

УДК 612.73:611.1:616-003.725

Е. И. Никитина, М. Ф. Шуба

О МЕХАНИЗМАХ РАССЛАБЛЯЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ВЕРАПАМИЛА И НОРАДРЕНАЛИНА НА ГЛАДКОМЫШЕЧНЫЕ КЛЕТКИ КРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

На основании предыдущих наших исследований было высказано предположение, что внеклеточные ионы кальция, участвующие в активации тонического сокращения (базального тонуса) гладких мышц коронарных артерий входят в гладкомышечные клетки (ГМК) через два типа стационарно открытых кальциевых каналов мембраны: 1) медленные потенциалозависимые неинактивирующиеся и 2) хемочувствительные [1, 2]. Судя по литературным данным и результатам наших исследований [3—7], можно полагать, что медленные потенциалозависимые неинактивирующиеся кальциевые каналы обладают более высокой чувствительностью к верапамилу, блокатору кальциевого тока, чем быстрые потенциалозависимые инактивирующиеся и, особенно, хемочувствительные кальциевые каналы мембраны. В этой связи представляло интерес сравнительное исследование действия верапамила и норадреналина на тонус ГМК коронарных артерий. Этому вопросу и посвящена настоящая работа.

Методика исследований

Исследования проведены на кольцевых полосках коронарных артерий крупного рогатого скота с наружным диаметром 1,2—3 мм с помощью метода двойного сахарозного мостика с одновременной регистрацией электрической и сократительной активности ГМК. До начала опыта препараты выдерживали не менее 90 мин в нормальном растворе Кребса и не менее 60 мин в том же растворе, но уже в экспериментальной камере при постоянной нагрузке $(7-10) \cdot 10^{-3}$ Н, которая сохранялась во все время эксперимента. Для отведения электрической активности и раздражения ГМК использовали хлорсеребряные электроды. Контакт между мышечной полоской и электродами осуществляли через агаровые мостики. В качестве основного раствора применяли раствор Кребса следующего состава (в ммоль): NaCl—120,4; NaHCO_3 —15,5; KCl—5,9; MgCl_2 —1,2; NaH_2PO_4 —1,2; CaCl_2 —2,5; глюкоза—11,5 на литр бидистиллированной воды. К применявшемуся бескальциевому раствору прибавляли ЭГТА в концентрации 0,5 ммоль/л для связывания возможных следов свободного кальция, а содержание MgCl_2 повышали до 12 ммоль/л для стабилизации мембраны ГМК. Исследуемые фармакологические вещества (норадреналин, верапамил) в соответствующих концентрациях вводили в эти растворы. Все растворы аэрировали газовой смесью, состоящей из 95% O_2 и 5% CO_2 , а их температуру поддерживали в пределах 36—37 °С.

Результаты исследований

На рис. 1, А показано действие различных концентраций верапамила на базальный тонус мышечной полоски коронарной артерии. Видно, что уже при концентрации верапамила 10^{-9} моль происходит значительное понижение тонуса, которое достигает своего максимума на 10—15 мин. Последующее увеличение концентрации верапамила до 10^{-7} моль привело к дальнейшему расслаблению мышечной полоски, а повышение концентрации до 10^{-6} — 10^{-5} моль не оказывало влияния на тонус. При всех исследованных концентрациях верапамила потенциал покоя (ПП) ГМК существенно не изменялся (рис. 2, Б—З).

На рис. 1, Б представлен график зависимости степени расслабления мышечной полоски от концентрации верапамила в растворе Кребса ($n=4$), из которого видно, что максимальное расслабление достигается

при концентрации верапамила 10^{-5} моль. Половинный эффект верапамила оказывает уже в концентрации $2 \cdot 10^{-9}$ моль.

Сравнительные исследования расслабляющего действия верапамила и бескальцевого раствора Кребса на одну и ту же полосу показали, что верапамил не полностью блокирует вход в ГМК коронарных артерий внеклеточного кальция, участвующего в активации базального тонуса. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 1, В, Г, из которого видно, что на фоне действия верапамила дополнительное расслабление, вызываемое бескальцевым раствором, бу-

