

С. М. Зеленський, А. І. Соловійов

Вивчення впливу радіації на кальційнезалежний шлях розслаблення аорти щурів під дією нітрогліцерину

Исследовано влияние нитроглицерина (НГ, 10^{-7} – 10^{-4} моль/л) на концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и сократительную активность гладких мышц (ГМ) дезэндотелизированных препаратов грудного отдела аорты крыс в норме и после γ -облучения в условиях предварительной активации сокращений ГМ аорты крысы гиперкалиевым раствором K^+ (60 ммоль/л). Установлено, что γ -облучение (6 Гр) статистически достоверно уменьшает базальное содержание $[Ca^{2+}]_i$ на $28,4\% \pm 11,9\%$. Показано, что доминирующим механизмом релаксации ГМ грудного отдела аорты крыс под влиянием НГ в условиях эксперимента является $[Ca^{2+}]_i$ -независимый механизм релаксации, опосредованный активацией растворимой формы гуанилатциклазы, и что γ -облучение животных статистически достоверно не влияет на него.

ВСТУП

Високий рівень захворювань серцево-судинної системи нині вимагає вирішення питання їх попередження та лікування. Особливого значення ця проблема набуває для України, яка постраждала від Чорнобильської катастрофи. Відомо, що радіаційне опромінення впливає на функцію ендотелію кровоносних судин, внаслідок чого виникає надмірна чутливість до вазоконстрикторних впливів, які спроможні призвести до розвитку довгострокового та стійкого скорочення гладеньких м'язів (ГМ) судин (вазоспазму), що є підґрунтям до таких захворювань серцево-судинної системи, як гіпертонія, інфаркт міокарда, порушення мозкового кровообігу тощо [12, 15, 16].

Добре відомо, що для лікування нападів стенокардії та усунення вазоспазмів приблизно з 1879 р. почали використовувати нітрогліцерин (НГ), синтезований італійським хіміком Асканіо Собреро у 1846 р. Вважається, що вазодилататорні властивості НГ пов'язані з його ферментативною біо-

© С. М. Зеленський, А. І. Соловійов

трансформацією в ГМ-клітинах (ГМК) з утворенням оксиду азоту (NO) [5]. Доведено, що розслаблення, викликане NO через активацію розчинної гуанілатциклази (рГЦ) та збільшення концентрації внутрішньоклітинного цГМФ, опосередковується зміною внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) [1, 3, 4, 18]. Розслаблювальний ефект цГМФ-залежних протеїнкіназ на ГМ реалізується головним чином за рахунок контролю концентрації $[Ca^{2+}]_i$, впливу на інозитол-1,4,5-трифосфатний шлях скорочення, активність кальцієвих АТФаз та активації кальційзалежних калієвих каналів мембран ГМК [11]. Зменшення внутрішньоклітинного вмісту цГМФ призводить до збільшення $[Ca^{2+}]_i$ та скорочення судин ГМ. NO може також зменшувати вхід Ca^{2+} до ГМК через потенціалзалежні кальцієві канали L-типу [2]. Дія донорів NO на $[Ca^{2+}]_i$ залежить від типу судин і способу активації скорочення [10]. Є дані, що при активації норадреналіном α -адренорецепторів ГМК хвостової артерії щура NO та НГ зменшує вазоконстрикцію без зменшення

$[Ca^{2+}]_i$ [19]. Деякі автори вважають, що поки механізм вазодилататорної дії НГ повністю не з'ясовано і не слід його однозначно пов'язувати тільки з утворенням NO [9].

Мета нашої роботи – вивчення взаємозв'язку індукованих НГ змін тонусу та $[Ca^{2+}]_i$ в умовах радіаційного опромінення.

