

© СОЛОДКОВ А.П., ЛАЗУКО С.С., 2004

ФУНКЦИЯ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

СОЛОДКОВ А.П.*, ЛАЗУКО С.С.**

*Витебский государственный медицинский университет,
кафедра нормальной физиологии*,
Центральная научно-исследовательская лаборатория***

Резюме. Целью настоящей работы было выяснить стресс-индуцированные изменения функции различных типов калиевых каналов, проявляющиеся в модуляции сократительной активности гладкой мышцы аорты, вызванной простагландином F2 α .

Опыты были проведены на 18 препаратах изолированного кольца аорты крыс линии Вистар. Стресс вызывали фиксацией крыс на спине в течение 6 часов. Для выяснения роли внутренне очищающих калиевых каналов K(ir) в модуляции тонуса гладкой мышцы в раствор Кребса-Хензелейата добавляли простагландин F2 α ($4 \cdot 10^{-6}$ М) и ионы бария (10^{-4} М). Блокаду кальцийактивируемых калиевых каналов K_{Ca} создавали введением в перфузионный раствор тетраэтиламмония в концентрации (10 мМ). Все эксперименты проводили до и после блокады синтеза NO L-NAME (10^{-4} мкМ) и циклооксигеназы индометацином (10^{-5} М).

Под влиянием иммобилизации в условиях блокады синтеза NO, K(ir) каналов, а также K(ir), K_{Ca} каналов наблюдался значительно меньший прирост напряжения, вызываемый ПФF2 α . В аорте крыс, перенесших стресс, после блокады синтеза NO, он составил всего лишь 29% (в контроле – 230%), K(ir) – 44% (в контроле 83%) и сочетанного влияние бария и тетраэтиламмония – 84% (в контроле – 300%). На фоне блокады синтеза NO барий и тетраэтиламмоний оказывали более выраженный эффект, однако величина приростов напряжения была на 51% и 40%, соответственно, меньшей, чем в контроле после добавления L-NAME. Следовательно, под влиянием стресса снижается функциональная роль калиевых каналов, в отношении регуляции сократительной активности гладкой мышцы аорты, а блокада синтеза NO ограничивает, но не устраняет характерное для стресса падение тонуса сосудистой гладкой мышцы. Сочетание блокады синтеза NO и различных семейств калиевых каналов практически полностью устраняет постстрессорное снижение напряжения гладкой мышцы, но в значительно меньшей степени, чем в контроле повышает сократительную активность ПФF2 α .

Таким образом, система калиевых каналов является мишенью действия длительного и интенсивного стрессорного воздействия, такого, как иммобилизация.

Ключевые слова: калиевые каналы, монооксид азота, гладкомышечная клетка, стресс.

Abstract. The aim of this work is to detect stress-induced changes of function of different types potassium channels, manifested in modulation of contractile activity of aorta smooth muscle evoked by F2 α prostaglandin.

The experiments have been performed on 18 preparations of rat isolated aorta rings. The stress has been evoked by rat fixation in the back position during 6 hours. For detection of the role of inwardly rectifying potassium channels K (ir) in tone modulation of smooth muscle F2 α prostaglandin ($4 \cdot 10^{-6}$ M) and Ba²⁺ (10^{-4} M) have been added to Krebs buffer. The blockade of Ca – activated K_{Ca} potassium channels has been evoked by addition of tetraethylammonium (10 mM) in concentration to the perfused solution.

All experiments have been conducted before and after blockade of L-NAME NO synthesis (10^{-4} mkM) and cyclooxygenase by indomethacine (10^{-5} M).

Under the influence of immobilization in conditions of NO synthesis blockade, K(ir) channels and K (ir), K_v, K_{Ca} channels significantly smaller increase of tension, evoked by PG F2 α has been observed. In rat aorta after stress influence, NO synthesis blockade, NO became 29% (in control – 230%), K(ir) – 44% (in control – 83%), as for the combined influence of Ba and tetraethylammonium – 84% (in control – 300%). On the base of blockade of NO synthesis Ba and tetraethylammonium have produced more expressed effect, but the value of tension was by 51% and 40% smaller, than in control after L-NAME addition, respectively.

