

На правах рукописи

Носарев Алексей Валерьевич

**РЕГУЛЯЦИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛАДКИХ
МЫШЦ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ И ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ**

03.00.13 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

ТОМСК – 2006

РАБОТА ВЫПОЛНЕНА
В ГОУ ВПО СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И
СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ

Научный консультант:

доктор медицинских наук,
профессор

Капилевич Леонид Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Байков Александр Николаевич

доктор медицинских наук, профессор

Киселев Владимир Дмитриевич

доктор медицинских наук, профессор

Яхонтов Сергей Владиславович

Ведущая организация:

ГУ НИИ физиологии СО РАМН (г. Новосибирск).

Защита состоится " ____ " _____ 2006 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава (634050, г. Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск, проспект Ленина, 107).

Автореферат разослан " ____ " _____ 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Суханова Г.А.

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

В общей структуре заболеваемости населения развитых стран одно из ведущих мест принадлежит патологическим состояниям, связанным с нарушением сократительной функции гладких мышц. В настоящее время серьёзной проблемой клинической пульмонологии остаются заболевания, связанные с нарушением тонуса гладких мышц воздухоносных путей и сосудов лёгких. Несмотря на существенный прогресс в изучении механизмов регуляции электрических и сократительных свойств гладкомышечных клеток, до настоящего времени нет единого мнения о механизмах локальной и дистантной регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток воздухоносных путей и сосудов легких, в том числе участие в регуляции эпителия, эндотелия и клеток микроокружения.

В основе регуляции сократительной активности гладких мышц сосудов и воздухоносных путей лежит определенная последовательность синтеза, продукции и реализации комплекса ряда биологически активных веществ эндотелием и эпителием соответствующих отделов [Капилевич Л.В. и др., 2001; Лебедько О.А. и др., 2002; Невзорова В.А. и др., 1998; Пальцев М.А., и др., 2003; Artinian L. Et al, 2001; Braer, C. Et al, 1994; Necker, M. 2000; Vanhoutte, P. 1998]. Сбой в любой из составляющих этого регуляторного каскада может приводить к разобщению параметров гемодинамики и вентиляции легких, к нарушению вентиляционно-перфузионных отношений, сопровождая, а не исключено, и инициируя, течение заболеваний легких и сердечно-сосудистой системы [Капилевич Л.В. и др., 2001; Лебедько О.А. и др., 2002; Уэйр, Е. К. 1995; Чучалин А. Г. 2002].

Одним из важнейших механизмов локальной, то есть короткодистантной, регуляции является эндотелий и эпителий – зависимый контроль механического напряжения гладких мышц сосудов и воздухоносных путей. Сосудистый эндотелий и эпителий воздухоносных путей модулируют сократительные ответы гладких мышц при воздействии многих биологически активных веществ и могут выделять как констрикторные, так и расслабляющие факторы [Лебедько О.А. и др., 2002; Невзорова В.А. и др. 1998; Уэйр, Е. К. 1995; Kuchan M., Frangos J. 1994].

Хотя в настоящее время существует достаточное количество сведений о заметных различиях миотропных реакций кровеносных сосудов малого и большого круга кровообращения в ответ на воздействие биологически активных веществ [Капилевич Л. В. И др. 2001; Невзорова, В. А. и др., 1997; Шуба М. Ф., Кочемасова Н. Г. 1988; Artinian, L. et al 2001; Braer C., Emery C. 1994; Dumas M. et. al. 2001; Hampl V., Herget J. 2000; Hislop A., Mak S. 1998; Kuriyama H., Kitamura K. et. al. 1998], по-прежнему, нет единого мнения о механизмах регуляции их сосудистого тонуса.

