

Received: 30.03.2018
Accepted: 16.10.2018
Published: 09.01.2019

Rola kanałów potasowych aktywowanych przez jony wapnia o małej i średniej przewodności w zależnej od śródbłonka hiperpolaryzacji naczyń krwionośnych w fizjologii i nadciśnieniu tętniczym*

The role of small and intermediate conductance calcium-activated potassium channels in endothelial-dependent hyperpolarization in physiology and arterial hypertension

Monika Kloza¹, Marta Baranowska-Kuczko^{1,2}, Olga Karpińska¹, Hanna Kozłowska¹

¹Zakład Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

²Zakład Farmacji Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Streszczenie

Śródbłonek naczyniowy pełni ważną rolę w regulacji napięcia ścian naczyń krwionośnych poprzez syntezę i uwalnianie m.in. substancji rozszerzających, takich jak tlenek azotu (NO) i prostacyklina I₂ (PGI₂). Ważną, niezależną od NO i PGI₂ rolę w relaksacji naczyń – zwłaszcza o małej średnicy (<300 μm), pełni hiperpolaryzacja zależna od śródbłonka (EDH – endothelium-derived hyperpolarization). Odpowiedź EDH zapoczątkowuje wzrost stężenia jonów wapnia w komórce śródbłonka w wyniku działania agonistów (np. acetylocholiny, bradykininy) lub napięcia ścinającego przepływającej krwi. Zainicjowany zostaje klasyczny szlak związany z pobudzeniem śródbłonkowych kanałów potasowych aktywowanych przez jony wapnia o małej (K_{Ca}2.3) i średniej (K_{Ca}3.1) przewodności, wpływem jonów potasowych z komórki śródbłonka i hiperpolaryzacją, która przenosi się na komórki mięśni gładkich i prowadzi do rozkurczu naczyń oporowych z udziałem wewnątrzprostowniczych kanałów potasowych (K_{IR}) oraz pompy sodowo-potasowej (Na⁺/K⁺-ATP-aza). EDH może być kompensacyjnym mechanizmem w warunkach zmniejszonej biodostępności NO związanej z dysfunkcją śródbłonka m.in. w nadciśnieniu tętniczym, jednak jego siła działania zależy od łożyska naczyniowego, modelu patologicznego i warunków eksperymentu. W nadciśnieniu tętniczym kanały K_{Ca}2.3 i K_{Ca}3.1 mogą wykazywać zmniejszoną aktywność i/lub ekspresję, przez co osłabia się zdolność małych naczyń do rozkurczu. Obecnie trwają badania nad wykorzystaniem związków modulujących (aktywatorów i inhibitorów) aktywność kanałów potasowych K_{Ca}2.3 i K_{Ca}3.1 jako prawdopodobny punkt uchwytu działania leków w terapii chorób układu krążenia. Aktywatory K_{Ca}2.3 i K_{Ca}3.1 np. SKA-31 obiecująco poprawiają odpowiedź zależną od EDH i polepszają funkcję śródbłonka oraz obniżają ciśnienie krwi. Może to sugerować przydatność tych związków w terapii nadciśnienia tętniczego.

Słowa kluczowe:

hiperpolaryzacja zależna od śródbłonka – EDH • K_{Ca}2.3 • K_{Ca}3.1 • nadciśnienie tętnicze • inhibitory K_{Ca}2.3/K_{Ca}3.1 • aktywatory K_{Ca}2.3/K_{Ca}3.1

*Publikacja finansowana z funduszy zadania badawczego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku nr N/ST/ZB/17/004/2213

Summary

The endothelium plays a crucial role in modulating vascular tone by synthesizing and releasing endothelium-derived relaxing factors, including nitric oxide (NO) and prostacyclin I_2 (PGI_2). Additionally, endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) that is NO – and PGI_2 – independent participates in the relaxation of small-diameter blood vessels ($<300 \mu m$). EDH response is initiated by agonists (e.g. acetylcholine, bradykinin) – or shear stress – induced increase of calcium ions level in the endothelium and involves opening of the endothelial small ($K_{Ca}2.3$) and intermediate conductance ($K_{Ca}3.1$) calcium-activated potassium channels. The efflux of potassium ions could elicit the hyperpolarization of the surrounding myocytes by the activation of the inward-rectifier potassium ion channel (K_{IR}) and/or Na^+/K^+ -ATPase. The reduced release and/or bioavailability of NO, which is characteristic for endothelial dysfunction and may result in arterial hypertension, stimulate the generation of EDH signals, as a compensatory mechanism to maintain the endothelial control of vasodilator tone. The contribution of EDH in endothelium-dependent relaxation varies between vascular beds, animal and experimental model. In arterial hypertension the reduced expression/activity of $K_{Ca}3.1$ and $K_{Ca}2.3$ results in impaired vasorelaxation. Currently, the use of modulatory compounds (activators and inhibitors) of $K_{Ca}3.1$ and $K_{Ca}2.3$ as the potential therapeutic targets in cardiovascular diseases is under intensive investigation. It has already been known that application of activators of $K_{Ca}3.1$ and $K_{Ca}2.3$ potassium channels such (as SKA-31) can improve the EDH-type responses, the endothelial function and decrease mean arterial blood pressure. This may suggest the usefulness of these compounds in the treatment of arterial hypertension.

Keywords: EDH-type relaxation • $K_{Ca}2.3$ • $K_{Ca}3.1$ • arterial hypertension • inhibitors of $K_{Ca}2.3/K_{Ca}3.1$ • activators of $K_{Ca}2.3/K_{Ca}3.1$

GICID 01.3001.0012.8388
DOI: 10.5604/01.3001.0012.8388
Word count: 5274
Tables: 3
Figures: 6
References: 77

Adres autorki: mgr Monika Kloza, Zakład Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2A, 15-222 Białystok, e-mail: monika.kloza@umb.edu.pl

Wykaz skrótów: **AC** – cyklaza adenylnowa, **Ach** – acetylocholina, **b.d.** – brak danych, **cAMP** – cykliczny adenylozomonofosforan, **cgMP** – cykliczny guanozynomonofosforan, **Ca²⁺** – jony wapnia, **[Ca²⁺]_i** – wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia, **Ca_v1.2** – kanały wapniowe aktywowane napięciem, **CO** – tlenek węgla, **COX** – cyklooksygenaza, **Cx** – koneksyna, **EC₅₀** – molowe stężenie agonisty, przy którym zostało osiągnięte 50% efektu maksymalnego, **EDH** – hiperpolaryzacja zależna od śródbłonna, **EDHF** – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący, **EDRF** – czynniki rozkurczające pochodzące ze śródbłonna, **eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu, **EETs** – kwasy epoksy-eikozatrienowe, **ER** – retikulum endoplazmatyczne, **GC** – cyklaza guanylanowa, **H₂O₂** – nadtlenek wodoru, **H₂S** – siarkowodór, **IC₅₀** – molowe stężenie antagonisty, przy którym zahamowano efekt maksymalny o 50%, **IP₃** – trifosforan inozytolu, **K⁺** – jony potasu, **K_{Ca}** – kanały potasowe aktywowane jonami wapnia, **K_{Ca}1.1** – kanały potasowe aktywowane jonami wapnia o dużej przewodności, **K_{Ca}2.3** – kanały potasowe aktywowane jonami wapnia o małej przewodności, **K_{Ca}3.1** – kanały potasowe aktywowane jonami wapnia o średniej przewodności, **K_{IR}** – wewnątrzprostownicze kanały potasowe, **K_v11.1**, **K_v1.3** – kanały potasowe aktywowane napięciem, **L-NAME** – ester metylowy N^ω-nitro-L-argininy, inhibitor syntazy tlenu azotu, **Na⁺** – jony sodu, **Na⁺/K⁺-ATP-aza** – pompa sodowo-potasowa, **NO** – tlenek azotu, **PGI₂** – prostacyklina I_2 , **RT-PCR** – łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkryptazą, **SHR** – szczury z nadciśnieniem spontanicznym, **SHR-SP** – szczury z nadciśnieniem spontanicznym podatne na udar mózgu, **TRP** – kanał przejściowego potencjału, **WKY** – szczury Wistar Kyoto.

ZNACZENIE ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO W REGULACJI ŚREDNICY NACZYŃ KRWIONOŚNYCH

Śródbłonek naczyniowy odpowiada za wiele procesów fizjologicznych, takich jak: synteza i sekrecja substancji biologicznie czynnych, regulacja ciśnienia i przepływu krwi, uczestniczy w angiogenezie, krzepnięciu krwi, fibrynolizie oraz reakcjach zapalnych i odpornościowych. Pełni znaczącą funkcję w regulacji napięcia ścian naczyń krwionośnych. Uwalnia zarówno czynniki kurczące: endotelinę-1, tromboksan A_2 oraz rozkurczające naczynia krwionośne m.in. tlenek azotu (NO), prostacyklinę I_2 (PGI_2). Ważną rolę w relaksacji naczyń, zwłaszcza o małej średnicy (<300 μm) pełni hiperpolaryzacja zależna od śródbłonka (EDH – endothelium-derived hyperpolarization), której klasyczny szlak jest związany z pobudzeniem kanałów potasowych aktywowanych przez jony wapnia (K_{Ca}) o małej ($K_{Ca}2.3$) i średniej ($K_{Ca}3.1$) przewodności [1]. EDH doprowadza do relaksacji naczyń krwionośnych [46, 50].

