

Скорочувальні реакції судинних гладеньких м'язів за умов гіперхолестеринемії та змін функціональної активності ендотелію

В экспериментах на изолированных полосках воротной вены кроликов показано, что в условиях экспериментальной гиперхолестеринемии и /или угнетения синтетической функции эндотелия с помощью ингибитора NO-синтазы L-NAME наблюдается уменьшение сократительных ответов сосудистых гладких мышц при растяжении, а также эндотелийзависимых дилататорных реакций на полосках аорты на ацетилхолин. L-аргинин стимулирует синтетическую деятельность эндотелия, что позволяет использовать его для коррекции функциональных нарушений эндотелия и исследуемых реакций.

Вступ

За умов експериментальної гіперхолестеринемії послабляються ендотеліозалежна вазодилатація судинних гладеньких м'язів і посилюються судинні реакції на вазоконстрикторні речовини [1, 4, 6, 9]. Ці явища значною мірою зумовлені як зниженням вивільнення ендотеліального фактора розслаблення, який є оксидом азоту (NO) або нітратом, що вивільнює NO [13, 15], так і, порушенням балансу між релаксуючими та констрикторними факторами, які виробляються ендотелієм (ендотелін, тромбоцит-активуючий фактор, ангіотензин II, супероксидні аніони, тромбоксан A₂ тощо) [21]. Встановлено, що ендотеліальний фактор розслаблення - оксид азоту утворюється в ендотеліальних клітинах з L-аргініну під дією NO-синтази [17, 18, 21]. Активація останньої залежить від концентрації внутрішньоклітинного кальцію та кальмодуліну. NO гальмує діяльність скорочувального апарату судинних гладеньком'язових клітин, стимулюючи розчинну фракцію гуанілатциклази, яка каталізує утворення циклічного 3',5'-гуанозинмонофосфату. Вазоконстрикторні та вазодилаторні фактори можуть виділятися ендотелієм при дії різних агоністів і під впливом механічних факторів [2, 3, 7, 10, 16, 19]. Механічні впливи на ендотелій проявляються при змінах внутрішньосудинного тиску та ступеня розтягування судинної стінки, які супроводжуються деформацією ендотеліальних клітин. Ці впливи звичайно призводять до вивільнення вазоактивних речовин, які змінюють скорочувальні реакції гладеньких м'язів судин. У той же час за умов порушення функціональної активності ендотелію, яке має місце при атеросклерозі, гіпертензії та інших патологічних станах, такі впливи на судинні гладенькі м'язи з боку ендотелію можуть бути обмежені [1, 4, 6, 7, 9, 12, 14]. Однак є дані, які свідчать, що введення попередника біосинтезу оксиду азоту

L-аргініну може стимулювати синтетичну функцію ендотелію, у тому числі й під час експериментальної гіперхолестеринемії [5, 9, 11, 20].

Мета нашої роботи - вивчення впливу зміни синтетичної активності ендотелію за умов гіперхолестеринемії на скорочувальні відповіді судинних гладеньких м'язів при розтягуванні.

Методика

Досліди виконані на ізольованих препаратах ворітної вени та грудної аорти кроликів: I група - контроль, II - тварини, які знаходилися на стандартній атерогенній дієті (0,2 г холестерину на 1 кг маси тварини кожен день) протягом 4 міс, III - тварини, які знаходилися на атерогенній дієті та одержували кожен день метиловий ефір N ω -нітро-L-аргініну (L-NAME, 2 мг/кг, внутрішньовенно) упродовж 2 міс, IV - тварини, які протягом 2 міс одержували тільки L-NAME, V - тварини, які впродовж 2 міс одержували L-NAME, а потім протягом 2 міс знаходилися на стандартній дієті, VI - тварини, які знаходилися на атерогенній дієті та одержували кожен день L-аргінін (25 мг/кг, внутрішньовенно) впродовж 4 міс. Судинні смужки масою 2-5 мг вміщували у термостатовану перфузійну камеру об'ємом 1 мл, де вони піддавалися вихідному пасивному натягуванню силою 4-6 мН (смужки ворітної вени) та 10-15 мН (аортальні смужки). Судинні препарати перфузували нормальним розчином Кребса при температурі 36,6-37 °C. Скорочувальну активність гладеньких м'язів реєстрували за допомогою механоелектричного перетворювача 6MXIC у режимі, близькому до ізометричного. Судинні смужки ворітної вени розтягували силою 1-22 мН. За допомогою окулярного гвинтового мікрометра МОВ-1-15^x вимірювали довжину смужок. Розраховували площу поперечного перерізу; F₀, яка є максимальною активною силою на одиницю площі поперечного перерізу; L_{макс} - довжину м'яза, яка характерна для його максимального скорочення. Для тестування судинної реактивності на препаратах грудного відділу аорти використовували ендотелійзалежний дилататор ацетилхолін (10⁻⁶ моль/л). Зміни тонічного напруження гладеньких м'язів грудної аорти визначали за відношенням до заданого рівня їх активації (плато норадреналінової контрактури), який приймався за 100%, і виражали у відсотках. У всіх тварин масова частка холестерину в крові визначалася у вихідному стані та безпосередньо перед проведенням гострого експерименту [4].