МЕТОДИКА

У дослідах було використано сегменти грудного відділу аорти дорослих щурів-самців лінії Вістар-Кіото масою $210 \text{ г} \pm 30 \text{ г}$. Усі процедури проводили з використанням рекомендацій Хельсинської Декларації щодо гуманного відношення до тварин. Судини ззовні ретельно вичищали від сполучної тканини та розрізали на сегменти шириною близько 1,5 мм. Дослідження проводили за кімнатної температури в розчині Кребса, що мав такий склад (ммоль/л): NaCl – 122, KCl – 4,7, NaHCO_3 – 15,5, KH_2PO_4 – 1,2, CaCl_2 – 2,5, MgCl_2 – 1,2 та глюкоза – 11,5, рН 7,3–7,4. З судин механічним способом видаляли шар ендотелію. Аналізували одночасні зміни $[Ca^{2+}]_i$ та тонусу ГМ, скорочення яких було активоване деполяризацією мембран ГМК гіперкалієвим розчином Кребса ($[K^+] = 60$ ммоль/л), який отримували еквімолярною заміною Na^+ на K^+ . Шурів розділили на дві групи: контрольну і дослідну. Дослідних тварин піддавали загальному одноразовому зовнішньому γ -опроміненню з використанням джерела «ТГТ Рокус-М», Росія (^{60}Co). Дослідження проводили на 9-ту добу після опромінення (6 Гр) в камері об'ємом 300 мкл, яку було встановлено на предметний стіл флуоресцентного неінвертованого мікроскопа «ЛЮМАМ-И2» (Росія). Зміни $[Ca^{2+}]_i$ вимірювали з використанням флуоресцентного кальцієвого індикатора fura-2 [7]. Після препарування сегменти судин вивертали шаром ендотелію назовні, з зовнішньої поверхні механічним способом видаляли ендотелій та вміщували у заван-

тажувальний розчин: fura-2AM – 10 мкмоль/л; DMSO – 2,5% (за об'ємом); Pluronic F-127 – 0,5 % (за масою); розчин Кребса – 95 % (за об'ємом) рН 7,35. Завантажування барвником сегментів судин здійснювали при кімнатній температурі в захищеному від світла місці впродовж 4 годин. Зразки сегментів судин опроміненіх і контрольних тварин завантажували в однакових умовах одночасно, після чого їх переносили у ванночку з розчином Кребса, та залишали там протягом 30 хв. Далі їх по черзі фіксували на двох гачках датчика сили у робочій камері з температурою розчину 36°C , під навантаженням (13–14) мН. Під час експерименту усі розчини, окрім NO, подавали до камери зі швидкістю 1 мл/хв за допомогою перистальтичного насоса Masterflex. Результати вимірювань $[Ca^{2+}]_i$ представлені як відношення ($R = I_{340\text{nm}} / I_{380\text{nm}}$) інтенсивності флуоресцентних сигналів (I) при довжині хвилі 340 та 380 нм, за вирахуванням значення фонові флуоресценції згідно з методикою Nimpen та співавт. [8]. Для цього у кінці експерименту для гасіння флуоресценції барвника застосовували розчин Кребса з Mn^{2+} (20 ммоль/л).

Для приготування водного (аутентичного) розчину NO, а також контролю його концентрації було використано методику [14]. Скляну посудину з 20 мл деіонізованої води ставили до ванночки з льодом і щільно закривали пробкою. Спочатку з посудини видаляли кисень за допомогою продування протягом 30 хв газоподібного аргону. Для цього з балона надходив потік газу, який по трубкам проходив спочатку через розчин KOH, а потім деіонізовану воду. Після цього клапан системи перемикався на балон з газоподібним NO, який також проходив спочатку крізь розчин KOH, а потім крізь деіонізовану воду протягом 10–15 хв. Розчин KOH використовували для видалення інших оксидів азоту з газоподібного NO. Таким чином, одержували основний насичений розчин NO, концентрація котрого

залежала від температури. Так, при 10 °С вона становила 2,5 ммоль/л, а за кімнатної температури (20 °С) була близько 2 ммоль/л. Для вивчення впливу NO на скорочення ГМ з цього розчину за допомогою мікрошприца (за умов повної ізоляції від повітря) швидко додавали потрібну кількість розчину у робочу камеру. Розчин NO існував не менше ніж 40 с, і за цей час він повністю змінювався. Концентрацію NO у розведеному розчині вимірювали на обладнанні Nitric Oxide Measuring System (“Innovative Instruments Inc., Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH”, США–Німеччина). Калібрування було виконано у хімічний спосіб, який рекомендовано виробником приладу.

Усі неорганічні сполуки одержували від фірми “Sigma Chemical Co.” (США), fura-2 AM — від “Molecular Probes, Inc.” (США).