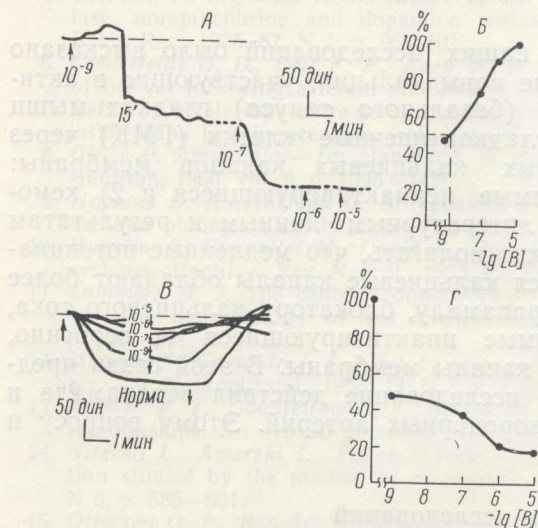


Рис. 1. Действие различных концентраций верапамила на базальный тонус и расслабление в бескальцевом растворе гладких мышц коронарных артерий.

А — снижение тонуса при увеличении концентрации верапамила в растворе Кребса. Вертикальная часть записи — остановка ленты самописца на 15 мин. Стрелки — начало действия соответствующей концентрации верапамила. Б — график зависимости степени расслабления мышечной полоски от концентрации верапамила в наружном растворе. По горизонтали — отрицательный логарифм концентрации верапамила. По вертикали — амплитуда расслабления в % к вызванному максимальной (10^{-5} моль) концентрацией верапамила. В — расслабление полоски в ответ на удаление ионов кальция из раствора с различными концентрациями верапамила. Стрелки — начало и конец действия бескальцевого раствора. Г — график зависимости расслабления полоски в ответ на удаление ионов кальция от концентрации верапамила в омывающем растворе. По горизонтали — отрицательный логарифм концентрации верапамила. По вертикали — расслабление полоски в % к контрольному.

дет тем больше, чем меньше концентрация верапамила. При максимальной концентрации верапамила (10^{-5} моль) дополнительное расслабление полоски составляет в среднем 18 % от реакции на удаление ионов кальция в норме, то есть эта часть входа в ГМК ионов Ca^{++} не чувствительна к блокирующему действию верапамила. В этой связи представляло интерес сравнение между собой расслабляющего действия верапамила, бескальцевого раствора и норадреналина. Результаты одного из подобных опытов представлены на рис. 2, А. В этом опыте вначале на мышечную полосу действовали норадреналином в максимальной концентрации (10^{-5} моль). Под влиянием этой концентрации норадреналина произошло значительное расслабление (рис. 2, А—1). После этого норадреналин отмывали, в результате чего тонус мышечной полоски восстанавливался. Затем на эту же полосу действовали верапамилем в максимальной концентрации (10^{-5} моль), что также привело к расслаблению мышечной полоски. Однако это расслабление оказалось значительно меньшим, чем первоначальное норадреналиновое расслабление. Добавление же к омывающему полосу раствору Кребса с верапамилем норадреналина (10^{-5} моль) вызывало дополнительное расслабление полоски, которое по абсолютной величине было заметно меньше, чем в контроле, но в сумме с верапамилем было даже больше, чем норадреналиновое расслабление в контроле. Оказалось, что величина добавочного норадреналинового расслабления на фоне действия верапамила состоит как бы из суммы расслабления, вызываемого бескальцевым раствором на фоне действия верапамила, и последующего добавочного расслабления, вызываемого норадреналином на фоне совместного действия верапамила и бескальцевого раствора (рис. 2, А—2).

Соотношение величин расслабления в бескальцевом растворе и в нормальном ($n=27$). Если норадреналин вызывает расслабление на 100 %, то верапамил вызывает в среднем 58,4 % расслабления. В бескальцевом растворе — 17,3 %.

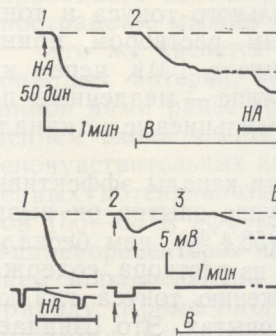


Рис. 2. Действие норадреналинового раствора и гиперполяризации.

А — расслабление полоски в ответ на действие норадреналина в максимальной концентрации (верхняя кривая) и тонуса (нижняя кривая). Б — график зависимости расслабления полоски в ответ на удаление ионов кальция от концентрации верапамила в омывающем растворе. По горизонтали — отрицательный логарифм концентрации верапамила. По вертикали — расслабление полоски в % к контрольному.

