

CARDIOPROTECȚIA ÎN ISCHEMIE / REPERFUZIE PRIN DESCHIDEREA CANALELOR DE POTASIU ATP DEPENDENTE

L. M. Popescu*, S. Mușat*, O. C. Trifan*, M. Leabu*, M. Hinescu*

INTRODUCERE

Bolile cardiovasculare reprezintă cauza principală de mortalitate și morbiditate pe plan mondial. Cunoașterea mecanismelor implicate în instalarea acestor boli, a efectelor și găsirea modalităților de combatere a lor antrenează eforturi sociale uriașe.

Infarctul miocardic acut se caracterizează printr-o mare complexitate a fenomenelor biologice implicate. Leziunile miocardice se datorează ischemiei și sunt accentuate de reperfuzie, în timpul restabilirii circulației sanguine. Pentru prevenirea sau diminuarea efectelor ischemiei și reperfuziei asupra țesutului miocardic există în prezent câteva direcții de acțiune:

- a. modularea activității canalelor ionice din endomembranele sau plasmalema cardiomiocitelor;
- b. protejarea sarcolemei împotriva efectelor induse de alterarea proceselor biochimice în miocardul ischemiat și reperfuzat;
- c. blocarea acțiunii radicalilor liberi ce apar la reoxigenarea țesutului din timpul reperfuziei.

Studii in situ și pe cord izolat perfuzat au arătat că substanța care acționează prin deschiderea canalelor de potasiu sensibile la ATP (canale KATP) (1) determină protejarea miocardului împotriva leziunilor induse de ischemie și reperfuzie (9,10). Mecanismul de acțiune constă, probabil, în deschiderea canalelor KATP din membrana miocitelor. Același mecanism este, probabil, răspunzător și de efectul aritmogen și inotrop negativ observat la administrarea unor astfel de substanțe, cum ar fi Pinacidil și Cromakalim (10,11, 13, 21). Deoarece, dovezile pentru aceste efecte sunt contradictorii (14), se impune prudență în recomandarea deschizătoarelor de canale de potasiu drept medicamente "cardioprotectoare" în ischemia și reperfuzia miocardică.

Arsenalul de deschizătoare de canale KATP a fost îmbogățit recent cu Aprikalim (RP52891) un compus capabil

să determine protejarea miocardului în timpul ischemiei și reperfuziei, această proprietate fiind disociată de orice efect hemodinamic sistemic (2) sau inotrop negativ.

Nicorandil, medicament întrebunțat ca nitrovasodilatator, are efect miocardoprotector prin mecanismul său care implică, probabil, și deschiderea canalelor KATP din membrana miocitelor (4, 15).

În experimentele noastre am testat efectul cardioprotector al medicamentelor Aprikalim și Nicorandil pe corduri de șobolani izolate și expuse 30 de minute la ischemie, urmate de 30 minute de reperfuzie, în preparat Langendorff.

Efectul protector al administrării acestor medicamente în perfuzie, înainte de ischemie, la doze mai mici decât cele raportate până în prezent în literatură (0,2 - 1 μM), a fost demonstrat prin: 1. parametri funcționali - refacerea contractilității miocardice (velocitatea -LVDp/Dt) și a debitului coronarian în timpul reperfuziei; 2. parametri biochimici - în timpul reperfuziei se reduce eliberarea de lactat-dehidrogenază (LDH), creatin-fosfokinază (CPK), glutamatoxaloacetat-transaminază (GOT), aldolază, α-hidroxiubutirat-dehidrogenază (α-HBDH); se reduc, de asemenea, activitatea peroxidazică, proteinele totale, lactatul și ATP, precum și conținutul miocardic în fosfolipide și acizi grași liberi.

MATERIALE ȘI METODE

1. Ischemie/reperfuzie experimentală pe cord de șobolan în preparat Langendorff.

Șobolani masculi rasa Wistar (cântărind 150-200 g) au fost heparinizați (1000 U/kg, bolus intraperitoneal) și anesteziați cu cloroform.

După deschiderea cavității abdominale, cordurile au fost oprite prin injectarea transdiafragmatică a unei soluții saline, normotonă și răcită la 40° C. Inimile au fost rapid

* Prof. Dr. L. M. Popescu, Dr. S. Mușat, Dr. O. C. Trifan, Dr. M. Leabu, Dr. M. Hinescu, Catedra de Biologie Celulară și Histologie. Universitatea de Medicină și Farmacie "Carol Davila", București

prelevate, cântărite, canulate, și montate într-o instalație de perfuzie tip Langendorff. Echilibrarea lor a durat 30 minute. În primele 10 minute au fost perfuzate cu tampon Krebs-Henseleit (KH) (mM: NaCl, 118; KCl, 4,7; MgSO₄, 1,2; KH₂PO₄, 1,2; NaHCO₃, 25; CaCl₂, 2,5; glucoză, 11; pH 7,4) la 37°C, barbotat cu amestec 95% - 5% O₂-CO₂, suplimentat cu heparină 1000 U/l. Pentru următoarele 20 minute perfuzia s-a făcut cu tampon KH fără heparină. Perfuzia s-a realizat la presiunea constantă de 70 mmHg, iar debitul coronarian a fost măsurat la fiecare 4 minute prin colectarea efluentului coronarian timp de un minut. Experimentele în care cordurile au avut în timpul echilibrării tulburări de ritm sau scăderi ale debitului coronarian nu au fost luate în considerare.