Всі наведені результати подано у вигляді середнього арифметичного ± помилка середнього арифметичного. Цифрові значення обробляли статистично за допомогою критерію t Стьюдента. Розходження вважали достовірними при $P < 0,05$. Усі розрахунки проводили на персональному комп’ютері з використанням програм OriginPro 7.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1,а зображено оригінальний запис реакції ГМ деендотелізованих препаратів грудного відділу аорти щура, попередньо скорочених гіперкалієвим розчином, на НГ (10^{-5} моль/л). На рис. 1,б для порівняння представлено оригінальний запис реакції ГМ деендотелізованих сегментів на дію верапамілу – блокатора кальцієвих каналів – у концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Верапаміл демонструє класичний характер залежності між $[Ca^{2+}]_i$ та силою скорочення (F): зменшення $[Ca^{2+}]_i$ призводить до пропорційного розслаблення ГМ. На відміну від верапамілу додавання НГ до омиваючого гіперкалієвого розчину Кребса призводило до релаксації ГМ, котра розвивалась без достовірних змін $[Ca^{2+}]_i$, тобто розслаблення ГМ відбувалося лише внаслідок зменшення чутливості скорочувального апарату ГМ до іонів кальцію.

Реакція на вплив НГ є дозозалежною (рис. 2). Під час вимірів концентрація НГ в омиваючому розчині змінювалася послідовно, ступінчасто від 10^{-4} до 10^{-7} моль/л. Середні значення амплітуди розслаблення на НГ (10^{-5} моль/л) становила для контроль-

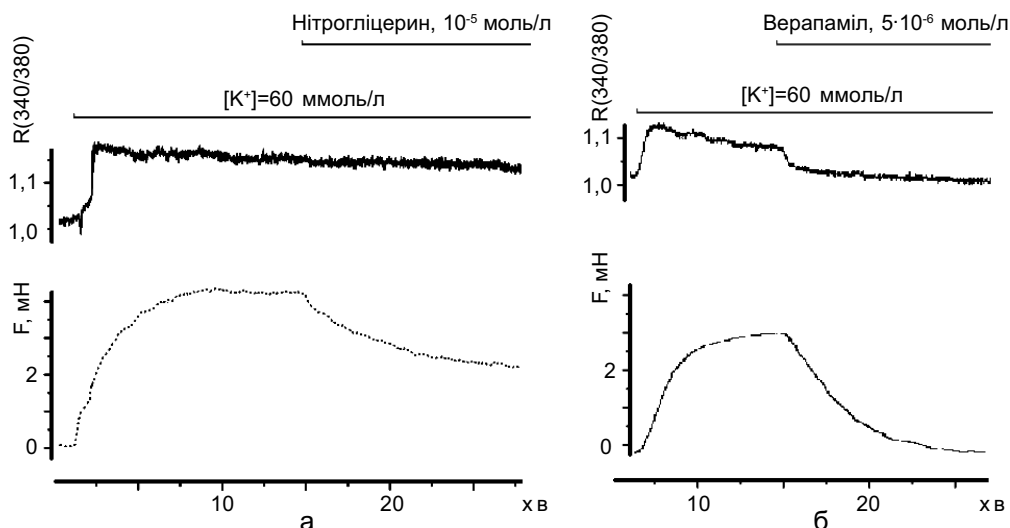


Рис. 1 Оригінальний запис одночасно зареєстрованих змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію ($R = I_{340nm} / I_{380nm}$) та сили скорочення (F) при дії гіперкалієвого розчину Кребса і нітрогліцерину (а), а також верапамілу (б) на деендотелізовані судинні препарати грудного відділу аорти щура

ної та експериментальної групи тварин $45,0 \pm 7,1$ та $50,1 \pm 12,0$ % відповідно від рівня тонічного компонента КС1-індукованого скорочення ($n=6$). При цьому зміни $[Ca^{2+}]_i$ під впливом НГ були статистично недостовірні: $6,1 \pm 6,0$ та $7,6 \pm 7,3$ % відповідно для щурів контрольної та дослідної груп. Дози половинного ефекту розслаблення (показники $leg EC_{50}$) становили $-5,05 \pm 0,27$ та $-5,17 \pm 0,36$ ($n=6$) відповідно для контрольних та експериментальних щурів. Незначне збільшення оцінки середнього значення $[Ca^{2+}]_i$ на кривій доза–ефект (див. рис. 2) зі збільшенням концентрації НГ, було зумовлено тенденцією до зменшення $[Ca^{2+}]_i$ за час проведення експерименту (приблизно 1 год), що підтвердили додаткові виміри без додавання у гіперкалієвий розчин НГ.

