

І.В. Іванова, О.В. Кислова, А.І. Соловйов

Ендотелійзалежний фактор гіперполяризації як резервний захисний механізм регуляції судинного тонусу при дії іонізуючого опромінення

Вивчали мембранні механізми, що лежать в основі змін скорочувальної активності судин, індукованих впливом γ -опромінення. Отримані результати свідчать, що останнє пригнічує ендотелійзалежне розслаблення ізольованих сегментів грудної аорти за рахунок значного зменшення NO-компонента, у той час як компонент ендотелійзалежного фактора гіперполяризації (ЕЗФ) залишається практично незмінним. Це підтверджувалося при визначенні вмісту метаболітів NO – нітритів: концентрація ацетилхолінстимульованого нітрит-аніона, що виділяється аортою опромінених щурів, була значно нижчою від контролю. Результати електрофізіологічних експериментів показали, що хоча опромінення значно пригнічувало сумарний вихідний струм у мембранах гладеньком'язових клітин аорти, однак цільність струму, що проходив через апамінчутливі калієві канали, при цьому не змінювалась, а через харибдотоксинчутливі – навіть істотно зростала. Таким чином, ЕЗФ стійкий до впливу γ -опромінення. Оскільки його активність зростала в умовах опромінення, можна припустити, що він відіграє ключову роль у резервному захисному механізмі, що вступає в дію при розвитку ендотеліальної дисфункції.

Ключові слова: ендотелійзалежний фактор гіперполяризації, оксид азоту, ендотелій, гладеньком'язові клітини, калієві канали, опромінення.

ВСТУП

Як відомо, ендотелій бере участь у регуляції судинного тонусу за допомогою секреції багатьох констрикторних та дилататорних речовин, які, в свою чергу, впливаючи на калієві канали мембран гладеньком'язових клітин (ГМК), здатні викликати скорочення або розслаблення кровоносних судин. Встановлено, що ендотелійзалежне розслаблення (ЕЗР) судин виникає за допомогою секреції/виділення низки вазодилататорних факторів [29]. Ендотелійзалежний фактор розслаблення (ЕЗФР), ідентифікований як NO, та простациклін, здатні відкривати калієві канали мембран ГМК, що призводить до виходу іонів калію, гіперполяризації, інактивації потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу та розслаблення судин [6, 26].

Було показано, що вагомий внесок у ЕЗР робить його третій, відмінний від NO та простацикліну, компонент, що позначається терміном “ендотеліальний гіперполяризувальний фактор” (ЕЗФГ), який вперше був уведений у 1988 р. [7]. Він характеризується здатністю викликати гіперполяризацію не тільки ГМК, але й ендотеліальних клітин (ЕК) [5, 13, 16, 19, 33]. Так, за наявності блокаторів NO-синтази та простацикліну ацетилхолін (АХ) викликав ЕЗР судин, яке супроводжувалось дозозалежною гіперполяризацією мембран ЕК і ГМК і підвищенням їхнього потенціалу спокою [11, 14]. Хімічна природа ЕЗФГ остаточно не встановлена, але дані багатьох досліджень свідчать, що, залежно від типу судин і виду тварин, функціональні його особливості притаманні багатьом та-

© І.В. Іванова, О.В. Кислова, А.І. Соловйов

ким сполукам, як метаболіти арахідонової кислоти ейпоксіейкозатрієнові та тригідроксіейкозатрієнові кислоти [4, 21], H_2O_2 [15, 24], натрійуретичні пептиди С-типу [24, 44], H_2S [16] та навіть K^+ [24]. Тобто, якщо терміном ЕЗФР позначається одиночна, чітко ідентифікована сполука (NO), то він включає в себе низку ендотеліальних факторів, механізм дії яких досліджується досить давно і продовжує бути предметом наукових дискусій.

Вважається, що ЕЗГФ-індукований механізм вазодилатації пов'язаний з активацією кальційзалежних калієвих каналів малої (SKCa) та середньої провідності (IKCa) у мембранах ЕК [19, 23, 26] і ГМК [6, 11, 21]. У відповідь на стимуляцію фізичними або нейрогуморальними чинниками у ЕК підвищується внутрішньоклітинна концентрація іонізованого кальцію, ендотелієм виділяється ЕЗГФ, що призводить до відкриття каналів SKCa та IKCa, витоку K^+ та гіперполяризації мембран ЕК [19]. Надалі ЕЗГФ може викликати гіперполяризацію ГМК через активацію каналів SKCa та IKCa у мембранах ГМК [6, 11, 21] або прямим її розповсюдженням від ЕК до ГМК через міоендотеліальні контакти [10, 14] чи відкриттям ендотеліальних IKCa-каналів, виходом K^+ з ЕК та акумуляції їх у просторі між ЕК і ГМК [16, 19, 23]. Ці механізми розвитку гіперполяризації мембран ГМК не обов'язково взаємовиключні, вони можуть проходити послідовно або одночасно, залежно від типу судин та умов експерименту, та залишаються предметом подальших наукових досліджень.

Встановлено, що сумісна дія селективного блокатора SKCa-каналів апаміну та неселективного блокатора IKCa харибдотоксину повністю блокує ЕЗФГ-гіперполяризацію мембран судинних міоцитів [20, 22, 45]. Були отримані фармакологічні підтвердження, що саме IKCa-канали беруть участь у процесах ендотеліязалежної гіперполяризації [11, 32]. Наприклад,

показано, що заміна харибдотоксину на блокатор калієвих каналів великої провідності іберіотоксин не призводила до повного пригнічення гіперполяризації мембран ЕК [17].

Відомо, що ендотелій є найбільш радіочутливою складовою судинної стінки, і саме порушення його функціонального стану значною мірою визначає зміни скорочувальних властивостей судин під дією іонізуючого опромінення [2]. Вплив γ -радіації здатний викликати пригнічення ЕЗР судин [31, 37], через втрату спроможності ендотелію контролювати судинний тонус, що призводитиме до розвитку артеріальної гіпертензії [36]. Опромінення може по-різному впливати на окремі компоненти ЕЗР судин і пов'язані з ними мембранні процеси [2, 37, 38], тому вивчення механізмів дії γ -радіації на судини є важливим для проведення направленої фармакологічної корекції судинних розладів. Відомо, що маркерами NO в організмі є нітрити (NO_2^-) та нітрати (NO_3^-), що утворюються в результаті його метаболічних перетворень [9, 39]. Показано, що серед стабільних метаболітів NO, який продукується стимульованим АХ ендотелієм, значно зростає питома вага саме нітрит-аніона [9], тому вимірювання його вмісту може відображати зміни концентрації ендотеліального NO. Оскільки, згідно з вищевказаним, гіперполяризація мембран судинних ГМК, що виникає внаслідок дії ЕЗГФ, пов'язана з каналами SKCa та IKCa, то вивчення їх активності при опроміненні може позначитися на функціонуванні ЕЗГФ. Тому метою нашого дослідження було вивчення мембранних механізмів розвитку ендотеліальної дисфункції судин, індукованих впливом іонізуючого опромінення.