Therefore, under stress influence the functional role of potassium channels in the relationship of contractile activity regulation of aorta smooth muscle decreases, blockade of NO synthesis limits but not eliminates specific for stress tone falling of vascular smooth muscle. The combination of blockade of NO synthesis and different families of potassium channels practically eliminates the poststressor reduction of smooth muscle tension but to significantly smaller degree than in control it elevates PG F2 α contractile activity.

Hence, the system of potassium channels is the target of action of prolonged and intensive stressor influence such as immobilization.

В 1980 г. было показано, что эндотелий вносит существенный вклад в снижение сосудистого тонуса [10, 13]. В 1984 г. Болтон и др. [6] впервые продемонстрировали, что стимуляция эндотелия сосудов вызывает гиперполяризацию и расслабление гладкой мышцы мезентериальной артерии морской свинки. В то же время, эндотелиальный NO способен гиперполяризовать гладкую мышцу лишь в некоторых сосудах. Позже стало очевидным, что подобную гиперполяризацию вызывает и простагландин [14].

Однако то обстоятельство, что в условиях блокады синтеза NO и простагландинов стимуляция эндотелия многих сосудов все же способна вызвать гиперполяризацию сосудистых гладких мышц, послужило основанием назвать это соединение неизвестной природы эндотелиальным фактором гиперполяризации (EDHF). В соответствии с этим NO, эйкозаноиды и эндотелиальный фактор гиперполяризации (EDHF) были идентифицированы как главные релаксирующие факторы эндотелиального происхождения.

Высвобождающиеся из эндотелиоцитов ионы K^+ , продукты P-450 монооксигеназного пути (EET), пероксид водорода и др. субстанции способны вызывать гиперполяризацию подлежащих гладкомышечных клеток, активируя K_{ir} -каналы, Na^+/K^+ АТФ-азу и/или $ВК_{Ca}$ (кальцийактивируемые калиевые каналы большой проводимости), обнаруженные в их мембране [7, 8, 15, 17]. Образующийся под влиянием NO ц-ГМФ в некоторых сосудах также способен их активировать [9, 16]. Активация калиевых каналов гладкомышечной клетки сопровождается закрытием потенциалзависимых кальциевых каналов, уменьшением входящего внутрь клетки кальция и снижением сократительной активности гладкой мышцы [9]. Таким образом, стало очевидным, что калиевые каналы гладкомышечных клеток имеют важное значение в регуляции силы сокращения гладкой мышцы, вызываемого различными вазоконстрикторами.

Методически эндотелийзависимое расслабление изолированных сосудов изучается на препаратах с предварительно повышенным на-

пряжением при помощи одного из спазмогенов (норадреналин, фенилэфрин, простагландин $F2\alpha$). При этом агонист вызывает деполяризацию и/или открытие кальциевых каналов саркоплазматического ретикулула гладких мышц сосуда, которые сопровождаются увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция. В свою очередь, это стимулирует выход калия из гладкого миоцита через кальцийзависимые калиевые каналы, что создает увеличение концентрации этих ионов на внеклеточной поверхности его мембраны («калиевое облако») [8]. Повышение внеклеточной концентрации ионов калия активирует Na/K -насос и K_{ir} каналы, что в конечном итоге может приводить к гиперполяризации и ослаблению эффекта вазоконстриктора. Следовательно, ингибируя в этих условиях различные калиевые каналы, можно определить их вклад в регуляцию тонуса сосудов.

Известно, что избыточная продукция NO может приводить к угнетению сердечной деятельности, вазоконстрикторных реакций на адренореактивные стимулы и глубокому, нередко необратимому падению артериального давления не только при септическом [4], анафилактическом [12], кардиогенном [2], геморрагическом [11], тепловом [3] и других видах шока, но и при стрессе [5]. Не исследованным остается вопрос о влиянии длительного стрессорного воздействия на вклад K_{ir} (внутренне очищающих), кальцийактивируемых калиевых каналов в условиях постстрессорных изменений эндотелийзависимого расслабления и сократительной активности гладкой мышцы.