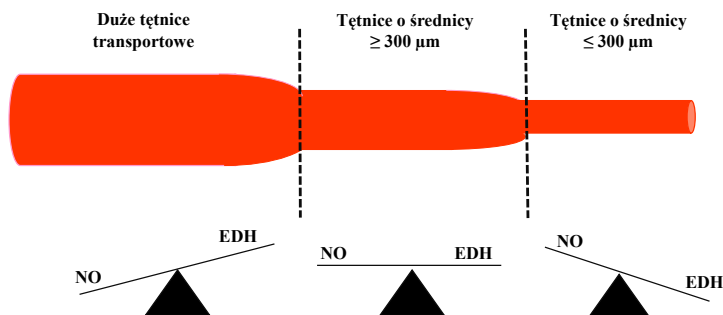
Po raz pierwszy znaczenie śródbłonka w procesie rozkurczu naczyń udowodnili w 1980 r. R. Furchgott i J. Zawadzki. W doświadczeniu przeprowadzonym na izolowanej aorticie piersiowej królika, z uszkodzonym śródbłonkiem naczyniowym, acetylocholina (ACh) nie działała wazodylatacyjnie. Na tej podstawie wywnioskowano, że w czasie niszczenia śródbłonka, nie uwalnia się czynnik relaksacyjny, który został nazwany śródbłonkowym czynnikiem rozkurczającym (EDRF – endothelium-derived relaxing factor) [30]. Ten historyczny eksperyment zmienił dotychczasowy pogląd o lokalnej kontroli napięcia naczyniowego. W późniejszych badaniach wykazano, że czynnikiem tym jest NO [39], który odgrywa główną rolę w regulacji napięcia naczyń tętniczych o funkcji transportowej [71]. Jego znaczenie maleje wraz ze zmniejszaniem średnicy naczynia (ryc. 1). Prostacyklina I_2 jest wytwarzana przez komórki śródbłonka w odpowiedzi na czynniki humoralne i mechaniczne, nie bierze udziału w utrzymaniu podstawowego

napięcia ścian naczyń, a pełni jedynie funkcję regulacyjną pod wpływem działających bodźców. Jej rola jest stała, bez względu na zmianę średnicy naczynia [63].

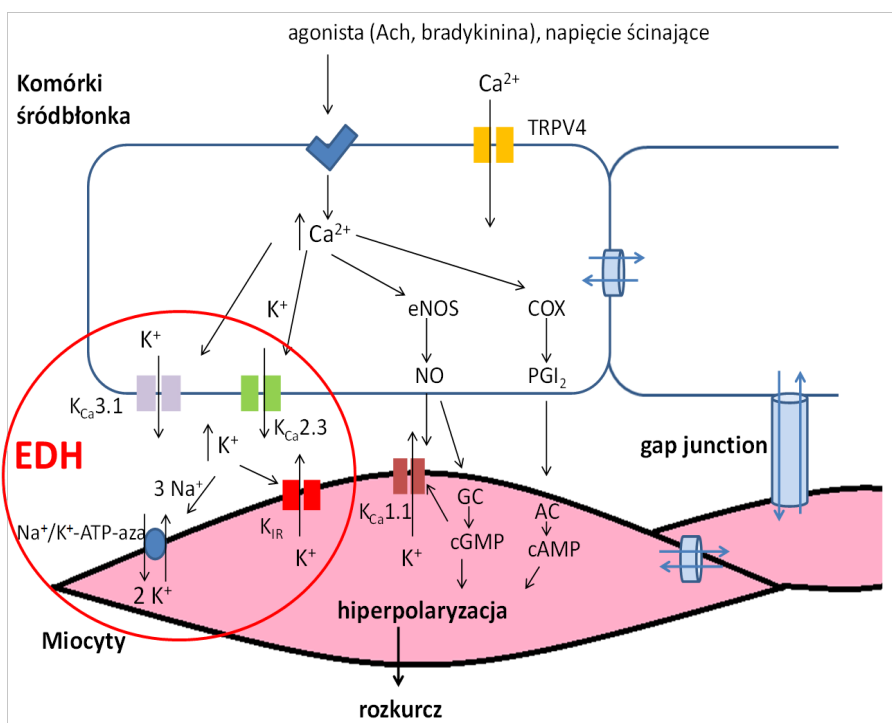
Przez wiele lat do grupy czynników wpływających na relaksację mięśni gładkich naczyń – oprócz NO i PGI_2 – zaliczano śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF – endothelium-derived hyperpolarizing factor), który po raz pierwszy opisali w 1988 r. Félétou i Vanhoute. W przeprowadzonym doświadczeniu na izolowanej tętnicy wieńcowej psa przy łącznej blokadzie syntazy tlenku azotu (eNOS) przez ester metylowy N^{ω} -nitro-L-argininy (L-NAME) oraz cyklooksygenazy przez indometacynę, acetylocholina nadal zachowywała zdolność rozkurczową badanego naczynia. Na tej podstawie postawiono hipotezę o istnieniu dodatkowego czynnika powodującego hiperpolaryzację i relaksację naczyń, czyli EDHF [25]. Dotąd poznano wiele potencjalnych czynników, które mogłyby pełnić te role. Należą do nich m.in. jony potasowe (K^+), kwasy epoksyekoatrienowe (EETs), nadtlenek wodoru (H_2O_2), połączenia szczelinowe (gap junctions), tlenek węgla (CO), siarkowodor (H_2S) [24, 47]. Jednak ze względu na mnogość czynników zaangażowanych w ten proces, a także to, że napięcie ścinające przepływającej krwi („shear stress”) także powoduje hiperpolaryzację i w następstwie relaksację naczynia, używanie określenia EDHF okazało się kłopotliwe i stało się nieaktualne, gdyż sama nazwa mylnie sugeruje istnienie tylko jednego czynnika. Od 2013 r. zaleca się stosowanie terminu: „hiperpolaryzacja zależna od śródbłonka” do opisu całego procesu zachodzącego w naczyniach krwionośnych o małej średnicy [26].

HIPERPOLARYZACJA ZALEŻNA OD ŚRÓDBŁONKA (EDH)

Mechanizm hiperpolaryzacji zależnej od śródbłonka odgrywa główną rolę w relaksacji naczyń oporowych (ryc. 1, 2). Reakcja EDH może być zapoczątkowana zarówno chemicznie przez związanie receptora z ligandem (m.in. Ach, bradykininą) lub mechanicznie przez



Ryc. 1. Zależność między średnicą naczynia krwionośnego a udziałem tlenku azotu (NO) i hiperpolaryzacji zależnej od śródbłonka (EDH) w kontroli napięcia naczyniowego (wg [63] zmodyfikowano)



Ryc. 2. Szlak hiperpolaryzacji zależnej od śródbłonna (EDH). Wzrost stężenia jonów wapnia Ca^{2+} w komórkach śródbłonna aktywowanych agonistą (np. bradykininą, acetylocholiną; Ach) lub napięciem ścinającym prowadzi do otwarcia kanałów potasowych o średniej i małej przewodności (odpowiednio $K_{Ca3.1}$ i $K_{Ca2.3}$) i wypływu jonów potasu (K^+) do przestrzeni międzykomórkowej. Jony K^+ pobudzają wewnątrzprzostownicze kanały potasowe (K_{IR}) oraz pompę sodowo-potasową ($Na^+/K^+-ATP-aza$) obecną w błonie komórki mięśniowej naczynia krwionośnego. Wzrost stężenia jonów wapnia Ca^{2+} w komórkach śródbłonna aktywuje również syntazę tlenku azotu (eNOS) oraz cyklooksygenazę (COX), zaangażowane w syntezę związków wazorelaksacyjnych: odpowiednio tlenku azotu (NO) i prostacykliny I_2 (PGI_2) działających za pośrednictwem kanałów potasowych aktywowanych przez jony wapnia o dużej przewodności ($K_{Ca1.1}$) i cyklicznego adenozyńmonofosforanu (cAMP). Na^+ - jony sodu; TRPV4 - kanały wapniowe zależne od potencjału; GC - cyklaza guanylanowa; cGMP - cykliczny guanozynomonofosforan; AC - cyklaza adenylanowa (wg [23, 34] zmodyfikowano)

działanie napięcia ścinającego płynącej krwi [2, 47]. Oba te zjawiska powodują wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [Ca^{2+}]. Jony Ca^{2+} pochodzą z dwóch źródeł: magazynu znajdującego się w siateczce endoplazmatycznej (ER) lub ich napływu z zewnątrz przez otwarte kanały wapniowe zależne od potencjału (TRP, transient receptor potential), zwłaszcza TRPV4 [23, 28]. Wysokie stężenie [Ca^{2+}]_i w komórce endotelium, może bezpośrednio aktywować kanały potasowe $K_{Ca2.3}$ i $K_{Ca3.1}$, natomiast pośrednio kanały potasowe aktywowane przez jony wapnia o dużej przewodności – $K_{Ca1.1}$ w miocytach [31]. Kanały potasowe $K_{Ca2.3}$ i $K_{Ca3.1}$ znajdują się głównie na powierzchni komórek śródbłonna i to im przypisuje się znaczącą rolę w procesie EDH [44] (tabela 1). Przez otwarte kanały potasowe następuje wypływ jonów K^+ z komórek śródbłonna do przestrzeni otaczającej, dochodzi do zwiększenia polarności błon, czyli ich hiperpolaryzacji. Stan ten w sposób bierny, dzięki obecności połączeń szczelinowych (gap junctions), przenoszony jest między sąsiadującymi komórkami homotypowymi (komórka śródbłonna – komórka śródbłonna) jak i heterotypowymi (komórka śródbłonna

– komórka mięśni gładkich) [67]. Ponadto za rozprzestrzenianie się hiperpolaryzacji ze śródbłonna na miocyty, mogą również odpowiadać uwolnione jony K^+ zwane „chmurą potasową”. Umiarkowany wzrost jonów K^+ w przestrzeni międzykomórkowej (<15 mM) może wywołać hiperpolaryzację i rozkurcz mięśni gładkich przez aktywację wewnątrzprzostowniczych kanałów potasowych (K_{IR}) oraz pompy sodowo-potasowej ($Na^+/K^+-ATP-aza$) znajdujących się w błonie komórki mięśniowej [23, 47] (ryc. 2). Kanały potasowe zależne od Ca^{2+} o dużej przewodności ($K_{Ca1.1}$), które znajdują się głównie w komórkach mięśni gładkich naczyń w sposób pośredni mogą uczestniczyć w ich hiperpolaryzacji. Ich pobudzenie następuje przez dyfundujące ze śródbłonna czynniki rozkurczające, których synteza indukowana jest przez wysokie stężenie jonów Ca^{2+} (np. EETs, H_2O_2 , NO) [44]. Kanały $K_{Ca1.1}$ mogą być aktywowane przez NO bezpośrednio lub pośrednio przez cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP), który jest pozytywnym modulatorem tych kanałów [61]. W wyniku opisanych wyżej procesów dochodzi do rozkurczu naczyń krwionośnych (ryc. 2, tabela 1).