У дослідях використовували такі реактиви: L-аргінін (фірми «Reanal», Угорщина), L-NAME та ацетилхолін (фірми «Sigma», США), норадреналін (фірми «Serva», ФРН).

Одержані результати обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію t Стюдента.

Результати та їх обговорення

Додаткове розтягування інтактних смужок ворітної вени кроликів силою 1-10 мН призводило до підвищення амплітуди їх фазних скоро-

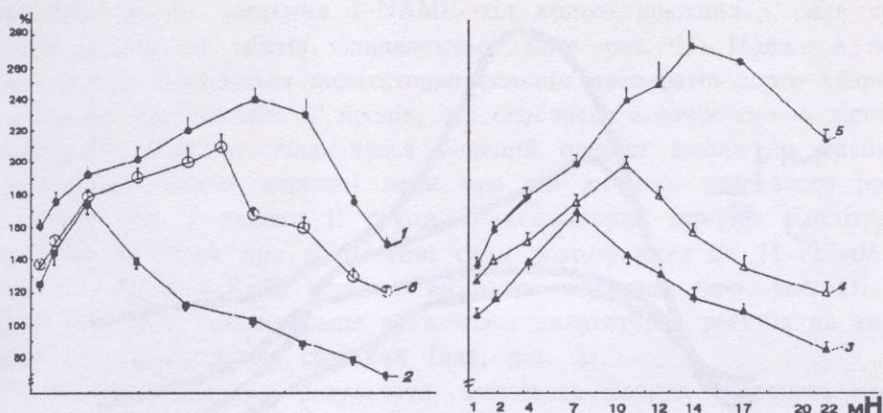


Рис. 1 Вплив гіперхолестеринемії та зміни синтетичної активності ендотелію на амплітуду фазних скорочень смужок ворітної вени кроликів при їх розтягуванні: 1 - контроль, 2 - після 4-місячної атерогенної дієти, 3 - після атерогенної дієти та введення L-NAME, 4 - після введення L-NAME, 5 - після введення L-NAME і 2-місячної стандартної дієти, 6 - після атерогенної дієти та введення L-аргініну. По осі абсцис - сила розтягування, по осі ординат - приріст амплітуди фазних скорочень.

чень на $60 \pm 5 - 120\% \pm 10\%$ відносно вихідного значення. При збільшенні сили розтягування до 14 мН приріст амплітуди фазних скорочень судинних гладеньких м'язів досягав максимальних значень ($140\% \pm 12\%$). Це відповідало $L_{\text{макс}}$. Подальше збільшення сили розтягування (до 17 мН) спричинювало те, що амплітуда скорочень зменшувалася, але продовжувала залишатися високою. Приріст амплітуди скорочень починав зменшуватися при додатковій силі розтягування 20-22 мН (рис. 1). У тварин після 4-місячної атерогенної дієти сила скорочень ізольованих смужок ворітної вени в абсолютних значеннях була в 7-10 разів меншою, ніж у контрольної групи кроликів. Додаткове розтягування смужок з силою 1 і 2 мН призводило до зростання амплітуди фазних скорочень на 25 ± 4 і $45\% \pm 8\%$ відповідно відносно вихідного значення. Максимальне збільшення амплітуди скорочень у них досягалось при додатковій силі розтягування препаратів 5 мН ($75\% \pm 7\%$). При подальшому збільшенні сили розтягування приріст амплітуди скорочень гладеньких м'язів різко падав (див. рис. 1). У цих тварин втричі зменшувалася реакція смужок грудного відділу аорти на ацетилхолін, який реалізує свою дію за участю ендотелію. Ця реакція становила $25\% \pm 5\%$ (рис. 2).

