

Влияние нитропруссид натрия на параметры электрической и сократительной активности гладкой мускулатуры нижнего пищеводного сфинктера

Стальбовский А.О., Студницкий В.Б., Медведев М.А.

Effect of sodium nitroprusside on parameters of electrical and contractile activities of lower esophageal sphincter unstriped muscles

Stalbovsky A.O., Studnitsky V.B., Medvedev M.A.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Стальбовский А.О., Студницкий В.Б., Медведев М.А.

Методом двойного сахарозного мостика проведены исследования электрической и сократительной активности гладких мышц нижнего пищеводного сфинктера (НПС) при действии нитропруссид натрия. Оценено действие донора оксида азота NO на калиевую и кальциевую проводимость мембраны, роль внутриклеточной NO-синтазы. Наблюдалась гиперполяризация мембран и снижение сократительной активности при применении нитропруссид натрия и L-NAME. Сделан вывод о действии NO на калиевую проводимость мембран, а также о возможном действии на сократительные белки и активацию цАМФ-зависимого пути регуляции физиологических функций гладкомышечной клетки (ГМК) НПС.

Ключевые слова: нижний пищеводный сфинктер, нитропруссид натрия, сократительная активность, гладкая мышца.

Investigations of electrical and contractile activities of lower esophageal sphincter unstriped muscles under sodium nitroprusside impact have been fulfilled by the method of double sucrose gap. Effect of nitric oxide donor on potassium and calcium membrane conductance has been evaluated, as well as the role of intracellular NO-synthase. Membrane hyperpolarization and contractile activity decrease during the use of sodium nitroprusside and L-NAME have been observed. Conclusion has been drawn of NO effect on potassium membrane conductance as well as of the possible effect on contractile proteins and activation of cAMP-dependent regulation of LES UM physiological functions.

Key words: lower esophageal sphincter, sodium nitroprusside, contractile activity, unstriped muscle

УДК 616.329:612.73

Введение

Сфинктеры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) имеют ряд существенных особенностей в регуляции их тонуса со стороны нервной и гуморальной систем организма. В настоящее время весьма интенсивно проводятся исследования по изучению влияния оксида азота (NO) на моторную функцию ЖКТ. Считается, что NO является одним из нейротрансмиттеров неадренергической — нехолинергической природы. Одним из отделов ЖКТ, в регуляции работы которого важ-

нейшую роль играет NO, является нижний пищеводный сфинктер (НПС) [6, 8].

Кроме NO, выделяемого нервными окончаниями, в мембране гладкомышечной клетки (ГМК) НПС найдена собственная NO-синтаза, имеющая структурные отличия от NO-синтазы нервных окончаний. Связанная с мембраной NO-синтаза является Ca^{2+} -зависимой и участвует в регуляции мышечного тонуса НПС [9]. Считается, что увеличение концентрации оксида азота, вызванного добавлением в омывающий раствор нитропруссид натрия HNa, приводит к активации цито-

зольной растворимой формы гуанилатциклазы. Повышение внутриклеточной концентрации цГМФ и активация соответствующих протеинкиназ снижает уровень цитозольного кальция Ca^{2+} , в ГМК [8], снижая его вход через потенциал-зависимые и хемочувствительные каналы, а также стимулирует его удаление наружу и депонирование в саркоплазматический ретикулум. Понижение уровня цитозольного кальция, в свою очередь, приводит к снижению тонического напряжения и силы вызванных сокращений гладкой мускулатуры [3, 5]. Эндогенный NO, активируя растворимую гуанилатциклазу, оказывает свое влияние на K^+ -каналы посредством цГМФ-зависимых и цГМФ-независимых путей регуляции [9]. Большинство из имеющихся в литературе данных получены в исследованиях, проведенных на сосудистых ГМК и отдельных структурах ЖКТ. При этом ряд особенностей действия NO на ГМК НПС остаются до конца не изученными.

Цель настоящего исследования — выявление некоторых особенностей регуляции параметров электрической и сократительной активности НПС оксидом азота.