MECHANIZM ROZPRZESTRZENIANIA SIĘ HIPERPOLARYZACJI MIĘDZY KOMÓRKAMI ŚRÓDBŁONKA ORAZ KOMÓRKAMI ŚRÓDBŁONKA I MIĘŚNI GŁADKICH NACZYŃ KRWIONOŚNYCH

Ściany tętniczek oporowych są zbudowane z pojedynczej warstwy komórek śródbłonka, oddzielonych błoną podstawną od warstwy mięśni gładkich. Mimo odgraniczenia warstw przez włókna kolagenowe i elastynowe, zostaje zachowana między nimi komunikacja. W błonie podstawnej znajdują się przestrzenie, w które wnikają fragmenty śródbłonka, dzięki którym komórki pozostają w bezpośrednim sąsiedztwie miocytów [76]. W takim umiejscowieniu komórki endotelium mają charakterystyczną budowę. Zawierają następujące struktury: retikulum endoplazmatyczne (ER), gap junctions, receptory trifosforanu inozytolu (IP_3), $K_{Ca}3.1$. Na szczególną uwagę zasługuje liczne występowanie $K_{Ca}3.1$, w miejscu połączeń mięśniowo-śródbłonkowych, zwłaszcza w bliskim sąsiedztwie ER [3] (ryc. 3). Retikulum endoplazmatyczne jest głównym źródłem Ca^{2+} w komórce. Jego uwolnienie następuje pod wpływem stymulacji receptorów IP_3 i/lub samych kanałów Ca^{2+} , ma to charakter powtarzających się prądów jonowych. Jony Ca^{2+} uwolnione z ER otwierają kanały $K_{Ca}3.1$, a także aktywują Na^+/K^+ -ATP-azę i kanały potasowe K_{IR} obecne w błonie komórki mięśniowej. Następuje wpływ jonów K^+ do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i hiperpolaryzacji komórek, która rozprzestrzeniając się lokalnie, jest mechanizmem regulacji napięcia naczyń oporowych, powodując ich rozkurcz [21, 22, 59].

Drugim regionem o swoistej organizacji jest obszar połączenia dwóch komórek śródbłonka. W sąsiadujących komórkach często tworzą się charakterystyczne zagłębienia nazywane kaweolami (ryc. 4). W tych miejscach występują licznie kanały $K_{Ca}2.3$, połączenia szczelinowe (zbudowane z koneksyn: Cx37, Cx40 i Cx43) oraz kanały TRP, zwłaszcza TRPV4 [58]. Zachodząca w tym obszarze hiperpolaryzacja zależy bezpośrednio od otwarcia kanałów $K_{Ca}2.3$ [65]. Warto zaznaczyć, że w naczyniach w stanie spoczynku, czyli przy braku czynników wazokonstrykcyjnych, reakcja EDH jest związana głównie z aktywacją kanałów $K_{Ca}2.3$ i zostaje przekazana na miocyty przez śródbłonkowo-mięśniowe połączenia szczelinowe [23], a przy pobudzeniu, czyli w naczyniach stymulowanych przez czynnik wazokonstrykcyjny, hiperpolaryzacja jest zależna zarówno od otwarcia kanału $K_{Ca}2.3$, jak i $K_{Ca}3.1$ [21].

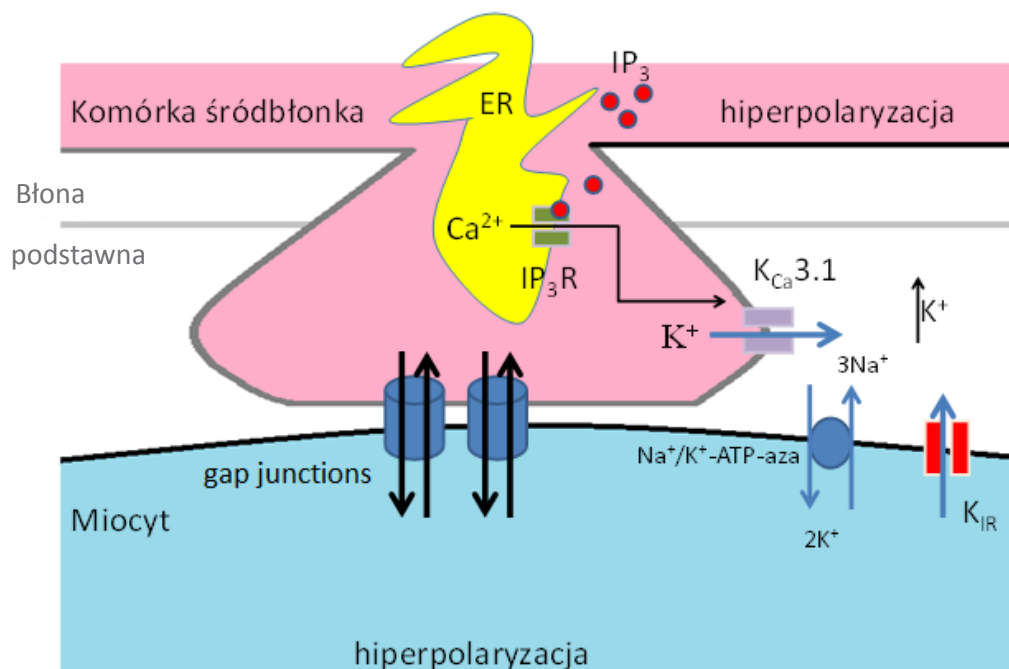
ŚRÓDBŁONKOWE KANAŁY POTASOWE AKTYWOWANE PRZEZ JONY WAPNIA

W tabeli 1 zestawiono cechy kanałów potasowych aktywowanych przez jony wapnia, najczęściej występujących w śródbłonku naczyniowym ($K_{Ca}2.3$ i $K_{Ca}3.1$), a dla porównania w miocytach naczyń krwionośnych ($K_{Ca}1.1$).

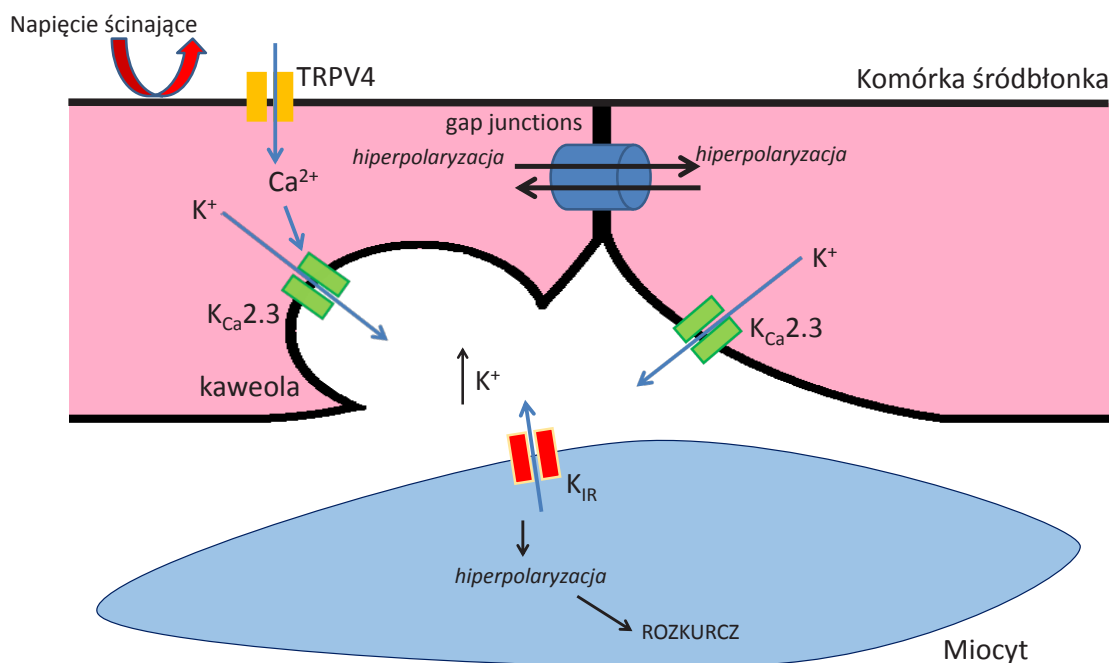
Kanały $K_{Ca}2.3$ oraz $K_{Ca}3.1$ wykazują ekspresję na komórkach śródbłonka całego łożyska naczyniowego, co potwierdzono u przedstawicieli wszystkich dotychczas zbadanych gatunków, m.in. człowieka, świni, krowy, psa,

Tabela 1. Charakterystyka kanałów potasowych aktywowanych przez jony wapnia znajdujące się w ścianie naczyń krwionośnych. $[Ca^{2+}]_i$ - wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia; NO - tlenek azotu; CO - tlenek węgla; EETs - kwasy epoksyekoizotrienowe; H_2S - kwas siarkowodorowy, pS – pikosimensy; na podstawie [2, 34, 49].