Таким чином, у тварин після 4-місячної атерогенної дієти відзначається менший приріст амплітуди фазних скорочень при тій же силі дозованого розтягування порівняно зі значеннями у контрольних тварин. У кролів II групи максимальний приріст амплітуди фазних скорочень досягався при менших значеннях сили розтягування. Максимальний приріст амплітуди скорочень у тварин за умов гіперхолестеринемії був у два рази меншим, ніж у контролі. Зменшення сили скорочення при розтягуванні смужок ворітної вени у тварин II групи відзначалося при значно меншій силі розтягування. За

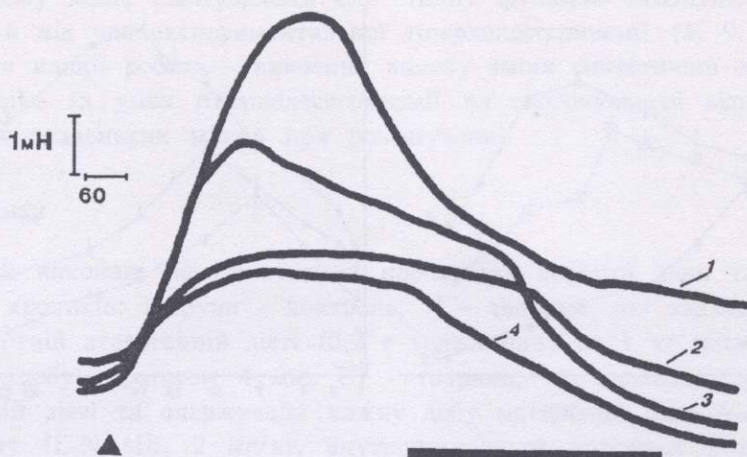


Рис. 2. Вплив ацетилхоліну (10^{-6} моль/л) на скорочувальні реакції попередньо активованих норадреналіном (10^{-6} моль/л) гладеньких м'язів ізолюваної аорти кроликів: 1 - контроль, 2 - після 4-місячної атерогенної дієти, 3 - після атерогенної дієти та введення L-NAME, 4 - після 4-місячної атерогенної дієти та введення L-аргініну.

умов гіперхолестеринемії також пригнічуються ендотелійзалежні дилаторні реакції. Отримані результати свідчать, що у тварин після 4-місячної атерогенної дієти міогенні механізми, які забезпечують зміну скорочувальної активності м'язів при збільшенні їх довжини, менш ефективні порівняно з інтактними тваринами.

У кролів, які знаходилися на атерогенній дієті та одержували кожену добу L-NAME, який пригнічує NO-синтазу [8], протягом 2 міс та у тварин, які одержували лише L-NAME (2 міс), виявлено істотне пригнічення фазної скорочувальної активності смужок ворітної вени, порівняно з контрольною групою кроликів. У тварин III групи максимальний приріст амплітуди скорочень досягався при силі розтягування 5-7 мН (у контролі 14 мН). Максимальне значення приросту амплітуди скорочень становило $71 \% \pm 7 \%$ відносно вихідного. Зменшення амплітуди фазних скорочень при розтягуванні смужок ворітної вени тварин III групи відмічалось при значно меншій силі розтягування. У тварин IV групи $L_{\text{макс}}$ досягалося при силі розтягування 9-10 мН, а приріст амплітуди фазних скорочень становив $100 \% \pm 6,7 \%$ відносно вихідного значення (див. рис. 1). У тварин III і IV груп зменшувалися й вазодилаторні реакції аортальних смужок на ацетилхолін.