Після того, як зміни $[Ca^{2+}]_i$ під дією НГ нами не були зареєстровані, виникло питання, а чи насправді вазорелаксаційна дія НГ пов'язана лише з його біотрансформацією та вивільненням NO? Або механізм дії НГ більш складніший і безпосередньо не пов'язаний з утворенням NO [9]?

Для вирішення цього питання були проведені порівняльні дослідження дії аутентичного розчину NO на ГМК деендотелізованих сегментів аорти. Виявлено два ти-

пи реакції ГМ (рис. 3,а,б): достовірне зменшення рівня $[Ca^{2+}]_i$ на $30,4 \pm 4,0$ % ($n=5$), в іншому – зменшення були статистично недостовірні – $3,3 \pm 3,9$ % ($n=8$, $P<0,05$). З отриманих результатів можна зробити висновок, що на відміну від НГ аутентичний NO поряд з розслабленням ГМ може викликати також і транзиторне зменшення $[Ca^{2+}]_i$. Але останнє достовірно не впливає на розслаблення, яке в першому разі було $69,1 \pm 9,2$ %, а в другому, більш частішому – $73,1 \pm 9,8$ %. Тобто цей факт наводить на думку, що розслаблення ГМ аорти, яке статистично однакове в обох випадках, не пов'язано зі зниженням $[Ca^{2+}]_i$. Отримані результати дають змогу припустити, що механізми розслаблювальної дії НГ та аутентичного NO в умовах експерименту суттєво не відрізняються, оскільки в обох випадках зменшення чутливості скоротливого апарату ГМК – це основний шлях розслаблення. Дещо більша релаксація та набагато швидша реакція при дії аутентичного NO, порівняно з НГ тієї самої концентрації у омиваючому препарат гіперкалієвому розчині Кребса, ймовірно пов'язана з тим, що дія НГ опосередкована через більш повільну його біотрансформацію.

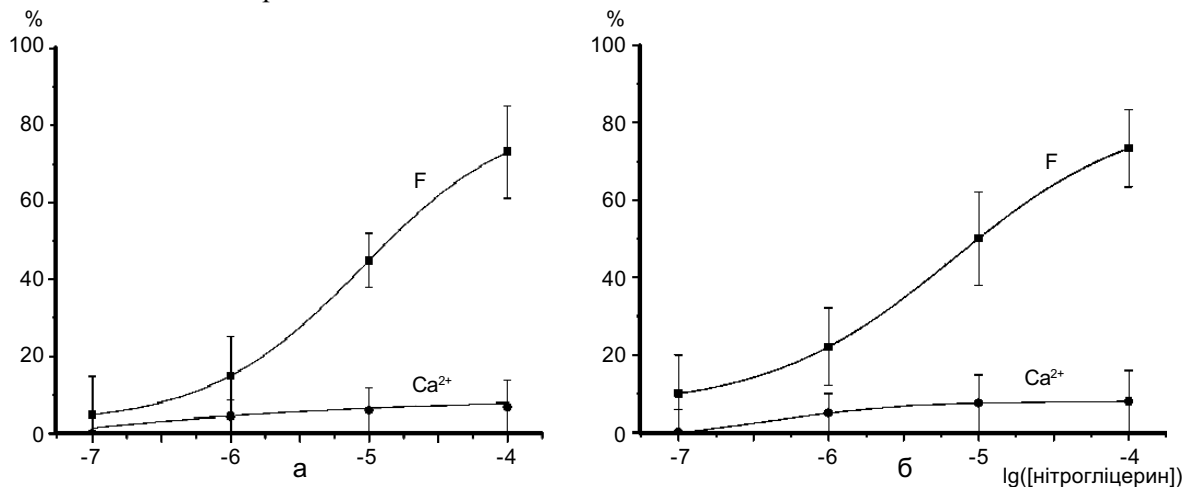


Рис. 2. Криві доза–ефект розслаблення та змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію $[Ca^{2+}]_i$ в аорти клітин гладеньких м'язів щурів від концентрації нітрогліцерину: а – контроль, б – 9-та доба після γ -опромінення у дозі 6 Гр. Розслаблення судин і зміни $[Ca^{2+}]_i$ відображені у відсотках від сталих значень сили скорочення та величини $R = I_{340nm} / I_{380nm}$ у момент додавання до розчину нітрогліцерину

