

УДК 612.73

С. А. Берштейн, А. И. Соловьев, О. В. Базилук

РЕЛАКСИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ СНИЖЕНИЯ ОКСИГЕНАЦИИ СКИНИРОВАННЫХ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКИХ МЫШЦ, НЕ СВЯЗАННЫЙ С ИЗМЕНЕНИЕМ КОНЦЕНТРАЦИИ Ca^{2+} В МИОПЛАЗМЕ

Высокая чувствительность сосудистых гладких мышц к изменениям уровня их оксигенации является фактом, не вызывающим сомнений. Вместе с тем локализация в гладкомышечных волокнах так называемого кислородного сенсора, т. е. по сути механизма, обуславливающего эту высокую чувствительность, пока не установлена. В настоящее время существуют достаточно веские доводы в пользу влияния изменений оксигенации не только на энергетический обмен гладкомышечных волокон, но также и на мембранные механизмы, ответственные за внутри- и внеклеточный транспорт кальция. Следует, однако, учитывать и возможность влияния изменений оксигенации сосудистых гладких мышц на функциональные свойства их миофибрилярного аппарата.

Эффективной моделью для исследования большинства перечисленных вопросов представляются так называемые химически скинированные гладкие мышцы, поскольку на них могут быть воспроизведены сокращения без участия возбудимых мембранных структур. Наряду с этим функциональное разрушение клеточных и субклеточных мембран позволяет задавать и контролировать концентрацию ионизированного кальция и АТФ в миоплазме гладкомышечных волокон.

Методика исследований

Из известных способов химического скинирования гладких мышц наиболее предпочтительным представляется метод, основанный на использовании детергента сапонины [1, 4], поскольку он позволяет на протяжении нескольких часов сохранять без заметных изменений сократительную способность миофибрилярного аппарата гладкомышечных волокон.

Эксперименты выполняли на препаратах воротной вены крыс после как можно более тщательного удаления их адвентициального слоя. Препараты сосуда помещали в перфузируемую ячейку объемом 0,7 см³ и подвергали предварительному натяжению силой $3-4 \cdot 10^{-3}$ Н. По истечении 60-90 мин перфузии оксигенированным раствором Кребса при температуре 25 °С и pH 7,4 воспроизводили сократительную реакцию гладких мышц на увеличение внеклеточной концентрации ионов калия (60-130 ммоль), используемую впоследствии для контроля (рис. 1, а). После этого исследуемый препарат воротной вены переводили на перфузию стандартным релаксирующим раствором (температура — 20 °С и pH 6,8) следующего состава (в ммоль): KCl — 130; MgCl₂ — 5; трис-HCl — 20; АТФ — 3,3; ЭГТА — 4. Перфузия релаксирующим раствором продолжалась 20 мин. Затем к релаксирующему раствору добавляли сапонин (0,1 мг/см³) и перфузировали сосудистый препарат в течение последующих 20 мин. Вслед за этим вновь возобновляли перфузию стандартным релаксирующим раствором, который и использовали в качестве перфузата на протяжении всего эксперимента на скинированных гладких мышцах.

Для воспроизведения сокращений скинированных гладких мышц воротной вены к стандартному релаксирующему раствору добавляли соответствующие концентрации CaCl₂ с учетом константы связывания комплекса Ca-ЭГТА, равной 10^6 M^{-1} при pH — 6,8.

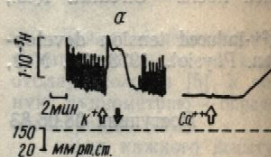
Изменения оксигенации скинированных гладких мышц воротной вены осуществляли путем снижения P_{O_2} в перфузате с 148 до 20 мм рт. ст. контролируемого полярографически.

Результаты исследований и их обсуждение

Эксперименты выполняли в двух модификациях. В одной из них сопоставляли сокращения скинированных гладких мышц воротной вены, вызываемые добавлением Ca^{2+} (10^{-4} моль) к оксигенированному (P_{O_2} —148 мм рт. ст.) и к гипоксическому (P_{O_2} —20 мм рт. ст.) перфузату (см. рисунок, б). При этом добавление Ca^{2+} к оксигенированному перфузату приводило к тоническому сокращению скинированных гладких мышц воротной вены, амплитуда которого составляла в среднем $0,33/10^{-3}$ Н/мг влажного веса препарата. Снижение напряжения кислорода в перфузате, содержащем ту же

концентрацию Ca^{2+} , до 20 мм рт. ст. сниженным и заметно более

В другой постановке вены, вызываемое Ca^{2+} в ном (P_{O_2} —148 мм рт. ст.) ствлялся перевод на перфу же содержанием Ca^{2+} (см.



Сократительные реакции и концентрации K^{+} и скинир

Белые стрелки — начало возде

ческим раствором, несмотря существенным и сравнительно 60%) амплитуды сокраще

Для исключения пред центрации ионизированного понированию Ca^{2+} внутри подвергали воздействию ко менений амплитуды сокра в одном из опытов обнару вает сокращение сосудист клеточными структурами и пами концентрации сапони субклеточных мембран, и, Ca^{2+} может быть исключе

Скинированные гладк Ca^{2+} , и концентрация посл фузате. В наших экспери стоянной. Это позволяет, мость выраженности сокра мышц от уровня оксигенац в миоплазме гладкомышечн

Во-вторых, наблюдае гладких мышц от уровня с сов макроэргических соеди центрация АТФ в перфузате эксперимента постоянной, служить препятствием дост

Результаты выполнени то, что снижение уровня о релаксирующее влияние, из рата гладкомышечных воло ния [3], что изменение чув потенциалным механизмом тельной способности миоф сосудистой стенки, обусловл сродства сократительных б что в этих условиях снижа гладких мышц.

