

Статті

УДК 612.731.14+612.733

М.О.Дудко, Ю.В.Биць

Дослідження ролі кальційакумулюючої здатності внутрішньоклітинних запасників гладеньких м'язів кровоносних судин у розвитку їх катехоламінового пошкодження

В бескальциевой среде исследованы норадреналиновые (10^{-5} моль/л) сократительные реакции гладких мышц артерий и вен кролика (аорта, бедренная артерия, задняя полая и бедренная вены) при разных способах заполнения ($0,5$ ммоль Ca^{2+} ; $0,5$ ммоль Ca^{2+} , 60 ммоль K^{+} ; 20 ммоль Ca^{2+} соответственно) их предварительно опустошенных норадреналинчувствительных внутриклеточных кальциевых запасников. Сравнительный анализ показателей соотношений максимальных амплитуд при использовании $0,5$ ммоль Ca^{2+} в присутствии 60 ммоль K^{+} и $0,5$ ммоль Ca^{2+} ; 20 ммоль Ca^{2+} и $0,5$ ммоль Ca^{2+} показал, что кальцийаккумулирующая способность запасников вен, независимо от источника заполнения, значительно превышает таковую в артериях. Токсическая концентрация адреналина (50 мкг/кг в ушную вену ежедневно в течение 5 дней) в большей степени угнетала способность запасников артерий поглощать цитоплазматический, а не внеклеточный кальций. Подобные изменения в венах не выявлены. Выявлена важная роль обнаруженных явлений в проявлении разной резистентности артерий и вен к кальциевому повреждению.

Вступ

Відомо, що іони кальцію (Ca^{2+}) відіграють провідну роль у розвитку як фізіологічних, так і патологічних процесів у гладеньких м'язах кровоносних судин [1, 2, 6]. Регуляція концентрації іонізованого кальцію в цитозолі — важлива передумова прояву не тільки їх фундаментальних властивостей, а й потужний ангіопротекторний механізм, що запобігає підвищенню внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} до токсичного рівня [3].

Мета нашої роботи — дослідження однієї із складових частин системи транспорту Ca^{2+} — кальційакумулюючої здатності внутрішньоклітинних запасників у розвитку катехоламінового пошкодження артерій та вен, що виявляють відповідно низьку та високу резистентність до пошкоджуючого впливу багатьох патогенних чинників [1, 2].

Методика

Дослідження проведено на грудній аорті, стегновій артерії, задній порожнистій та стегновій венах кролів масою $2,5$ — $3,0$ кг. Першу серію дослідів проводили на кровоносних судинах інтактних тварин, другу — на судинах

кролів, яким для моделювання катехоламінового пошкодження у вушну вену вводили адреналін (50 мкг/кг) щодобово протягом 5 діб. Під його впливом в досліджуваних артеріях розвивався медіакальциноз, а у венах змін не спостерігалось [1, 2]. Судини препарували й розрізали під кутом 45° на спіральні смужки довжиною 1 см і товщиною близько 1 мм. Досліджувані препарати розміщували в термостатичній камері ($35-36^\circ\text{C}$) й перфузували розчином Кребса, такого складу (ммоль/л) NaCl — 120,4; KCl — 5,9; CaCl_2 — 2,5; MgCl_2 — 1,2; глюкоза — 11,5; *трис* (фірма «Serva», Німеччина) — 30; (тривалість 60 хв, pH — 7,35). При цьому артеріальну смужку розтягували з силою 1,96 мН, венозу — 0,98 мН. Далі склад розчинів та схема впливу з відповідною послідовністю та експозицією були такими: 1) безкальцієвий розчин (2 ммоль/л ЕГТА фірми «Serva» (Німеччина), як і всі подальші безкальцієві розчини) — 3 хв, 2) норадреналіновий безкальцієвий розчин (10^{-5} моль/л норадреналіну) — 5 хв, 3) безкальцієвий розчин — 10 хв, 4) вибірково гіпокальцієвий (0,5 ммоль/л CaCl_2), гіпокальцієво-гіперкальцієвий (0,5 ммоль/л CaCl_2 , 60 ммоль/л KCl) чи гіперкальцієвий (20 ммоль/л CaCl_2 розчин) — 5 хв. Після використання одного з режимів заповнення попередньо спустошених запасників смужку витримували 3 хв у безкальцієвому і 5 хв у норадреналіновому безкальцієвому розчинах. При цьому реєстрували скорочувальну реакцію в ізометричному режимі за допомогою механотрону 6MX1C. При переході до іншого режиму заповнення запасників препарат протягом 10 хв перфузували безкальцієвим розчином. Підсилений сигнал із механотрону поступав через аналого-цифровий перетворювач «Граніт» (МВВ-16.8.14.003) у персональний комп'ютер IBM AT/286 й записувався за допомогою програми «Screen», версія 3.12. Компенсацію осмотичності розчинів проводили однаково — еквімолярним збільшенням чи зменшенням концентрації *трису*, за винятком гіпокальцієво-гіперкальцієвого розчину, де зростання осмотичності за рахунок KCl компенсувалося еквімолярним зменшенням концентрації NaCl , а зменшення за рахунок CaCl_2 — еквімолярним збільшенням концентрації *трису*.

