în prezența inhibitorilor canalelor de Ca^{2+} .

Concluzii

Ravitenul stimulează influxul ionilor de Ca^{2+} în interiorul celulelor musculaturii netede vasculare în prezența inhibitorilor specifici ai canalelor lente de Ca^{2+} , factor absolut necesar în desfășurarea contracțiilor tonice.

Ravitenul a amplificat și contracția vasculară indusă prin depolarizarea membranei, mecanism independent de receptorii membranari.

Bibliografie

1. Lupu V., "Realizări științifice în farmacologie", Chișinău, 1999, p.147.
2. Rasmussen H., Kojima I., Apfeldorf W., Barrett P., "Cellular mechanisms of hormone action in the Kidney: messenger function of calcium and cyclic AMP". *Kidney Int.*, 1986, p.29, 90-97.
3. Rasmussen H., Takuwa Y., Park S., "Protein kinase muscle contraction. *FASEB J.*", 1987, 1, 177-185.
4. Southan G.J., Szabo Csaba, Connor M.P., Salzman A.L., Thiemerman C., Amidines are potent inhibitors of nitric oxide synthases: preferential inhibition of the inducible isoform. 1995, *Eur.jurn.of Pharmacol.*, 291, 311-318
5. Todiraș M // Contribuții la studiul relațiilor sistemului renină-angiotensină și monoxidului de azot la nivel cardio-vascular. Autoreferatul tezei de doctorat, Iași, 1995.
6. Спасов А.А. Биохимические аспекты механизма действия некоторых вазоактивных средств // Автореф. дис. докт. мед. наук. // М-1975, с.23.
7. Спасов А.А. Биохимические механизмы кардио и вазотропного действия сосудистых средств. // Фармакология процессов регуляции кровообращения. Труды ВГМИ. – Волгоград, 1977. ТХХХ Вып.3. с.23-90.