

І.В. Кізуб, А.І. Соловійов, О.О. Мойбенко, О.В. Стефанов

Вплив блокади гліколізу та міоендотеліального електричного зв'язку на розвиток скоротливих реакцій стінки легеневих артерій та аорти щурів під дією гіпоксії

Исследовали влияние блокады гликолиза на развитие гипоксических реакций изолированных препаратов легочных артерий и грудной аорты крыс в контроле, после их деэндоотелизации и при блокаде миоэндоотелиальной электрической связи. Селективная блокада гликолиза вызывала реверсию гипоксической констрикции препаратов легочных артерий, но не гипоксической дилатации препаратов аорты. Гипоксическая констрикция препаратов легочных артерий исчезала после их деэндоотелизации и не изменялась при последующей блокаде гликолиза. Кроме того, блокада гликолиза не влияла на гипоксические реакции препаратов легочных артерий с заблокированной миоэндоотелиальной электрической связью. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что вызванная гипоксией констрикция легочных артерий, в отличие от гипоксической дилатации аорты, является эндотелийзависимой. При этом в развитие гипоксической легочной вазоконстрикции вовлечен гликолиз в эндотелиальных клетках, где он может быть связан с формированием деполаризующих электрических сигналов к гладким мышцам, обуславливая констрикторное влияние эндотелия на стенку легочных артерий в условиях гипоксии.

ВСТУП

Відомо, що гіпоксія викликає скорочення стінки легеневих артерій ссавців, на відміну від судин системного кола кровообігу, де під дією гіпоксії спостерігається вазодилатація. Гіпоксична легенева вазоконстрикція (ГЛВ) лежить в основі патогенезу гіпоксичної легеневої гіпертензії, внаслідок якої може розвинути гіпертрофія правого шлуночка та серцева недостатність. Механізми розвитку ГЛВ досі остаточно не з'ясовано, зокрема не визначено внутрішньоклітинні сигнальні шляхи та сенсори.

Добре відомо, що дія гіпоксії на судинні гладеньком'язові клітини (ГМК) пов'язана зі змінами іонної проникності клі-

тинної мембрани [5, 7, 17] внаслідок змін окисно-відновного стану клітини [12, 25], що призводить до коливань внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Показано, що в ГМК легеневих артерій гіпоксія викликає підвищення $[Ca^{2+}]_i$ [19]. Це може бути пов'язано із пригніченням калієвих каналів та наступним входом Ca^{2+} через кальцієві канали L-типу [23], вивільненням Ca^{2+} із внутрішньоклітинних місць зв'язування [8] та активацією незалежних від мембранного потенціалу шляхів входу Ca^{2+} [13]. Також відомо, що у розвиток ГЛВ значний внесок робить ендотелій, здійснюючи модулюючий (гуморальний) вплив на ГМК [1, 10, 20].

Більшість існуючих теорій щодо внутрішньоклітинних ланок, чутливих до зни-

ження ступеня pO_2 розглядають оксидази мітохондріального електронно-транспортного ланцюга [9, 21] як джерело ключового сигналу у вигляді реактивних видів кисню або змін окисно-відновного стану клітини [22]. Разом з тим тканинна киснева нестача може безпосередньо впливати на енергопостачання як ГМК, так і ендотеліоцитів. Відомо, що початковий етап клітинного дихання, яким є гліколіз, сам здатний забезпечувати третину утворення АТФ у судинних ГМК [23]. Показано, що гліколіз може відігравати важливу роль у розвитку скоротливих реакцій стінки кровоносних судин при гіпоксії [2, 3]. Зокрема, встановлено феномен реверсії гіпоксичної констрикторної реакції легеневих артерій на дилататорну за умов блокади гліколізу [4, 16]. Крім того, як було показано раніше, за допомогою гліколізу змінюється мембранний потенціал ендотеліоцитів у разі гіпоксії [16]. Краще розуміння механізмів ГЛВ є необхідним для лікування гіпоксичної легеневої гіпертензії та визначення шляхів її ефектної фармакологічної корекції.