МЕТОДИКА

У дослідженні було використано 20 самців-щурів лінії Вістар масою 170–220 г.

Тварин піддавали загальному одноразовому зовнішньому опроміненню в дозі 6 Гр при потужності 0,8-0,84 Гр/хв із використанням джерела "ТГТ Рокус-М", Росія (^{60}Co). Декапітацію їх здійснювали після попередньої анестезії фенобарбіталом натрію (50 мг/кг).

У щурів видаляли грудну аорту, очищали її від жирової та сполучної тканин. Сегменти аорти розміром 2–3 мм фіксували у проточній камері на сталевих гачках з навантаженням 10–20 мН і перфузували термостабілізованим (37°C) розчином Кребса. Реєстрацію скорочень здійснювали в ізометричному режимі за допомогою аналогово-цифрового перетворювача Lab-Trax 4/16 ("World Precision Instruments", США), з'єданого з персональним комп'ютером.

Скорочення ізольованих сегментів аорти викликали додаванням до перфузуючого розчину норадреналіну бітартату (НА, 10^{-6} моль/л). ЕЗР досліджуваних судин викликали кумулятивною аплікацією АХ (10^{-9} – 10^{-5} моль/л) і реєстрували на фоні скорочення, викликаного дією НА за наявності у розчині індометацину (10^{-5} моль/л).

Для визначення вмісту нітритів з аорти видаляли сегмент довжиною 1 см, вивертали його та для надання йому робочого навантаження натягували на спеціально виготовлену поліетиленову трубку діаметром 3 мм і довжиною 15 мм. Сегмент аорти витримували в такому положенні у розчині Кребса протягом 30 хв. Впродовж 2 год судини інкубували (37°C) у розчині Кребса (10^{-6} моль/л) і без нього. Вимірювали вміст нітритів за допомогою реактиву Гріса на фотометрі "Screen Master" (Італія) спектрофотометричним методом [1]. Потім за методом Бредфорд [3] визначали вміст загального білка в гомогенатах досліджуваних сегментів, отриманих з використанням гомогенізатора Потера.

Для проведення досліджень використовували модифікований розчин Кребса

наступного складу (ммоль/л): NaCl – 133,0, KCl – 4,7, NaHCO_3 – 16,3, NaH_2PO_4 – 1,38, CaCl_2 – 2,5, MgCl_2 – 1,05, глюкоза – 7,8 (рН 7,4). Усі названі реактиви були виробництва фірми "Sigma" (США). В експериментах також використовували наступні реагенти: N^w -нітро-L-аргінін метиловий ефір (L-NAME, $3 \cdot 10^{-4}$ моль/л, "Sigma", США), апамін і харибдотоксин (10^{-6} моль/л, "Peninsula Laboratories Europe LTD", Японія) та неселективний інгібітор калієвих каналів тетраетиламоній (ТЕА, 5 ммоль/л, "Sigma", США).

Трансмембранні іонні струми ГМК досліджували методом patch-clamp у конфігурації ціла клітина. Свіжоізольовані ГМК аорти отримували таким чином. Сегменти судин поміщали у розчин, що містив (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 6, MgCl_2 – 3, глюкози – 10, HEPES – 10, а також 1 мг/мл папаїну (11,55 од./мл), 1 мг/мл дитіотретіол, та 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну. Тканини інкубували у термостаті ($+37^{\circ}\text{C}$) протягом 20 хв, відмивали від папаїну у свіжому розчині та піпетували. Аліквоти отриманих ізольованих ГМК поміщали у розчин з нормальною концентрацією Ca^{2+} , що містив (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5,9, MgCl_2 – 1,2, CaCl_2 – 2,5, HEPES – 10, глюкози – 11,5 (рН 7,4). Фіксацію потенціалу та реєстрацію струмів здійснювали за допомогою підсилювача Axopatch 200B та аналого-цифрового перетворювача Digidata 1200B ("Axon Instruments", США). Результати аналізували за допомогою програми pCLAMP 9.0 та Origin 6.0. Електроди для вимірювання трансмембранного струму виготовляли із боросилікатних скляних капілярів. Електроди, що мали опір 2–5 МОм, заповнювали розчином такого складу (ммоль/л): KCl – 140, Na_2ATP – 1, MgCl_2 – 1, EGTA – 0,3, HEPES – 10 (рН 7,2).

Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Origin 6.0 зі знаход-

женням середнього арифметичного та стандартної помилки середнього значення ($M \pm m$). Порівняння вибірок проводили за критерієм t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження ендотелійзалежних реакцій судин. Для визначення механізмів розвитку ендотеліальної дисфункції судин застосовувався метод фармакологічного розділення основних компонентів ЕЗР за допомогою селективних блокаторів. Дія простацикліну блокувалася індометацином, NO-залежного компонента – L-NAME, а ефекти ЕЗГФ усувалися при сукупній дії двох специфічних блокаторів кальційзалежних калієвих каналів апаміну та харибдотоксину. Оскільки у наших попередніх дослідженнях було виявлено, що внесок простацикліну в загальне ЕЗР аорти щурів на дію АХ незначний, цей компонент протягом усіх

експериментів блокувався індометацином. Було встановлено, що сегменти аорти щурів контрольної групи відповідали дозозалежним розслабленням на дію АХ у концентраціях 10^{-9} – 10^{-5} моль/л. Максимальна амплітуда цього розслаблення становила $92,3 \% \pm 2,1\%$ ($n=12$, рис.1). На 30-ту добу пострадіаційного періоду спостерігалось різке зменшення АХ-індукованого розслаблення: до $42,8 \% \pm 2,9 \%$ ($n=8$, $P < 0,001$; рис. 2) відносно контролю. Аналіз результатів дослідження показав, що іонізуюче опромінення знижує також і чутливість ефекторних елементів судин до дії АХ: значення $\log EC_{50}$ становило $-6,1 \pm 0,02$, що вірогідно відрізнялося від контролю: $-7,8 \pm 0,20$ ($n = 8$, $P < 0,01$). Отримані результати свідчать про те, що γ -опромінення здатне суттєво пригнічувати ЕЗР аорти щурів на всьому діапазоні концентрацій АХ.

