

- namic Aspects of Arterial Disease, Ohio State Univ. Columbus, 1974, p. 101—104.
9. Feig L. A., Peppas N. A., Chisolm G. M. et al. Transport of albumin across the aortic wall during acute angiotensin-induced hypertension.—Proc. 29th Annu. Conf. Eng. Med. Biol., Boston, 1976, vol. 18, Chevy Chase, Md., p. 232—234.
 10. Hultner J., Badonell M. C., Elemer G., Gabbiani G. Aortic intima of the rat in various phases of hypertension.—Exp. and Mol. Pathol., 1979, 31, N 1, p. 191—200.
 11. Majack R. A., Bhalla R. C. Ultrastructural characteristics of endothelial permeability pathways in chronic hypertension.—Hypertension, 1981, 3, N 5, p. 586—595.
 12. Sato T., Shamoto M. A simple rapid polychrome stain for epoxy-embedded tissue.—Stain Technol., 1973, 48, N 5, p. 22—26.
 13. Schwartz S. M., Benditt E. P. Aortic endothelial cell replication. 1. Effect of age and hypertension in the rat.—Circ. Res., 1977, 41, N 2, p. 248—255.
 14. Weiner J., Lattes R. G., Meltzer B., Spiro D. The cellular pathology of experimental hypertension. IV. Evidence for increased vascular permeability.—Amer. J. Pathol., 1969, 54, N 2, p. 187—194.

Ин-т геронтологии АМН СССР, Киев

Поступила 04.11.82

УДК 612.73+612.22.02

А. И. Соловьев

О МЕХАНИЗМАХ СТИМУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКИХ МЫШЦ ПРИ ИХ ГИПЕРОКСИГЕНАЦИИ

В последние годы значительно возросло число случаев контакта человека со средой, содержащей повышенное количество кислорода. Так, в клинике широкое распространение получил метод оксигенотерапии. В ряде экстремальных ситуаций широко используются искусственные газовые смеси с повышенным содержанием или давлением кислорода. Однако механизмы действия на сосудистые гладкие мышцы (СГМ) кислорода в высоких концентрациях остаются во многом неясными и спорными. Высказывается даже сомнение в том, что кислород может служить «нормальным возбудителем сократительной активности сосудистой мускулатуры» [5].

Ранее нами [2, 3], была показана линейная зависимость между выраженностью сократительных реакций ГМ воротной вены и напряжением кислорода (P_{O_2}) в перфузате в диапазоне от 13 до 130 гПа. Сходные результаты на ГМ воротной вены [6, 11] и аорты [8, 9] были получены и другими авторами. Работы о влиянии на СГМ высоких (более 195 гПа) концентраций кислорода немногочисленны [1, 7, 10, 13]. При этом внимание в них акцентируется главным образом на механизмах действия кислорода, связанных с изменениями интенсивности энергетического метаболизма. Так, в частности, утверждается [10], что стимулирующий эффект высоких концентраций кислорода на СГМ опосредуется благодаря нарастанию в этих условиях скорости синтеза высокоэнергетических фосфатов. Однако имеются данные о том [14], что перевод ГМ коронарной артерии с нормоксического на гипероксический перфузат хотя и сопровождается усилением сократительных реакций СГМ на действие агонистов, тем не менее содержание в них АТФ не изменяется.

В последние годы в нашей лаборатории был получен ряд новых данных, свидетельствующих о возможности прямого влияния кислорода на гладкомышечные клетки сосудистой стенки, связанного не только с изменениями интенсивности окислительного фосфорилирования, но и с его действием на клеточные мембраны СГМ. Настоящая работа посвящена исследованию механизмов действия высоких концентраций кислорода на сократительную активность гладких мышц сосудистой стенки.

Методика. Опыты выполнялись на общепринятой модели гладких параты помещали в термостативному растяжению силой от са следующего состава (в KH_2PO_4 —1,38; $CaCl_2$ —2,5; температура—37 °С. Для повышению раствору добавляли сухую активность СГМ регистрировали в изометрическом режиме. Эми импульсами постоянного т 20—30 В. Необходимый уровень пропускания через него фузате контролировали с по ческим методом. Для оценки ровании сократительных реак критерий Вант-Гоффа (число или иной реакции, измерении

$$\text{на } 10^\circ\text{C}, Q_{(10)} = \frac{10}{R_1 \frac{T_2 - T_1}{T_1}}$$

туры, при которых производ расценивались как соответст ческими процессами, а в дн метаболических процессов.