Використаний нами метод для дослідження кальційакумулюючої здатності внутрішньоклітинних запасників — модифікований варіант аналогічних методик [11]. Результати обробляли статистично.

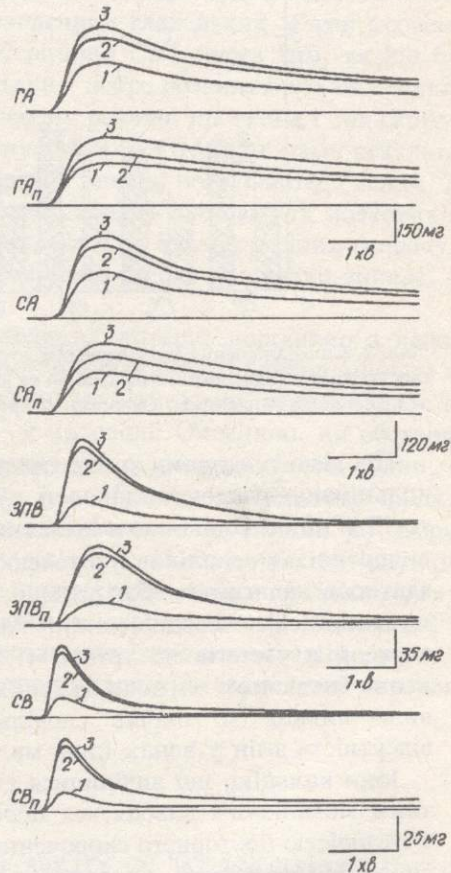
Результати та їх обговорення

Норадреналіну притаманний широкий спектр спустошуючого впливу на внутрішньоклітинні запасники кальцію. Про це свідчить наявність в агоніста загальних місць накопичення Ca^{2+} з багатьма відомими біологічно активними речовинами (серотонін, гістамін, кофеїн, ангіотензин-II, простагландин PGH_2 тощо) [6], здатність викликати у безкальцієвому середовищі в кровеносних судинах з добре розвинутими запасниками скорочення, максимальна амплітуда якого складає 60—90 % від контрольного [6]. Агоніст може індукувати вивільнення Ca^{2+} з основної кальційакумулюючої ємкості гладкого міоциту — саркоплазматичного ретикулуму (СР). Спряження цього процесу із стимуляцією адренорецептора відбувається внаслідок надходження незначної кількості Ca^{2+} з поверхневої мембрани й запуском механізму вивільнення кальцію, що індукується кальцієм [19]. Можливим варіантом є також активація фосфоліпази С, утворення інозитолтрифосфату й мобілізація під його впливом Ca^{2+} з СР [7]. Доказів

вивільнення норадреналіном Ca^{2+} з мітохондрій немає, але спорідненість останніх до Ca^{2+} досить низька і його великі концентрації трапляються тут лише внаслідок екстремальних умов та при пошкодженні [10].

Згідно з сучасними поглядами на механізм заповнення запасників можна виділити два основних шляхи цього процесу. Один із них залежить від концентрації позаклітинного Ca^{2+} та безпосереднього надходження Ca^{2+} через ділянки щільних контактів між плазматичною мембраною і мембраною запасника [6, 11], що описано для СР [15]. Другий залежить від концентрації внутрішньоклітинного кальцію із поглинанням Ca^{2+} запасником з цитозоллю [6, 11], активний характер якого також проявляється у СР, де показана наявність Mg-залежної АТФази, що активується іонами Ca^{2+} [18]. У безкальцієвому середовищі ми зареєстрували норадреналінові скорочувальні реакції одного і того ж гладенького м'язу кроля (як інтактного, так і пошкодженого адреналіном) при заповненні його попередньо спустошених запасників 0,5 ммоль Ca^{2+} ; 0,5 ммоль Ca^{2+} при наявності 60 ммоль K^+ (завдяки чому створювалася висока концентрація Ca^{2+} в цитозолі) та 20 ммоль Ca^{2+} відповідно. Показники відношень максимальних амплітуд при використанні 0,5 ммоль Ca^{2+} при наявності 60 ммоль K^+ та 0,5 ммоль Ca^{2+} ; 20 ммоль Ca^{2+} та 0,5 ммоль Ca^{2+} відповідно дозволяли нам опосередковано оцінити потенційну кальційакумулюючу здатність внутрішньоклітинних запасників окремої судини і порівняти її з іншими даними. Такий аналіз показував також особливості та їх зміну при катехоламіновому пошкодженні кожного з наведених методів заповнення запасників.