Гистологические исследования легочных артерий кролика [Капилевич Л. В. И др. 2002], показывают, что сосуды артериального русла малого круга кровообращения незначительно отличаются от магистральных сосудов такого же диаметра более выраженным представительством мышечного слоя [Уэйр Е. К., Дж. Т. Ривс 1995.]. Диапазон же данных о сократительных реакциях этого сосудистого отдела на действие биологически активных веществ настолько широк, что отражает абсолютно противоположные точки зрения. По мнению ряда авторов, гистамин может вызывать сокращение гладкомышечных сегментов легочной артерии [Капилевич Л. В. И др. 2002; Криукова Е. Н., Карпушев А. В. и др. 2001; Krstic M. et.al. 1996; Kusela S., Toroc J., 1996], хотя суще-

ствуют данные и о его вазодилатирующем эффекте, как опосредованном, так и не зависящим от эндотелия сосудов [Krstic M. et.al. 1996; Kuchan M., Frangos J. 1994; Shi W., Wang C. et al 1998]. Противоречивыми остаются сведения и о механизмах адренэргической регуляции гладкомышечного тонуса легочной артерии [Капилевич Л. В. и др. 2002-2003; Шуба М. Ф., Кочемасова Н. Г. 1988; Damron D.S. et al 2002; Dumas M. et al 1998; Grandordy B. 1987; Yamauchi J. et al 2001].

Резюмируя изложенное, можно заключить, что имеет место необходимость изучения регуляции механического напряжения гладкомышечных клеток воздухоносных путей и легочной артерии в норме и при моделировании дисфункции аппарата внешнего дыхания.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить механизмы дистантной и локальной регуляции сократительной активности гладких мышц легочной артерии и воздухоносных путей.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Исследовать особенности адренэргической, холинэргической и гистаминэргической регуляции механического напряжения гладких мышц легочных артерий и воздухоносных путей.
2. Исследовать роль циклических нуклеотидов в регуляции механического напряжения гладких мышц легочных артерий.
3. Исследовать роль эндотелия и эпителия в регуляции сократительной активности гладких мышц респираторного тракта.
4. Исследовать особенности адренэргической, холинэргической и гистаминэргической регуляции механического напряжения гладких мышц легочных артерий и воздухоносных путей в условиях бронхиальной гиперреактивности.
5. Изучить механизмы регуляции циклическими нуклеотидами механического напряжения гладких мышц легочных артерий и воздухоносных путей в условиях бронхиальной гиперреактивности.
6. Изучить ионную проводимость мембран эритроцитов и гладкомышечных клеток легочных артерий в условиях бронхиальной гиперреактивности.
7. Провести сравнительную характеристику особенностей регуляции сократительной активности гладких мышц легочных артерий и стенки воздухоносных путей.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Особенностью адренэргической регуляции механического напряжения ГМК легочных артерий является констрикторный ответ на β -адреномиметики, в то же время гладкие мышцы воздухоносных путей отвечают дилатацией. Холиномиметики карбохолин и пилокарпин, а так же гистамин оказывают констрикторное действие на гладкие мышцы легочной артерии и воздухоносных путей.
2. Вещества, увеличивающие внутриклеточную концентрацию циклических нуклеотидов (нитрозоглутатион, изопротеренол, ингибиторы фосфодиэстераз), оказывают констрикторное действие на ГМК легочных артерий и дилатирующее действие на гладкие мышцы бронхов.
3. Эпителий воздухоносных путей снижает констрикторные ответы на различные биологически и физиологически активные вещества, тогда как эндотелий легочных артерий способен оказывать как релаксирующее модулирующее действие (при

аппликации α -адреномиметиков, гистамина), так и констрикторное (при аппликации β -адреномиметиков и холиномиметиков).

4. Моделирование бронхоспастического состояния на морских свинках повышает кальций-активируемую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов. Сенсibilизация приводит к исчезновению вызванных потенциалов действия гладких мышц легочной артерии на добавление тетраэтиламмония.

5. Сенсibilизация морских свинок овальбумином приводит к потенцированию констрикторных ответов гладких мышц легочных артерий и воздухоносных путей на воздействие гистамина, β -адреномиметиков, холиномиметиков и к развитию системного воспалительного процесса, отражающегося эозинофильной инфильтрацией стенок бронха и легочной артерии, снижением оксигенации крови, снижением концентрации восстановленного глутатиона, повышением концентрации углекислого газа и активации ферментов антиоксидантной защиты (глутатионредуктазы, каталазы, глутатионпероксидазы).