Результаты. Повыш 650—780 гПа сопровож 10 с) и значительными кратительную активност щений увеличивается в веса препарата, т. е. бо стота фазных сокращен

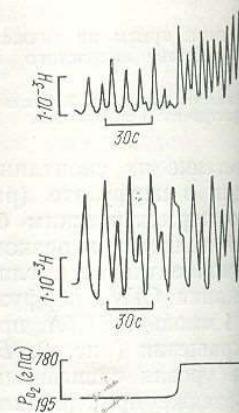


Рис. 1. Сократительные реакции СГМ на гипероксигенацию перфузата.

что повышенная частота сокращений всего времени действия препарата, как положительный и отрицательный эффект. Несмотря на продолжительность действия с высоким содержанием кислорода содержание препарата существенно снижается и результаты опытов мало отличаются от контроля.

Методика. Опыты выполнены на изолированных сегментах воротной зоны крыс — общепринятой модели гладких мышц спонтанно активных резистивных сосудов. Препараты помещали в термостатированную камеру, где их подвергали исходному пассивному растяжению силой от $4 \cdot 10^{-3}$ до $6 \cdot 10^{-3}$ Н и перфузировали раствором Кребса следующего состава (в ммоль/л): NaCl — 133; KCl — 4,7; NaHCO_3 — 16,3; KH_2PO_4 — 1,38; CaCl_2 — 2,5; MgCl_2 — 1,2; глюкоза — 7,8; pH раствора — 7,4; температура — 37 °С. Для повышения концентрации ионов калия в перфузате к буферному раствору добавляли сухую соль KCl в необходимом количестве. Сократительную активность СГМ регистрировали с помощью механотронного преобразователя 6МХЗС в изометрическом режиме. Электрическую стимуляцию осуществляли прямоугольными импульсами постоянного тока частотой 16 Гц, длительностью 20 мс и амплитудой 20—30 В. Необходимый уровень насыщения перфузата кислородом создавали посредством пропускания через него газовых смесей заданного состава. Значения P_{O_2} в перфузате контролировали с помощью открытого платинового электрода полярографическим методом. Для оценки относительной роли метаболических процессов в формировании сократительных реакций СГМ на кислород использовали термокинетический критерий Вант-Гоффа (число $Q_{(10)}$), определяемый как отношение параметров той или иной реакции, измеренное при двух температурных уровнях, отличающихся

на 10 °С, $Q_{(10)} = \frac{R_2^{10} - T_1}{R_1^{10} - T_2}$, где R_1, R_2 — параметры реакции; T_2, T_1 — температуры, при которых производились измерения. Значения $Q_{(10)}$ в диапазоне 1,1—1,3 расценивались как соответствующие реакциям, определяемым преимущественно физическими процессами, а в диапазоне 2,0—4,0 — как зависящие главным образом от метаболических процессов.

Результаты. Повышение уровня оксигенации перфузата со 191 до 650—780 гПа сопровождается быстрыми (латентный период менее 10 с) и значительными изменениями параметров, характеризующих сократительную активность СГМ (рис. 1, А). Амплитуда фазных сокращений увеличивается в среднем с $0,3 \cdot 10^{-3}$ до $0,8 \cdot 10^{-3}$ Н/мг влажного веса препарата, т. е. более чем в 2,5 раза. Существенно возрастает частота фазных сокращений, с 7—8 до 15—16 в 1 мин. Следует заметить,