Ischemia globală normotermică a fost indusă prin oprirea perfuziei timp de 30 minute, cordurile fiind imersate în soluție izotonă, la 37°C, deaerată. După ischemie cordurile au fost reperfuzate timp de 30 minute.

2. Modelul experimental.

Cordurile au fost grupate după cum urmează: primul grup a fost tratat timp de 10 minute înainte de ischemie cu Aprikalim (APK); al doilea grup a fost tratat cu Nicorandil (NIC); al treilea grup (control) nu a primit medicament. În preischemie și în reperfuzie au fost colectate probe din efluentul coronarian pentru analize biochimice.

Contractilitatea ventriculului stâng după cele 30 de minute de reperfuzie a fost măsurată în experimente separate după metoda descrisă anterior (19).

3. Determinări biochimice

Pentru dozarea enzimelor s-au folosit: kit optimizat pentru LDH (Sigma), kit pentru CK (Sigma, procedeu No. 45 - Uv), kit pentru aspartat aminotransferază (Sigma, procedeu No. DG-120-UV), kit pentru α -HBDH (Sigma,

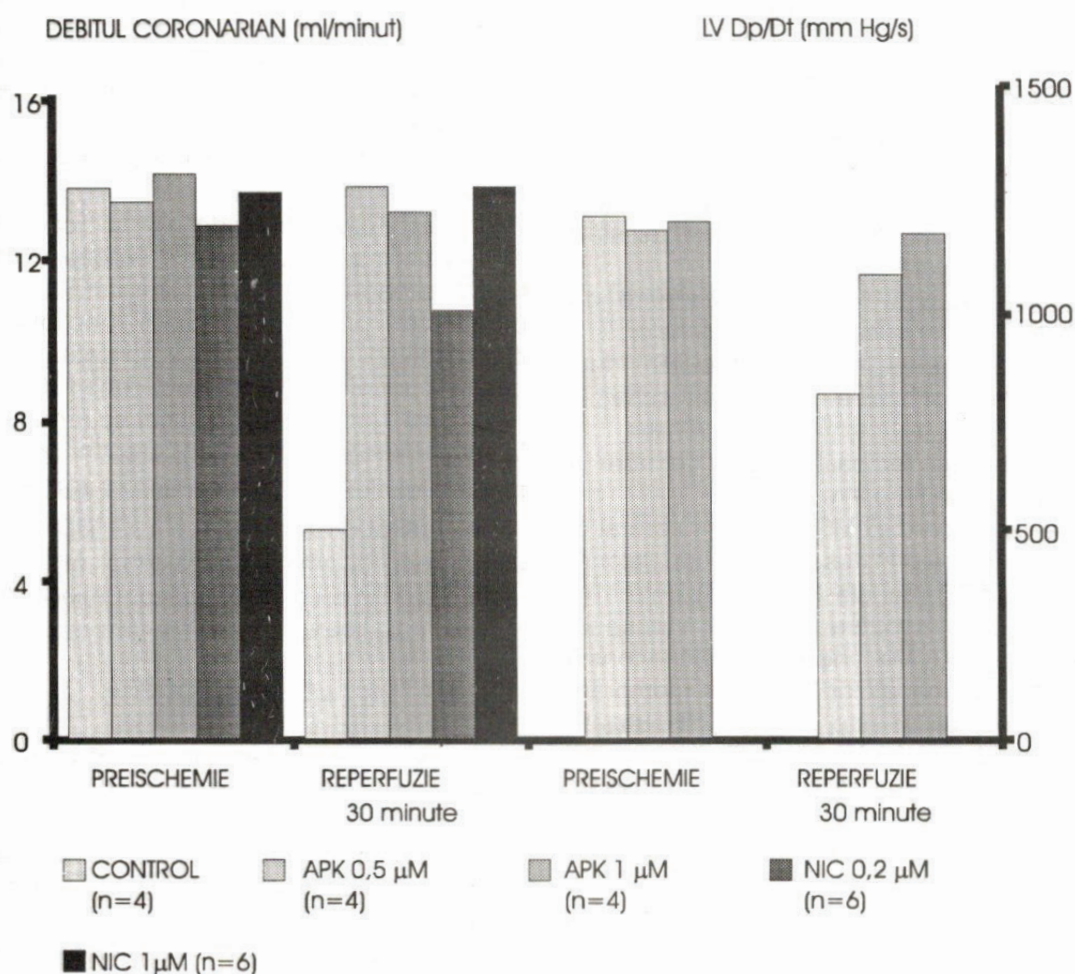


Figura 1. Debitul coronarian (ml/minut) în preischemie și după 30 de minute de reperfuzie pentru control și tratament cu: 0,5 μM Aprikalim, 1 μM Aprikalim, 0,2 μM Nicorandil, 1 μM Nicorandil (stânga); LVDp/Dt (mm Hg/s) în preischemie și după 30 de minute de reperfuzie pentru control și tratament cu 0,5 μM Aprikalim, 1 μM Aprikalim (dreapta).

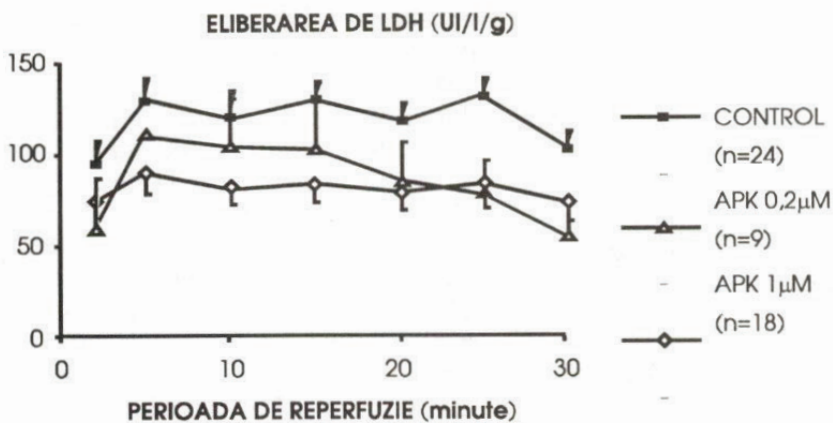