Материал и методы

Методом двойного сахарозного мостика [1] были изучены электрические и сократительные свойства препаратов циркулярного слоя гладкой мускулатуры НПС котлов. Гладкомышечные полоски вырезались из проксимальной части сфинктера. Все манипуляции с препаратами проводились в нормальном растворе Кребса при комнатной температуре и пассивной аэрации [4]. Состав физиологического раствора был следующим (ммоль): NaCl — 120,4; $NaHCO_3$ — 15,5; NaH_2PO_4 — 1,2; KCl — 5,9; $MgCl_2$ — 1,2; $CaCl_2$ — 2,5; глюкоза — 11,5. Эксперименты проводились при температуре раствора 37 °С, pH = 7,4. Все растворы готовились на бидистиллированной воде из солей марки ХЧ. Использовались следующие препараты: тетраэтиламмоний (ТЭА) — «Реахим» (Россия); нитропруссид натрия (HNa); N^G -nitro-L-arginine methyl ester

Экспериментальные и клинические исследования

(L-NAME); метиленовый синий — «Sigma» (США). Запись данных осуществлялась на пишущем потенциометре КСП-4.

Полученные экспериментальные данные подвергались графическому анализу для оценки мышечного тонуса и мембранного потенциала покоя, а также измерялись величины силы и продолжительности сокращений, вызванных деполяризующими импульсами электрического тока. Сопротивление мембран оценивалось по величине анэлектротонических потенциалов. Данные усреднялись в рамках экспериментальных периодов, вычислялась ошибка среднего, периоды затем сравнивались с применением критерия Вилкоксона для зависимых выборок [2]. Далее в статье, там, где это не оговорено специально, достигнутый уровень значимости критерия Вилкоксона $p < 0,05$.

Результаты

Электрическая активность гладкомышечных препаратов характеризовалась стабильным уровнем мембранного потенциала покоя. Препараты имели значительный исходный тонус, который изменялся нерегулярным образом около некоторых средних значений, служивших изолиниями для оценки тонических реакций. Раздражение препаратов импульсами электрического тока прямоугольной формы длительностью 5 с различной полярности приводило к возникновению электротонических потенциалов и развитию сократительных ответов. Действие деполяризующих импульсов тока любой амплитуды не приводило к генерации пиковых потенциалов действия, однако сопровождалось сократительной реакцией. Развитие анэлектротонических потенциалов при действии гиперполяризующих импульсов электрического тока у части препаратов $17,4 \pm 0,7\%$ ($n = 7$) сопровождалось снижением исходного тонуса препаратов.

Эффекты различных доз нитропруссид натрия

Нитропруссид натрия в концентрациях $1 \cdot 10^{-7}$ — $1 \cdot 10^{-3}$ моль проявлялся дозозависимым ингибированием вызванной электрическим током со-

кратительной активности. В концентрациях начиная с $1 \cdot 10^{-7}$ моль и выше возникала быстроразвивающаяся дозозависимая гиперполяризация мембраны ГМК.

В концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ моль HNa приводил к снижению величины вызванных сократительных ответов на $10,2 \pm 0,07\%$ ($p < 0,01$) ($n = 6$) и снижению сопротивления ГМК на $4,0 \pm 0,02\%$ ($n = 6$). В концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль HNa приводил к полному подавлению вызванной сократительной активности и гиперполяризации мембраны на $5,4 \pm 0,7$ мВ.

Сопротивление мембраны ГМК снижалось на $21,1 \pm 2,1\%$ ($p < 0,01$) по сравнению с контрольными значениями в нормальном растворе Кребса. Эти эффекты сохранялись в течение всего времени действия HNa и исчезали на 8—10-й мин отмыва нормальным раствором Кребса.

Эффекты нитропруссид натрия на фоне тетраэтиламмония

Действие ТЭА ($1 \cdot 10^{-2}$ моль) характеризовалось стойкой деполяризацией мембраны ГМК и ростом ее сопротивления аналогично литературным данным [3, 7, 9]. На фоне действия ТЭА применение HNa ($1 \cdot 10^{-4}$ моль) приводило к снижению сопротивления мембраны ГМК на $18,2 \pm 2,8\%$, а также сопровождалось полным угнетением вызванной сократительной активности, которое прекращалось на 3—5-й мин после окончания действия HNa. Таким образом, восстановление вызванной сократительной активности на фоне ТЭА наступало значительно быстрее. Величина гиперполяризации в начале действия HNa ($3,6 \pm 0,8$ мВ) достоверно ($p < 0,01$; $n = 14$) отличалась от таковой в отсутствие тетраэтиламмония ($5,4 \pm 0,7$ мВ). Наблюдавшееся снижение тонуса препаратов имело менее выраженный характер, чем в нормальном растворе Кребса (рис. 1).