Таким чином, отримані результати свідчать, що за умов гіперхолестеринемії та/або пригнічення синтетичної активності ендотелію за допомогою блокатора NO-синтази має місце зменшення як скорочувальних реакцій судинних гладеньких м'язів при їх розтягування, так і ендотелійзалежних дилаторних реакцій. У той же час, результати дослідів на судинних препаратах тварин V групи свідчать, що зміни скорочувальних реакцій, які мають місце під впливом пригнічення синтетичної активності ендотелію, є зворотними. Через 2 міс

після припинення введення L-NAME хід кривої довжина - сила судинних гладеньких м'язів відновлюється (див. рис. 1). Майже в повному об'ємі зберігається дилататорна реакція препаратів аорти тварин V групи на ацетилхолін. У кролів, які одночасно з атерогенною дієтою отримували L-аргінін, відзначався більший приріст амплітуди фазних скорочень препаратів ворітної вени при тій же силі дозованого розтягування, ніж у тварин II групи. Максимальний приріст амплітуди скорочень досягався при збільшенні сили розтягування до 11-12 мН і становив $110 \% \pm 8 \%$ відносно вихідного значення (див. рис. 1). У тварин IV групи також краще виявлялася дилататорна реакція на ацетилхолін на аортальних смужках (див. рис. 2).

Як свідчать одержані результати, амплітуда фазних скорочень препаратів ворітної вени за умов гіперхолестеринемії та пригнічення синтетичної активності ендотелію істотно зменшується при розтягуванні, а сила при якій досягається максимальне скорочення також є значно меншою. Раніше нами показано, що амплітуда скорочень судинних препаратів при їх розтягуванні значною мірою визначається виділенням з ендотелію біологічно активних речовин, яким властива стимулююча дія на скорочення судинних гладеньких м'язів [3, 19]. У той же час, в багатьох працях продемонстровано, що функція ендотелію у процесі атерогенезу пригнічена [1, 4, 6, 9, 11]. Тому можливо припустити, що однією з причин пригнічення залежності довжина - сила у тварин з гіперхолестеринемією, може бути функціональна недостача у них ендотелію. Це підтверджується також впливом пригнічення NO-синтази, і впливом L-аргініну на характер скорочувальних реакцій судинних гладеньких м'язів при їх розтягуванні у тварин з гіперхолестеринемією. Відомо, що L-аргінін, який є попередником біосинтезу оксиду азоту, стимулює біосинтез останнього та ендотеліозалежні судинні реакції [5, 11, 17]. Певне відновлення ходу кривої довжина - сила при гіперхолестеринемії, яке спостерігається при введенні L-аргініну, можливо зумовлено саме стимулюючою дією зазначеного препарату на функцію ендотелію. З іншого боку, відновлююча дія введення L-аргініну підтверджує участь ендотеліальних факторів у розвитку цих реакцій і свідчить, що L-аргінін може бути використаний для корекції порушень судинної реактивності на зміну внутрішньосудинного тиску, яке супроводжується змінами довжини судинних гладеньких м'язів.

Висновки

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що за умов експериментальної гіперхолестеринемії зменшення міогенних реакцій судинних гладеньких м'язів, які мають місце при розтягуванні судинної стінки зумовлено пошкодженням ендотелію. Структурні зміни саме ендотелію призводять до порушення його синтетичної та секреторної функції. Це знаходить своє підтвердження і в дослідях, де пригнічується синтетич-

на активність ендотелію за допомогою блокатора NO-синтетази. В той же час стимуляція синтетичної діяльності ендотелію за допомогою L-аргініну, який є попередником оксиду азоту, дозволяє використати останній для корекції ендотеліальних порушень.

M.N.Tkachenko

CONTRACTILE RESPONSES OF VASCULAR SMOOTH MUSCLES
IN HYPERCHOLESTEROLEMIA AND AT CHANGES OF
ENDOTHELIUM'S FUNCTIONAL ACTIVITY

Experiments on the isolated stripes of the portal vein of rabbits in experimental hypercholesterolemia and/or inhibition of endothelium's synthetic function with NO-synthase inhibitor L-NAME revealed the decrease of the contractile responses of vascular smooth muscles to stretching, as well as endothelium-dependent relaxation of aortal stripes to acetylcholine. L-arginine stimulated the synthetic activity of endothelium, thus enabling to use it for the correction of functional disturbances of the endothelium and of the studies responses.