Целью настоящей работы было выяснить стресс-индуцированные изменения функции различных типов калиевых каналов, проявляющиеся в модуляции сократительной активности гладкой мышцы аорты, вызванной простагландином $F2\alpha$.

Методы

Опыты были проведены на 18 препаратах изолированного кольца аорты крыс линии Вистар. Животных разделили на две группы: контрольные ($n=8$) и перенесшие стресс ($n=10$). Стресс вызывали фиксацией крыс на спине в течение 6 часов. После чего их освобождали и на 90 минут помещали в клетку.

Каждому животному внутрибрюшинно вводили гепарин (500 ед/кг) и затем под уретановым наркозом (1 г/100 г веса тела) вскрывали грудную клетку, удаляли сердце, легкие, отпрепаровывали грудную аорту, иссекали ее фрагмент длиной 15-20 мм и помещали его в охлажденный до 4°C раствор Кребса-Хензелята. В охлажденном растворе фрагмент аорты тщательно очищали от жировой и соединительной ткани и лезвием вырезали кольцевой сегмент шириной 3 мм. Один конец кольцевого сегмента аорты жестко фиксировали, а другой прикрепляли к рычажку датчика силы, в качестве которого использовали механотрон 6МХ1С. Препарат функционировал в изометрическом режиме [1]. Приготовленный таким образом кольцевой сегмент аорты помещали в термостатируемую ванночку объемом 27 мл, заполненную раствором Кребса-Хензелята рН-7,4 при температуре 37°C. Раствор насыщали карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂). Регистрацию напряжения препарата осуществляли при помощи потенциометра КСП-4. Исходное напряжение кольца аорты равнялось приблизительно 2 г. В течение периода стабилизации (60-80 мин.) раствор Кребса-Хензелята, омывающий препарат аорты, обновляли каждые 15 минут.

Для выяснения роли внутренне очищающих калиевых каналов K(ir) в модуляции тонуса гладкой мышцы в перфузионный раствор до-

бавляли простагландин F2α (4*10⁻⁶М) и затем ионы бария (10⁻⁴ М). Блокаду кальцийактивируемых K_{Ca} калиевых каналов создавали введением таким же образом в перфузионный раствор высокой концентрации тетраэтиламмония (10 мМ) [16]. Все эксперименты проводили до и после блокады синтеза NO L-NAME (10⁻⁴ мкМ) и циклооксигеназы индометацином (10⁻⁵М).

Прирост напряжения (развиваемое напряжение) рассчитывали как разницу между максимальным и исходным напряжением, выраженным в мГ.

Цифровой материал обработали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Все химреактивы были получены из Sigma и Aldrich (USA).

Результаты и обсуждение

Влияние ионов бария и тетраэтиламмония на вызываемый простагландином F2α прирост напряжения контрольных колец аорты до и после блокады синтеза NO и простагландинов.

В контрольной группе до и после блокады синтеза NO исходное напряжение кольца аорты не различалось и составляло 2064±78 мГ и 1971±24 мГ, соответственно.