Додавання до розчину Кребса L-NAME значно зменшувало ЕЗР реакцій судин

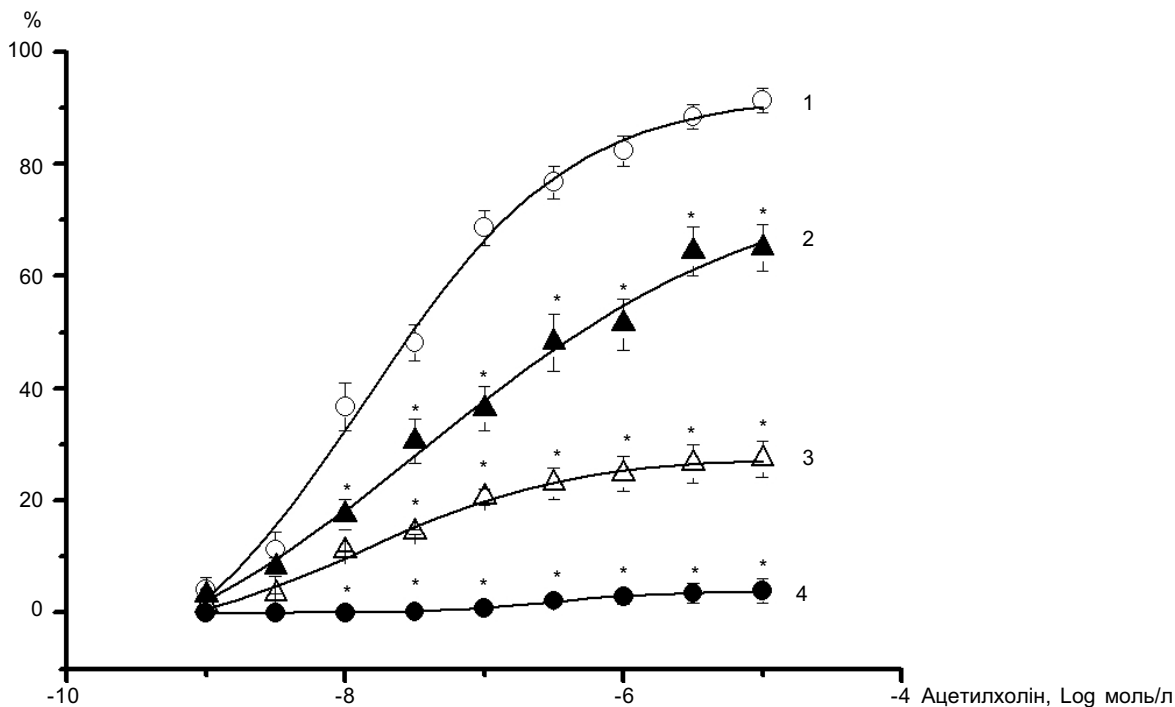


Рис 1. Ацетилхолініндуковане ендотелійзалежне розслаблення судинних сегментів аорти щурів контрольної групи: 1 – вихідний стан, 2 – за наявності апаміну та харибдотоксину, 3 – метилового ефіру N^w-нітро-L-аргініну, 4 – метилового ефіру N^w-нітро-L-аргініну, апаміну, харибдотоксину та тетраетиламонію. * $P < 0,05$

контрольної групи щурів: до $27,4\% \pm 3,3\%$ ($n=10$, $P<0,001$), у той час як сумісна дія апаміну і харибдотоксину знижувала амплітуду ЕЗР лише до $65,0\% \pm 4,1\%$ ($n=10$, $P<0,001$; рис.1). Блокування NO-синтази не впливало на амплітуду ЕЗР аорти опроміненних щурів: значення максимальної дилатації при цьому вірогідно не змінювалося: з $42,8 \pm 3,0$ до $39,6\% \pm 2,3\%$ ($n=8$, $P>0,05$; див. рис.2). Дія апаміну і харибдотоксину, навпаки, спричиняла значне зменшення амплітуди ЕЗР: до $16,0\% \pm 4,7\%$ ($n=8$, $P<0,05$). Для усунення залишкової амплітуди ЕЗР судин у розчин Кребса разом з апаміном і харибдотоксином і L-NAME додавався неселективний блокатор калієвих каналів ТЕА, після чого реакція розслаблення практично зникла: $2,3\% \pm 0,3\%$ ($n=8$, $P<0,001$). Таким чином, результати експериментів свідчать, що опромінення здатне пригнічувати ЕЗР за рахунок значного зменшення його NO-компонента, у той час як ЕЗГФ-компонент цього роз-

слаблення залишається практично незмінним (див. рис. 1, 2).

Вимірювання вмісту нітритів, утворених ендотелієм аорти. Таким чином оцінювалася кількість продукування ендотелієм NO. Результати показали, що опромінення суттєво не впливало на базальний вміст нітрит-аніона, що виділяли сегменти аорти (рис. 3). АХ-стимульований вміст нітрит-аніона, утвореного ендотелієм аорти щурів контрольної групи, становив $27,0$ нмоль/мг $\pm 2,7$ нмоль/мг і був вірогідно вищий від базального ($15,7$ нмоль/мг $\pm 1,1$ нмоль/мг, $n=6$, $P<0,001$). Концентрація АХ-стимульованого нітрит-аніона, утворена аортою опроміненних щурів, була значно нижчою, ніж у контролі та становила $14,9$ нмоль/мг $\pm 1,7$ нмоль/мг ($n=6$, $P<0,001$). При цьому АХ-стимульований вміст нітрит-аніона достовірно не відрізнявся від базального (див. рис.3). Отже, згідно з отриманими результатами, можна припустити, що радіаційний вплив практично повністю блокує здатність