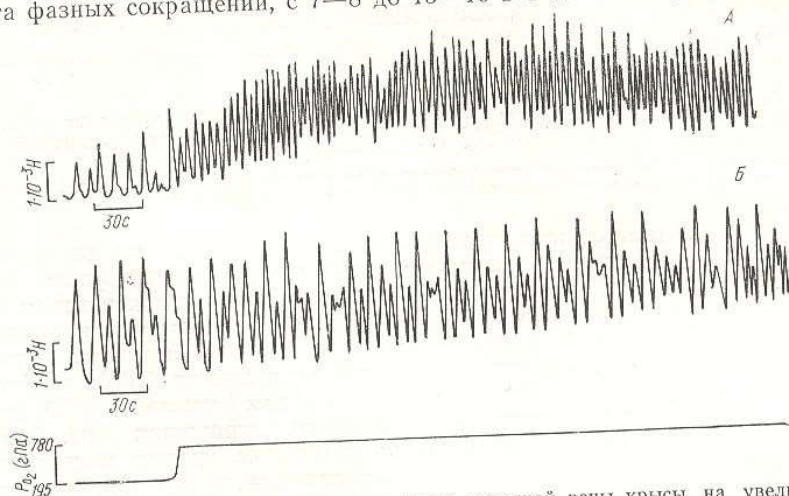


Рис. 1. Сократительные реакции гладких мышц воротной вены крысы на увеличение оксигенации перфузата при температуре 37 (А) и 27 °С (Б).

что повышенная частота фазных сокращений поддерживается в течение всего времени действия высоких концентраций кислорода, тогда как положительный инотропный эффект кислорода менее устойчив. Несмотря на продолжающуюся перфузию СГМ буферным раствором с высоким содержанием кислорода, амплитуда фазных сокращений постепенно снижается и к исходу 15—20 мин перфузии в большинстве опытов мало отличается от исходных значений.

Положительный хронотропный эффект кислорода на СГМ сохраняется при снижении температуры перфузата на 10°C, тогда как положительный инотропный эффект при гипотермии практически устраняется (рис. 1, Б). Значения $Q_{(10)}$ для хроно- и инотропного эффекта воздействия кислорода на сократительную активность СГМ составляют соответственно 1,03 и 2,4.

Гипероксигенация СГМ, перфузируемых буферным раствором, в котором концентрация Ca^{2+} снижена до 0,008 ммоль/л, в значительной

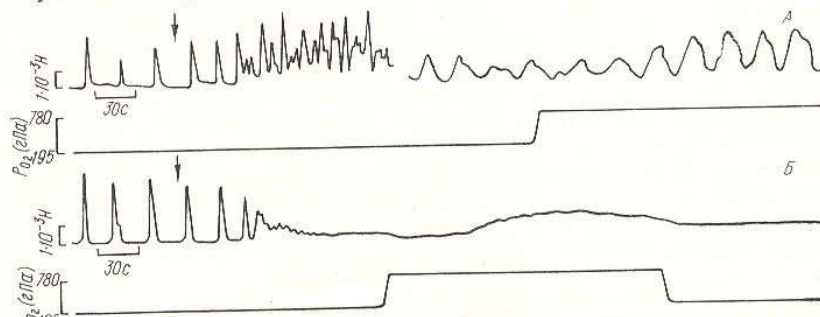


Рис. 2. Сократительные реакции гладких мышц воротной вены крысы на увеличение оксигенации буферного раствора, содержащего 0,008 ммоль/л CaCl_2 (А) и бескальциевого раствора с добавлением 1 ммоль/л ЭГТА (Б). Стрелками обозначено начало перфузии указанными растворами.

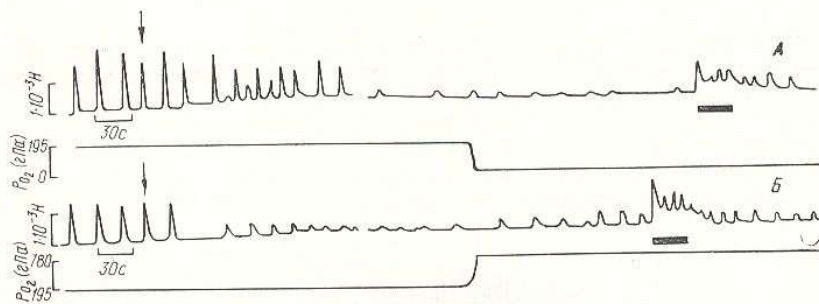


Рис. 3. Сократительные реакции гладких мышц воротной вены крысы на снижение (А) и увеличение (Б) оксигенации перфузата на фоне действия цианистого калия (1,5 ммоль/л).

Стрелками обозначено начало перфузии буферным раствором с добавлением цианидов. Утолщенные черные линии под кривой соответствуют продолжительности электрической стимуляции.

степени приостанавливает прогрессирующее угнетение их спонтанной активности, вызванное недостатком ионов кальция в перфузате (рис. 2, А). Последующий перевод СГМ на перфузию нормоксическим буферным раствором с таким же содержанием Ca^{2+} приводит к резкому торможению, а в итоге и прекращению спонтанной активности гладкомышечных клеток. Увеличение степени оксигенации СГМ, перфузируемых бескальциевым раствором с добавлением 1 ммоль/л ЭГТА, приводит к развитию выраженного тонического сокращения (рис. 2, Б).