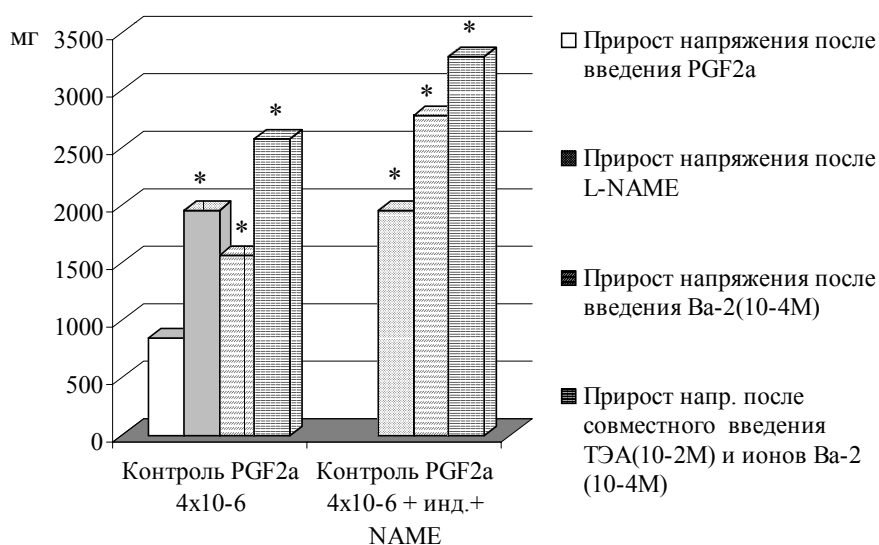


Рис. 1. Прирост напряжения изолированного кольца аорты крысы, вызываемый простагландином F2α на фоне блокады синтеза NO, введения ионов бария (10⁻⁴М) и их сочетание с тетраэтиламмонием (10⁻² М); * - p<0,05 по сравнению со значением прироста напряжения аорты, полученного после введения только простагландина F2α.

Добавление ПГФ2 α ($4 \cdot 10^{-6}$ М) в условиях интактной системы синтеза NO приводило к увеличению напряжения кольца аорты на 851 ± 77 мг, а на фоне L-NAME и индометацина его пророст был в 2,3 раза больше и составил 1951 ± 61 мг ($p < 0,01$) (рис. 1).

В условиях нормального синтеза NO после добавления в перфузионный раствор блокатора внутренне очищающих калиевых каналов (10^{-4} М ионов бария) прирост напряжения аорты, вызываемый ПГФ2 α , увеличился на 708 мг по сравнению с действием только простагландина F2 α и составил 1559 ± 77 мг. В условиях блокады синтеза NO под влиянием ионов бария прирост напряжения аорты, вызываемый ПГФ2 α , увеличился на 829 мг ($p > 0,05$) и равнялся 2780 ± 385 мг ($p < 0,05$).

Совместное добавление ионов бария и тетраэтиламмония (неспецифическая блокада большинства калиевых каналов) приводило к тому, что под влиянием ПГФ2 α прирост напряжения аорты как в условиях интактного синтеза NO, так и блокады его синтеза оказался самым существенным и составлял в контроле 2518 ± 351 мг и при добавлении L-NAME и индометацина - 3286 ± 268 мг ($p < 0,05$).

Следовательно, блокада синтеза NO увеличила констрикторный эффект ПГФ2 α в 2,3 раза, блокада K $_{ir}$ калиевых каналов – на 83%,

K $_{ir}$ и кальцийактивируемых калиевых каналов (так же, как и ингибирование синтеза NO) увеличила прирост напряжения, вызываемый ПГФ2 α , в 2 раза. Таким образом, вклад различных калиевых каналов в регуляцию сократительной активности сосудистой гладкой мышцы не менее важен, чем NO, высвобождаемого сосудистым эндотелием.

Сочетанная блокада синтеза NO и K $_{ir}$ калиевых каналов, а также NO и большинства калиевых каналов привела к увеличению прироста напряжения контрольного сегмента аорты в 3,3 и в 3,9 раза, по сравнению с действием только ПГФ2 α в условиях интактной системы синтеза NO.

Следовательно, блокада синтеза NO усиливает блокирующий эффект ионов Ca^{+2} и тетраэтиламмония в отношении калиевых каналов и снижает их противодействие констрикторному эффекту ПГФ2 α .

Влияние иммобилизационного стресса на величину вызываемого простагландином F2 α прироста напряжения кольца аорты, наблюдаемого при добавлении ионов бария, тетраэтиламмония до и после блокады синтеза NO и простагландинов.