6. Гладкие мышцы легочных артерий в большей степени подвержены констрикторным ответам на воздействие адреномиметиков, холиномиметиков, серотонина и модуляторов внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов, нежели ГМК воздухоносных путей. Сенсibilизация морских свинок овальбумином снижает релаксирующее влияние эпителия и эндотелия, потенцирует сократительные ответы ГМК легочной артерии и воздухоносных путей.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые показано, что вещества, приводящие к увеличению внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов, приводят к сокращению сосудистых гладких мышц в физиологических условиях. При аппликации нитрозоглутатиона, изопротеренола, форсколина наблюдаются сократительные реакции гладких мышц легочной артерии.

Впервые представлены данные, характеризующие различия в регуляции механического напряжения гладких мышц легочной артерии и воздухоносных путей биологически активными веществами. Гладкие мышцы легочной артерии в большей степени подвержены констрикции, тогда как ГМК воздухоносных путей – дилатации.

Впервые показано увеличение скорости гиперполяризации и реполяризации мембраны эритроцитов на воздействие кальциевого ионофора A23187 при сенсibilизации морских свинок овальбумином.

Установлено, что при сенсibilизации морских свинок происходит изменение сократительной активности гладких мышц легочной артерии и воздухоносных путей, заключающееся в развитии состояния гиперреактивности и гиперчувствительности ГМК; происходят системные нарушения, ведущие к развитию окислительного стресса на фоне снижения оксигенации крови.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Результаты исследования являются важным вкладом в развитие фундаментальных знаний о адренэргической, холинэргической и гистаминэргической регуляции функций гладких мышц легочных сосудов и воздухоносных путей. Существенно дополнены представления об участии сигнальной системы, связанной с метаболизмом циклических нуклеотидов, в регуляции механического напряжения сосудистых гладкомышечных клеток.

Установлено, что увеличение внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов способно оказывать констрикторное действие на легочную артерию.

Сенсибилизация морских свинок овалбумином приводит к изменению ответов сегментов легочной артерии и воздухоносных путей на воздействие биологически активных веществ, в большей степени повышаются констрикторные реакции.

Полученные данные фундаментального характера открывают новые подходы к объяснению сосудистых реакций при бронхиальной астме и патологических состояниях, сопровождающихся нарушениями регуляции сократительной активности гладких мышц легочной артерии и бронхов. Результаты исследования расширяют научную базу для создания новых средств коррекции состояний, связанных с нарушением регуляции механического напряжения гладкомышечных клеток.

Основные положения работы используются в курсах лекций и практических занятиях, проводимых на кафедре биофизики и функциональной диагностики, на кафедре нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета.

Методические приемы и новые данные используются в научных исследованиях, проводимых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии, биохимической лаборатории ЦНИЛ Сибирского государственного медицинского университета. Областями применения полученных данных являются физиология, биофизика, фармакология.

СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 291 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», глав собственных результатов и их обсуждения и заключения. Библиография включает 724 работы, в том числе 150 – отечественных авторов и 574 – зарубежных. Работа иллюстрирована 72 рисунками и включает 2 таблицы.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Основные результаты диссертации обсуждены на всероссийских и международных конгрессах: ● Международный конгресс «Научная молодежь на пороге XXI века», 18–19 мая 2000 (Томск). ● Второй конгресс молодых учёных и специалистов «Научная молодёжь на пороге XXI века» – Томск 2001. ● Конференция, посвященная 150-летию член-корр., профессора А. С. Догеля – Томск СГМУ 2002, ● III международный конгресс молодых учёных и специалистов «Науки о человеке», 16–17 мая 2002 (Томск). ● The 13th European Meeting on Hypertension, June 13–17, 2003 (Milan, Italy). ● Пироговская научная конференция студентов и молодых ученых, Москва, 20 марта 2003. ● X Международный Симпозиум «Биологическая подвижность» посвященный памяти академика Г. М. Франка (1904-1976), 23 мая–1 июня 2004 (г. Пушино, Московская область). ● Симпозиум с международным участием «Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц», 28–29 мая, 2004 (г. Томск). ● V Международный конгресс молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» – Томск 2004 г. ● VI Международный конгресс молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» – Томск 2005 г. ● V Сибирский физиологический съезд – Томск 2005 г. ● VII Международный конгресс молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» – Томск 2006 г. ● The 16th European Meeting on Hypertension, (Madrid, Spain), June 12–15, 2006.