Figura 2. Dinamica eliberării de LDH (UI/l/g greutate umedă) în reperfuție pentru control și tratament cu: 0,2 μM Aprikalim, 1 μM Aprikalim.

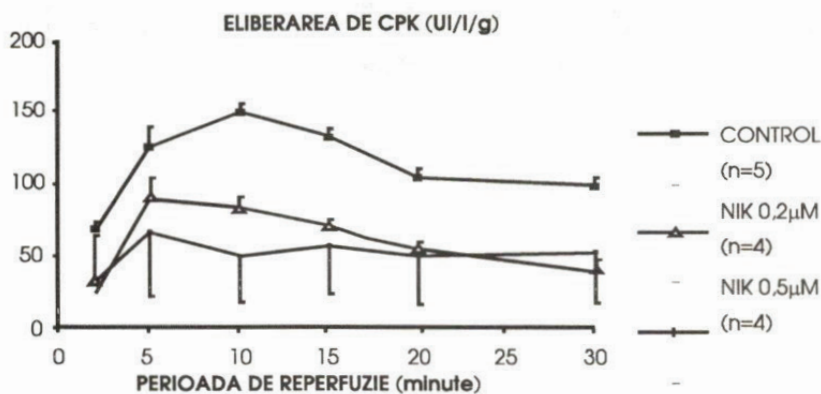


Figura 3. Dinamica eliberării de CPK (UI/l/g greutate umedă) în reperfuție pentru control și tratament cu: 0,2 μM Nicorandil, 0,5 μM Nicorandil.

procedeu No. DG-120-UV), kit pentru lactat (Sigma, procedeu No. 735), kit pentru ATP (Sigma) și kit pentru 5'-nucleotidază (Sigma).

Activitatea peroxidică în efluentul coronarian a fost măsurată prin analiza în puncte, pe hârtie de nitroceluloză, folosind 3,3'-diaminobenzidina ca substrat și a fost cuantificată prin densitometrie cu sistemul pentru analiză de imagini LUCIA S (Nikon - Optoteam, Vienna).

Conținutul miocardic în fosfolipide (FL) și acizi grași liberi (AGL) a fost măsurat prin cromatografie în strat subțire urmată de cromatografia în faza gazoasă (19).

Conținutul total în proteine al efluentului coronarian a fost măsurat cu kit Sigma (metoda Lowry modificată).

REZULTATE

1. Tratamentul cu Aprikalim sau Nicorandil îmbunătățește performanțele cardiace din timpul reperfuției.

În timpul reperfuției scad atât debitul coronarian cât și viteza. După 30 de minute, debitul coronarian scade la 52% din debitul preischemic, iar LVDp/Dt la 67% (figura 1). Acești parametri au fost menținuți la valori comparabile cu cele din preischemie pentru cordurile tratate cu Aprikalim 0,5 - 1 μM, sau cu Nicorandil 0,2 - 1 μM (figura 1).