Под влиянием иммобилизации в условиях блокады синтеза NO и простагландинов, K $_{ir}$

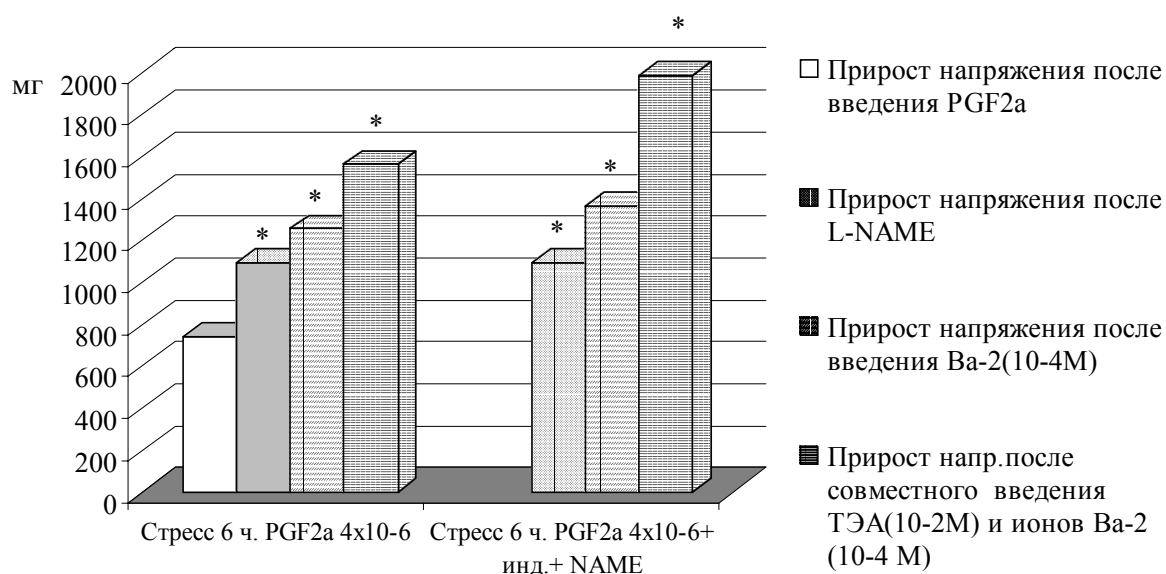


Рис. 2. Влияние 6-часового иммобилизационного стресса на прирост напряжения изолированного кольца аорты крысы, вызываемый простагландином F2 α на фоне блокады синтеза NO, введения ионов бария (10^{-4} М) и их сочетания с тетраэтиламмонием (10^{-2} М); * - $p < 0,05$ по сравнению со значением прироста напряжения аорты, полученного после введения только простагландина F2 α .