Метою нашої роботи було дослідити роль гліколізу у формуванні гіпоксичних реакцій стінки магістральних артерій легеневого та системного кіл кровообігу.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на кільцевих сегментах легеневих артерій і грудної аорти щурів обох статей масою 200 – 250 г. Тварини були анестезовані фенобарбіталом (50 мг/кг) та забиті цервікальною дислокацією з наступним знекровленням. Скоротливу активність препаратів реєстрували в ізометричному режимі. Перфузію інтактних судинних сегментів проводили термостатованим (36 – 37 °С) розчином Кребса наступного складу (в ммоль/л): NaCl – 133; KCl – 4,7; $NaHCO_3$ – 16,3; NaH_2PO_4 – 1,38; $CaCl_2$ – 2,5; $MgCl_2$ – 1,2; глюкоза – 7,77;

(рН 7,3 – 7,4). Дослідження скоротливих реакцій інтактних судинних препаратів проводили на фоні попереднього їх скорочення норадреналіном у концентрації $3 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Деендотелізацію судинних препаратів здійснювали механічним шляхом, а її перевірку – за допомогою аплікації ацетилхоліну (10^{-5} моль/л), який за відсутності ендотелію викликав скорочення судинного препарату.

Блокаду проведення електричних струмів від ендотелію до гладеньких м'язів здійснювали попередньою 15-хвилинною аплікацією 18β -гліцеретинової кислоти ($2 \cdot 10^{-5}$ моль/л) [24]. Для блокади гліколізу використовували селективний блокатор гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази моноіодацетат (10^{-5} моль/л) у комбінації з піруватом (10^{-3} моль/л).

Нормоксичний стан створювали барбатуванням буферного розчину сумішшю газів 21% O_2 , 5% CO_2 , 74% N_2 . Парціальний тиск O_2 при цьому становив 135 – 145 мм рт. ст. Гіпоксичний стан створювали барбатуванням буферного розчину сумішшю газів 5% CO_2 і 95% N_2 , знижуючи pO_2 до 30 – 35 мм рт. ст. Парціальний тиск кисню та рН визначали за допомогою вимірювача розчиненого кисню “Inolab Multi Level 1”, (“WTW”, Німеччина) та рН-метра MP 220 (“Mettler Toledo”, США).

У роботі було використано наступні фармакологічні агенти: ацетилхолін, 18β -гліцеретинова кислота, моноіодацетат, артеринол, піруват натрію (“Sigma”, США).

Амплітуда скоротливих реакцій представлена як $M \pm m$ для кількості експериментів (n). Достовірність розходжень між значеннями визначали за критерієм t Стьюдента. Розходження вважалися статистично достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гіпоксія ($pO_2 = 30 - 35$ мм рт. ст.) викликала двофазну реакцію стінки ізольованих