2. Tratamentul cu Aprikalim sau Nicorandil previne pierderea conținutului celular în timpul reperfuției.

Reperfuția după ischemie globală normotermică (30 minute), este însoțită de

Componentul eliberat a)	Dupa 5 minute de reperfuție		Dupa 30 minute de reperfuție	
	Control b)	1μM Aprikalim	Control	1μM Aprikalim
alfa-HBDH	107 ± 12,4	81 ± 13,99	106,17 ± 12,92	63,44 ± 13,9*
GOT	21,33 ± 2,75	12,51 ± 2,19*	18,57 ± 2,52	8,4 ± 2,19*
Aldolaza	3,2 ± 0,44	3,4 ± 0,19	4,28 ± 0,34	2,09 ± 0,46**
5'-Nucleotidaza			135,77 ± 33,28	116,25 ± 53,61
ATP	51,68 ± 8,48	29,2 ± 9,2	105,64 ± 16,45	36,04 ± 9,11**
Lactat			13 ± 3,25	4,63 ± 1,33*

Tabel 1.

Aprikalim reduce eliberarea în efluentul coronarian a componentilor intracelulari în timpul reperfuției.

a) Măsurat în perfuzatul strâns până la momentul indicat (excepție pentru ATP).

b) Valorile reprezintă media ± s.e.m. și sunt exprimate în UI/l/g greutate umedă, cu excepția aldolazei (unități SL/ml/g greutate umedă), 5'-nucleotidazei (unități Shinowara), ATP (nM/min) și lactatului (nmol/dl/g greutate umedă). Semnificația statistică comparativ cu grupul control: *p<0,05 **p<0,01.

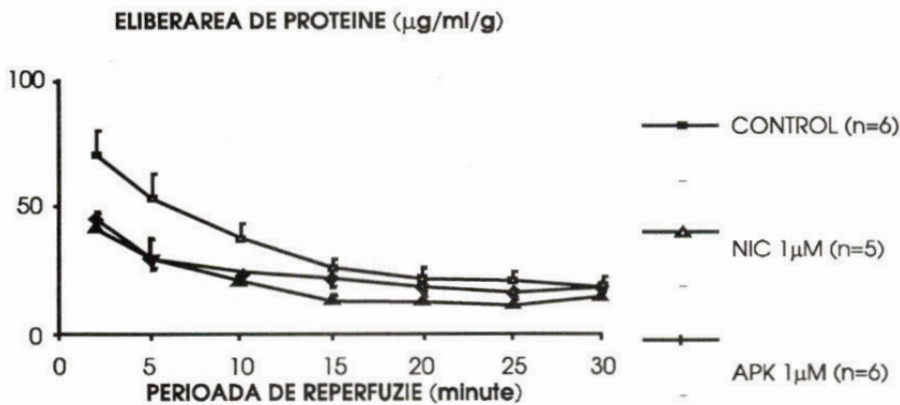


Figura 4. Dinamica eliberării de proteine (µg/ml/g greutate umedă) în perfuzat în timpul reperfuziei pentru control și tratament cu: 1 µM Aprikalim, 1 µM Nicorandil.

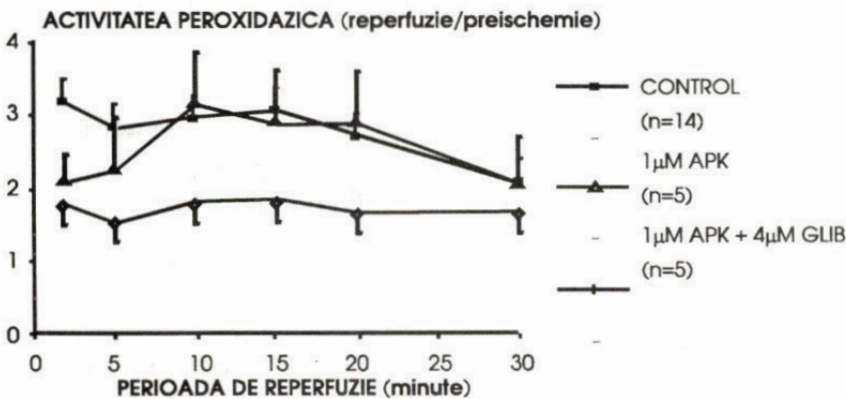


Figura 5. Creșterea eliberării de peroxidaze în efluentul coronarian (raportat la valorile din preischemie) în timpul reperfuziei pentru control, 1 µM Aprikalim și 1 µM Aprikalim simultan cu 4 µM Gilbenclamid.