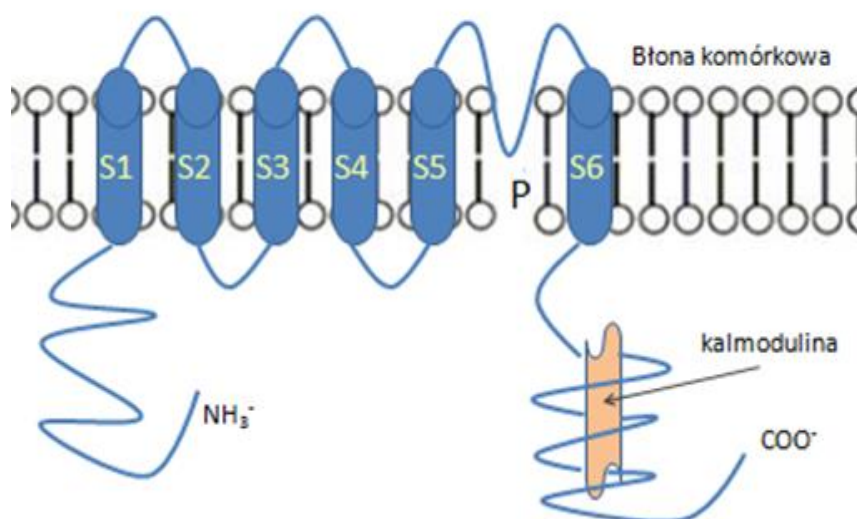
| Cecha | Kanały potasowe aktywowane przez jony wapnia obecne w naczyniach krwionośnych | | |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Przewodność dla jonów potasu | mała; 10 pS | średnia; 20-80 pS | duża; 240 pS |
| Podtyp | $K_{Ca}2.3$ (SK_{Ca}) | $K_{Ca}3.1$ (HK_{Ca}) | $K_{Ca}1.1$ (BK_{Ca}) |
| Geny kodujące | KCNN3 | KCNN4 | KCNMA1 - podjednostka α ; KCNMB1 - podjednostka β |
| Rozmieszczenie w naczyniach | Komórki śródbłonka w miejscu połączenia dwóch komórek śródbłonka, kaweole | Komórki śródbłonka w miejscu połączeń mięśniowo-śródbłonkowych | Komórki mięśni gładkich ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej |
| Wrażliwość na jony wapnia | Jony Ca^{2+} - połączone z kalmoduliną | Jony Ca^{2+} - połączone z kalmoduliną | jony Ca^{2+} |
| Zależność od napięcia | - | - | + |
| Fizjologiczne czynniki pobudzające | Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ | Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ | Wzrost $[Ca^{2+}]_i$; depolaryzacja; CO; NO; EETs; H_2S ; kinaza białkowa A; kinaza białkowa B |
| Fizjologiczne czynniki hamujące | Spadek $[Ca^{2+}]_i$ | Spadek $[Ca^{2+}]_i$ | Spadek $[Ca^{2+}]_i$; hiperpolaryzacja; kinaza białkowa C |



Ryc. 3. Rozmieszczenie kanałów $K_{Ca3.1}$ w obszarze śródłonkowo-mięśniowym i proponowany mechanizm ich aktywacji przez uwalniane prądy jonów wapnia (Ca^{2+}) z retikulum endoplazmatycznego (ER). $K_{Ca3.1}$ - kanał potasowy aktywowany przez jony wapnia o średniej przewodności; K_{IR} - wewnątrzprostwniczny kanał potasowy; IP_3R - receptor dla trifosforanu inozytolu; IP_3 - trifosforan inozytolu; K^+ - jony potasu; gap junctions - połączenia szczelinowe (wg [3, 22, 34] zmodyfikowano)



Ryc. 4. Rozmieszczenie kanałów jonowych w błonie komórkowej sąsiadujących komórek śródłonka. $K_{Ca2.3}$ - kanał potasowy aktywowany przez jony wapnia o małej przewodności; K_{IR} - wewnątrzprostwniczny kanał potasowy; TRPV4 - kanał wapniowy zależny od potencjału; gap junctions - połączenia szczelinowe; K^+ - jony potasu; Ca^{2+} - jony wapnia (wg [23] zmodyfikowano)



Ryc. 5. Schemat podjednostki budującej kanały potasowe aktywowane przez jony wapnia o małej ($K_{Ca}2.3$) i średniej ($K_{Ca}3.1$) przewodności z sześcioma domenami S1-S6 i końcem karboksylowym wiążącym kalmodulinę. Szczelina oznaczona symbolem P została utworzona pomiędzy domenami S5 i S6 (wg [17] zmodyfikowano)

szczura [8, 18, 48, 52, 53, 60]. W warunkach fizjologicznych komórki mięśniowe nie mają na swojej powierzchni tych kanałów [24, 34]. Ten stan może ulec jednak zmianie w patologii. W odpowiedzi na uszkodzenie naczyń, spowodowane np. przezskórną śródnacyniową angioplastyką wieńcową, pomostowaniem aortalno-wieńcowym lub w wyniku rozwijającej się miażdżycy na powierzchni miocytów tworzących nadmiernie rozrastającą się błonę wewnętrzną (tzw. neointymę) stwierdzono obecność kanałów $K_{Ca}3.1$ [44, 74]. Należy jednak pamiętać, że kanały potasowe $K_{Ca}2.3$ i $K_{Ca}3.1$ są nie tylko na komórkach śródbłonna. U ludzi $K_{Ca}3.1$ znajdują się również na krwinkach białych i czerwonych, gdzie są zaangażowane w zależną od jonów Ca^{2+} odpowiedź immunologiczną oraz regulują objętość erytrocytów [27, 34]. W nabłonku jelit, oskrzeli i ślinianek odpowiadają za wytwarzanie m.in. śliny czy śluzu [48]. Kanały $K_{Ca}2.3$ występują w neuronach dopaminergicznych ośrodkowego układu nerwowego pośredniczą w kontroli czasu refrakcji. Ich obecność stwierdzono także w mięśniach szkieletowych, w pęcherzu moczowym, rdzeniu kręgowym, zwojach korzeni grzbietowych, sercu [45].

Kanały potasowe $K_{Ca}2.3$ i $K_{Ca}3.1$ są zbudowane z czterech jednakowych podjednostek α , kodowanych przez następujące geny: *KCNN3* dla $K_{Ca}2.3$ oraz *KCNN4* dla $K_{Ca}3.1$. Każda podjednostka zawiera sześć transbłonowych domen (S1-S6), z końcem NH_2 i $COOH$ zwróconym do wnętrza komórki (ryc. 5). W domenie S4 brak jest regionu bogatego w argininę, który odpowiada za wrażliwość receptora na zmiany napięcia błony [34, 45]. Właściwy otwór kanału zlokalizowano między regionem S5-S6, natomiast kalmodulina wchodzi w interakcję z C-końcem łańcucha polipeptydowego.

FARMAKOLOGIA KANAŁÓW POTASOWYCH AKTYWOWANYCH PRZEZ JONY WAPNIA O MAŁEJ ($K_{Ca}2.3$) I ŚREDNIEJ ($K_{Ca}3.1$) PRZEWODNOŚCI

Związki, które aktywują lub hamują śródbłonkowe K_{Ca} są przeważnie modulatorami, które samodzielnie nie powodują otwarcia/zamknięcia kanałów, a zmieniają ich konformację przestrzenną. Jest to związane ze zwiększeniem wrażliwości na jony Ca^{2+} , dzięki czemu niższe stężenie tych jonów jest konieczne do otwarcia kanałów $K_{Ca}2.3$ i $K_{Ca}3.1$ (modulatory pozytywne) lub dochodzi do zmniejszenia wrażliwości na jony Ca^{2+} , co powoduje, że znacznie wyższe stężenie tych jonów jest konieczne do otwarcia kanałów potasowych (modulatory negatywne) [13, 74]. W dostępnym piśmiennictwie nomenklatura jest niejednolita [13, 36, 74], dla uproszczenia, w pracy modulatory pozytywne i negatywne będą nazywane odpowiednio aktywatorami i blokerami/inhibitorami [1].

AKTYWATORY

Wszystkie dotychczas poznane aktywatory kanałów $K_{Ca}2.3$ i $K_{Ca}3.1$ są pochodzenia syntetycznego (tabela 2). Pierwszym wprowadzonym do lecznictwa był riluzol, który słabo i nieselektywnie pobudza $K_{Ca}2.3$ oraz $K_{Ca}3.1$ [35]. Może również blokować kanały sodowe znajdujące się na neuronach i kanały K_{IR} . Wykorzystany został w terapii stwardnienia zanikowego bocznego, ze względu na hamowanie procesów wywoływanych przez kwas glutaminowy, a wpływ na kanały K_{Ca} był jedynie działaniem dodatkowym [13]. Innym poznany związek był 1-EBIO (1-ethyl-2-benzimidazolinone) [19], który wykazuje cechy słabego aktywatora z większym powinowactwem do $K_{Ca}3.1$ niż $K_{Ca}2.3$. Jego wykorzystanie ogranicza się jedynie do badań laboratoryjnych.

Nowszymi aktywatorami o znacznie silniejszym działaniu są NS309 [69] i SKA-31 [60]. NS309 charakteryzuje się mniejszą selektywnością niż SKA-31 (tabela 2). Poza kanałami K_{Ca} aktywuje zależne od napięcia kanały potasowe ($K_v11.1$) i kanały wapniowe ($Ca_v1.2$) oraz receptory adenozyliny A_{2A} [6, 23]. Oba związki wykazują działanie rozkurczowe w naczyniach krwionośnych. NS309 wywoływał zależny od śródbłonna i szlaku EDH rozkurcz izolowanych tętnic płucnych człowieka i krezkowych szczura [48, 66]. Poprawiał też wyraźnie funkcję śródbłonna i reakcję zależną od EDH w małych izolowanych tętnicach krezkowych szczurów z cukrzycą typu 1 [5]. Powodował słabszą relaksację naczyń krezkowych szczurów z nadciśnieniem indukowanym octanem deoksykortykosteronu i zwiększoną podażą soli (model DOCA-salt) w porównaniu z normotensyjną kontrolą [42].