Сократительные реакции СГМ на изменение уровня оксигенации перфузата в значительной степени сохраняются также при добавлении в буферный раствор цианидов в концентрации (1,5 ммоль/л), полностью прекращающей потребление кислорода гладкомышечными клетками сосудистой стенки (рис. 3).

На фоне действия блокатора кальциевых каналов верапамила (10^{-5} моль/л) сократительная реакция ГМ воротной вены на увеличение степени оксигенации перфузата со 191 до 581 гПа выражена в значительно меньшей степени (рис. 4, Б) и ее амплитуда составляет не более 10 % от амплитуды аналогичной реакции СГМ на кислород в отсутствие верапамила (рис. 4, А).

И, наконец, в условиях вышением внеклеточной ионной концентрации Ca^{2+} (снизилась с 195 до 780 гПа) эффект оксигенации перфузата (рис. 5, А). Амплитуды ГМ воротной вены при снижении температуры перфузата и скорости ее развития неск

Рис. 4. Сократительные реакции гладких мышц воротной вены крысы на увеличение оксигенации перфузата при добавлении (Б) и отсутствии (А) в буферном растворе верапамила (10^{-5} моль/л).

Стрелкой и индексом К+ обозначено начало перфузии буферным раствором с избытком ионов калия (60 ммоль/л).

Обсуждение. Недавние данные о роли кислорода как индуктора перестройки липидных мембран (БЛ) и зависимых кальциевых каналов (КК) в ответ на изменение концентрации кислорода за счет липидных молекул. При этом в прямой зависимости от концентрации кислорода. Замена кислорода на азот приводит к закрытию каналов.

Сама мысль о зависимости сократительной активности от содержания кислорода в перфузате. Более 10 лет тому назад было показано, что в печени жирных кислот в печени в основном только лишь потребляется и к пространственной ориентации в простом пространстве, восстановлены или углерода. Учитывая, что мембран, можно предположить, что будет способствовать перестройке структур клетки.

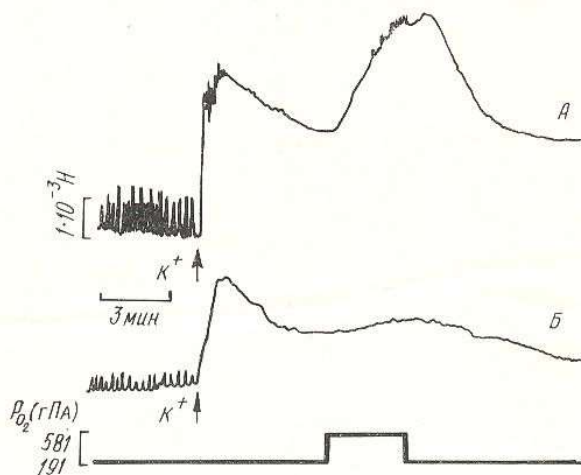
Известно также, что в перфузии (и кислорода) клетка перфузируется. Приводятся данные [13], что при 390 гПа сопровождается средним на 21,9 мВ и рН. Ранее мы уже указывали, что в перфузии воротной вены при ее гипероксигенации, это, видимо, связано с перестройкой мембран.

Можно думать, что в перфузии концентраций кислорода и кальциевых каналов и способность СГМ к тоническому сокращению.

И, наконец, в условиях полной деполяризации СГМ, вызванной повышением внеклеточной концентрации K^+ до 180 ммоль/л, гладкомышечные клетки воротной вены реагируют на повышение P_{O_2} в перфузате со 195 до 780 гПа заметным приростом уровня тонического напряжения (рис. 5, А). Амплитуда сократительной реакции деполяризованных ГМ воротной вены на кислород практически не изменяется при снижении температуры перфузата на 10 °С, хотя латентный период и скорость ее развития несколько замедлены (рис. 5, Б).

Рис. 4. Сократительные реакции гладких мышц воротной вены крысы на увеличение оксигенации перфузата при добавлении (Б) и отсутствии (А) в буферном растворе верапамила (10^{-5} моль/л).

Стрелкой и индексом K^+ обозначено начало перфузии буферным раствором с избытком ионов калия (60 ммоль/л).