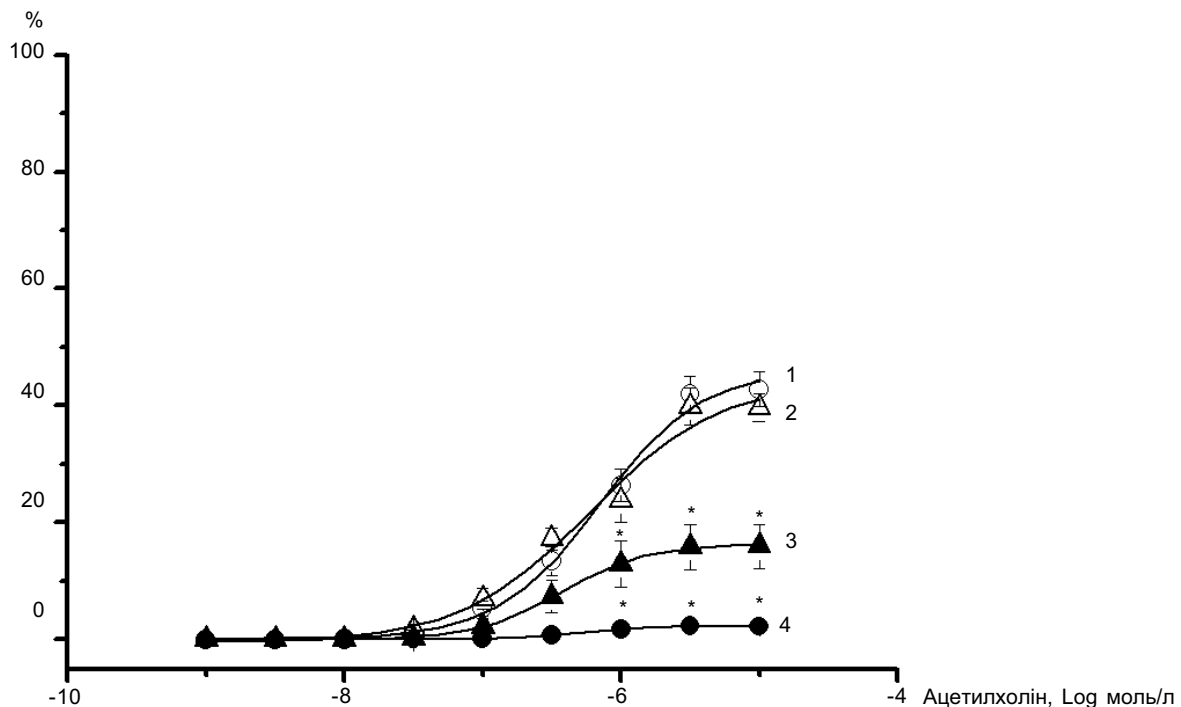


Рис 2. Ацетилхолініндуковані реакції судинних сегментів аорти щурів, досліджуваних на 30-ту добу після опромінення (1) та впливу метилового ефіру N^o-нітро-L-аргініну (2), апаміну та харибдотоксину (3), метилового ефіру N^o-нітро-L-аргініну, апаміну, харибдотоксину та тетраетиламонію (4). *P<0,05

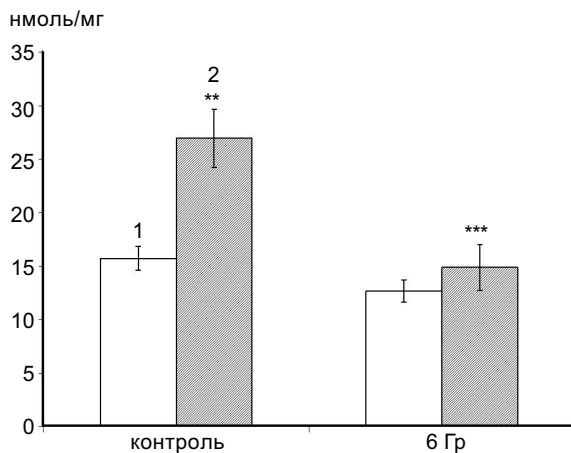


Рис 3 Базальна (1) та стимульована (2) ацетилхоліном концентрація нітрит-аніона (n=6), утвореного з оксиду азоту, що виділявся ендотелієм сегментів аорти (через 2 год інкубації).

**P < 0,01 порівняно з базальною концентрацією;
***P < 0,001 порівняно зі стимульованою концентрацією

ендотелію аорти виділяти оксид азоту на дію АХ.

Електрофізіологічні дослідження. Сумарний вихідний струм було зафіксовано у відповідь на ступінчасту деполяризацію плазматичної мембрани ГМК від -100 до +70 мВ через кожні 3 с за підтримуваного потенціалу -60 мВ. Отримані результати показали, що γ -опромінення значно пригнічує сумарний вихідний струм: при максимальному рівні деполяризації мембрани +70 мВ щільність струму у опроміненних тварин становила $24,4 \text{ пА/пФ} \pm 2,6 \text{ пА/пФ}$, що було значно нижче порівняно з контролем ($63,3 \text{ пА/пФ} \pm 3,9 \text{ пА/пФ}$, n=8, P<0,001; рис. 4, 5). В обох групах тварин проводилась оцінка внеску в сумарний вихідний струм каналів SKCa і IKCa. Дія апаміну, селективного блокатора SKCa-каналів, достовірно знижувала сумарний вихідний струм як у контролі (з $63,3 \pm 3,9$ до $37,9 \text{ пА/пФ} \pm 5,4 \text{ пА/пФ}$, n=8, P<0,01; рис.4), так і за умов опромінення