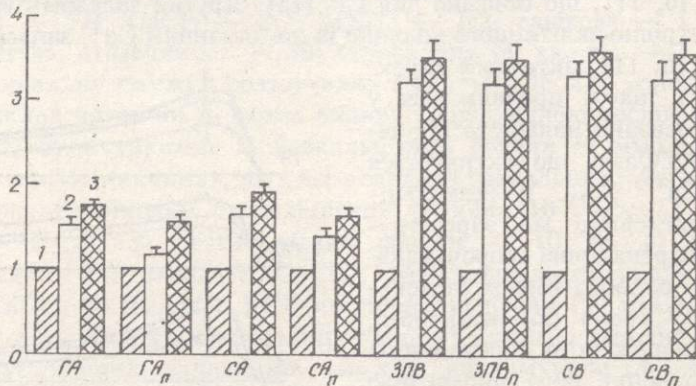
Однаковий режим заповнення запасників інтактних і пошкоджених артерій та вен кролів порізному впливає на співвідношення максимальних амплітуд подальших норадреналінових скорочень у безкальцієвому середовищі (мал. 1, 2). Отримані результати показали, що кальційакумулююча здатність внутрішньоклітинних запасників вен значно перевищує таку в артеріях ($P < 0,01$) і не залежить від того, що є переважаючим джерелом їх заповнення — цитоплазматичний чи позаклітинний кальцій. Щодо регіональних розбіжностей в судинах одного й того самого типу, то описані



Мал. 1. Скорочувальні реакції гладеньких м'язів артерій та вен у безкальцієвому середовищі при різних режимах заповнення їх запасників під впливом норадреналіну (10^{-5} моль/л) протягом 1 хв. Тут і на мал. 2: 1 — 0,5 ммоль Ca^{2+} ; 2 — 0,5 ммоль Ca^{2+} ; 60 ммоль K^+ ; 3 — 20 ммоль Ca^{2+} ; ГЛ — грудна аорта, СА — стегнова аорта, ЗПВ — задня порожниста вена, СВ — стегнова вена. Індекс П — адреналінова інтоксикація, доза 50 мкг/кг щодобово, протягом 5 діб.

показники були дещо вищими в стегновій артерії відносно грудної аорти ($P < 0,05$). Різниця між задньою порожнистою та стегною венами виявилася недостовірною.

Пояснити описані явища можна вищим рівнем енергопостачання системи активного транспорту вен відносно артерій [1, 5] та його зростанням із зменшенням діаметра обох типів судин [1], що реалізує себе в різній швидкості поглинання Ca^{2+} запасниками за одиницю часу.



Мал. 2. Співвідношення максимальних амплітуд норадреналінових (10^{-5} моль/л) скорочувальних реакцій гладеньких м'язів артерій та вен у безкальцієвому середовищі при різних режимах заповнення їх запасників. Скорочення при заповненні $0,5 \text{ mM Ca}^{2+}$ прийнято за 1, $n=9-10$.

Під дією токсичних концентрацій адреналіну відбувалася істотна депресія кальційакумуючої здатності чутливих до норадреналіну запасників артерій ($P < 0,05$ порівняно з інтактними артеріями). Подібних змін у венах не виявлено. Адреналінова інтоксикація викликала переважне пригнічення здатності запасників обох артерій, що досліджувались, поглинати цитоплазматичний, а не позаклітинний кальцій, що більше проявляється в грудній аорті, ніж у стегновій артерії ($P < 0,05$). Аналіз кінетики процесу розслаблення інтактних та пошкоджених судин кролів у безкальцієвому середовищі виявив її значне сповільнення в артеріях і практично повну відсутність змін у венах (див. мал. 1).