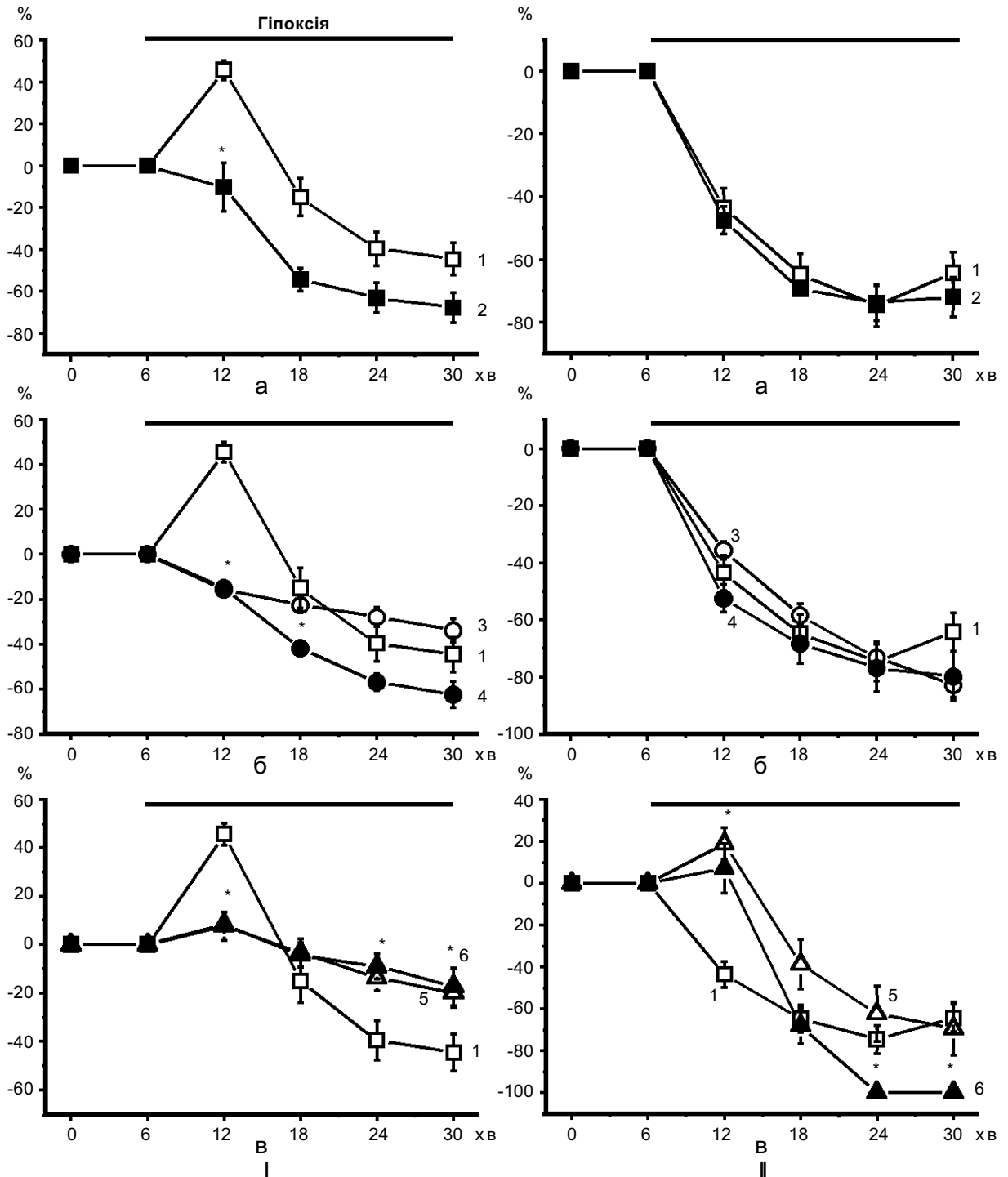
препаратів легеневих артерій, попередньо активованих норадреналіном, яка складалась із швидкого транзиторного скорочення та наступного повільного розслаблення. Деендотелізовані препарати легеневих артерій відповідали на гіпоксію розслабленням. Інтактні препарати легеневих артерій після 15-хвилинної преінкубації 18 β -гліциретиновою кислотою, яка роз'єднує електричний зв'язок між ендотеліальним шаром і гладенькими м'язами та порушує обмін електричними сигналами між ними, відповідали на дію гіпоксії транзиторним скороченням, яке достовірно зменшувалося порівняно з реакцією інтактних препаратів, не оброблених 18 β -гліциретиновою кислотою (рисунок, I).

Попередня 20-хвилинна аплікація селективного блокатора гліколізу моноацетату в комбінації з піруватом, який є субстратом циклу трикарбонових кислот, викликала реверсію гіпоксичної констрикторної відповіді інтактних препаратів легеневих артерій на дилататорну, однак не впливала на гіпоксичні реакції препаратів легеневих артерій після їх деендотелізації або блокади міоендотеліального електричного зв'язку 18 β -гліциретиновою кислотою (див. рисунок, I).