Обсуждение. Недавно были опубликованы данные [4] о роли кислорода как индуктора переноса Ca^{2+} через искусственные бислоиные липидные мембраны (БЛМ). Показано, что формирование потенциал-зависимых кальциевых каналов в БЛМ происходит только в присутствии кислорода за счет образования неустойчивых гидроперекисных липидных молекул. При этом проницаемость БЛМ для Ca^{2+} находилась в прямой зависимости от продолжительности оксигенации среды. Замена кислорода на азот приводила к «исчезновению» кальциевых каналов.

Сама мысль о зависимости проницаемости клеточных мембран от содержания кислорода в окружающей среде не столь уж неожиданна. Более 10 лет тому назад высказывалась точка зрения [12], что окисление жирных кислот в присутствии кислорода не может ограничиваться только лишь потерей водорода, но неизбежно должно приводить и к пространственной перестройке их молекулярной структуры, т. к. ориентация в пространстве молекул жирной кислоты зависят от того, восстановлены или окислены связи между различными атомами углерода. Учитывая, что жирные кислоты входят в состав клеточных мембран, можно предположить, что изменение конфигурации их молекул будет способствовать изменению ионной проницаемости мембранных структур клетки.

Известно также, что при действии любого окислителя (в том числе и кислорода) клетка теряет ионы калия и деполяризуется [12]. Приводятся данные [13], что повышение P_{O_2} в перфузате с 52 до 390 гПа сопровождается деполяризацией ГМ артериального протока в среднем на 21,9 мВ и развитием выраженного тонического сокращения. Ранее мы уже указывали [7] на повышение возбудимости ГМ воротной вены при ее гипероксигенации. Как следует из представленных данных, это, видимо, связано с деполяризацией клеточных мембран.

Можно думать, что деполяризация СГМ под действием высоких концентраций кислорода приводит к активации потенциалзависимых кальциевых каналов и увеличению входящего кальциевого тока. Способность СГМ к тоническим реакциям в ответ на повышение P_{O_2} в

перфузате при перфузии их бескальциевым раствором может быть объяснена высвобождением в этих условиях внутриклеточно связанного кальция. Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в этом случае обусловлено его выходом из структур саркоплазматического ретикулума и, возможно, митохондрий. Нельзя исключить также формирование в клеточной мембране в условиях гипероксигенации новых «каналов» для Ca^{2+} вследствие действия на нее первичных продуктов перекисного окисления липидов.

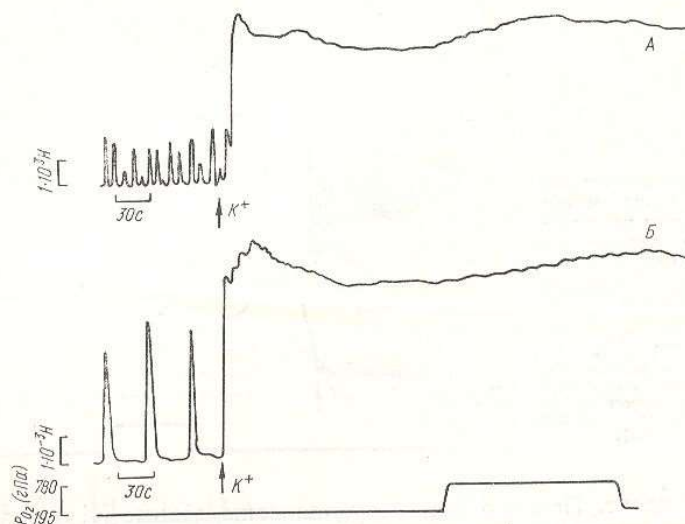


Рис. 5. Сократительные реакции гладких мышц воротной вены крысы на увеличение оксигенации перфузата на фоне полной калиевой деполаризации (180 ммоль/л K^+) при температуре 37 (А) и 27° С (Б).

Стрелкой и индексом K^+ обозначено начало перфузии буферным раствором с избытком ионов калия.

Кальциевая природа сократительной реакции СГМ на повышение степени их оксигенации подтверждается результатами опытов с использованием блокатора кальциевых каналов плазматической мембраны верапамила. В условиях блокады входящего кальциевого тока амплитуда сокращения СГМ в ответ на увеличение P_{O_2} в перфузате оказывается менее выраженной и реализуется, очевидно, главным образом за счет высвобождения внутриклеточно связанного кальция.