Влияние нитропруссид натрия на параметры...

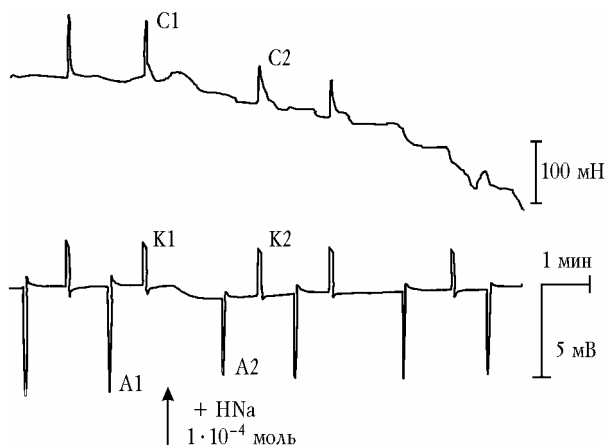


Рис. 1. Сократительная и электрическая активность гладких мышц нижнего пищевода сфинктера: А1, К1, С1 — ан- и катэлектротонический потенциал и сокращение соответственно на фоне ТЭА; А2, К2, С2 — на фоне действия HNa

Эффекты L-NAME

Действие L-NAME в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль в нормальном растворе Кребса вызывало снижение на $38,2 \pm 4,3\%$ ($n = 8$) силы вызванных сокращений и снижение исходного мышечного тонуса, при этом достоверных изменений сопротивления мембран не наблюдалось. Эти показатели возвращались к исходным значениям при отмыве препаратов нормальным раствором Кребса. Наряду с этим отмечалась медленно развивающаяся гиперполяризация мембраны и восстановление мембранного потенциала до исходного уровня при окончании действия L-NAME. Также восстанавливалась сила вызванных сокращений (рис. 2).

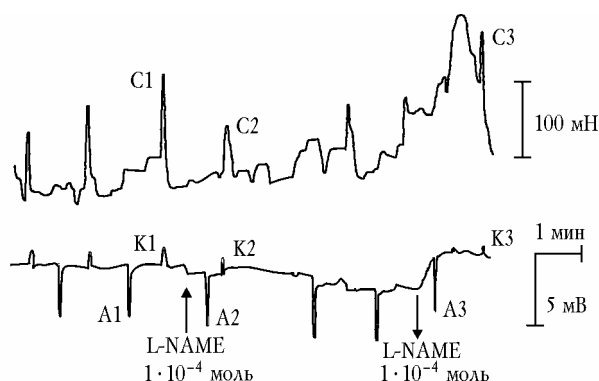


Рис 2. Сократительная и электрическая активность гладких мышц нижнего пищевода сфинктера при действии L-NAME: А3, К3, С3 — ан- и катэлектротонический потенциал и сокра-

щение
но после окончания действия L-NAME. Остальные обозначения

соответствен-

см. на рис. 1

Эффекты нитропруссид натрия на фоне метиленового синего

Действие метиленового синего в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль в инкубационном растворе приводило к снижению силы вызванных сокращений на $62,2 \pm 7,3\%$ ($p < 0,05$; $n = 6$) без изменения исходного тонуса. Действие на этом фоне HNa в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль характеризовалось значительным снижением тонуса препаратов и гиперполяризацией мембраны на $2,6 \pm 0,7$ мВ ($n = 6$). При этом полностью подавлялась вызванная сократительная активность в течение всего времени действия HNa (рис. 3). Также наблюдалось снижение электрического сопротивления мембраны на $21,4 \pm 0,6\%$ от исходного уровня ($p < 0,01$; $n = 6$).

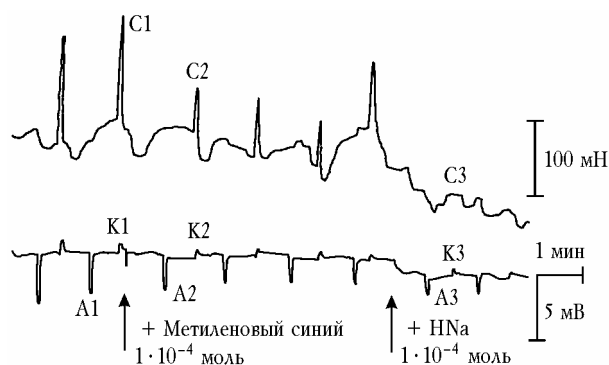


Рис 3. Сократительная и электрическая активность гладких мышц нижнего пищеводного сфинктера на фоне метиленового синего при действии HNa. Обозначения см. на рис. 1 и 2