eliberarea CPK și LDH în efluentul coronarian (figurile 2, 3). Eliberarea enzimelor a fost observată chiar și după 2 minute de la reluarea perfuziei miocardului ($67,6 \pm 17,6$ UI//g greutate umedă și $95,53 \pm 11,45$ UI//g greutate umedă pentru CPK și respectiv LDH). Activitatea CPK eliberată este maximă după 10 minute de reperfuzie ($151,2 \pm 31,6$ UI//g greutate umedă) și scade treptat la $98,67 \pm 26,7$ UI//g greutate umedă după 30 de minute. Eliberarea LDH crește după 5 minute la $128 \pm 11,7$ UI//g greutate umedă și rămâne în jurul acestei valori pe toată durata reperfuziei ($101,9 \pm 9,44$ UI//g greutate umedă la 30 minute).

Tratamentul cordurilor cu Aprikalim (0,2 - 1 µM) timp de 10 minute înainte de ischemie reduce, dependent de doză, eliberarea de LDH (figura 2). Aprikalim a fost eficient până la concentrația 0,2 µM deoarece a scăzut eliberarea de LDH (măsurată după 30 de minute) de la $101,9 \pm 9,44$ la $54,11 \pm 8,56$ UI//g greutate umedă ($p < 0,05$).

	Martor a)	Control	Aprikalim 0,5 µM	Aprikalim 1 µM
AGL	$1,12 \pm 0,22$	$10,58 \pm 0,26$	$3,47 \pm 0,34^{***}$	$1,97 \pm 0,17^{***}$
FC	$431 \pm 16,2$	$362 \pm 5,8$	$397 \pm 9,6^*$	$398 \pm 6,8^*$
FE	$69,7 \pm 1,4$	$52,3 \pm 1,6$	$61,2 \pm 4,1$	$69,4 \pm 4,9^{**}$
FS	$8,46 \pm 0,84$	$6,3 \pm 0,64$	$7,38 \pm 0,2$	$6,84 \pm 0,41$
FI	$50,1 \pm 1,26$	$19,2 \pm 3,26$	$26,9 \pm 4,17$	$24,1 \pm 0,16$

Tabel 2.

Conținutul în lipide al miocardului pretrat cu Aprikalim.

a) Valorile reprezintă media \pm s.e.m. și sunt exprimate în c.p.m. $\times 10^{-3}$ /g greutate umedă; n=4 experimente pentru fiecare grup.

Semnificația statistică comparativ cu grupul control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Abrevieri: AGL, acizi grași liberi (total); FC, fosfatidilcolină; FE, fosfatidiletanolamină; FS, fosfatidilserină; FI, fosfatidilinozitol.

Tabel 3.

Nicorandil reduce eliberarea în efluentul coronarian a componentelor intracelulari în timpul reperfuziei.

a) Măsurat în perfuzatul strâns până la momentul indicat.

b) Valorile reprezintă media \pm s.e.m. și sunt exprimate: GOT, α -HBDH - UI//g greutate umedă, aldolaza - unități SL/ml/g greutate umedă.

Semnificația statistică comparativ cu grupul control: * $p < 0,05$.

	Control	Nicorandil 1µM	Control	Nicorandil 1µM
a-HBDH	$107 \pm 12,4$	$86,5 \pm 21,36$	$106,17 \pm 12,92$	$78,5 \pm 17,4$
GOT	$21,33 \pm 9,88$	$9,88 \pm 2,92^*$	$18,57 \pm 2,52$	$10,08 \pm 2,99^*$
Aldolaza	$3,2 \pm 0,44$	$1,64 \pm 0,82$	$4,28 \pm 0,34$	$2,43 \pm 0,83^*$

Tratamentul cordurilor cu Nicorandil (0,2 - 0,5 μM) timp de 10 minute înainte de ischemie reduce, dependent de doză, eliberarea de CPK (figura 3). Nicorandil (0,2 μM) reduce eliberarea CPK în reperfuzie de la $151,2 \pm 31,6$ la $84 \pm 3,24$ UI/l/g greutate umedă după 10 minute ($p < 0,05$) și de la $98,67 \pm 26,7$ la $41 \pm 5,42$ UI/l/g greutate umedă după 30 minute ($p < 0,05$).

Deși cantitatea de enzime eliberate este semnificativ scăzută după tratamentul cu Aprikalim sau Nicorandil, dinamica eliberării LDH și respectiv CPK nu se modifică.