SKA-31 działa zarówno na kanały $K_{Ca}3.1$ jak i $K_{Ca}2.3$, przy czym wykazuje większą aktywność wobec $K_{Ca}3.1$, np. w tętnicach szyjnych myszy [36, 60]. Charakteryzuje się korzystnymi właściwościami farmakokinetycznymi, m.in. słabym wiązaniem z białkami oraz brakiem tok-

syczności wobec tkanek [60]. Jak dotąd wpływ SKA-31 na obniżenie ciśnienia tętniczego krwi w warunkach *in vivo* został wykazany u normotensyjnych myszy [56, 60], świń [52] i psów rasy beagle [18], a także u myszy z nadciśnieniem tętniczym indukowanym angiotensyną II [60] oraz wywołanym supresją genu kodującego $K_{Ca}2.3$ [4].

W badaniach *in vitro* w izolowanym bijącym sercu, podanie SKA-31 znacznie zwiększyło przepływ krwi w naczyniach wieńcowych [51]. SKA-31 powodował zależnie od wieku i płci relaksację izolowanej tętnicy krezkowej górnej myszy [46]. Ponadto w badaniach na izolowanych tętnicach krezkowych szczura wykazano, że zależne od EDH działanie relaksacyjne SKA-31 nie różniło się u zwierząt normotensyjnych WKY (Wistar Kyoto) i u zwierząt z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym SHR (spontaneously hypertensive rat) [41, 62]. Badania te mogą wskazywać na poprawianie funkcji śródbłonna przez SKA-31.

Uzyskana odpowiedź hipotensyjna oraz korzystne działanie rozkurczowe naczyń krwionośnych pod wpływem SKA-31 może być w przyszłości wykorzystane w obni-

Tabela 2. Porównanie siły działania aktywatorów i blokerów kanałów potasowych aktywowanych przez jony wapnia o małej ($K_{Ca}2.3$) i średniej ($K_{Ca}3.1$) przewodności. IC_{50} - molowe stężenie antagonisty, przy którym zahamowano efekt maksymalny o 50%; EC_{50} - molowe stężenie agonisty, przy którym zostało osiągnięte 50% efektu maksymalnego; nM - nanomole; μ M – mikromole; na podstawie [15, 74]

| | Substancje aktywne | $K_{Ca}2.3$ | $K_{Ca}3.1$ |
|----------------------------------|--------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Aktywatory (EC_{50}) | Riluzol | 10-20 μ M | 10-20 μ M |
| | 1-EBIO | 87-600 μ M | 24-80 μ M |
| | NS309 | 120-900 nM | 10-27 nM |
| | SKA-31 | 3 μ M | 260 nM |
| | SKA-111 | 13,7 μ M | 111 nM |
| | SKA-121 | 4,4 μ M | 190 nM |
| Blokery/Inhibitory (IC_{50}) | Charybdotoksyna | Brak działania przy stężeniu 1 μ M | 2-28 nM |
| | TRAM-34 | 20 μ M | 10-25 nM |
| | Senicapoc | >10 μ M | 11 nM |
| | Apamina | 1-13 nM | Brak działania przy stężeniu 1 μ M |
| | NS6180 | >10 μ M | 11 nM |
| | UCL1684 | 6-10 nM | Brak działania przy stężeniu 1 μ M |

zaniu ciśnienia tętniczego. Wprawdzie spadek ciśnienia krwi u psów i świń był krótkotrwały, a to może skutecznie ograniczyć użyteczność SKA-31 w długoterminowym leczeniu chorych z nadciśnieniem. Istnieje jednak grupa pacjentów mogących odnieść potencjalną korzyść w stosowaniu krótko działających agonistów, m.in. z nadciśnieniem tętniczym opornym na konwencjonalne leczenie; nadciśnieniem tętniczym pojawiającym się podczas zabiegów chirurgicznych; u pacjentów ze skurczem naczyń niewrażliwych na donory NO bądź z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc, gdy stosowanie np. antagonistów receptorów β -adrenergicznych jest przeciwwskazane [45]. W tabeli 2 zestawiono substancje oddziaływające na kanały $K_{Ca}3.1$ i $K_{Ca}2.3$ z uwzględnieniem ich selektywności.

BLOKERY/INHIBITORY

Pierwszymi stosowanymi w badaniach blokerami kanałów K_{Ca} były toksyny pochodzenia naturalnego: charybdotoksyna i apamina (tabela 2). Charybdotoksyna jest związkiem wyizolowanym z jadu skorpiona, który blokuje kanały $K_{Ca}3.1$ [33]. Niestety nie jest idealnym inhibitorem, ponieważ wpływa również na kanały $K_{Ca}1.1$ oraz $K_{V}1.3$ [74]. Zastosowanie pochodnych klotrimazolu: TRAM-34 i ICA-17043 (syn. senicapoc) o znacznie większej selektywności wobec $K_{Ca}3.1$, skutecznie zastąpiło stosowaną w badaniach charybdotoksynę [75]. Najnowszym poznanym związkiem o podobnych właściwościach jest NS6180 [68].

Tabela 3. Porównanie zmian ekspresji wybranych kanałów jonowych i białek w ścianie naczyń krwionośnych oraz siły działania hiperpolaryzacji zależnej od śródbłonna (EDH) u szczurów hipertensyjnych w porównaniu do odpowiednich normotensyjnych kontroli

| Model nadciśnienia tętniczego | Naczynie | Ekspresja | | | | EDH | Piśmiennictwo |
|--------------------------------|----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|-----|---------------|
| | | $K_{Ca}3.1$ | $K_{Ca}2.3$ | $K_{IR}2.1$ | Na^+/K^+ -ATP-aza | | |
| SHR-SP | Drugie odgałęzienie tętnicy krezkowej | ↑ | ↓ | b.d. | b.d. | ↓ | [32] |
| SHR+L-NAME | Perfundowane tętnice nerkowe | ↑* | →* | b.d. | b.d. | ↑ | [64] |
| Pierwotne | SHR | b.d. | ↓ | ↓ | b.d. | ↓ | [73] |
| | SHR | b.d. | b.d. | b.d. | →* | ↓ | [9] |
| | SHR | b.d. | b.d. | b.d. | b.d. | ↓ | [46] |
| Nadciśnienie indukowane Ang II | Czwarte odgałęzienie tętnicy krezkowej | ↓ | ↓ | b.d. | b.d. | → | [38] |
| Wtórne | Nefrektomia | ↓ | ↓ | b.d. | b.d. | ↓ | [43] |
| DOCA-salt (model wysokosodowy) | Trzecie odgałęzienie tętnicy krezkowej | ↓ | b.d. | b.d. | b.d. | → | [42] |

↓ - zmniejszenie ekspresji/reakcji; ↑ - zwiększenie ekspresji/reakcji; → - ekspresja/reakcja bez zmian; b.d. - brak danych, *- w badaniu do oceny zmian ekspresji wykorzystano metodę RT-PCR w pozostałych użyto metody Western-blot; SHR-SP- szczury z nadciśnieniem spontanicznym podatne na udar mózgu; SHR - szczury z nadciśnieniem spontanicznym; L-NAME - inhibitor syntazy tlenu azotu; Ang II - angiotensyna II; $K_{Ca}2.3$ - kanały potasowe aktywowane przez jony wapnia o małej przewodności; $K_{Ca}3.1$ - kanały potasowe aktywowane przez jony wapnia o średniej przewodności; K_{IR} - wewnątrzprzostonnicze kanały potasowe; Na^+/K^+ -ATP-aza - pompa sodowo-potasowa

Apamina, będąca toksyną pszczelą, wykazuje aktywność wobec kanałów potasowych $K_{Ca}2.3$ [40]. W przeciwieństwie do charydotoksyny nie blokuje bezpośrednio kanału, a jej działanie jest związane z mechanizmem allosterycznym [57]. Związkiem hamującym aktywność kanału $K_{Ca}2.3$ jest również syntetyczny UCL1684 [10].

ZNACZENIE ODPOWIEDZI ZALEŻNEJ OD EDH W NADCIŚNIENIU TĘTNICZYM

Nadciśnienie tętnicze jest chorobą układu sercowo-naczyniowego, w której dochodzi do zmian strukturalnych i funkcjonalnych prowadzących, m.in. do dysfunkcji endotelium, upośledzenia rozkurczu i nadmiernego skurczu naczyń krwionośnych. Zaburzenie funkcji śródbłonna zwykle przebiega z obniżeniem syntezy lub zmniejszeniem aktywności NO [17]. Zachodzące zmiany mogą również dotyczyć samej reakcji EDH, powiązanej przede wszystkim z kanałami potasowymi $K_{Ca}2.3$ i $K_{Ca}3.1$, która może się zmniejszać, pozostawać na stałym poziomie lub ulegać wzmocnieniu (tabela 3) [7].

Zmniejszenie syntezy NO przez śródbłonek w nadciśnieniu tętniczym upośledza utrzymanie odpowiedniego napięcia naczyń. Gdy jego ilość maleje, udział EDH w rozkurczu naczyń o małej średnicy, takich jak tętnice wieńcowe, nerkowe zaczyna pełnić główną rolę kompensacyjną [9, 23]. Potwierdzono to w tętnicach perfundowanych nerek szczurów z SHR, przy blokadzie NO oraz u myszy transgenicznym z ludzkim genem angiotensynogenu i reniny, u których wykazano lepszy rozkurcz zależny od EDH w porównaniu z relaksacją naczyń u zwierząt normotensyjnych [64, 72]. Całkowita kompensacja niedoboru NO, reakcją zależną od EDH u szczurów z nadciśnieniem tętniczym, wynika prawdopodobnie ze zwiększonej ekspresji kanałów potasowych $K_{Ca}3.1$ oraz ich większego udziału w reakcji rozkurczowej badanych naczyń [64].