Іони кальцію, що виділилися із запасника, завдяки активним транспортним механізмам виводяться переважно назовні. Це підтверджується неможливістю повторного скорочення в безкальцієвому розчині після першого супермаксимального норадреналінового стимулу, кореляцією швидкості спустошення норадреналінчутливого запасника і виходу $^{45}\text{Ca}^{2+}$ з гладком'язових клітин [13]. Значне сповільнення кінетики розслаблення пошкоджених артерій по відношенню до інтактних і практично повна відсутність змін у венах (при такому ж порівнянні) наводить на думку, що при катехоламіновому пошкодженні гальмується й процес виведення Ca^{2+} через плазматичну мембрану артерій.

У механізмі пошкоджуючого впливу адреналіну на гладенькі м'язи кровоносних судин кроля можна виділити кілька істотних моментів. Важливе значення в розвитку такого пошкодження має тривале перевантаження іонами Ca^{2+} цитоплазми й активація Ca^{2+} -залежних протеаз, АТФаз, накопичення Ca^{2+} в мітохондріях і подальше пригнічення енергетичного обміну [1, 4]. Слід відзначити, що створення токсичної концентрації Ca^{2+} у цитозолі є центральною ланкою в механізмі дії багатьох патогенних чинників [12]. Як показала група дослідників [20], жодна з таких мембранотоксичних речовин, як лізолецитин, метилметансульфонат, етилметансуль-

фонат, мелітин, токсин блідої поганки фалоїдин тощо не викликала пошкодження в безкальцієвому середовищі, а навпаки, індукувала його розвиток при наявності Ca^{2+} .

Очевидно, що більш виражену здатність протистояти створенню токсичних концентрацій цитоплазматичного кальцію, а отже і пошкодженню матимуть клітини, для яких паралельно з потужним безпосереднім активним транспортом Ca^{2+} через плазматичну мембрану характерний добре налагоджений, опосередкований внутрішньоклітинними запасниками механізм зниження концентрації Ca^{2+} у цитозолі. Це підтверджується гіпотезою, згідно з якою внутрішньоклітинні запасники гладеньких м'язів кровоносних судин є проміжними місцями зберігання Ca^{2+} перед тим, як він буде виведений назовні [17, 18]. Адже судини з добре розвинутими запасниками навіть після перебування в безкальцієвому розчині протягом 1 год скорочуються у відповідь на дію норадреналіну [11, 14]. Отримані нами результати показують, що в цьому відношенні артерії значно поступаються венам. Доказом такого твердження є низька резистентність вінцевих та мозкових артерій до пошкоджуючого впливу катехоламінів, здатність яких скорочуватися в безкальцієвому середовищі розвинута слабко й швидко зникає, або взагалі відсутня [9].

Таким чином, гладенькі м'язи великих артерій порівняно з венами мають значно менше виявлений (досить чутливий до адреналінового пошкодження) опосередкований внутрішньоклітинними запасниками механізм зниження концентрації Ca^{2+} у цитозолі. Очевидно, ця обставина відіграє істотну роль у прояві феномену різної резистентності судин, які досліджувалися, до медіакальцинозу й довільного кальцієвого пошкодження. Оскільки при його розвитку відбувається первинний чи вторинний розлад енергетичного обміну клітини [1, 4], такі міркування підтверджуються тим, що будь-яке погіршення енергопостачання гладком'язових клітин кровоносних судин призводить до вивільнення Ca^{2+} внутрішньоклітинними запасниками та зниження швидкості його поглинання [8]. Аналогічний ефект спостерігається при закисненні середовища, що оточує міоцити [16].

N.A.Dudko, Yu.V.Byts

THE STUDY OF CALCIUM-ACUMULATING ABILITY OF INTERACELLULAR CALCIUM STORES IN SMOOTH MUSCLES OF BLOOD VESSELS IN DEVELOPMENT OF THEIR CATECHOLAMINE INJURY

Noradrenaline (10^{-5}M) contractile reactions of smooth muscles of the rabbit arteries and veins (aorta, a. femoralis, V. cava posterior, v. femoralis) were investigated in the calcium-free medium using different methods of loading ($0,5\text{ mM Ca}^{2+}$; $0,5\text{ mM Ca}^{2+}$; 60 mM K^{+} ; 20 mM Ca^{2+}) of their predepleted noradrenaline-sensitive intracellular calcium stores. The comparative analysis of indices of relationships of maximum amplitudes using $0,5\text{ mM Ca}^{2+}$ in presence of 60 mM K^{+} and $0,5\text{ mM Ca}^{2+}$, 20 mM Ca^{2+} and $0,5\text{ mM Ca}^{2+}$ has shown that calcium-accumulating ability of vein stores exceeds significantly that in arteries independent of the loading source. The toxic concentration of adrenaline (50 mg/kg in ear vein everyday during 5 days) inhibited more significantly the ability of arterial calcium stores to absorb cytoplasmic but not extracellular calcium. We failed to find the changes of the kind in veins. It has been found that the phenomena described are very important as they show different resistance of arteries and veins to the calcium injury.