Способность СГМ реагировать на изменения P_{O_2} в окружающей среде связана, по-видимому, не только с системой окислительного фосфорилирования, так как в значительной степени сохраняется на фоне действия цианидов, блокирующих транспорт электронов от цитохрома аа₃ (цитохромоксидазы) к кислороду.

Таким образом, есть основания полагать, что «сенсор кислорода» может быть локализован в клеточной мембране СГМ. Это предположение подтверждается результатами исследований влияния избытка кислорода на СГМ при гипотермии. Низкая величина $Q_{(10)}$ для положительного хронотропного эффекта кислорода свидетельствует о незначительной зависимости этого эффекта от изменений энергетического метаболизма. Вдвое большая величина $Q_{(10)}$ для положительного инотропного эффекта указывает на существование выраженного метаболического компонента этой реакции. Действительно, сила сокращения гладкомышечных клеток не может не зависеть от интенсивности метаболических процессов, связанных с трансформациями энергии.

Итак, деполаризация клеточных мембран СГМ, вызванная повышением P_{O_2} в окружающей среде, способна приводить к активации сократительной деятельности гладкомышечных клеток посредством увеличения кальциевой проницаемости плазматической мембраны и роста внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Однако, как показали пе-

давние исследования [13] реализовано не только 3 механизмов. Нами было обнаружено, что на кислород сохраняется мышечных клеток, и ам кислорода практически не перфузата на 10°С. Следовательно, кислород принимает участие в механизме, связанный, очевидно (хемочувствительных) ка

STIMULATION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE

The effect of high oxygenation of vascular smooth muscle preparation which served as active smooth muscles of resistance.

Results of the study of the effect of high oxygenation of vascular smooth muscle preparation on energy production are less. It is supposed that membrane of potential-dependent Ca^{2+} -channel cellular Ca^{2+} ; 2) release of potential-independent (chemosensitive) new calcium channels.

1. Айвар Ю. П., Орлов Р. С. Влияние почечных артерий на тонус сосудов. Докл. АН СССР, 1981, т. 252, № 6, с. 1494—1497.
2. Берштейн С. А., Соловьев А. И. Зависимость тонуса сосудов от уровня оксигенации перфузата. Докл. АН СССР, 1979, т. 252, № 6, с. 1494—1497.
3. Гуревич М. И., Берштейн С. А., Соловьев А. И. Dependence of vascular tone on P_{O_2} level of perfusate. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1979, p. 35.
4. Лебедев А. В., Левицкий И. И. Ионы кальция через бис-2-метил-5-изопропил-1-тио-4-хлорбензолсульфонил-фторид. Докл. АН СССР, 1978, т. 252, № 6, с. 1494—1497.
5. Конрад Г. П. Регуляция тонуса сосудов. Докл. АН СССР, 1978, т. 252, № 6, с. 1494—1497.
6. Орлов Р. С. Ионные механизмы тонуса сосудов в условиях гипотермии. Докл. АН СССР, 1978, т. 252, № 6, с. 1494—1497.
7. Соловьев А. И. Спонтанная активность гладких мышц при разном уровне оксигенации перфузата. Докл. АН СССР, 1981, т. 252, № 6, с. 1494—1497.
8. Chang A. E., Detar R. J. The effect of hypoxia on the tone of the arterial smooth muscle. Amer. J. Physiol., 1968, 215, 115—120.
9. Coburn R. F. Oxygen tension and vascular tone. In: Hypoxia and ischemia. New York, 1979, p. 35.
10. Fay F. S., Nair P., Whalen R. E. The effect of hypoxia on the tone of the arterial smooth muscle. Ibid, p. 35.
11. Hellstrand P. Oxygen sensitivity of the arterial smooth muscle. Acta Physiol. Scand., 1979, 111, 1—10.
12. Laborit H. Laborit A. 1979, p. 35.
13. Roulet M. J., Coburn R. F. The effect of hypoxia on the tone of the arterial smooth muscle. Circulation, 1979, 60, 1—10.
14. Sakanashi M., Higuchi M. The effect of hypoxia on the metabolism of isolated smooth muscle. Ibid, p. 525—530.