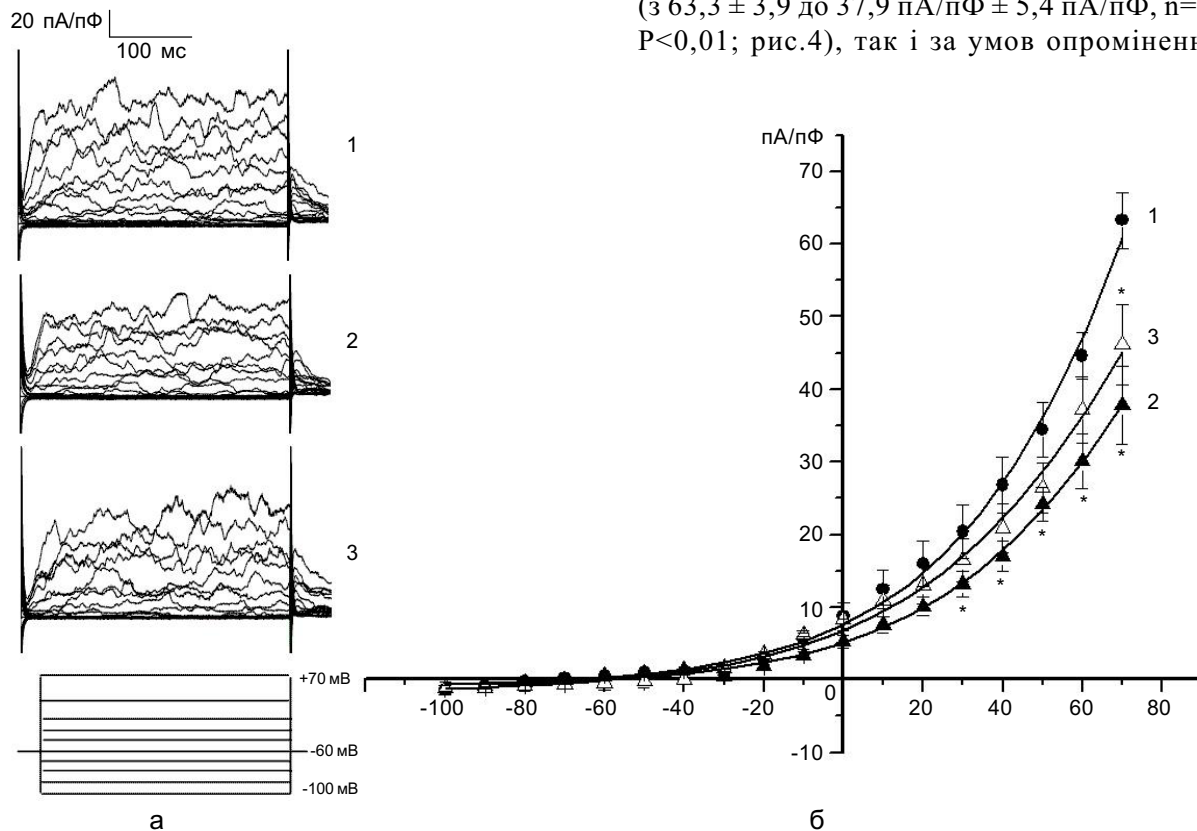


Рис 4. Сумарний вихідний калієвий струм мембрани гладеньком'язових клітинах аорти контрольних щурів (а): 1 – вихідний стан, 2 – вплив апаміну, 3 – харибдотоксину, а також вольт-амперна характеристика вихідного струму (б). * P<0,05 порівняно з контрольними значеннями

(з $24,4 \pm 2,6$ до $11,5 \text{ пА/пФ} \pm 1,6 \text{ пА/пФ}$, $n=8$, $P<0,001$; див. рис. 5). Харибдотоксин, неселективний інгібітор ІКСа-каналів, майже не змінював сумарний вихідний струм у контролі (див. рис 4), водночас при опроміненні пригнічував амплітуду вихідного струму так само, як апамін: до $12,3 \text{ пА/пФ} \pm 1,3 \text{ пА/пФ}$ ($n=8$, $P<0,001$) при рівні мембранного потенціалу $+70 \text{ мВ}$ (див. рис. 5). Таким чином, результати показали, що хоча опромінення значно пригнічувало сумарний вихідний струм мембрани ГМК, але щільність струму, який проходив через апамінчутливі калієві канали, при цьому не змінювалась, а через харибдотоксинчутливі – навіть суттєво підвищувалася (рис. 6).

Вищенаведені результати свідчать, що внаслідок дії іонізуючого опромінення значно зменшується NO-залежний компонент інтегрального розслаблення [38]. Це підтверджують і результати досліджень з визначення вмісту нітрит-аніона, який

виділяється ендотелієм аорти. Зменшення NO-компонента ЕЗР може бути пов'язано з пригніченням ендотеліальної активності NO-синтази, а також вільнорадикальною інактивацією NO при дії γ -опромінення [31]. Нами нещодавно було показано, що внаслідок іонізуючої радіації майже повністю пригнічується активність кальційзалежних калієвих каналів великої провідності не тільки мембрани ГМК [35], а і ендотеліоцитів [42]. Оскільки ці канали беруть участь у формуванні рушійної сили для входу Ca^{2+} та кальційзалежної ендотеліальної активації NO-синтази, це також може призводити до зниження синтезу NO, що і проявляється в зменшенні ЕЗР.

Вважається, що внесок ЕЗГФ у ЕЗР збільшується зі зменшенням діаметра судин, тобто найбільшим він буде у резистивних судин, від яких залежить рівень системного кров'яного тиску [34, 43]. Отже значний внесок ЕЗГФ-компонента в ЕЗР саме цих судин доводить його важливу роль у процесах контролю судинного тонуусу. Навпаки, внесок NO-компонента в ЕЗР підвищується

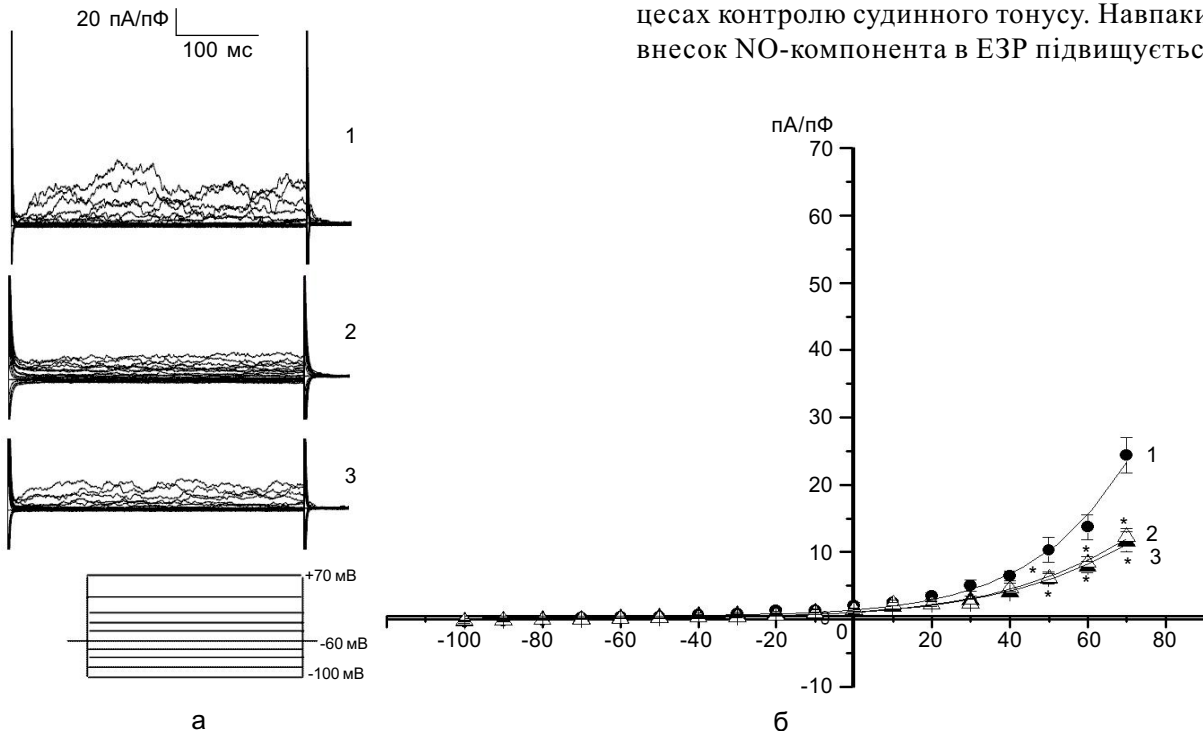


Рис 5. Сумарний вихідний калієвий струм мембрани гладеньком'язових клітинах аорти опромінених щурів (а) та вольт-амперна характеристика вихідного струму (б): 1 – 30-та доба після опромінення, 2 – вплив апаміну, 3 – вплив харибдотоксину. * $P<0,05$ порівняно зі значеннями, зареєстрованими на 30-ту добу після опромінення