Рис. 3. Относительные величины расслабления в бескальцевом растворе и в нормальном. Заштрихованные столбики — расслабление в бескальцевом растворе.

составляет только 23 %. Новое расслабление было на 50—60 % меньше, чем в нормальном растворе. В норадреналиновом растворе расслабление было на 100 %, верапамил вызывал по величине к наблюдению. Наконец, было установлено, что новое расслабление, вызываемое адреналином коронарных артерий. В верапамиле были найдены из опытов представленные небольшие гиперполяризации мышечной полоски. Анэлектротоническое расслабление, вызываемое адреналином, было несколько большим, чем норадреналиновое. В верапамиле, что было несколько большим, чем норадреналиновое, гиперполяризацией верапамила анэлектротоническое расслабление вызывало мембрану, уменьшая тонус мышечной полоски.

Соотношение величин расслаблений, вызываемых норадреналином, бескальциевым раствором и верапамилом, представлено на рис. 3, I ($n=27$). Если норадреналиновое расслабление в контроле принять за 100 %, то верапамилорасслабление и бескальциевое расслабление будут составлять в среднем 58,4 и 68,8 % соответственно. На фоне же верапамилорасслабления норадреналиновое составляет в среднем 51,9, а бескальциевое — 17,3 % от нормального норадреналинового расслабления. В бескальциевом растворе добавочное норадреналиновое расслабление

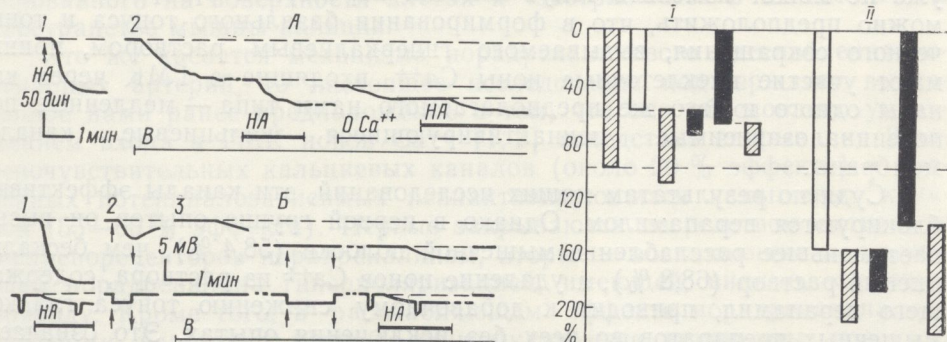


Рис. 2. Действие норадреналина (10^{-5} моль), верапамила (10^{-5} моль), бескальциевого раствора и гиперполяризующего тока на мембранный потенциал и базальный тонус гладких мышц коронарных артерий.

А — расслабление полоски под действием норадреналина в норме (1) и на фоне действия верапамила и бескальциевого раствора с верапамилом (2). Б — изменение мембранного потенциала (нижняя кривая) и тонуса (верхняя кривая) гладкомышечных клеток коронарных артерий при действии норадреналина (1) и гиперполяризующего тока (2) в норме и на фоне действия верапамила (3). Стрелки — начало и конец действия анэлектротонической гиперполяризации.

Рис. 3. Относительные величины расслаблений полосок коронарных артерий, вызванных норадреналином, верапамилом и бескальциевым раствором.

Заштрихованные столбики — норадреналин (10^{-5} моль), белые — верапамил (10^{-5} моль), черные — бескальциевый раствор. Остальные обозначения в тексте.

составляет только 23,2 %. Однако в части опытов общее норадреналиновое расслабление мышечной полоски коронарной артерии в контроле было на 50—60 % меньше, чем вызываемое верапамилом или бескальциевым раствором (рис. 3, II; $n=18$). Тем не менее добавочное норадреналиновое расслабление на фоне действия бескальциевого раствора и, особенно, верапамила, сохранялось и было довольно близким по величине к наблюдаемому в первой группе экспериментов.