W badaniach funkcjonalnych znacznie częściej wykazywano zahamowanie odpowiedzi EDH. W izolowanych tętnicach krezkowych (drugie odgałęzienie od tętnicy krezkowej górnej), pochodzących od szczurów z nadciśnieniem pierwotnym podatnych na udar (SHR-SP; stroke-prone spontaneously hypertensive rat) stwierdzono słabsze działanie relaksacyjne acetylocholiny niż w naczyniach wyizolowanych od szczurów normotensyjnych. Ponadto u szczurów SHR-SP wykazano większą ekspresję kanałów $K_{Ca}3.1$ oraz mniejszą ekspresję $K_{Ca}2.3$ niż u szczurów normotensyjnych. Obserwowana regulacja w górę (up-regulation) $K_{Ca}3.1$, nie mogła jednak skorygować upośledzonej relaksacji związanej ze zmniejszoną reakcją EDH u szczurów SHR-SP, a więc przeciwdziałać występującemu nadciśnieniu [32]. W badaniach przeprowadzonych na izolowanej górnej tętnicy krezkowej szczurów SHR, wykazano, że osłabiona aktywność kanałów $K_{Ca}3.1$ jest zaangażowana w początkowej fazie upośledzenia relaksacji zależnej od EDH [46]. Zmniejszenie reakcji EDH, zaobserwowano również w doświadczeniach przeprowadzonych na izolowanych tętnicach krezkowych szczurów SHR. Główna przyczyna osłabie-

nia odpowiedzi rozkurczowej naczyń na acetylocholiny wynikała ze zmniejszenia ekspresji kanałów $K_{Ca}2.3$. Nie zaobserwowano natomiast zmian między grupą badaną, a kontrolną w relaksacji naczyń po zastosowaniu TRAM-34 blokera kanałów $K_{Ca}3.1$ [73]. Podobnie spadek ekspresji kanału $K_{Ca}2.3$ udowodniono u szczurów po nefrektomii [43] oraz u myszy z nadciśnieniem tętniczym wywołanym mutacją w genie kanału $K_{Ca}2.3$ [70].

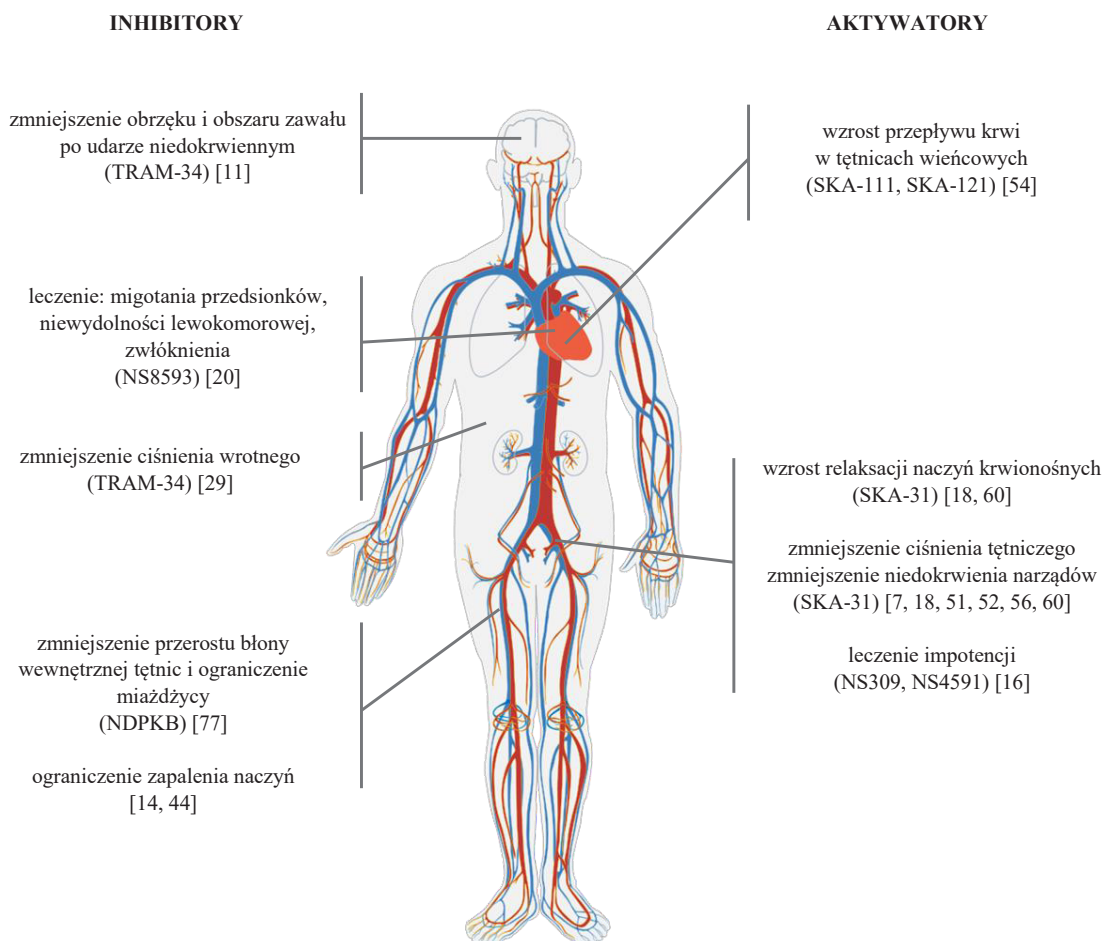
Znane są przypadki, iż mimo spadku ekspresji K_{Ca} i uszkodzonego śródbłonna pod wpływem nadciśnienia tętniczego reakcja EDH pozostawała na niezmiennym poziomie u szczurów z nadciśnieniem tętniczym indukowanym angiotensyną II [38] oraz w modelu DOCA-salt [42].

Reakcja EDH zapoczątkowana w śródbłonnku przez aktywację kanałów $K_{Ca}2.3$ i $K_{Ca}3.1$, przenosi się na miocyty i obecne tam białka błonowe, czyli K_{IR} i Na^+/K^+-ATP -azę. Hiperpolaryzacja miocytów przez pobudzenie wymienionych białek prowadzi do rozkurczu naczyń mikrokrążenia. Sygnał z $K_{Ca}2.3$ przenoszony jest na K_{IR} , a z $K_{Ca}3.1$ głównie na Na^+/K^+-ATP -azę (tzw. down stream, ryc. 2) [21]. W badaniach prowadzonych w naczyniach krezkowych szczurów SHR wykazano zmniejszenie aktywności hiperpolaryzacyjnej oraz ekspresji kanałów $K_{Ca}2.3-K_{IR}$, natomiast nie zaobserwowano tych zmian w $K_{Ca}3.1 - Na^+/K^+-ATP$ -azie. Ten zaburzony szlak może spowodować zwiększenie napięcia naczyniowego *in vivo* i może być jedną z przyczyn wzrostu ciśnienia tętniczego krwi charakterystycznego dla szczurów SHR [73].

Dotychczas nie wyjaśniono jednoznacznie przyczyn rozbieżności między wynikami prac, w których badano relaksację naczyń zależną od EDH. Nie można wykluczyć wpływu wykonywania badań na różnych gatunkach zwierząt i różnych modelach zwierzęcych nadciśnienia (pierwotne i wtórne nadciśnienie tętnicze) oraz różnic wieku i płci badanych zwierząt. Różnice budowy i właściwości funkcjonalnych badanych naczyń i ich odgałęzień również mogły się przyczynić do otrzymania przeciwstawnych wyników [12, 23]. Przyczynę tego zjawiska upatruje się w rozmieszczeniu kanałów i ich liczbie $K_{Ca}2.3$ i $K_{Ca}3.1$ w obrębie ściany naczyń. Przykładem może być doświadczenie przeprowadzone na pierwszych i czwartych odgałęzieniach tętnicy krezkowej szczurów Sprague-Dawley w obecności L-NAME i indometacyny. W pierwszym odgałęzieniu tętnicy krezkowej zarówno apamina, jak i TRAM-34, stosowane oddzielnie nie nosiły całkowicie odpowiedzi indukowanej przez acetylocholiny, co świadczy o jednoczesnej aktywacji kanałów $K_{Ca}2.3$ i $K_{Ca}3.1$. Natomiast w czwartorzędowym odgałęzieniu tętnicy krezkowej po zastosowaniu apaminy uzyskano pełną blokadę relaksacji, co sugerowało główną rolę kanałów $K_{Ca}2.3$ [37]. Zmiany ekspresji poszczególnych białek zaangażowanych w reakcję EDH w modelach nadciśnienia tętniczego przedstawiono w tabeli 3.