Academician A.A.Bogomoletz Ukrainian Medical University,
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Быць Ю.В. Роль нарушений метаболизма сосудистой стенки в процессе ее склерозирования: Автореф. Дис. ... док. мед. наук. — 1973.
2. Быць Ю.В., Атаман А.В. Сравнительный анализ адреналиновых поражений артериальных и венозных сосудов // Нервные и гуморальные механизмы компенсации в условиях действия нервных и гуморальных факторов. — Запорожье, 1985. — 22 с.
3. Другманс Г., Кастилс Р. Электромеханическое и фармакомеханическое сопряжение в гладкой мышце сосудов // Физиология и патофизиология сердца. — М.: Медицина, 1988. — Т. 2. — С. 471—483.
4. Нейлер В.Г., Дейли М. Дж. Кальций и повреждение кардиомиоцитов // Там же. — С. 555—578.
5. Петерсон Дж. В. Метаболизм и энергетика гладкой мышцы сосудов // Там же. — С. 537—557.
6. Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г. Физиология сосудистых гладких мышц. — К.: Наук. думка, 1988. — 244 с.
7. Berridge M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers // J. Biochem. — 1984. — 220, № 5. — P. 345—354.
8. Breemen C. Van, Wuytack F., Castteels R. Stimulation of ^{45}Ca efflux from smooth muscle cells by metabolic inhibition and high K depolarization // Pflugers. Arch. — 1975. — 359, № 11. — P. 183—196.
9. Breemen C. Van, Siegel B. The mechanism of alfa-adrenergic activation of the dog coronary artery // Circ. Res. — 1980. — 46, № 3. — 426—430.
10. Bohr D.F., Somlyo A.P., Sparks H.V. Handbook of physiology: The cardiovascular system. Vascular smooth muscle. — Bethesda: Amer. Physiol. Soc., 1980. — 2, № 22. — P. 74—125.
11. Castteels R., Droogmans G. Exchange characteristics of the noradrenaline sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells of rabbit ear artery // J. Physiol. (Lond.). — 1981. — 317, № 17. — P. 263—279.
12. Chizzonite R.A., Zac R. Calcium-induced cell death: susceptibility of cardiac myocytes is age-dependent // Science. — 1981. — 213, № 56. — P. 1508—1510.
13. Deth R., Van Breemen C. Relative contributions of Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release during drug-induced activation of the rabbit aorta // Pflugers. Arch. — 1974. — 348, № 67. — P. 13—22.
14. Deth R., Van Breemen C. Agonist-induced release of intracellular Ca^{2+} in the rabbit aorta // J. Membr. Biol. — 1977. — 30, № 34. — P. 363—380.
15. Devine C.E., Somlyo A.V., Somlyo A.P. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscle // J. Cell. Biol. — 1972. — 52, № 55. — P. 690—718.
16. Dunnet J., Nayler W.G. Effect of pH on calcium accumulation and release of isolated fragments of cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum // Biochim. biophys. Acta. — 1979. — 198, № 19. — P. 434—438.
17. Itoh T., Izumi H., Kurijama H. Mechanism of relaxation induced by activation of beta-adrenoceptors in smooth muscle cells in the guinea-pig mesenteric artery // J. Physiol. (Lond.). — 1982. — 326, № 4. — P. 475—493.
18. Raeymaekers L., Castteels R. Measurement of Ca uptake in the endoplasmic reticulum of the smooth muscle cells of the rabbit ear artery // Arch. Int. Physiol. Biochim. — 1981. — 75, № 5. — P. 33—34.
19. Saida K., Breemen C. Van. A possible Ca^{2+} -release mechanism mediated by norepinephrine in vascular smooth muscle // Pflugers. Arch. — 1983. — 397, № 25. — P. 166—167.
20. Schanne F.A.X., Kane A.B., Young E.E., Farber J.L. Calcium dependence of toxic cell death: A Final Common Pathway // Science. — 1979. — 206, № 4419. — P. 700—702.

Укр. мед. ун-т ім. акад. О.О.Богомольца
М-ва охорони здоров'я України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 18.06.92