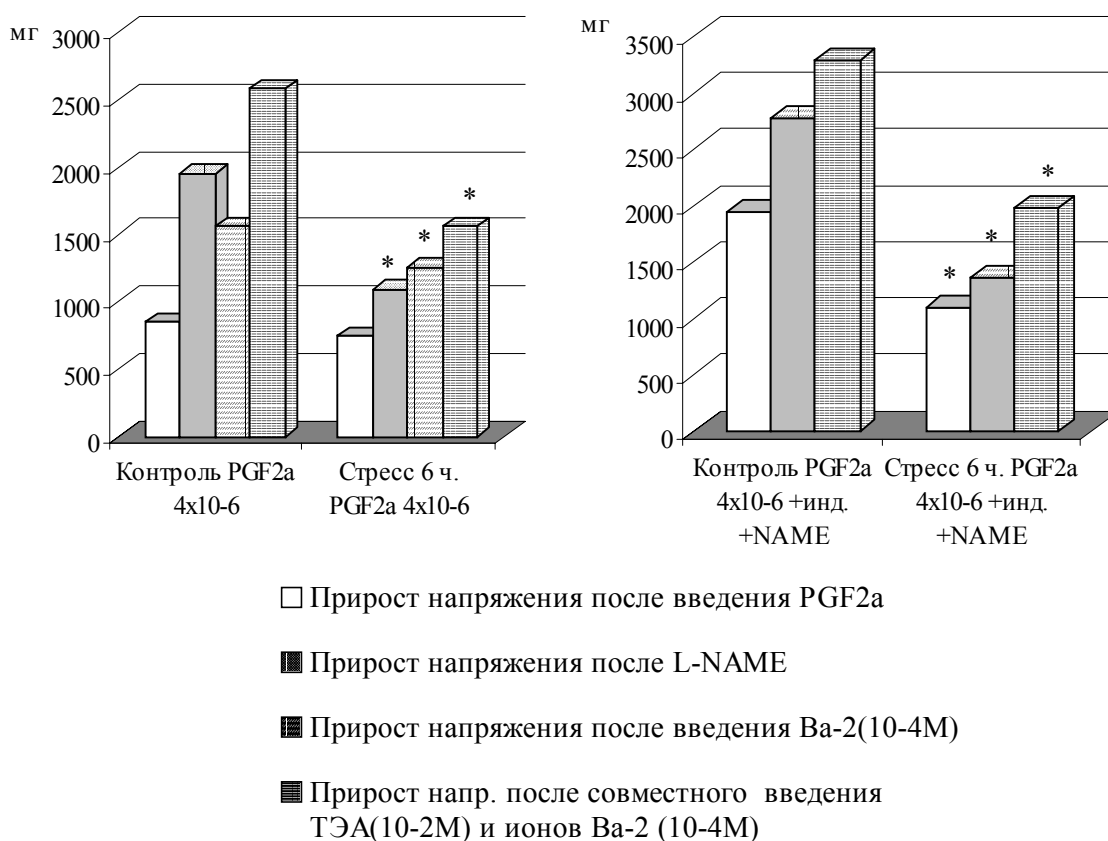


Рис. 3. Сравнение влияния 6-часового иммобилизационного стресса на прирост напряжения изолированного кольца аорты крысы, вызываемый простагландином F2α после введения ионов бария (10⁻⁴М) и их сочетания с тетраэтиламмонием (10⁻² М) до и после блокады синтеза NO, простагландинов, * - p<0,05 по сравнению с данным значением прироста напряжения аорты в контроле, полученным после введения только простагландина F2α.

каналов, а также K_{Ca} каналов наблюдался значительно меньший прирост напряжения, вызываемый ПГF2α (рис. 2, 3). В аорте крыс, перенесших стресс, после блокады синтеза NO, он составил всего лишь 29% (в контроле – 230%), K(ir) – 44% (в контроле 83%) и сочетанного влияние ионов бария и тетраэтиламмония - 84% (в контроле – 300%). На фоне блокады синтеза NO барий и тетраэтиламмоний оказывали более выраженный эффект, однако величина приростов напряжения была на 51% и 40%, соответственно, меньшей, чем в контроле после добавления L-NAME и индометацина.

Следовательно, под влиянием стресса снижается функциональная роль калиевых каналов, в отношении регуляции сократительной активности гладкой мышцы аорты, а блокада синтеза NO ограничивает, но не устраняет характерное для стресса падение тонуса сосудистой гладкой мышцы. Сочетание блокады синтеза NO и различных семейств калиевых каналов практически полностью устраняет пост-

стрессорное снижение напряжения гладкой мышцы, но в значительно в меньшей степени, чем в контроле, повышает сократительную активность ПГF2α.

Таким образом, становится очевидным, что NO, а также K(ir), K_{Ca} каналы гладкомышечной клетки представляют собой систему противодействия сокращению, вызываемому вазоконстрикторами. Кроме того, система калиевых каналов является мишенью действия длительного и интенсивного стрессорного воздействия, такого, как иммобилизация.

Обращает на себя внимание тот факт, что в отличие от контроля, после иммобилизационного стресса, блокирующий эффект L-NAME и индометацина оказывается менее сильным, чем действие ионов бария. Это дает основание полагать, что в регуляции сократительной активности гладкой мышцы после стресса не менее важную роль, чем монооксид азота играют внутренне очищающие, а также другие виды калиевых каналов (возможно, K_{Ca})