PODSUMOWANIE

EDH pełni rolę kompensacyjną, jednak siła jego działania zależy od łożyska naczyniowego, modelu patologicz-



Ryc. 6. Potencjalne wykorzystanie i działanie substancji farmakologicznie czynnych wpływających na kanały potasowe aktywowane przez jony wapnia o małej ($K_{Ca2.3}$) i średniej ($K_{Ca3.1}$) przewodności w układzie krążenia

nego i warunków eksperymentu. Obecnie trwają badania nad wykorzystaniem aktywatorów i blokerów/inhibitorów kanałów potasowych $K_{Ca2.3}$ oraz $K_{Ca3.1}$ jako prawdopodobny punkt uchwytu działania leków w terapii chorób układu krążenia [55]. Aktywatory tych kanałów obiecująco

poprawiają odpowiedź zależną od EDH i polepszają funkcję śródbłonna w chorobach sercowo-naczyniowych, w tym nadciśnienia tętniczego. Potencjalne terapeutyczne wykorzystanie w układzie krążenia związków oddziałujących na $K_{Ca2.3}$ i $K_{Ca3.1}$ przedstawiono na ryc. 6.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Alexander S.P., Catterall W.A., Kelly E., Marrion N., Peters J.A., Benson H.E., Faccenda E., Pawson A.J., Sharman J.L., Southan C., Davies J.A., CGTP Collaborators: The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Voltage-gated ion channels. *Br. J. Pharmacol.*, 2015; 172: 5904-5941
- [2] Baranowska M., Kozłowska H., Korbut A., Malinowska B.: Kanały potasowe w naczyniach krwionośnych ich znaczenie w fizjologii i patologii. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 596-605
- [3] Billaud M., Lohman A.W., Johnstone S.R., Biwer L.A., Mutchler S., Isakson B.E.: Regulation of cellular communication by signaling microdomains in the blood vessel wall. *Pharmacol. Rev.*, 2014; 66: 513-569
- [4] Brähler S., Kaistha A., Schmidt V.J., Wölfle S.E., Busch C., Kaistha B.P., Kacik M., Hasenau A.L., Grgic I., Si H., Bond C.T., Adelman J.P., Wulff H., de Wit C., Hoyer J., Köhler R.: Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension. *Circulation*, 2009; 119: 2323-2332
- [5] Brøndum E., Kold-Petersen H., Simonsen U., Aalkjaer C.: NS309 restores EDHF-type relaxation in mesenteric small arteries from type 2 diabetic ZDF rats. *Br. J. Pharmacol.*, 2010; 159: 154-165
- [6] Brown B.M., Shim H., Wulff H.: Are there superagonists for calcium-activated potassium channels? *Channels*, 2017; 11: 504-506
- [7] Bryan R.M. Jr., You J., Golding E.M., Marrelli S.P.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology*, 2005; 102: 1261-1277
- [8] Burnham M.P., Bychkov R., Féletou M., Richards G.R., Vanhoutte P.M., Weston A.H., Edwards G.: Characterization of an apamin-sensitive small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in porcine coro-

- nary artery endothelium: relevance to EDHF. *Br. J. Pharmacol.*, 2002; 135: 1133-1143
- [9] Büssemaeker E., Popp R., Fisslthaler B., Larson C.M., Fleming I., Busse R., Brandes R.P.: Aged spontaneously hypertensive rats exhibit a selective loss of EDHF-mediated relaxation in the renal artery. *Hypertension*, 2003; 42: 562-568
- [10] Campos Rosa J., Galanakis D., Piergentili A., Bhandari K., Ganelin C.R., Dunn P.M., Jenkinson D.H.: Synthesis, molecular modeling, and pharmacological testing of bis-quinolinium cyclophanes: potent, non-peptidic blockers of the apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^+ channel. *J. Med. Chem.*, 2000; 43: 420-431
- [11] Chen Y.J., Nguyen H.M., Maezawa I., Grössinger E.M., Garing A.L., Köhler R., Jin L.W., Wulff H.: The potassium channel $KCa_{3.1}$ constitutes a pharmacological target for neuroinflammation associated with ischemia/reperfusion stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2016; 36: 2146-2161
- [12] Chennupati R., Lamers W.H., Koehler S.E., De Mey J.G.: Endothelium-dependent hyperpolarization-related relaxations diminish with age in murine saphenous arteries of both sexes. *Br. J. Pharmacol.*, 2013; 169: 1486-1499
- [13] Christophersen P., Wulff H.: Pharmacological gating modulation of small – and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels ($K_{Ca2.x}$ and $K_{Ca3.1}$). *Channels*, 2015; 9: 336-343
- [14] Ciudad P., Miguel-Velado E., Ruiz-McDavitt C., Alonso E., Jiménez-Pérez L., Asuaje A., Carmona Y., García-Arribas D., López J., Marroquín Y., Fernández M., Roqué M., Pérez-García M.T., López-López J.R.: $Kv1.3$ channels modulate human vascular smooth muscle cells proliferation independently of mTOR signaling pathway. *Pflugers Arch.*, 2015; 467: 1711-1722
- [15] Coleman N., Brown B.M., Oliván-Viguera A., Singh V., Olmstead M.M., Valero M.S., Köhler R., Wulff H.: New positive Ca^{2+} -activated K^+ channel gating modulators with selectivity for $K_{Ca3.1}$. *Mol. Pharmacol.*, 2014; 86: 342-357
- [16] Comerma-Steffensen S.G., Carvacho I., Hedegaard E.R., Simonsen U.: Small and intermediate calcium-activated potassium channel openers improve rat endothelial and erectile function. *Front. Pharmacol.*, 2017; 8: 660
- [17] Dalsgaard T., Kroigaard C., Simonsen U.: Calcium-activated potassium channels – a therapeutic target for modulating nitric oxide in cardiovascular disease? *Expert Opin. Ther. Targets*, 2010; 14: 825-837
- [18] Damkjaer M., Nielsen G., Bodendiek S., Staehr M., Gramsbergen J.B., de Wit C., Jensen B.L., Simonsen U., Bie P., Wulff H., Köhler R.: Pharmacological activation of $K_{Ca3.1}/K_{Ca2.3}$ channels produces endothelial hyperpolarization and lowers blood pressure in conscious dogs. *Br. J. Pharmacol.*, 2012; 165: 223-234
- [19] Devor D.C., Singh A.K., Frizzell R.A., Bridges R.J.: Modulation of Cl^- secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca^{2+} -dependent K^+ channel. *Am. J. Physiol.*, 1996; 271: L775-L784
- [20] Diness J.G., Bentzen B.H., Sørensen U.S., Grunnet M.: Role of calcium-activated potassium channels in atrial fibrillation pathophysiology and therapy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2015; 66: 441-448
- [21] Dora K.A., Gallagher N.T., McNeish A., Garland C.J.: Modulation of endothelial cell $K_{Ca3.1}$ -channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries. *Circ. Res.*, 2008; 102: 1247-1255
- [22] Edwards G., Félétou M., Weston A.H.: Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch.*, 2010; 459: 863-879
- [23] Félétou M.: Endothelium-dependent hyperpolarization and endothelial dysfunction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2016; 67: 373-387
- [24] Félétou M., Vanhoutte P.M.: EDHF: an update. *Clin. Sci.*, 2009; 117: 139-155
- [25] Félétou M., Vanhoutte P.M.: Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 1988; 93: 515-524
- [26] Félétou M., Vanhoutte P.M.: Endothelium-dependent hyperpolarization: No longer an f-word! *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2013; 61: 91-92
- [27] Feske S., Wulff H., Skolnik E.Y.: Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2015; 33: 291-353
- [28] Filosa J.A., Yao X., Rath G.: TRPV4 and the regulation of vascular tone. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2013, 61: 113-119
- [29] Freise C., Heldwein S., Erben U., Hoyer J., Köhler R., Jöhrens K., Patsenker E., Ruehl M., Seehofer D., Stickle F., Somasundaram R.: K^+ -channel inhibition reduces portal perfusion pressure in fibrotic rats and fibrosis associated characteristics of hepatic stellate cells. *Liver Int.*, 2015; 35: 1244-1252
- [30] Furchgott R.F., Zawadzki J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288: 373-376
- [31] Garland C.J., Dora K.A.: EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol.*, 2017; 219: 152-161
- [32] Giachini F.R.C., Carneiro F.S., Lima V.V., Carneiro Z.N., Dorrance A., Webb R.C., Tostes R.C.: Up-regulation of intermediate calcium-activated potassium channels counterbalance the impaired endothelium-dependent vasodilatation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Transl. Res.*, 2009; 154: 183-193
- [33] Giangiacomo K.M., Sugg E.E., Garcia-Calvo M., Leonard R.J., McManus O.B., Kaczorowski G.J., Garcia M.L.: Synthetic charybdotoxin-iberiotoxin chimeric peptides define toxin binding sites on calcium-activated and voltage-dependent potassium channels. *Biochemistry*, 1993; 32: 2363-2370
- [34] Grgic I., Kaistha B.P., Paschen S., Kaistha A., Busch C., Si H., Köhler K., Elsässer H.P., Hoyer J., Köhler R.: Disruption of the Gardos channel ($K_{Ca3.1}$) in mice causes subtle erythrocyte macrocytosis and progressive splenomegaly. *Pflugers Arch.*, 2009; 458: 291-302
- [35] Grunnet M., Jespersen T., Angelo K., Frøkjær-Jensen C., Klaerke D.A., Olesen S.P., Jensen B.S.: Pharmacological modulation of SK3 channels. *Neuropharmacology*, 2001; 40: 879-887
- [36] Hasenau A.L., Nielsen G., Morisseau C., Hammock B.D., Wulff H., Köhler R.: Improvement of endothelium-dependent vasodilations by SKA-31 and SKA-20, activators of small – and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ -channels. *Acta Physiol.*, 2011; 203: 117-126
- [37] Hilgers R.H., Todd J.Jr., Webb R.C.: Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K^+ channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2006; 291: H216-H222
- [38] Hilgers R.H., Webb R.C.: Reduced expression of SK_{Ca} and IK_{Ca} channel proteins in rat small mesenteric arteries during angiotensin II-induced hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2007; 292: H2275-H2284
- [39] Ignarro L.J., Buga G.M., Byrns R.E., Wood K.S., Chaudhuri G.: Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1988; 246: 218-226
- [40] Ishii T.M., Maylie J., Adelman J.P.: Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 23195-23200
- [41] Kloza M., Baranowska-Kuczko M., Karpińska O., Kusaczuk M., Malinowska B., Kozłowska H.: EDH-type responses to the activator of potassium $KCa_{2.3}$ and $KCa_{3.1}$ channels SKA-31 in the small mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.*, 2016; 111: S103
- [42] Kloza M., Baranowska-Kuczko M., Malinowska B., Karpińska