A.A.Bogomolets Institute of Physiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ведерников Ю.П. Отсутствие эндотелийзависимой реакции расслабления изолированных сегментов коронарной артерии человека при коронарном атеросклерозе // Кардиология. - 1987. - 27, № 7. - С. 103-105.
2. Дворецкий Д.П. Роль динамической деформации кровеносных сосудов в регуляции их тонуса // Физиол. журн. СССР. - 1990. - 76, № 8. - С. 961-976.
3. Сагач В.Ф., Ткаченко М.Н. Роль эндотелия во взаимоотношениях длина-сила сосудистых гладких мышц // Докл. АН Украины. - 1993. - № 12. - С. 138-141.
4. Сагач В.Ф., Соловійов, А.І., Базилюк О.В. та ін. Ендотелій-залежні судинні реакції у кроликів під час тривалої експериментальної гіперхолестеринемії // Фізіол. журн. - 1994. - 40, № 2. - С. 73-82.
5. Сагач В.Ф., Ткаченко М.Н. Влияние L-аргинина на активные миогенные реакции сосудистых гладких мышц при гиперхолестеринемии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1995. - 119, № 2. - С. 118-120.
6. Талаева Т.В., Тараненко В.М., Исаечкина И.М. и др. Динамика изменений функциональных характеристик эндотелия и гладкомышечных клеток сосудов в условиях длительной гиперхолестеринемии // Физиол. журн. СССР. - 1990. - 76, № 8. - С. 1055-1060.
7. Хаяутин В.М., Лукошкова Е.В., Рогоза А.Н., Никольский В.П. Отрицательные обратные связи в патогенезе первичной артериальной гипертензии: механочувствительность эндотелия // Там же. - 1993. - 79, № 8. - С. 1-21.
8. Bellan J.A., Minkes R.K., McNamara D.B., Kadowitz P.J. Nω-nitro-L-arginine selectively inhibits vasodilator responses to acetylcholine and bradykinin in cats // Amer. J. Physiol. - 1991. - 29, № 3. - P. H1025-H1029.
9. Cooke J.P., Dzau J., Creager A. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is corrected by L-arginine // Basic. Res. Cardiol. - 1991. - 86, Suppl. 2. - P. 173-181.
10. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // Nature. - 1980. - 288, № 5789. - P. 373-376.
11. Girerd X.J., Hirsch A.T., Cooke J.P. et al. L-Arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits // Circulat. Res. - 1990. - 67, № 6. - P. 1301-1308.
12. Harrison D.G. Endothelial dysfunction in atherosclerosis // Basic. Res. Cardiol. - 1994. - 89, Suppl. 1. - P. 87-102.
13. Ignarro L.J., Byrns R.E., Buga G.M. et al. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide - elicited vascular smooth muscle relaxation // J. Pharmacol. and Exp. Ther. - 1988. - 244, № 1. - P. 181-189.
14. Luscher T.F., Dohi Y. Endothelium-derived relaxing factor and endothelin in hypertension // News in Physiol. Sciences (NIPS). - 1992. - 7, June. - P. 120-123.

15. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // *Nature*. - 1987. - 327, № 6122. - P. 524-526.
16. Reinhart W.H. Shear-dependence of endothelial functions // *Experientia*. - 1994. - 50, № 4. - P. 87-93.
17. Sakuma I., Stuehr D.J., Gross S.S. *et al.* Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. - 1988. - 85, № 22. - P. 8664-8667.
18. Schmidt H.H.H.W., Nau H., Wittfoht W. *et al.* Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide // *Eur. J. Pharmacol.* - 1988. - 154, № 2. - P. 213-216.
19. Tkachenko M.N., Sagach V.F. Length-tension dependence in vascular smooth muscle: possible participation of endothelin // *Experientia*. - 1995. - 51, № 9-10. - P. 936-940.
20. Tsao P.S., McEvoy L.M., Drexler H. *et al.* Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine // *Circulation*. - 1994. - 89, № 5. - P. 2176-2182.
21. Vane J.R. The endothelium : maestro of the blood circulation // *Phil. Trans. Raj. Soc. London Ser. B. Biol. Sci.* - 1994. - 343, № 1304. - P. 225-246.

Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця
НАН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 27.12.96