Применяемая нами доза (10мМ) тетраэтиламмония неселективно блокирует K_{Ca} каналы [16], тем самым выявляя их функциональное значение. Известно, что монооксид азота имеет важное значение в регуляции функциональной активности K_{Ca} каналов. В связи с этим можно предположить, что характерное для стресса увеличение в эндотелии, а, возможно, и в гладкомышечных клетках продукции NO вносит существенный вклад в модуляцию функциональной активности калиевых каналов. Кроме того, в последнее время стало известно, что при стрессе снижается количество восстановленного глутатиона. Это также способно оказывать влияние на функцию калиевых каналов. В связи с этим можно заключить, что 6-часовая иммобилизация сопровождается как повышением напряжения систем подавления констрикторного потенциала гладкой мышцы, так, по-видимому, снижением сократительной активности гладкой мышцы, что, очевидно, имеет важное значение в предупреждении развития стрессиндуцированного повышения тонуса, а, возможно, и спазма артериальных сосудов. На основании вышесказанного можно предположить, что только сочетанное нарушение продукции эндотелиального NO и функции системы калиевых каналов гладкомышечных клеток может быть причиной критического сужения просвета артериальных сосудов, способного привести к нарушению кровоснабжения органа.

Литература

1. Блатнер Р., Классен Х., Денерт Х. и др. Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц // М.: Мир. - 1983. - С.208.
2. Ванин А.Ф., Манухина Е.Б., Лапшин А.В. и др. Усиление синтеза оксида азота в стенке аорты при экспериментальном инфаркте миокарда // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1993. - №8. - С. 142-144.
3. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю., Микоян В.Д. и др. Увеличение продукции оксида азота в органах крысы при тепловом шоке // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1996. - №5. - С.520-523.
4. Стокле Ж.-К., Мюллер Б., Андрианцитохайна Р., Клещев А. Гиперпродукция оксида азота в патофизиологии кровеносных сосудов // Биохимия. - 1998. - Т.7. - С.976-983.
5. Ульяновский Л.С., Медведев О.С., Бунятян А.М. и др. Изменение гемодинамики при иммобилизационном стрессе // Бюлл.эксперим. биол. мед.- 1985.- №9.- С.262-265.
6. Bolton T.B., Lang R.J., Takewaki T. Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery // J. Physiol. - 1984. Vol.351. - P.549-572.
7. Edwards G., Dora K.A., Gardener M.J., Garland C.J. et al. K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries // Nature.- 1998.-Vol.396. - P.269-272.
8. Edwards G., R.R. Gillian, M.J. Gardener et al. Roles of the inward-rectifier K^+ channel and Na^+/K^+ -ATP-ase in the hyperpolarization to K^+ in rat mesenteric arteries // EDHF 2002. -2003 - P.309-317.
9. Gauthier K. M., N.J. Rusch Potassium channels and membrane potential in vascular endothelial and smooth muscle cells // EDHF 2002.-Edited by Paul M.Vanhoutte.-Taylor & Francis, 2003. - P.256-260.
10. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // Nature.- 1980.- Vol.299. - P.373-376.
11. Koch M.A., Hasser E.M., Schadt J.C. Influence of nitric oxide on the hemodynamic response to hemorrhage in conscious rabbits // Am. J. Physiol. - 1995.
12. Mitsuhashi H., Takeuchi H., Saitoh J. et al. An inhibitor of nitric oxide synthase, N(omega)-nitro-L-arginine-nethyl ester, attenuates hypotension but does not improve cardiac depression in anaphylaxis in dogs // Shock. - 1995. - Vol.3. - P.447-453.
13. Nagao T.,Vanhoutte P.M Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxation // Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.- 1993.- Vol. 8.- P. 1-6.
14. Parkington H.C., Chow J.M., Evans R.G. et al. Role for endothelium derived hyperpolarizing factor in vascular tone in rat mesenteric and hindlimb circulations in vivo // J. Physiol. - 2002. - Vol.542. - P.929-937.
15. Taddei S., Ghiadoni L., Viridis A. et al. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients // Circulation. - 1999. - Vol.100. - P.1400-1405.
16. Vanhoutte P. I M. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better // J. Clin. Investig. - 2001. - Vol.107. № 1. - P.23-25.
17. Widman M.D., Weintraub N.L., Fudge J.L. et al. Cytochrome P-450 pathway in acetylcholine-induced canine coronary microvascular vasodilation in vivo // Am. J.Physiol. - 1998. - Vol.274. - P.H283-H289.

Поступила 18.06.2004 г.
Принята в печать 25.06.2004 г.