Інтактні препарати грудної аорти, попередньо скорочені норадреналіном, відповідали на гіпоксію розслабленням так само, як і після їх деендотелізації. Попередня 15-хвилинна блокада міоендотеліального електричного зв'язку 18 β -гліциретиновою кислотою викликала невелике транзиторне скорочення інтактних препаратів грудної аорти у відповідь на гіпоксію. Попередня селективна блокада гліколізу моноацетатом у комбінації з піруватом не впливала на гіпоксичні реакції інтактних препаратів, препаратів оброблених 18 β -гліциретиновою кислотою та деендотелізованих препаратів грудної аорти (див. рисунок, II).

Отримані нами результати свідчать про те, що ГЛВ пов'язана з гліколізом, оскільки його блокада в інтактних препаратах легеневих артерій повністю усуває констрикторну реакцію на гіпоксію. Однак той факт, що блокада гліколізу не впливає на гіпоксичні реакції деендотелізованих легеневих артерій, може доводити те, що в підтриманні ГЛВ беруть участь пов'язані із гліколізом метаболічні зсуви в ендотеліальних клітинах.

Відомо, що ГЛВ залежить від впливу ендотелію [1, 10, 20] і це також можна бачити з результатів наших досліджень. Разом з тим наші дослідження показують, що модулюючий вплив ендотелію на розвиток гіпоксичних реакцій і легеневих, і системних артерій, можливо, є багатоконпонентним. З одного боку, відмінність у реакціях на гіпоксію стінки судин легеневого та системного кровообігу може бути зумовлена зсувом під дією гіпоксії балансування у взаємодії ендотеліальних гіперполяризуючих і деполіаризуючих мембрану ГМК факторів [15]. Встановлено, що підтримання ГЛВ залежить від гліколітичного АТФ [11]. Можна припустити, що ендотелійзалежне формування ГЛВ пов'язане з залученням АТФ гліколітичного походження у процеси в ендотелії, котрі зумовлюють гуморальний його вплив на ГМК легеневих артерій при гіпоксії. Можливо, розвиток ГЛВ опосередкований ще не ідентифікованим ендотеліальним фактором, про який повідомляють деякі автори [14], синтез, біотрансформація або вивільнення якого можуть залежати від гліколізу. Разом з тим наші досліди на аорті показують, що ендотелій не є необхідним для формування дилататорної реакції стінки системних магістральних судин на гіпоксію і, на відміну від легеневих артерій, гліколіз, можливо, не залучений у її розвиток. Така реакція стінки аорти на гіпоксію може бути наслідком зниження енергоутворення ГМК через гіпоксичне



Вплив моноіодацетату на гіпоксичні реакції препаратів легеневих артерій (I) та грудної аорти (II) щурів при інтактному ендотелії (а), при зруйнованому ендотелії (б) та при блокаді міоендотеліального електричного зв'язку 18β-гліцеретиною кислотою (в): 1 – інтактний ендотелій, 2 – інтактний ендотелій і моноіодацетат, 3 – деендотелізація, 4 – деендотелізація і моноіодацетат, 5 – інтактний ендотелій, 18β-гліцеретинова кислота і моноіодацетат.

За умовний нуль прийнято рівень тонусу, створений дією норадреналіну.

* P<0,05 – вірогідні зміни відносно реакцій інтактних препаратів; n = 8 – 16.

пригнічення окисного фосфорилування [11].

Іншим значним компонентом модулюючого впливу ендотелію на розвиток гіпоксичних реакцій судинної стінки, як можна побачити з наших досліджень, можуть бути електричні сигнали від ендотелію до ГМК. Про це свідчить той факт, що порушення міоендотеліального електричного зв'язку призводить до значного зменшення ГЛВ та появи транзиторної констрикторної відповіді на гіпоксію в аорті (див. рисунок I, II). Відомо, що ендотеліальні та гладеньком'язові клітини утворюють між собою міоендотеліальні контакти [31]. Зміни мембранного потенціалу ендотеліоцитів можуть електротонічно передаватися через ці контакти на ГМК [6, 24]. Таким сигналом може бути деполяризація, яка спостерігається на мембрані ендотеліоцитів під дією гіпоксії і залежить від гліколізу [16]. Можна припустити, що такі зміни мембранного потенціалу ендотеліоцитів, розповсюджуючись на мембрану ГМК, здатні викликати її деполяризацію та скорочення. Як показують результати нашого дослідження, гліколіз залучений саме у формування міоендотеліальних електричних сигналів, які можуть виникати під дією гіпоксії в ендотелії, оскільки його блокада не впливає на гіпоксичні реакції ні легеневих артерій, ні аорти за умов блокади міоендотеліального електричного зв'язку.