Наконец, было исследовано действие верапамила на норадреналиновое расслабление, сопровождаемое гиперполяризацией, и на расслабление, вызываемое анэлектротонической гиперполяризацией ГМК коронарных артерий. Во всех этих опытах концентрации норадреналина и верапамила были максимальными (10^{-5} моль). Типичная запись одного из опытов представлена на рис. 2, Б. В контроле норадреналин вызывал небольшую гиперполяризацию клеток, сопровождавшуюся уменьшением сопротивления мембраны и заметным расслаблением мышечной полоски. Анэлектротоническая гиперполяризация ГМК, равная по величине норадреналиновой, также сопровождалась расслаблением мышечной полоски. Однако это расслабление было значительно меньшим, чем норадреналиновое. Затем на ту же полоску подействовали верапамилом, что привело к ее расслаблению, которое оказалось немного большим, чем расслабление, вызванное анэлектротонической гиперполяризацией до действия верапамила. На фоне же действия верапамила анэлектротоническая гиперполяризация не вызвала добавочного расслабления, тогда как норадреналин еще гиперполяризовал мембрану, уменьшал ее сопротивление и заметно снижал тонус мышечной полоски.

Обсуждение результатов исследований

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что верапамил эффективно расслабляет мышцы коронарных артерий, с константой диссоциации (K_d) $2 \cdot 10^{-9}$ моль. Эта величина довольно близка к наблюдаемой при действии верапамила на тоническую компоненту калиевой контрактуры в различных гладких мышцах [3, 5]. Кроме того, на фоне действия верапамила гиперполяризующий ток уже не может изменить тонус полосы коронарной артерии. Поэтому можно предположить, что в формировании базального тонуса и тонического сокращения, вызываемого гиперкалиевым раствором, принимают участие внеклеточные ионы Ca^{++} , входящие в ГМК через каналы одного и того же предполагаемого нами типа — медленные потенциалозависимые неинактивирующиеся кальциевые каналы мембраны.

Судя по результатам наших исследований, эти каналы эффективно блокируются верапамилом. Однако в первой группе опытов он вызывает меньшее расслабление мышечной полосы (58,4 %), чем бескальциевый раствор (68,8 %), а удаление ионов Ca^{++} из раствора, содержащего верапамил, приводит к добавочному снижению тонуса гладкомышечных препаратов во всех без исключения опытах. Это означает, что не все пути входа в ГМК кальция, который активирует базальный тонус, блокируются верапамилом. Судя по степени расслабления полосы в бескальциевом растворе, верапамилустойчивая фракция составляет около 20 % от общего количества входящего в ГМК и активирующего базальный тонус кальция. Мы предполагаем, что эта фракция кальция входит в ГМК через стационарно открытые хемочувствительные и, в частности, β -адреночувствительные кальциевые каналы мембраны. Тем более, что в литературе уже имеются данные о том, что верапамил действительно недостаточно эффективно блокирует хемочувствительный вход в клетки ионов Ca^{++} [7—10, 12].

При анализе результатов наших экспериментов нам пришлось разделить их на две группы. В первую вошли опыты, в которых норадреналиновое расслабление было больше, чем вызываемое верапамилом или бескальциевым раствором (рис. 3, I); во вторую — опыты, в которых наблюдалось обратное соотношение (рис. 3, II). Очевидно, эти две группы гладкомышечных препаратов различались по своей чувствительности к норадреналину. Это различие можно объяснить, предположив, что мышечные полосы второй группы были повреждены во время препаровки, вследствие чего ГМК были деполяризованы, поскольку известно, что в деполяризованной калием гладкой мышце коронарной артерии норадреналин вызывает расслабление, составляющее только 40—45 % от нормального [2]. В пересчете на такую величину норадреналинового расслабления результаты обеих групп экспериментов совпадают. Естественно, в случае деполяризованной мышцы верапамил, как блокатор потенциалозависимого входа кальция в клетки, и бескальциевый раствор будут сильнее расслаблять ГМК, нежели норадреналин. Этим же можно объяснить и случаи несовпадения суммы верапамилового и дополнительного норадреналинового расслабления на фоне верапамила с величиной общего норадреналинового расслабления в контроле (рис. 2, А—З), наблюдаемые в первой группе опытов, а также случаи отсутствия гиперполяризации ГМК коронарных артерий при действии норадреналина, о чем мы сообщали ранее [1].

Различие же в соотношении реакций на действие верапамила и бескальциевого раствора этих двух групп гладкомышечных препаратов становится понятным с учетом того, что в реакциях сокращения — расслабления гладких мышц может принимать участие и кальций, связанный с наружной поверхностью мембраны клеток [11]. Его роль ста-

новится более заметной в таких условиях мышечной деятельности, когда большее число кальция связывается с эффектами этого, связанного с другими источниками. О верапамилом устраняется в бескальциевом же растворе борованного на поверхности пространства мышцы.