Cantitatea totală de proteine eliberate în perfuzat de cordurile din grupul control este maximă în primele minute ale reperfuziei ($71 \pm 9,09$ $\mu\text{g/ml/g}$ greutate umedă la 2 minute) și scade continuu, ajungând la $18,33 \pm 2,96$ $\mu\text{g/ml/g}$ greutate umedă după 30 de minute (figura 4). Tratamentul cu 1 μM Aprikalim sau 1 μM Nicorandil reduce eliberarea de proteine în primele 10 minute de reperfuzie (la 5 minute de la $54,3 \pm 8,52$ la $29,96 \pm 4,74$, respectiv $30,23 \pm 6,38$ $\mu\text{g/ml/g}$ greutate umedă, $p < 0,05$).

În experimentele noastre am identificat o eliberare bazală de activitate peroxidazică din miocard (variind între 0,02 și 0,07 unități de densitate optică), care crește de aproximativ trei ori în primele momente ale reperfuziei (minutul 2). În figura 5 activitatea peroxidazică a efluentului coronarian din reperfuzie este exprimată sub forma raportului dintre activitatea bazală (preischemie) și activitatea din diferite momente. Eliberarea după 2 minute este de $3,17 \pm 0,33$ ori mai mare și scade lent spre sfârșitul reperfuziei (după 30 de minute $2,09 \pm 0,21$). Tratamentul cu 1 μM Aprikalim reduce eliberarea de peroxidaze în timpul reperfuziei. Acest efect este reversibil prin administrarea simultană de 4 μM Glibenclamid (GLIB), un blocant specific al canalelor KATP.

Aprikalim (1 μM) reduce și eliberarea altor compuși celulari ce pot caracteriza leziunea miocardică cum sunt: α -HBDH, 5'-nucleotidaza, aldolaza, GOT, ATP și lactat, dozați în efluentul coronarian după 5 și 30 de minute de reperfuzie (tabelul 1).

În experimentele control după 30 de minute de reperfuzie, în miocard se acumulează acizi grași liberi și scade nivelul fosfolipidelor. Aceste efecte sunt reversibile dependent de doză, prin administrarea de Aprikalim (tabelul 2).

Tratamentul cu 1 μM Nicorandil reduce eliberarea în efluentul coronarian, după 5 și 30 de minute de reperfuzie, a α -HBDH, GOT și aldolazei (tabelul 3).

DISCUȚII

Prezența în membrana miocardocitelor a canalelor KATP, care în mod fiziologic sunt inhibitate de nivelurile intracelulare normale ale ATP (5, 6, 16, 17), sugerează că aceste canale ar putea să se deschidă în timpul perioadelor cu concentrații intracelulare scăzute de ATP din timpul ischemiei sau hipoxiei (3). Deschiderea acestor canale ar putea fi responsabilă și de o parte din efluxul de potasiu

observat în timpul ischemiei (8, 20, 22, 23, 24). Aceste premise au condus la ipoteza că blocarea (închiderea) canalelor KATP ar putea avea efect miocardoprotector și antiaritmie, iar activarea (deschiderea) lor este contraindicată (7, 24).

În experimentele noastre am folosit Aprikalim și Nicorandil, medicamente care activează (deschid) canalele KATP, iar rezultatele demonstrează că aceste substanțe, la concentrațiile utilizate, protejează cordul izolat de șobolan în ischemie-reperfuzie.

Faptul că dinamica eliberării enzimelor în reperfuzie nu se modifică sugerează că leziunile miocardice se produc, dar sunt mult diminuate. Efecte asemănătoare, de reducere a leziunilor miocardice induse de ischemie-reperfuzie, au fost obținute și cu alți deschizători ai canalelor KATP cum ar fi: Pinacidil și Cromakalim (9,10), sau RP49356 (5).

Efectul Nicorandilului sau Aprikalimului este reversibil prin Glibenclamid, un inhibitor (blocant) specific al canalelor KATP (7). Administrat singur Glibenclamid nu modifică, sau agravează ușor leziunea miocardică indusă de ischemie-reperfuzie (12, 18, 19).

Nicorandilul, pe lângă efectul de deschidere a canalelor KATP acționează și prin activarea guanilat ciclazei (4), răspunzătoare, în parte, de efectul vasodilatator al medicamentului.

Pentru Aprikalim (RP 52891), enantiomer activ al compusului RP 49356, nu s-a descris până în prezent o altă acțiune decât cea de deschidere a canalelor KATP.

Deschiderea canalelor KATP din celulele musculare netede ale sistemului vascular cardiac, determină hiperpolarizarea membranei și micșorarea influxului de calciu prin canalele de calciu controlate electric, urmată de relaxare și, consecutiv, vasodilatație. Deși benefică pentru evoluția ulterioară a miocardului confruntat cu ischemia și reperfuzia, vasodilatația nu este singurul efect al activării canalelor KATP la nivelul cordului, cu atât mai mult cu cât medicamentele doar cu efect nitrovasodilatator nu reduc comparabil leziunile induse de ischemie-reperfuzie (4). Este evident că efectul cardioprotector prin deschiderea canalelor KATP se datorează acțiunii directe asupra cardiomiocitelor.