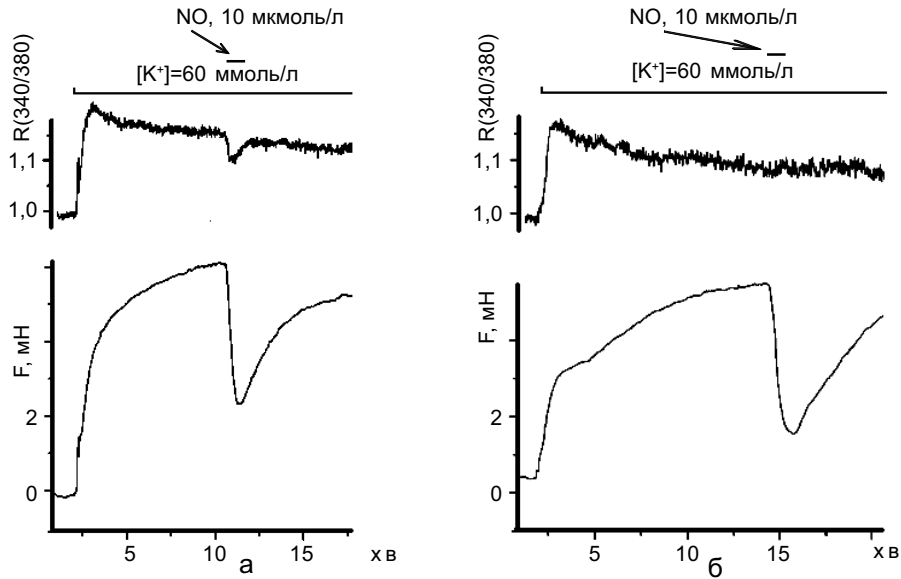


Рис. 3 Оригінальні записи одночасно зареєстрованих сили скорочення (F) і відносних змін внутрішньоклітинної концентрації $[Ca^{2+}]_i$ (R) при одноразовому додаванні у розчин робочої камери аутентичного NO: а – зі зміною кальцієвого сигналу, б – без зміни кальцієвого сигналу

Для того, щоб перевірити механізм дії НГ, ми інгібували активність рГЦ, безпосередньої мішені NO в ГМК, за допомогою ODQ – специфічного блокатора активної гем-субодиниці ферменту рГЦ [13]. На рис. 4 зображено оригінальні записи реакції ГМ деендотелізованих сегментів грудного відділу аорти щура, попередньо скорочених гіперкалієвим розчином Кребса, на НГ (10^{-6} моль/л) у контролі (рис. 4,а), та на 20-й

хвилині дії блокатора ODQ ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л) (рис. 4,б). Результати вимірів показали, що на фоні дії ODQ здатність до скорочення ГМ під впливом гіперкалієвого розчину Кребса залишається без суттєвих змін, у той час як дилататорні властивості НГ пригнічуються на $86,2 \% \pm 2,05 \%$ для контрольних і на $84,7 \% \pm 2,9 \%$ для опромінених щурів ($n=5$).