зі збільшенням діаметра судин [34, 43], тобто в аорті здорових щурів переважає NO-залежна релаксація, а дія ЕЗГФ мінімальна, що і показали наші результати. У судинах опромінених тварин синтез та/або виділення NO зменшувався, що супроводжувалося збільшенням ЕЗГФ-компонента, дією якого значною мірою визначалася величина ЕЗР. Таким чином, наші результати дають змогу припустити, що за ендотеліальної дисфункції ЕЗГФ здатний збільшувати свою функціональну активність, у той час як ефект NO значно знижується. Ця компенсаторна функція ЕЗГФ при розвитку серцево-судинної патології була показана як на деяких експериментальних моделях [6, 17], так і при лікуванні людей. Так, наприклад, активність ЕЗГФ зростала у пацієнтів з есенціальною гіпертензією за умов пониженого ендотеліалозалежного NO виділення [40].

Результати показали, що апамінчутливий компонент струму мембрани ГМК, виявляв стійкість до γ -опромінення, а майже не пред-

ставлені в контрольних ГМК харибдотоксинчутливі канали при цьому значно активувалися (див. рис. 6). Існують дані, що експресія ІКСа-каналів значно посилюється при проліферації ГМК [27, 28], яка спостерігається при серцево-судинних захворюваннях [8, 41]. Можна припустити, що за умов опромінення внесок ЕЗГФ зростає внаслідок збільшення експресії ІКСа-каналів при проліферації ГМК, яка може відбуватися за розвитку дисфункції судин під впливом опромінення. Згідно з цим, коли чутливий до радіації NO [31, 37] не здатний підтримувати вазодилатацію, може вступати в дію захисний механізм, який частково проявляється в активації пов'язаних з ЕЗГФ ІКСа-каналів ГМК, що посилює гіперполяризацію мембран ГМК та, відповідно, вазодилатацію судин. При цьому слід враховувати, що ендотеліальні ІКСа-канали також можуть сприяти збільшенню ЕЗГФ-компонента. Оскільки відомо, що їх активність підвищується при вазо-

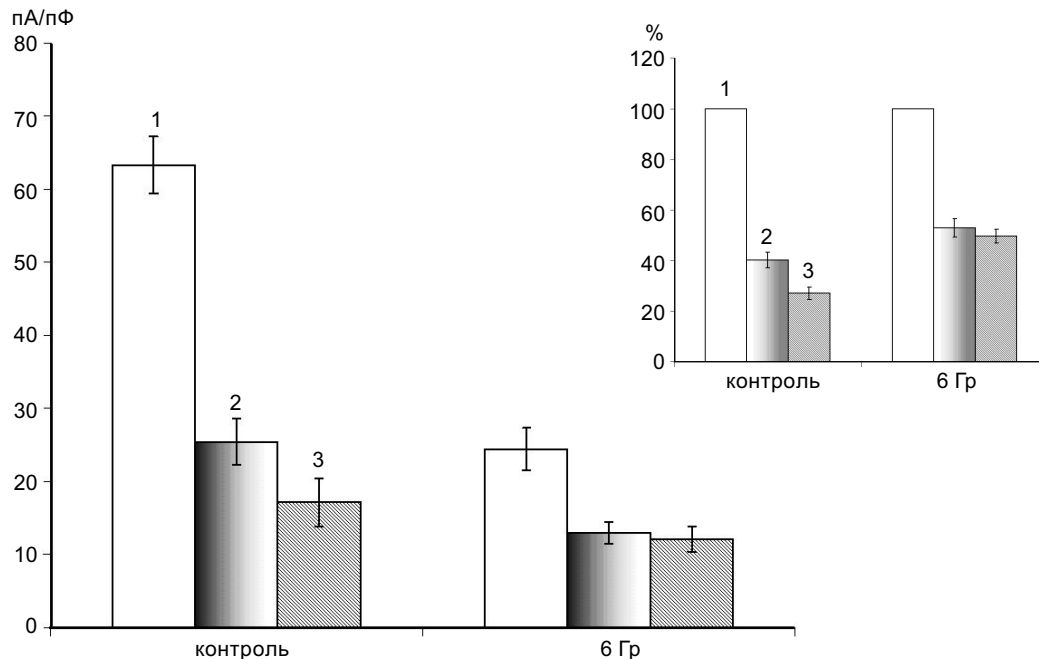


Рис. 6. Апамін- і харибдотоксинчутливі компоненти загального вихідного калієвого струму, зареєстрованого у гладеньком'язових глітинах аорти контрольних та щурів, досліджуваних на 30-ту добу після опромінення при рівні мембранного потенціалу +70 мВ: 1 – сумарний вихідний струм, 2 – апамінчутливий компонент калієвого струму, 3 – харибдотоксинчутливий компонент калієвого струму. На вставці показано відносний внесок кожного з компонентів у загальний струм, що був прийнятий до 100 % як в контролі, так і за умов опромінення

констрикції [11, 12], вона може зростати і при судинній патології, викликаній дією іонізуючого опромінення.

Результати дослідження показали, що хоча L-NAME майже не впливав на амплітуду ЕЗР судин опромінених тварин, після сумісної дії апаміну і харибдотоксину рееструвалася залишкова амплітуда ЕЗР, яка повністю усувалася тільки за додаткового впливу ТЕА. Тому можна припустити, що в процес розвитку гіперполяризації мембрани ГМК, можливо, залучаються також інші типи калієвих каналів. Так, наприклад, існують дані, що калієві канали вхідного випрямлення та Na^+ , K^+ -помпа можуть брати участь у ЕЗГФ-реакціях, активуючись у відповідь на незначне підвищення концентрації K^+ в міжклітинному просторі, викликати гіперполяризацію мембрани ГМК і вазодилатацію [18].