Deschiderea canalelor KATP din membrana miocitelor determină în condiții normale scurtarea potențialului de acțiune, iar în condițiile ischemiei ar putea împiedica apariția depolarizării membranei (22, 23). Ambele situații au drept urmare scăderea influxului de calciu prin canalele comandate electric. Micșorarea intrării de calciu ar putea fi mecanismul principal prin care aceste substanțe protejează miocardul, un rol cheie având concentrația la care sunt administrate.

Protecția dată de activarea canalelor KATP precum și accentuarea leziunilor induse de ischemie-reperfuzie la administrarea de blocante ale canalelor KATP sugerează că aceste canale de potasiu sensibile la ATP, prin deschidere, ar putea reprezenta un mecanism protector fiziologic, la care cordul apelează în situații critice semnalizate prin niveluri scăzute de ATP.

CONCLUZII

1. Aprikalim și Nicorandil reduc, dependent de doză, leziunile induse de ischemie-reperfuție în cordul de șobolan preparat Langendorff.

2. Demonstrarea efectului miocardoprotector direct al medicamentelor Aprikalim și Nicorandil la concentrații mici (0,2-1 μM), nearitmogene, deschide perspectiva utilizării acestor compuși în condiții clinice.

3. Efectul cardioprotector este reversat de Glibenclamid, sugerând intervenția canalelor de potasiu sensibile la ATP.

REZUMAT

Aprikalim (RP52891) și Nicorandil protejează cordul de șobolan în preparat Langendorff împotriva leziunilor induse de ischemie (30 minute)/reperfuție (30 minute). La concentrații nearitmogene (0,2 - 1 μM) Aprikalim sau Nicorandil: (i) reduc, dependent de doză, eliberarea în reperfuție a enzimelor intracelulare (peroxidaze, lactat dehidrogenaza, etc), a proteinelor în general și a compușilor cu greutate moleculară mică (ATP și lactat); (ii) păstrează conținutul tisular în acizi grași și fosfolipide (în special fosfatidilcolina și fosfatidiletanolamina); (iii) la concentrația 1 μM restabilesc complet debitul coronarian și viteza ventriculului stâng (LVDp/Dt) (măsurate după 30 de minute de reperfuție). Efectul protector a fost reversat prin administrarea concomitentă de Glibenclamid (4 μM), sugerând că deschiderea canalelor de potasiu sensibile la ATP este implicată în mecanismul protecției miocardice.

Cuvinte cheie: miocard, ischemie-reperfuție, deschizătoare de canale de potasiu, Aprikalim, Nicorandil

ABSTRACT

We demonstrate that Aprikalim (RP52891) and Nicorandil effectively protect myocardium during ischemia (30 min.)/reperfusion (30 min.) in rat Langendorff-perfused hearts. At non-arrhythmogenic concentrations (0.2-1 μM) Aprikalim or Nicorandil: (i) dose-dependently reduced the release of intracellular enzymes (peroxidases, lactate dehydrogenase, etc.) total protein and low-molecular-weight compounds (ATP and lactate) during reperfusion; (ii) preserved the tissue contents of free fatty acids and phospholipids (mainly phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine); (iii) at 1 μM completely restored the coronary flow and the left ventricular pressure development (LVDp/Dt) (measured after 30 min. of reperfusion). The myocardial protection was reversed by 4 μM Glibenclamide, suggesting the involvement of an ATP sensitive K⁺ channels opening mechanism.

Key words: myocardium, ischemia-reperfusion, K⁺ channel openers, Aprikalim, Nicorandil.