- O., Harasim-Symbor E., Kasacka I., Kozłowska H.: The influence of DOCA-salt hypertension and chronic administration of the FAAH inhibitor URB597 on $K_{Ca}2.3/K_{Ca}3.1$ -EDH-type relaxation in rat small mesenteric arteries. *Vascul. Pharmacol.*, 2017; 99: 65-73
- [43] Köhler R., Eichler I., Schönfelder H., Grgic I., Heinau P., Si H.A., Hoyer J.: Impaired EDHF-mediated vasodilation and function of endothelial Ca^{2+} -activated K^+ channels in uremic rats. *Kidney Int.*, 2005; 67: 2280-2287
- [44] Köhler R., Kaistha B.P., Wulff H.: Vascular K_{Ca} -channels as therapeutic targets in hypertension and restenosis disease. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2010; 14: 143-155
- [45] Köhler R., Oliván-Viguera A., Wulff H.: Endothelial small - and intermediate-conductance K channels and endothelium-dependent hyperpolarization as drug targets in cardiovascular disease. *Adv. Pharmacol.*, 2016; 77: 65-104
- [46] Kong B.W., Man R.Y., Gao Y., Vanhoutte P.M., Leung S.W.: Reduced activity of SK_{Ca} and Na-K ATPase underlies the accelerated impairment of EDH-type relaxations in mesenteric arteries of aging spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol. Res. Perspect.*, 2015; 3: e00150
- [47] Kozłowska H., Baranowska M., Gromotowicz A., Malinowska B.: EDHF – śródbronkowy czynnik hiperpolaryzujący. Znaczenie w fizjologii i chorobach naczyń krwionośnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 555-564
- [48] Kroigaard C., Dalsgaard T., Nielsen G., Laursen B.E., Pilegaard H., Köhler R., Simonsen U.: Activation of endothelial and epithelial $K_{Ca}2.3$ calcium-activated potassium channels by NS309 relaxes human small pulmonary arteries and bronchioles. *Br. J. Pharmacol.*, 2012; 167: 37-47
- [49] Ledoux J., Werner M.E., Brayden J.E., Nelson M.T.: Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology*, 2006; 21: 69-79
- [50] Leung S.W., Vanhoutte P.M.: Endothelium-dependent hyperpolarization: age, gender and blood pressure, do they matter? *Acta Physiol.*, 2017; 219: 108-123
- [51] Mishra R.C., Belke D., Wulff H., Braun A.P.: SKA-31, a novel activator of SK_{Ca} and IK_{Ca} channels, increases coronary flow in male and female rat hearts. *Cardiovasc. Res.*, 2013; 97: 339-348
- [52] Mishra R.C., Mitchell J.R., Gibbons-Kroeker C., Wulff H., Belenkie I., Tyberg J.V., Braun A.P.: A pharmacologic activator of endothelial KCa channels increases systemic conductance and reduces arterial pressure in an anesthetized pig model. *Vascul. Pharmacol.*, 2016; 79: 24-31
- [53] Nilius B., Droogmans G.: Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.*, 2001; 81: 1415-1459
- [54] Oliván-Viguera A., Valero M.S., Pinilla E., Amor S., García-Villalón Á.L., Coleman N., Laría C., Calvín-Tienza V., García-Otín Á.L., Fernández-Fernández J.M., Murillo M.D., Gálvez J.A., Díaz-de-Villegas M.D., Badorrey R., Simonsen U. i wsp.: Vascular reactivity profile of novel KCa 3.1-selective positive-gating modulators in the coronary vascular bed. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2016; 119: 184-192
- [55] Ozkor M.A., Quyyumi A.A.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. *Cardiol. Res. Pract.*, 2011; 2011: 156146
- [56] Radtke J., Schmidt K., Wulff H., Köhler R., de Wit C.: Activation of $KCa3.1$ by SKA-31 induces arteriolar dilatation and lowers blood pressure in normo- and hypertensive connexin40-deficient mice. *Br. J. Pharmacol.*, 2013; 170: 293-303
- [57] Rauer H., Lanigan M.D., Pennington M.W., Aiyar J., Ghanshani S., Cahalan M.D., Norton R.S., Chandy K.G.: Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca^{2+} -activated over voltage-gated K^+ channels. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 1201-1208
- [58] Saliez J., Bouzin C., Rath G., Ghisdal P., Desjardins F., Rezzani R., Rodella L.F., Vriens J., Nilius B., Feron O., Balligand J.L., Dessy C.: Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca^{2+} signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. *Circulation*, 2008; 117: 1065-1074
- [59] Sandow S.L., Neylon C.B., Chen M.X., Garland C.J.: Spatial separation of endothelial small - and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K_{Ca}) and connexins: possible relationship to vasodilator function? *J. Anat.*, 2006; 209: 689-698
- [60] Sankaranarayanan A., Raman G., Busch C., Schultz T., Zimin P.I., Hoyer J., Köhler R., Wulff H.: Naphtho[1,2-d]thiazol-2-ylamine (SKA-31), a new activator of $K_{Ca}2$ and $K_{Ca}3.1$ potassium channels, potentiates the endothelium-derived hyperpolarizing factor response and lowers blood pressure. *Mol. Pharmacol.*, 2009; 75: 281-295
- [61] Schubert R., Nelson M.T.: Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2001; 22: 505-512
- [62] Seki T., Goto K., Kiyohara K., Kansui Y., Murakami N., Haga Y., Ohtsubo T., Matsumura K., Kitazono T.: Downregulation of endothelial transient receptor potential vanilloid type 4 channel and small-conductance of Ca^{2+} -activated K^+ channels underpins impaired endothelium-dependent hyperpolarization in hypertension. *Hypertension*, 2017; 69: 143-153
- [63] Shimokawa H., Godo S.: Diverse functions of endothelial NO synthases system: NO and EDH. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2016; 67: 361-366
- [64] Simonet S., Isabelle M., Bousquenaud M., Clavreul N., Félétou M., Vayssettes-Courchay C., Verbeuren T.J.: $K_{Ca}3.1$ channels maintain endothelium-dependent vasodilatation in isolated perfused kidneys of spontaneously hypertensive rats after chronic inhibition of NOS. *Br. J. Pharmacol.*, 2012; 167: 854-867
- [65] Smith P.D., Brett S.E., Luykenaar K.D., Sandow S.L., Marrelli S.P., Vigmund E.J., Welsh D.G.: K_{IR} channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle. *J. Physiol.*, 2008; 586: 1147-1160
- [66] Stankevicius E., Dalsgaard T., Kroigaard C., Beck L., Boedtkjer E., Misfeldt M.W., Nielsen G., Schjorring O., Hughes A., Simonsen U.: Opening of small and intermediate calcium-activated potassium channels induces relaxation mainly mediated by nitric-oxide release in large arteries and endothelium-derived hyperpolarizing factor in small arteries from rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2011; 339: 842-850
- [67] Straub A.C., Zeigler A.C., Isakson B.E.: The myoendothelial junction: connections that deliver the message. *Physiology*, 2014; 29: 242-249
- [68] Strøbæk D., Brown D.T., Jenkins D.P., Chen Y.J., Coleman N., Ando Y., Chiu P., Jørgensen S., Demnitz J., Wulff H., Christophersen P.: NS6180, a new $K_{Ca}3.1$ channel inhibitor prevents T-cell activation and inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Br. J. Pharmacol.*, 2013; 168: 432-444
- [69] Strøbæk D., Teuber L., Jørgensen T.D., Ahring P.K., Kjær K., Hansen R.S., Olesen S.P., Christophersen P., Skaaning-Jensen B.: Activation of human IK and SK Ca^{2+} -activated K^+ channels by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime). *Biochim. Biophys. Acta.*, 2004; 1665: 1-5
- [70] Taylor M.S., Bonev A.D., Gross T.P., Eckman D.M., Brayden J.E., Bond C.T., Adelman J.P., Nelson M.T.: Altered expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circ. Res.*, 2003; 93: 124-131
- [71] Vanhoutte P.M., Shimokawa H., Feletou M., Tang E.H.: Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiol.*, 2017; 219: 22-96
- [72] Waeckel L., Bertin F., Clavreul N., Damery T., Köhler R., Paysant J., Sansilvestri-Morel P., Simonet S., Vayssettes-Courchay C., Wulff H., Verbeuren T.J., Félétou M.: Preserved regulation of renal perfusion pressure by small and intermediate conductance K_{Ca} channels in hypertensive mice with or without renal failure. *Pflugers Arch.*, 2015; 467: 817-831

[73] Weston A.H., Porter E.L., Harno E., Edwards G.: Impairment of endothelial SK_{Ca} channels and of downstream hyperpolarizing pathways in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.*, 2010; 160: 836-843

[74] Wulff H., Köhler R.: Endothelial small-conductance and intermediate-conductance K_{Ca} channels: an update on their pharmacology and usefulness as cardiovascular targets. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2013; 61: 102-112

[75] Wulff H., Miller M.J., Hansel W., Grissmer S., Cahalan M.D., Chandy K.G.: Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, *IKCa1*: a potential immunosuppressant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 8151-8156

[76] Yamamoto Y., Imaeda K., Suzuki H.: Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J. Physiol.*, 1999; 514: 505-513

[77] Zhou X.B., Feng Y.X., Sun Q., Lukowski R., Qiu Y., Spiger K., Li Z., Ruth P., Korth M., Skolnik E.Y., Borggreffe M., Dobrev D., Wieland T.: Nucleoside diphosphate kinase B-activated intermediate conductance potassium channels are critical for neointima formation in mouse carotid arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2015; 35: 1852-1861

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.