Что же касается коронарных артерий, то, как известно, данное нами ранее предположение о входе в ГМК реночувствительных кальциевых потенциалозависимых (55—60 % эффекта) β -адренорецепторов не имеет норадреналина природу. Кроме того, видимо, участвуют в этом процессе и другие механизмы, в которых снижается миоплазма (около 20 %). Например, в сопрягающем механизме посредством циклического удаления ионов Ca^{++} .

На основании изложенного можно предположить, что лин полностью устраняется коронарных артерий. В связи с этим расслабление этих мышц норадреналином, который вызывает расслабление, близительное к верапамилу, что это расслабление не является кальцием, а одним из коронарных артерий нергических рецепторов можно допустить и для коронарного кровотока.

ON MECHANISMS OF RELAXING EFFECTS

Effect of verapamil, on the contractile activity of bovine coronary arteries. The basal tonus of coronary arteries and the level of calcium ions. The action of verapamil on the slow potential-dependent calcium channels of the SMC membrane.

Department of Neuromuscular Physiology, A. A. Bogomoletz Institute of Physiology, Academy of Sciences, Ukraine.

новится более заметной в деполяризованной мышце, поскольку именно в таких условиях мышечные клетки имеют в рабочем состоянии гораздо большее число кальциевых каналов, чем в поляризованной мышце, где эффекты этого, связанного с наружной мембраной кальция относительно малы и маскируются гораздо большими эффектами кальция из других источников. Очевидно, при блокаде входа ионов Ca^{++} в ГМК верапамилом устраняется любой потенциалозависимый вход кальция, в бескальциевом же растворе может сказываться присутствие адсорбированного на поверхности клетки и «застывшего» в межклеточном пространстве мышцы кальция.

Что же касается механизма норадреналинового расслабления коронарных артерий, то настоящее исследование подтверждает высказанное нами ранее предположение о том, что оно обусловлено уменьшением входа в ГМК ионов Ca^{++} [1, 2] вследствие закрывания β -адреночувствительных кальциевых каналов (около 20 % эффекта) и медленных потенциалозависимых неинактивирующихся кальциевых каналов (55—60 % эффекта). Первые закрываются посредством активации β -адренорецепторов норадреналином, вторые — возникающие под влиянием норадреналина гиперполяризацией, имеющей, видимо, калиевую природу. Кроме того, в расслабляющем эффекте норадреналина, по-видимому, участвуют какие-то внутриклеточные механизмы, посредством которых снижается концентрация ионизированного кальция в миоплазме (около 20—25 % эффекта). Какие это механизмы — трудно сказать. Например, высказывается предположение [4], что основным сопрягающим механизмом является вызываемая катехоламинами через посредство циклической АМФ интенсификация кальциевого насоса, удаляющего ионы Ca^{++} из клетки.

На основании изложенного можно предположить, что норадреналин полностью устраняет базальный тонус гладких мышц коронарных артерий. В связи с этим возникает вопрос, каким образом происходит расслабление этих мышц под влиянием других медиаторов, например аденозина, который вызывает расслабление мышечной полоски, приблизительно равное по величине норадреналиновому [1]? Можно полагать, что это расслабление также зависит в основном от внеклеточного кальция, и одни и те же кальциевые каналы мембраны ГМК коронарных артерий управляются со стороны как пурин-, так и адренергических рецепторов. Такой же механизм действия и взаимодействия можно допустить и для других медиаторов, участвующих в регуляции коронарного кровотока.

E. I. Nikitina, M. F. Shuba

ON MECHANISMS OF VERAPAMIL AND NOREPINEPHRINE RELAXING EFFECTS ON CORONARY ARTERY SMOOTH MUSCLE CELLS

Summary

Effect of verapamil, norepinephrine and calcium-free solution on electrical and contractile activity of bovine coronary artery smooth-muscle cells (SMC) with a 1.5-3 mm outside diameter was studied using the double-sucrose gap method. Verapamil decreased the basal tonus of coronary strips with $K_d=2 \cdot 10^{-9}\text{M}$, but had no influence on electrical properties of the SMC membrane. Calcium-free solution against the verapamil background led to an additional decrease of the tonus. Norepinephrine (10^{-5}M) caused hyperpolarization and decrease of the SMC membrane resistance and also dilation of the muscle strip, the latter being to some extent persistent in calcium-free and verapamil solutions ($10^{-9} \cdot 10^{-5}\text{M}$). It is suggested that norepinephrine-dependent dilation of the coronary arteries and the level of their basal tonus depend on both the intra- and extracellular calcium ions. The action of extracellular calcium ions is connected with functioning of slow potential-dependent and chemosensitive potential-independent calcium channels.