Отже, результати наших досліджень свідчать про те, що гіпоксична констрикторна реакція легеневих артерій, на відміну від гіпоксичної вазодилатації аорти, є ендотеліозалежною. При цьому у розвиток ГЛВ залучений гліколіз в ендотеліальних клітинах, де він може бути пов'язаний із формуванням електричних сигналів до ГМК, зумовлюючи констрикторний вплив ендотелію на тонус стінки легеневих артерій під дією гіпоксії.

I.V. Kizub, A.I. Soloviev, A.A. Moibenko, A.V. Stefanov

THE INFLUENCE OF GLYCOLYSIS AND BLOCKADE OF MYOENDOTHELIAL GAP JUNCTIONS ON CONTRACTILE RESPONSES OF PULMONARY ARTERY AND AORTA IN RATS UNDER HYPOXIA

The effects of blockade of glycolysis on the contractile activity of isolated vascular rings of both the pulmonary artery and the thoracic aorta were studied under hypoxia in intact, denuded vessels and those with blocked myoendothelial electrical coupling. The blockade of glycolysis led to a reversion of a hypoxic contraction in the pulmonary artery but had no effect on hypoxic dilatation of the aorta. Hypoxic constriction of the pulmonary artery was abolished after denudation and stayed unchanged at the following blockade of glycolysis. Moreover, blockade of glycolysis had no effect on the hypoxic responses of the pulmonary artery after blockade of the myoendothelial gap junctions. The data suggest that hypoxic contraction of the pulmonary artery is endothelium-dependent, in contrast to the hypoxic dilatation of the aorta. It is likely that glycolysis in endothelial cells and myoendothelial gap junctions contribute to hypoxic pulmonary vasoconstriction due to formation and conduction the depolarizing electrical signals from endothelial cells to smooth muscles causing their contraction under hypoxia.

*Institute of Pharmacology and Toxicology Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev,
A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Базилук О.В., Берштейн С.А., Соловьев А.И. Роль эндотелия в развитии сократительных реакций сосудистых гладких мышц при снижении их оксигенации // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1986. – **101**, №6. – С.134 – 141.
2. Гуревич М.И., Берштейн С.А., Соловьев А.И. Дефицит кислорода в тканях и их кровоснабжение // Успехи физиол. наук. – 1981. – **12**, №4. – С.77 – 98.
3. Соловьев А.И., Берштейн С.А. Влияние блокады гликолиза в сосудистой стенке на фазную активность гладких мышц // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1982. – **94**, №8. – С.11 – 13.
4. Соловьев А.И. Особенности реагирования сосудистых гладких мышц на кислород при блокаде гликолиза в сосудистой стенке // Физиол. журн. – 1984. – **30**, №6. – С.733 – 736.
5. Соловьев А.И., Стефанов А.В. Механизмы изменения кальциевой проводимости сарколеммы гладкомышечных клеток сосудов при гипоксии // Физиол. журн. СССР. – 1985. – **71**, №12. – С.1560 – 1567.
6. Emerson G.G., Segal S.S., Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed

- arteries: role of vasomotor control // *Circulat. Res.* – 2000. – **87**, №6. – P. 427 – 428.
7. Franco-Obregon A., Lopez-Barneo J. Low pO₂ inhibits calcium channel activity in arterial smooth muscle cells // *Amer. J. Physiol.* – 1996. – **271**, №6. – P.H2290 – H2299.
 8. Gelband C.H., Gelband H. Ca²⁺ release from intracellular stores is an initial step in hypoxic pulmonary vasoconstriction of rat pulmonary artery resistance vessels // *Circulation.* – 1997. – **96**. – P.3647 – 3654.
 9. Jones R.D., Hancock J.T., Morice A.H. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? // *Free Radical Biol. end Med.* – 2000. – **29**. – P.416 – 424.
 10. Kovitz K.L., Aleskowitz T.D., Sylvester J.T., Flavahan N.A. Endothelium-derived contracting and relaxing factors contribute to hypoxic responses of pulmonary arteries // *Amer. J. Physiol.* – 1993. – **265**. – P.H1139 – H1148.
 11. Leach R.M., Hill M., Snetkov V.A., Robertson T.P. and Ward J.P.T. Energy state, pH and vasomotor tone during hypoxia in precontracted pulmonary and femoral arteries // *Am. J. Physiol.* – 2000. – **278**. – P.L294 – L304.
 12. Park M.N., Lee S.H., Ho W.K., Earm Y.E. Redox agents as a link between hypoxia and the responses of ionic channels in rabbit pulmonary vascular smooth muscle // *Exp. Physiol.* – 1995. – **80**, №5. – P.835 – 842.
 13. Robertson T.P., Hague D.E., Aaronson P.I., Ward J.P.T. Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat // *J. Physiol.* – 2000. – **252**. – P.669 – 680.
 14. Robertson T.P., Ward J.P.T., Aaronson P.I. Hypoxia induces the release of a pulmonary-selective, Ca²⁺-sensitising, vasoconstrictor from the perfused rat lung // *Cardio-vasc. Res.* – 2001. – **50**. – P.45 – 150.
 15. Ruckborn K., Siegel G. Hypoxic vasoconstriction and vasodilatation in human pulmonary arteries // *J. Vasc. Res.* – 1994. – **31**, №1. – P. 43.
 16. Soloviev A., Bondarenko A. Selective glycolysis blockade reverses electrical responses in vascular and endothelial cells to hypoxia. Abstract of Intern. Simp. of New Development in Smooth Muscle and Endothelial Cell Signaling. 16-19 May, 1999, Nagoya, Japan – P49. – P.121.
 17. Soloviev A.I., Stefanov A.V., Bazilyk O.V. et al. Changes in plasma membrane ionic permeability and related contractile responses in vascular smooth muscle at hypoxia // *Pathophysiology* – 1996. – **3**. – P.11 – 20.
 18. Spagnoli L.G., Villaschi S., Neri L., Palmieri G. Gap junction in myo-endothelial bridges of rabbit carotid arteries // *Experientia.* – 1982. – **38**. – P.124 – 125.
 19. Valuda M.S., Kleinman J.G., Madden J.A. Effect of hypoxia and norepinephrine on cytoplasmic free Ca²⁺ in pulmonary and cerebral arterial myocytes // *Amer. J. Physiol.* – 1993. – **265**, №6. – P.L591 – 597.
 20. Ward J.P.T., Robertson T.P. The role of endothelium in hypoxic pulmonary vasoconstriction // *Exp. Physiol.* – 1995. – **80**. – P. 793 – 801.
 21. Waypa G.B., Chandel N.S., Schumacker P.T. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing // *Circulat. Res.* – 2001. – **88**, №12. – P.1259 – 1266.
 22. Weissmann N., Tadic A., Hanze J. et al. Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H₂O₂? // *Amer. J. Physiol.* – 2000. – **279**. – P.L683 – L690.
 23. Wendt I.R. Effects of substrate and hypoxia on smooth muscle metabolism and contraction // *Ibid.* – 1989. – **256**. – P.C719 – C727.
 24. Yamamoto Y., Fukuta H., Nakahira Y., Suzuki H. Blockade by 18β-glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles // *J. Physiol.* – 1998. – **511**, №2. – P.501 – 508.
 25. Yuan X.J., Tod M.L., Rubin L.J., Blaustein M.P. Hypoxic and metabolic regulation of voltage-gated K⁺ channels in rat pulmonary artery smooth muscle cells // *Exp. Physiol.* – 1995. – **80**, №5. – P.803 – 813.

*Ін-т фармакології та токсикології АМН України, Київ;
Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 16.06.2003*