Обсуждение

Нитропруссид натрия, являясь донором NO, вызывает снижение тонуса и вызванной сократительной активности ГМ НПС так же, как и в других гладкомышечных структурах ЖКТ и сосудов. При этом дозозависимое ингибирование HNa сократительной активности ГМ НПС, по литературным данным, обусловлено снижением уровня цитозольного кальция и изменением калиевой проводимости мембраны [7, 8].

В примененной нами концентрации тетраэтиламмоний подавляет основные виды калиевой

Экспериментальные и клинические исследования

проводимости мембраны ГМК [7, 9]. При действии HNa на фоне ТЭА наблюдается менее выраженная гиперполяризация мембраны а также более быстрое восстановление вызванной сократительной активности. Это дает основание считать, что одной из причин возникающей гиперполяризации при действии HNa является повышение калиевой проводимости мембраны. Также нельзя исключить, что наблюдаемая гиперполяризация мембраны обусловлена снижением кальциевой проводимости [8, 9].

Ингибирование растворимой формы цитозольной гуанилатциклазы метиленовым синим, помимо подавления вызванной сократительной активности, не оказывало влияния на эффекты HNa. Это свидетельствует о возможном прямом действии NO на каналные белки [8].

Подавление внутриклеточного синтеза NO в ГМ НПС при действии L-NAME, возможно, характеризуется дополнительной активацией цАМФ-зависимого пути регуляции ГМК НПС сократительной активности вследствие реципрокных взаимодействий между системами цАМФ и цГМФ [6]. Не исключено, что снижение концентрации цГМФ может усиливать активацию цАМФ-зависимого пути регуляции сократительной активности ГМК НПС, снижая активность цГМФ-зависимых цАМФ-стимулирующих фосфодиэстераз.

В заключение следует отметить, что регуляторные эффекты NO на параметры электрической и сократительной активности ГМ НПС обусловлены не только изменением концентрации цитозольного кальция, но и увеличением калиевой проводимости мембран, о чем свидетельствует снижение сопротивления мембран. Также возможно непосредственное действие NO на сократительные белки ГМК.

Литература

1. Артеменко Д.М., Шуба М.Ф. Методика дослідження електричних еластивостей нервних та м'язових волокон за допомогою поверхневих позаклітинних електродів // Физиол. журн. АН УССР. 1964. Т. 10. < 3. С. 403—407 .
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М: Практика, 1999. 450 с.
3. Земляков И.Ю. Физиологические особенности гладкомышечных клеток нижнего пищеводного сфинк-

Стальбовский А.О., Студницкий В.Б., Медведев М.А.

тера: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1985. 26 с.

4. Студницкий В.Б., Кулагин К.В., Бармин В.Ю. и др. Роль внутриклеточного рН в регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток аноректальной области котов // Нейрогуморальные механизмы органов пищеварительной системы. Томск, 1997. С. 114.
5. Сфинктеры пищеварительного тракта: нижний пищеводный (кардиальный сфинктер), его строение и функция в норме и при функциональной непроходимости кардии / Под. ред. В.Ф. Байтингера. Томск, 1994. С. 215.
6. *Abdel-Latif A.A.* Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases

Влияние нитропруссид натрия на параметры...

and contraction in smooth muscle // *Exp. Biol. Med.* 2001. V. 226. < 3. P. 153—163.

7. *Daniel E.E., Jury J., Salapatek A.M. et al.* Nitric oxide from enteric nerves acts by a different mechanism from myogenic nitric oxide in canine lower esophageal sphincter // *J. Pharm. and Exp. Therap.* 2000. V. 294. P. 270—279.
8. *Lukas K.A., Pitari G.M., Kazerounian S. et al.* Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP // *Pharmacol. Rev.* 2000. V. 52. P. 375—413.
9. *Salapatek A.M., Yu-Fang Wang, Yu-Kang Mao et al.* Myogenic NOS in canine lower esophageal sphincter: enzyme activation, substrate recycling and product actions // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 1998. V. 274. P. 1145—1157.

Поступила в редакцию 11.11.2003 г.