Базилук

ОКСИГЕНАЦИИ ГЛАДКИХ МЫШЦ, КОНЦЕНТРАЦИИ

к изменениям уровня их. Вместе с тем локализация го сенсора, т. е. по сути, пока не установлена. в пользу влияния измене- дкомышечных волокон, но ри- и внеклеточный транс- злияния изменений оксиге- тва их миофибрилярного

а перечисленных вопросов гладкие мышцы, поскольку я возбудимых мембранных чных и субклеточных мем- нонизированного кальция

гладких мышц наиболее пред- ызовании детергента сапо- льких часов сохранять без лярного аппарата гладко- ны крыс после как можно епараты сосуда помещали дварительному натяжению сгенированным раствором сократительную реакцию ни ионов калия (60— 1, а). После этого иссле- стандартным релаксирую- го состава (в ммоль): 4. Перфузия релаксирую- щему раствору добавляли т в течение последующих идартным релаксирующим на протяжении всего экс-

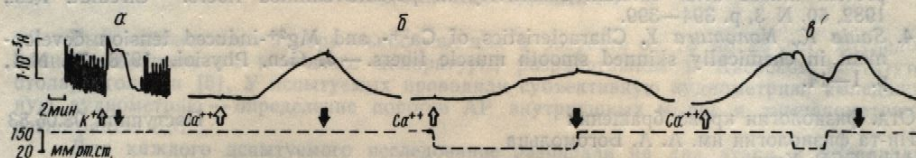
гладких мышц воротной вены зетствующие концентрации А, равной 10^6 М- 1 при юртовой вены осуществля- . контролируемого поляро-

ждение

дной из них сопоставляли ызываемые добавлением и к гипоксическому (P_{O_2} — вление Ca^{2+} к оксигениро- нированных гладких мышц $0,33/10^{-3}$ Н/мг влажного зате, содержащем ту же

концентрацию Ca^{2+} , до 20 мм рт. ст сопровождалось примерно в 1,5—2 раза менее выра- женным и заметно более медленно развивающимся тоническим сокращением.

В другой постановке опыта сокращение скинированных гладких мышц воротной вены, вызываемое Ca^{2+} в концентрации 10^{-4} моль, воспроизводили в оксигенированном (P_{O_2} —148 мм рт. ст.) перфузате, а после достижения плато сокращения осуществ- лялся перевод на перфузию гипоксическим раствором (P_{O_2} —20 мм рт. ст.) с тем же содержанием Ca^{2+} (см. рисунок, в). В этих условиях перевод на перфузию гипокси-



Сократительные реакции интактных (а) гладких мышц воротной вены на повышение концентрации K^+ и скинированных (б, в) — на повышение концентрации Ca^{2+} в перфузате.

Белые стрелки — начало воздействия, черные — окончание. Нижняя кривая — уровень напряжения кислорода в перфузате.

ческим раствором, несмотря на ту же концентрацию Ca^{2+} в перфузате, сопровождался существенным и сравнительно быстро развивающимся снижением (в среднем на 35—60%) амплитуды сокращения, наблюдавшегося в оксигенированном перфузате.

Для исключения предположения о связи полученных данных с изменениями концентрации ионизированного кальция в миоплазме, которые возможны благодаря депонированию Ca^{2+} внутриклеточными структурами, скинированные гладкие мышцы подвергали воздействию кофеина в концентрации 5 ммоль. При этом каких-либо изменений амплитуды сокращения, вызываемого применявшейся концентрацией Ca^{2+} , ни в одном из опытов обнаружено не было. Поскольку кофеин, как известно [2], вызывает сокращение сосудистых гладких мышц путем мобилизации депонируемого субклеточными структурами ионизированного кальция, нужно полагать, что применяемые нами концентрации сапонина приводили к функциональному разрушению также и субклеточных мембран, и, следовательно, способность этих структур депонировать Ca^{2+} может быть исключена.

Скинированные гладкие мышцы лишены мембранных механизмов транспорта Ca^{2+} , и концентрация последнего в миоплазме определяется его содержанием в перфузате. В наших экспериментах концентрация Ca^{2+} в перфузате поддерживалась постоянной. Это позволяет, во-первых, утверждать, что наблюдавшаяся нами зависимость выраженности сократительных реакций скинированных сосудистых гладких мышц от уровня оксигенации перфузата не связана с изменениями концентрации Ca^{2+} в миоплазме гладкомышечных волокон.

Во-вторых, наблюдаемая зависимость выраженности сократительных реакций гладких мышц от уровня оксигенации перфузата не определяется истощением ресурсов макроэргических соединений в условиях гипоксической перфузии, поскольку концентрация АТФ в перфузате достаточно высока (3,3 ммоль) и поддерживается в ходе эксперимента постоянной, а сарколемма скинированных гладких мышц не может служить препятствием доступу АТФ к миофибриллам.

Результаты выполненных исследований, таким образом, служат указанием на то, что снижение уровня оксигенации сосудистых гладких мышц способно оказывать релаксирующее влияние, изменяя функциональные свойства миофибрилярного аппарата гладкомышечных волокон. Это согласуется с недавно выдвинутой точкой зрения [3], что изменение чувствительности сократительных белков к Ca^{2+} может быть потенциальным механизмом вазодилатации. Вполне возможно, что угнетение сократительной способности миофибрилл, наблюдаемое нами при сниженной оксигенации сосудистой стенки, обусловливается связанным с недостатком кислорода уменьшением сродства сократительных белков к ионизированному кальцию. Не исключено также, что в этих условиях снижается активность АТФазы миомина волокон сосудистых гладких мышц.