Слід зазначити, що отримані нами

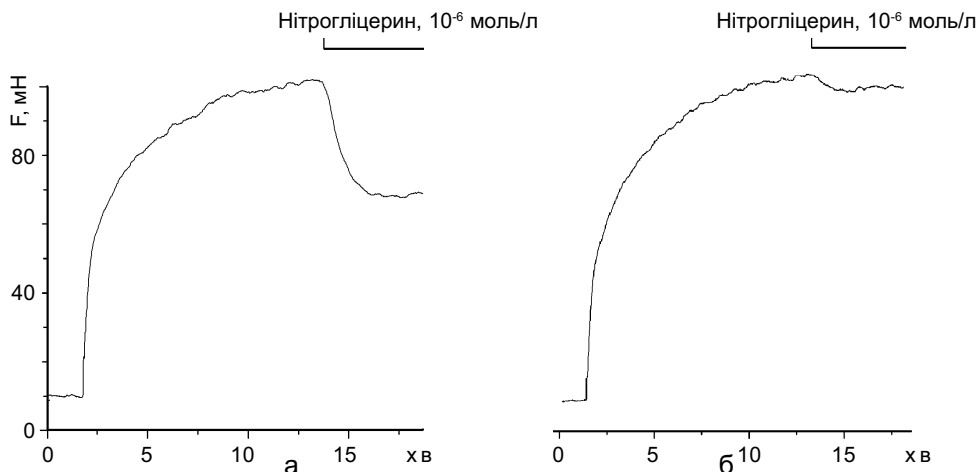


Рис. 4. Оригінальний запис дії нітрогліцерину на скорочення клітин гладеньких м'язів аорти, викликане гіперкалієвим розчином Кребса: а – контроль, б – на 20-й хвилині дії блокатора ODQ

результати відносно впливу γ -опромінення на вазодилаторні властивості НГ були досить неочікувані. Дійсно, відомо, що радіація впливає як на тонус аорти щурів [17], так і на внутрішньоклітинний вміст цГМФ ГМК судин щурів [20]. Виходячи з цього здавалося, що мають бути також зміни у дії НГ, оскільки активність саме рГЦ впливає на вміст цГМФ. Крім того, наші виміри показали, що початкові (базальні) значення $[Ca^{2+}]_i$ ($[Ca^{2+}]_{ibasal}$) у ГМК контрольних і опромінених щурів, які були визначені перед початком дії гіперкалієвого розчину Кребса, статистично достовірно відрізнялися. Значення $[Ca^{2+}]_{ibasal}$ під впливом радіаційного опромінення достовірно зменшилися на $28,4\% \pm 11,9\%$ відносно результатів контрольних щурів ($n=8$). Зареєстроване нами зменшення цього показника збігається з даними Zhong та співавт. [20], які встановили факт підвищення вмісту цГМФ ГМК після γ -опромінення. Проте наші результати свідчать, що на значення НГ-індукованої релаксації не впливає зменшення $[Ca^{2+}]_{ibasal}$ у ГМК, крім того, НГ-індукована активація рГЦ не призводить до зменшення $[Ca^{2+}]_i$. Тобто, в умовах експерименту НГ розслаблює ГМ повністю кальційнезалежним шляхом. Це не суперечить припущенню про ферментативну біотрансформацію НГ з утворенням NO, оскільки і при NO-індукованому розслабленні цей шлях є основним.

ВИСНОВКИ

1. Домінуючим внутрішньоклітинним шляхом НГ-індукованої релаксації ГМК є рГЦ-залежний шлях.

2. НГ, подібно до NO, розслаблює ГМ аорти щурів лише через зміни кальцієвої чутливості скоротливого апарату ГМК.

3. γ -Опромінення у дозі 6 Гр статистично достовірно не впливає на НГ-індуковану релаксацію ГМ аорти.

S.M.Zelenskyi, A.I.Solovyov

RADIATION DOES NOT AFFECT CALCIUM-DEPENDENT PATHWAY OF NITROGLYCERINE-EVOKED RELAXATION OF RAT AORTA

The effects of nitroglycerine (NG, 10^{-7} – 10^{-4} M) on contractile force and intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in deendotelized thoracic aorta smooth muscles (SM) precontracted with high K^+ in control and γ -irradiated rats (6Gy) were investigated. NG-induced activation of soluble guanylate cyclase (sGC) as dominating pathway of NG-induced SM relaxation without related decrease in $[Ca^{2+}]_i$ level is demonstrated. Radiation was without effect on this sGC-dependent and $[Ca^{2+}]_i$ – independent NG-induced relaxation of vascular smooth muscle but decreased the basal levels of $[Ca^{2+}]_i$ by $(28,4 \pm 11,9)\%$ (6Gy, 9th-day).