BIBLIOGRAFIE

- Ashcroft, S.J.H., Ashcroft, F.M., Properties and function of ATP sensitive K⁺ channels, *Cell. Sign.*, 2, 197-214, 1993.
- Auchampach, J. A., Maruyama, M., Cavero, I., Gross, G. J., The new K⁺ channel opener Aprikalim (RP52891) reduces experimental infarct size in dogs in the absence of hemodynamic changes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259 (3), 961 - 967, 1991.
- Benndorf, K., Friedrich, M., Hirche, H., Anoxia opens ATP regulated K channels in isolated heart cells of the guinea pig, *Pflugers Arch.*, 419 (1), 108-110, 1991.
- Borg, C., Mondot, S., Mestre, M., Cavero, I., Nicorandil: Differential contribution of K⁺ channel opening and guanylate cyclase stimulation to its vasorelaxant effects on various endothelin-1 contracted arterial preparation. Comparison to aprikalim (RP2891) and nitro glycerin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259 (2), 526534, 1991.
- Escande, D., Thuringer, D., Le Guern, S., Laville, M., Cavero, I., Potassium channel openers act through an activation of ATP-sensitive K⁺ channels in guinea pig cardiac myocytes, *Pflugers Arch.* 414, 669, 1989.
- Escande, D., Henry, P., Potassium channels and pharmacological targets in cardiovascular medicine, *Eur. Heart J.*, 14, (Suppl B), 2-9, 1993.
- Fossett, M., De Weille, J.R., Green, R.D., Schmid Antomarchi, H., Lazdunski, M., Antidiabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K⁺ channels, *J. Biol. Chem.*, 263, 7933, 1988.
- Gasser, R. N. A., and Vaughan-Jones, R., Mechanism of potassium efflux and action potential shortening during ischaemia in isolated mammalian cardiac muscle, *J. Physiol.*, 431, 713-741, 1990.
- Grover, G.J., Dzwonczyk, S., Parham, C. S., Sleph, P. G., The protective effects of cromakalim and pinacidil on reperfusion function and infarct size in isolated perfused rat hearts and anesthetized dogs, *Cardiovasc. Drug Ther.*, 4 (2), 465-474, 1990a.
- Grover, G. J., McCullough, J.R., Henry, D.D., Conder, L.M., Sleph, P. G., Anti-ischemic effects of the potassium channel activators pinacidil and cromakalim and the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburide, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 251, 98, 1989.
- Grover, G. J., Sleph, P. G., Dzwonczyk, S., Pharmacologic profile of cromakalim in the treatment of myocardial ischemia in isolated rat hearts and anesthetized dogs, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 16 (6), 853-864, 1990b.
- Kurusu, K., Tsuruhara, Y., Fukumura, F., Nakashima, A., Tokunaga, K., Effects of glibenclamide and

- nicorandil on cardiac function during ischaemia and reperfusion in isolated perfused rat hearts, *Am. J. Physiol.*, 261 (6 Pt. 2), H1864 - H1871, 1991.
13. Lau, W. M., Effects of potassium channel blockers on the negative inotropic responses induced by cromakalim and pinacidil in guinea pig atrium, *Pharmacology*, 45 (1), 916, 1992.
14. Longman, S., D. and Hamilton, T. C., Potassium channel activator drugs: mechanism of action, pharmacological properties, and therapeutic potential, *Medicinal Research Reviews*, 12 (2), 73-148, 1992.
15. Mitani, A., Kinoshita, K., Fukamachi, K., Sakamoto, M., Kurisu, K., Tsuruhara, Y., Fukumura, F., Nakashima, A., Tokunaga, K., Effects of glibenclamide and nicorandil on cardiac function during ischaemia and reperfusion in isolated perfused rat hearts, *Am. J. Physiol.*, 261 (6 Pt. 2), H1864 - H1871, 1991.
16. Noma, A., ATP regulated K⁺ channels in cardiac muscle, *Nature*, 305, 147-148, 1983.
17. Noma, A., Shibasaki, T., Intracellular ATP and cardiac membranes currents. in *Channels*, vol. 1, cap. 5, ed. T Narahashi (Plenum Press. New-York), 183, 1988.
18. Popescu, L.M., Musat, S., Trifan, O.C., Leabu, M., Popescu, A.C., Popescu, M., Hinescu, M., K⁺-channel openers protect myocardium against ischaemia-reperfusion injury, *Histochem. J.(a)*, 24, 574, 1992.
19. Popescu, L.M. Musat, S., Trifan, O.C., Leabu, M., Tigaret, C.M., Popescu, M., Popescu, A., Hinescu, M.E., Moraru, I.I., Das, D.K. ATP-Regulated K⁺-channel openers protect the myocardium against ischemia-reperfusion injury, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1994, in press.
20. Sedlis, S., P., Mechanisms of ventricular arrhythmias in acute ischaemia and reperfusion, *Cardiovasc. Clin.*, 22 (1) 3 - 18, 1992.
21. Tosaki, A., Szerdahelyi, P., Das, D. K., Reperfusion induced arrhythmias and myocardial ion shifts: A pharmacologic interaction between pinacidil and cicletanine in isolated rat heart., *Basic Res. Cardiol.*, 87 (4), 366-384, 1992.
22. Vanheel, B and de Hemptinne, A., Influence of KATP channel modulation on net potassium efflux from ischaemic mammalian cardiac tissue, *Cardiovasc. Res.*, 26, 1030-1039, 1992.
23. Weiss, J.N. et al., ATP sensitive potassium channels and cellular potassium loss in hypoxic and ischomic mammalian ventricle, *J. Physiol.*, 447, 649-673, 1992.
24. Wolleben, C. D., Sanguinetti, M. C., Siegl, P. K., Influence of ATP-sensitive potassium channel modulators on ischemia-induced fibrillation in isolated rat hearts, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 21 (8), 783-788, 1989.