Department of Neuromuscular Physiology,
A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Список литературы

1. Никитина Е. И. Действие норадреналина и ионов калия на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток коронарных артерий. — Физиол. журн. СССР, 1980, 66, № 10, с. 1493—1498.
2. Никитина Е. И., Кочемасова Н. Г., Тараненко В. М., Шуба М. Ф. О механизме расслабляющего действия норадреналина на гладкомышечные клетки коронарных артерий. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1981, 91, № 5, с. 517—520.
3. Тараненко В. М., Кочемасова Н. Г., Никитина Е. И., Шуба М. Ф. Селективное торможение верапамилом тонической компоненты калиевой контрактуры гладкомышечных клеток воротной вены. — Там же, 1978, 88, № 9, с. 311—314.
4. Шишкин С. Б., Баранов А. Г. Действие норадреналина на гладкомышечные клетки коронарных артерий. — Физиол. журн. СССР, 1979, 65, № 4, с. 606—610.
5. Шуба М. Ф., Тараненко В. М., Кочемасова Н. Г. Действие ионов марганца и верапамила на электрогенез и сокращение в гладких мышцах мочеточника. — Там же, 1980, 66, № 8, с. 1209—1216.
6. Churchill P. C. Effect of D-600 on inhibition of *in vitro* renin release in the rat by high extracellular potassium and angiotensin. — II. — J. Physiol., 1980, 304, July, p. 449—458.
7. Freer R. J. Calcium and angiotensin tachyphylaxis in rat uterine smooth muscle. — Amer. J. Physiol., 1975, 228, № 5, p. 1423—1430.
8. Haessler G. Differential effect of verapamil on excitation-contraction coupling in smooth muscle and on excitation — secretion coupling in adrenergic nerve terminals. — J. Pharmacol. and Exp. Therap., 1972, 180, № 3, p. 672—682.
9. Kohlhardt M., Bauer B., Krause H., Fleckenstein A. Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors. — Pflüger Arch. gen. Physiol., 1972, 335, № 4, p. 309—322.
10. Shuman H. J., Görlitz B. D., Wagner J. Influence of papaverine, D-600, and nifedipine on the effects of noradrenaline and calcium on the isolated aorta and mesenteric artery of the rabbit. — Naunin-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1975, 289, N 4, p. 409—418.
11. Van Breemen C., Lontzenhiser R., Mangel A., Meisheri K. Ca^{2+} -compartments in vascular smooth muscle: Adv. Physiol. Sci., Molecular and cellular aspects of muscle function/ Eds. Varga E., Köber A., Kovach T., Kovach L. New York: Pergamon; Budapest: Akad. Kiadó, 1981, vol. 5, p. 47—58.
12. Van Breemen C., Siegel B. The mechanism of α -adrenergic activation of the dog coronary artery. — Circulat. Res., 1980, 46, N 3, p. 426—429.

Отдел нервно-мышечной физиологии
Института физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
27.08.81.

УДК 612.73:612.467.1:615.218.

НА ИОННЫЕ
МОЧ

Было показано, действием на гладкие мышцы свинки, выражающемся в изменении действия (ПД), сокращения [13, 14] ионным составом ПД обусловлено вхождением ионов в рецептивные потенциалы плато. Удлинение плато под действием гистамина их кинетический анализ позволил получить только с помощью этой проблемы.

Эксперименты проводились в условиях фиксации тока 500 мкА. Исследовали потенциалы действия в течение 50 мс и амплитуду мембраны фазы фиксации на заданном уровне при разрезании мочеточника из целого мочеточника $\times 10$ мм.

На целом мочеточнике 3×10^{-6} моль вызывало увеличение потенциала плато концентрации гистамина 3×10^{-7} моль почти в 2 раза до $1,5 \times 10^{-6}$ и дальнейшее повышение вызывает. При повышении ряда с удлинением (3—5 мВ) и увеличении на 20 %. При длительном потенциале покоя.

Мышечная структура продольного и кольцевого мускулатуры на оба слоя удлинения плато I-ных клеток кольцевых гистаминов не удлинения мембран