*Institute of Pharmacology and Toxicology Academy
Medical Sciences of Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Blatter L.A., Wier W.G. Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current // *Cell Calcium*. – 1994. – **15**, Feb. – P. 122–131.
- Clapp L., Garney A. Modulation of calcium movements by nitroprusside in isolated smooth muscle cells // *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* – 1991. – **418**, № 5. – P. 462–470.
- Collins P., Griffith T.M., Henderson A.H., Lewis M.J. Endothelium-derived relaxing factor alters calcium fluxes in rabbit aorta: a cyclic guanosine monophosphate-mediated effect // *J. Physiol.* – 1986. – **381**, Dec. – P. 427–437.
- Furukawa K.-I., Ohshima N., Yawada-Iwata Y., Shigekawa M. Cyclic cGMP stimulates Na^+/Ca^{2+} exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture // *J. Biol. Chem.* – 1991. – **266**, № 19. – P. 12377–123341.
- Gregory R.J. Thatcher, Adrian C. Nicolescu, Brian M. Bennett, Violeta Toader. Nitrates and NO release: contemporary aspects in biological and medicinal chemistry // *J. Free Radical. Biol. and Med.* – 2004. – **37**, № 8. – P. 1122–1143.
- Griffith T.M., Edwards D.H., Lewis M.J., Henderson A.H. Evidence that cyclic guanosine monophosphate (cGMP) mediates endothelium-dependent relaxation // *Eur. J. Pharmacol.* – 1985. – **112**, № 2. – P. 195–202.
- Gryniewicz G., Poenie G.M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260**, March. – P. 3440–3450.
- Himpens B., Matthijs G., Somlyo A.V. et al. Cytoplasmic free calcium, myosin light chain phosphorylation, and force in phasic and tonic smooth muscle // *J. Gen. Physiol.* – 1988. – **92**, Dec. – P. 713–729.
- Kleschyov A.L., Oelze M., Daiber A. et al. Does Nitric

- oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin?// *Circulat. Res.* – 2003. – **93**. – P.104–112.
10. Lehen'kyi V.V., Zelensky S.N., Stefanov A.V., Soloviev A.I. Effects of nitric oxide donors on vascular smooth muscles depend on a type of vascular smooth-muscle preactivation // *Cardiovascular. Toxicol.* – 2002. – **2**, № 2. – P. 151–160.
 11. Lincoln T., Komalavilas P., Cornwell T. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase // *Hypertension.* – 1994. – **23**. – P. 1141–1147.
 12. Menendez J.C., Casanova D., Amado J.A. et al. Effects of radiation on endothelial function // *Intern. J.Rad. Oncol., Biol., Phys.* – 1998. – **41**, № 4. – P. 905–913.
 13. Schrammel A., Behrends S., Schmidt K. et al. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase // *Mol. Pharmacol.* – 1996. – **50**, № 1. – P.1–5.
 14. Soloviev A., Lehen'kyi V., Zelensky S., Hellstrand P. Nitric oxide relaxes rat tail artery smooth muscle by cyclic GMP-independent decrease in calcium sensitivity of myofilaments // *Cell Calcium.* – 2004. – **36**, № 2. – P. 165–173.
 15. Soloviev A., Stefanov A., Tishkin S. et al. Saline containing phosphatidylcholine liposomes possess the ability to restore endothelial function damaged resulting from r-irradiation // *J. Physiol. and Pharmacol.* – 2002. – **53**. – P. 707–712.
 16. Soloviev A., Tishkin S., Parshikov A. et al. Mechanisms of endothelium dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilation // *Br. J. Pharmacol.* – 2003. – **138**. – 5. – P.837–844.
 17. Soloviev A., Tishkin S., Zelensky S. et al. Ionizing radiation alters myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: potential role of protein kinase // *Amer. J. Physiol.* – 2005. – **289**. – P.755–762.
 18. Somlyo A.P., Somlyo A.V. Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II:Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase // *Physiol. Rev.* – 2003. – **83**. – P.1325–1358.
 19. Tran Nguyen N. P., Spitzbarth E., Robert A. et al. Nitric oxide lowers the calcium sensitivity of tension in the rat tail artery// *J. Physiol.* – 1998. – **507**, № 1. – P. 163–174.
 20. Zhong G.Z., Chen F.R., Bu D.F. et al. Cobalt-60 gamma radiation increased the nitric oxide generation in cultured rat vascular smooth muscle cells// *Life Sci.* – 2004. – **74**, № 25. – P.3055–3063.

In-т фармакології та токсикології АМН України
E-mail: zelensky@ukrpost.ua

Матеріал надійшов до редакції 04.03.2008