Отже, ЕЗГФ стійкий до іонізуючої радіації [37] і його активність зростає за патологічних умов [30]. Більше того, показано, що ендотелій аорти морських свинок, де не виражений ЕЗГФ-компонент, ЕЗР під впливом опромінення пригнічується практично повністю [25]. Тому не виключено, що саме ЕЗГФ може відігравати ключову роль у резервному захисному механізмі, який вступає в дію при розвитку ендотеліальної дисфункції, викликаній γ -опроміненням. Враховуючи це, подальші дослідження, направлені на вивчення механізму дії ЕЗГФ є надзвичайно перспективним напрямком для пошуку нових підходів до фармакологічної корекції порушень ендотеліальної функції судин.

И.В. Иванова, О.В. Кислова, А.И. Соловйов

ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМЫЙ ФАКТОР ГИПЕРПОЛЯРИЗАЦИИ КАК РЕЗЕРВНЫЙ ЗАЩИТНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ СОСУДИСНОГО ТОНУСА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ

Изучали мембранные механизмы, лежащие в основе изменений сократительной активности сосудов, инду-

цированных воздействием облучения. Полученные результаты свидетельствуют, что γ -радиация подавляет эндотелийзависимое расслабление изолированных сегментов грудной аорты за счет значительного уменьшения его NO-компоненты, в то время как компонента эндотелийзависимого фактора гиперполяризации (ЭЗГФ) остается практически неизменной. Это подтверждается при определении содержания метаболитов NO – нитритов: концентрация ацетилхолинстимулированного нитрита-аниона была значительно ниже контроля. Результаты электрофизиологических экспериментов показали, что хотя облучение существенно уменьшало суммарный выходящий ток в мембранах гладкомышечных клеток аорты, однако плотность тока, который проходил через апаминчувствительные калиевые каналы, при этом не изменялась, а через харибдотоксинчувствительные – даже возрастала. Таким образом, ЭЗГФ устойчивый к воздействию γ -радиации. Поскольку его активность повышалась в условиях облучения, можно предположить, что он играет ключевую роль в резервном защитном механизме, который вступает в действие при развитии эндотелиальной дисфункции.

Ключевые слова: эндотелийзависимый фактор гиперполяризации, оксид азота, эндотелий, гладкомышечные клетки, калиевые каналы, облучение.

I.V. Ivanova, O.V. Kislova, A.I. Soloviev

THE ENDOTHELIUM – DERIVED HYPERPOLARIZING FACTOR: A RESERVE DEFENCE MECHANISM OF VASODILATATION UNDER RADIATION IMPACT

The goal of this study was to determine the cellular mechanisms of vascular endothelial dysfunction in rats irradiated with γ -rays. Acetylcholine (Ach)-induced relaxation of rat thoracic aorta rings was measured as a test of endothelial integrity and function. The data obtained allow suggest that endothelial function is impaired in aorta from g-irradiated rats mainly due to the loss of EDRF/NO-dependent, but not EDHF-dependent relaxation. It has been shown that γ -irradiation reduced the Ach-induced NO-release measured as nitrite anion content. Experiments on isolated rat aortic smooth muscle cells using whole-cell patch clamp technique demonstrated that irradiation led to a significant decrease in outward potassium currents. However, γ -ray irradiation was without effect on K^+ -current carried through apamine-sensitive channels while the current through charybdotoxin-sensitive channels was increased as compared to cells from control animals. The data suggest that EDHF is resistant to ionized radiation and may constitute a crucial reserve mechanism for maintenance of blood flow under radiation. Therefore, it is likely that the subsequent studies related to EDHF identification will be important for new drugs development and targeted pharmacological intervention at endothelium dysfunction in case of radiation impact.

Key words: endothelium-derived hyperpolarizing factor, ni-

tric oxide, endothelium, potassium channels, smooth muscle cells, irradiation

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коцюрuba A.B., Семикопна Т.В., Вікторов О.П. Спосіб кількісного визначення нітрит-аніона в біологічній рідині // Пат. України UA 31600 A, G 01 N 33/52. – Бюл. № 7–11 від 15.12.2000 р.
2. Beckman J.A., Thakore A., Kalinowski B.H., Harris J.R., Creager M.A. Radiation therapy impairs endothelium-dependent vasodilation in humans // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2001. – **37**, №3. – P. 761–765.
3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteing-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
4. Campbell W.B., Falck J.R. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors // *Hypertension.* – 2007. – **49**. – P.590–596.
5. Chataigneau T., Fleming I., Busse R. EDHF-mediated responses induced by bradykinin in the porcine coronary artery // *EDHF* – 2000. – P. 187–194.
6. Chawengsub Y., Gauthier K., Campbell W.B. Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in the regulation of vascular tone // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2009. – **297**, №2. – P. 495–507.
7. Chen G., Suzuki H., Weston A.H. Acetylcholine released endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels // *Brit. J. Pharmacol.* – 1988. – **95**. – P. 1165–1174.
8. Cheong A., Bingham A.J, Li J., Kumar B., Sukumar P., Munsch C., Buckley N.J., Neylon C.B., Porter K.E., Beech D.J, Wood I.C. Downregulated REST transcription factor is a switch enabling critical potassium channel expression and cell proliferation // *Mol. Cell.* – 2005. – **20**. – P. 45–52.
9. Cohen R.A., Plane F., Najibi S., Huk I., Malinski T, Garland C.J. Nitric oxide is the mediator of both endothelium dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P. 4193–4198.
10. Coleman H.A, Tare M., Parkington H. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2004. – **31**, №9. – P.641–649.
11. Crane G.J, Gallagher N., Dora K.A, Garland C.J. Small and intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery // *J. Physiol.* – 2003. – **553**. – P.183–189.
12. Crane G.J, Garland C.J. Thromboxane receptor stimulation associated with loss of SKCa activity and reduced EDHF responses in the rat isolated mesenteric artery // *Brit. J. Pharmacol.* – 2004. – **142**. – P. 43–50.
13. Dora K.A, Gallagher N.T, McNeish A., Garland C.J. Modulation of endothelial cell KCa3.1 channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries // *Circ. Res.* – 2008. – **102**, № 10. – P.1148–50.
14. Dora K.A. Coordination of vasomotor responses by the endothelium // *Circ. J.* – 2010. – **74**, №2. – P. 226–232.
15. Ellis A., Triggle C.R. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2003. – **81**. – P. 1013–1028.
16. Fällittou M., Vanhoutte P.M. EDHF: an update // *Clin. Sci. (Lond.)*. – 2009. – **117**, №4. – P.139–155.
17. Feletou M., Vanhoutte P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – **26**. – P.1215–1225.
18. Feletou M., Vanhoutte P. EDHF: The Complete Story. – USA: Taylor&Francis. – 2006. – 312 P.
19. Feletou M., Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization: past beliefs and present facts // *Ann. Med.* – 2007. – **39**. – P. 495–516.
20. Garland C.J, Hiley C.R, Dora K.A. EDHF: spreading the influence of the endothelium // *Brit. J. Pharmacol.* – 2010. – Dec 6.
21. Gauthier K., Chawengsub Y., Goldman D., Conrow R.E., Anjaiah S., Falck J., Campbell W.B. 11(R), 12(S), 15(S)-trihydroxyeicosa-5(Z), 8(Z), 13(E)-trienoic acid: an endothelium-derived 15-lipoxygenase metabolite that relaxes rabbit aorta // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2008. – **294**. – P. 1467–1472.
22. Gluais P., Edwards G., Weston A., Falck J.R., Vanhoutte P.M., Fällittou M. Role of SK_{Ca} and IK_{Ca} in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery // *Brit. J. Pharmacol.* – 2005. – **144**, №4. – №P. 477–485.
23. Grgic I.; Kaistha B.P., Hoyer J., Kuhler R. Endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses – relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery // *Ibid.* – 2009. – **157**, 4. – P. 509–526.
24. Griffith T.M. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? // *Ibid.* – 2004. – **141**, №6. – P. 881–903.
25. Ivanova I.V., Tishkin S.M., Kislova O.V. Kizub I.V., Soloviev A.I. The EDHF component of the endothelium-dependent relaxation constitutes a reserve mechanism of vasodilatation under radiation impact // In: 5-th International EDHF Symposium – Endothelium, Vasoactive Factors and Inflammation. – 2008. – Tampere, Finland. – 30 P.
26. Jackson W.F. Potassium Channels in the Peripheral Microcirculation // *Microcirculation.* – 2005. – **12**, №1. – P. 113–127.
27. Kuhler R, Wulff H., Eichler I., Kneifel M., Neumann