Ин-т физиологии им. А. А. Борогана, Киев

Физиол. журн., 1984, т. 30, № 4

давние исследования [13], влияние кислорода на СГМ может быть реализовано не только за счет потенциалзависимых мембранных механизмов. Нами было обнаружено, что способность СГМ реагировать на кислород сохраняется при полной калиевой деполяризации гладкомышечных клеток, и амплитуда этой тонической реакции СГМ на кислород практически не изменяется при снижении температуры перфузата на 10 °С. Следовательно, в реакции сосудистых гладких мышц на кислород принимает участие потенциалнезависимый мембранный механизм, связанный, очевидно, с деятельностью потенциалнезависимых (хемочувствительных) кальциевых каналов.

A. I. Soloviev

STIMULATION MECHANISMS OF CONTRACTILE ACTIVITY OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE AT THEIR HYPEROXYGENATION

The effect of high oxygen concentration (400-600 mm Hg) on contractile activity of vascular smooth muscle (VSM) was investigated using the rat portal vein preparation which served as an experimentally convenient model of spontaneously active smooth muscles of resistance vessels.

Results of the study permit suggesting that mainly membrane structures and sarcoplasmic reticulum are involved to the VSM response to oxygen and mechanisms of energy production are less significant in development of O₂-induced contraction. It is supposed that membrane effect of oxygen on VSM is mediated via: 1) activation of potential-dependent Ca²⁺-channels and increase of membrane permeability for extracellular Ca²⁺; 2) release of intracellular bound calcium; 3) activation of membrane potential-independent (chemosensitive) mechanism of O₂-induced contraction; 4) formation of new calcium channels in the sarcolemma of smooth muscle cells.

Список литературы

1. Айвар Ю. П., Орлов Р. С. Влияние pH, pCO₂ и pO₂ на сократимость и реактивность почечных артерий.— Физиол. журн., СССР, 1981, 67, № 6, с. 904—910.
2. Берштейн С. А., Соловьев А. И., Базилук О. В. Сократительные эффекты симпатической стимуляции сосудистых гладких мышц при разных уровнях оксигенации перфузата.— Докл. АН СССР, 1980, 250, № 2, с. 491—493.
3. (Гуревич М. И., Берштейн С. А., Соловьев А. И.) Gurevich M. I., Berchtein S. A., Soloviev A. I. Dependence of sympathetic stimulation of vascular smooth muscles on Po₂ level of perfusate.— In: Physiology and pharmacology of smooth muscle. Sofia, 1979, p. 35.
4. Лебедев А. В., Левицкий Д. О., Логинов В. А. Кислород как индуктор переноса ионов кальция через бислоиные липидные мембраны.— Докл. АН СССР, 1980, 252, № 6, с. 1494—1497.
5. Конради Г. П. Регуляция сосудистого тонуса.— Л.: Наука, 1973.—325 с.
6. Орлов Р. С. Ионные механизмы действия гипоксии на сосудистую стенку.— В кн.: Кровообращение в условиях высокогорья и экспериментальной гипоксии. Душанбе, 1978, с. 188—189.
7. Соловьев А. И. Спонтанная и вызванная сократительная активность сосудистых гладких мышц при различных температурных режимах перфузата.— Физиол. журн., 1981, 27, № 5, с. 650—653.
8. Chang A. E., Detar R. Oxygen and vascular smooth muscle contraction revisited.— Amer. J. Physiol., 1980, 238, N 5, p. H716—728.
9. Coburn R. F. Oxygen tension sensors in vascular smooth muscle.— In: Tissue hypoxia and ischemia. New York: Plenum press, 1977, p. 101—115.
10. Fay F. S., Nair P., Whalen W. J. Mechanism of oxygen induced contraction of ductus arteriosus.— Ibid, p. 123—134.
11. Hellstrand P. Oxygen sensitivity of spontaneous and induced contraction in venous smooth muscle.— Acta physiol. scand., 1975, 94, N 2, p. 65A—66A.
12. (Laborit H.) Лабори А. Регуляция обменных процессов.— М.: Медицина, 1970.—383 с.
13. Roulet M. J., Coburn R. F. Oxygen-induced contraction in the guineapig neonatal ductus arteriosus.— Circulat. Res., 1981, 49, N 4, p. 997—1002.
14. Sakanashi M., Higuchi M., Takenaka F. Responsiveness and highenergy phosphate metabolism of isolated coronary arteries.— Jap. J. Pharmacol., 1979, 29, N 4, p. 525—530.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила 13.01.83