- D., Knorr A., Grgic I., Kdmpfe D., Si H., Wibawa J., Real R., Borner K., Brakemeier S., Orzechowski H.D., Reusch H.P., Paul M., Chandy K.G., Hoyer J. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis // *Circulation*. – 2003. – **108**. – P. 1119–1125.
28. Neylon C.B., Lang R.J., Fu Y., Bobik A., Reinhart P.H. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} -channel in vascular smooth muscle: relationship between $K(Ca)$ channel diversity and smooth muscle cell function // *Circ. Res.* – 1999. – **85**. – P. 33–43.
29. Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium // *Physiol. Rev.* – 2001. – **81**. – P. 1415–1459.
30. Park Y., Capobianco S., Gao X., Falck J.R., Dellsperger K.C., Zhang C. Role of EDHF in type 2 diabetes-induced endothelial dysfunction // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2008. – **295**. – P. 1982–1988.
31. Qi F.Z., Sugihara T., Hattori Y., Kanno M., Abe K. Functional and morphological damage of endothelium in rabbit ear artery following irradiation with cobalt 60 // *Brit. J. Pharmacol.* – 1998. – **123**, №4. – P. 653–660.
32. Sandow S.L., Neylon C.B., Chen M.X., Garland C.J. Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K^{+}) and connexins: possible relationship to vasodilator function? // *J. Anat.* – 2006. – **209**. – P.689–698.
33. Selemidis S., Cocks T. Myoendothelial and circumferential spread of endothelium-dependent hyperpolarization in coronary arteries // *EDHF*. – 2000. – P. 75–86.
34. Shimokawa H., Yasutake H., Fujii K., Owada M.K., Nakaike R., Fukumoto Y., Takayanagi T., Nagao T., Egashira K., Fujishima M., Takeshita A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1996. – **28**. – P. 703–711.
35. Soloviev A.I., Tishkin S.M., Ivanova I.V., Zelensky S.N., Dosenko V.E., Kyrychenko S.V., Moreland R.S. Function and mRNA expression of large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} -channels in rat aorta smooth muscle cells under ionized irradiation // *Life Sci.* – 2009. – **84**. – P. 164–171.
36. Soloviev A.I., Tishkin S.M., Zelensky S.N., Ivanova I.V., Kizub I.V., Pavlova A.A., Moreland R.S. Ionizing radiation alters myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: Potential role of protein kinase C // *Amer. J. Physiol. Reg. Integr. Compar. Physiol.* – 2005. – **289**. – P. 755–762.
37. Soloviev A., Tishkin S., Parshikov A. Mosse I., Stefanov A., Gurney A., Osipenko O. The EDHF-dependent but not the NO-dependent component of the acetylcholine-induced relaxation of the rabbit aorta resistant to ionized radiation // *Endothelium-dependent Hyperpolarizations*. – EDHF–2000. – P. 400–410.
38. Sugihara T., Hattori Y., Yamamoto Y., Qi F., Ichikawa R., Sato A., Liu M., Abe K., Kanno M. Preferential impairment of nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in human cervical arteries after irradiation // *Circulation*. – 1999. – **100**, №6. – P. 635–641.
39. Sun J., Zhang X., Broderick M., Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay // *Sensors*. – 2003. – **3**. – P. 276–284.
40. Taddei S., Versari D., Cipriano A., Ghiadoni L., Galetta F., Franzoni F., Magagna A., Virdis A., Salvetti A. Identification of a cytochrome P450 2C9-derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential hypertensive patients // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2006. – **48**. – P. 508–515.
41. Tharp D.L., Wamhoff B.R., Wulff H., Raman G., Cheong A., Bowles D.K. Local delivery of the $KCa3.1$ blocker, TRAM-34, prevents acute angioplasty-induced coronary smooth muscle phenotypic modulation and limits stenosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – **28**. – P. 1084–1089.
42. Tishkin S.M., Rekalov V.V., Ivanova I.V., Moreland R.M., Soloviev A.I. Ionized non-fatal whole-body irradiation inhibits Ca^{2+} -dependent K^{+} -channels in endothelial cells of rat coronary artery: possible contribution to depression of endothelium-dependent vascular relaxation // *J. Radiat. Biol.* – 2007. – **83**, №3. – P. 161–169.
43. Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries // *J. Clin. Invest.* – 1997. – **100**. – P. 2793–2799.
44. Wei C.M., Hu S., Miller V.M., Burnett J.C. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – **205**. – P.765–771.
45. Zygmunt P.M.; Edwards G.; Weston A.H. Larsson B., Hugstedt E.D. Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery // *Brit. J. Pharmacol.* – 1997. – **121**, №1. – P. 141–149.