Основные результаты диссертации опубликованы в 39 печатной работе, 16 из них – в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В работе использовались экспериментальные животные – беспородные кролики-самцы массой 1,5 – 2 кг (всего – 44 кролика) и морские свинки-самцы весом 300-400 г в количестве 390 особей. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществлялось в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Кроликов и свинок умерщвляли без применения медикаментозного наркоза методом цервикальной дислокации (заключение локального этического комитета СибГМУ № 469 от 13.06.2006 г.). После этого вскрывали грудную клетку, выделяли легкие и сердце. Сосуды легких и воздухоносные пути (трахея и бронхи до 3 порядка) препарировали в ванночке с раствором Кребса при комнатной температуре (20-25 °С). Для изучения сократительной активности приготавливали кольцевые гладкомышечные сегменты легочной артерии и ее ветвей шириной 3-4 мм. При необходимости эндотелий удалялся механически вращением деревянного шпателя в просвете сегмента в течение 1 мин. Так же поступали и с эпителием бронхов и трахеи. Сохранность или полнота удаления эпителия/эндотелия контролировалась гистологически. Для исследования ион-транспортирующих систем клеточных мембран собирали кровь из аорты у экспериментальной и контрольной групп морских свинок сразу после умерщвления.

Методом механографии исследовали сократительную активность (механическое напряжение) гладкомышечных сегментов. Установка состоит из станины с теплообменником, в крышке которого размещена кювета объемом 5 мл. В дне кюветы закреплены 2 металлических крючка. Сегменты крепятся в кювете, и после растяжения нагрузкой 500 мг фиксируются на штоках механоэлектрических преобразователей. В кювете находится термостатируемый раствор Кребса. Во время отмывания производится смена раствора, по времени занимающая 1 – 2 секунды. В качестве механоэлектрического преобразователя использован датчик силы FT10G, что позволяло проводить эксперимент в условиях, близких к изометрическим. Сигнал, поступивший с датчиков, подавался на 16-ти разрядный АЦП и далее записывался и обрабатывался с помощью компьютера.

Метод двойного сахарозного моста использовался для одновременного раздражения и регистрации электрических и сократительных параметров изолированных полосок гладкомышечных клеток. Сущность метода состоит в том, что на определенном участке полоски гладкомышечных клеток путем длительной перфузией изотоническим раствором сахарозы создается высокое сопротивление межклеточного пространства. Этот метод позволяет длительно регистрировать одновременные изменения мембранного потенциала и сократительной активности ГМК при действии, как электрическим стимулом, так и биологически активными веществами.

Метод потенциометрического исследования ионной проводимости эритроцитарных мембран. Для регистрации изменений мембранного потенциала эритроцитов в ответ на увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция использовался метод, предложенный в работах [Орлов С. Н., Петрова И. В. и др. 1992; Low P. S. 1979] и основанный на том, что в присутствии протонофора распределение протонов зависит от мембранного потенциала E_m как: $E_m = 2.303RT/F (pH_i - pH_0)$, где pH_i и pH_0 – значения pH

цитоплазмы и среды инкубации, соответственно. При низкой буферной емкости среды инкубации изменениями рН; можно было пренебречь, а внутриклеточный рН определялся при гемолизе клеток в присутствии детергента, для чего в конце всех опытов в суспензию вносился тритон X-100 до конечной концентрации 0,2%.

Для **гистологического исследования** забирались легочные артерии, главные, среднедолевые бронхи и мелкие бронхиолы с участками легочной паренхимы. Забранный материал фиксировался, обезвоживался, заливался в парафин. Для осуществления обзорной микроскопии слизистой оболочки бронхов проводилась окраска микропрепаратов гематоксилином и эозином. Для исследования коллагеновых волокон соединительной ткани срезы окрашивались пикрофуксином по Ван-Гизону. Исследование тканевых базофилов и эозинофилов производилось с помощью сочетанной окраски гистологических препаратов основным коричневым и прочным зеленым. Микрофотографирование препаратов осуществляли цифровым фотоаппаратом (LDC Digital camera QV-100 фирмы Casio).

Биохимические методы исследования. Для определения напряжения кислорода и углекислого газа в крови использовали автоматический анализатор «СТАТ ПРОФИЛ М» (Stat Profile M). Интенсивность процессов перекисного окисления липидов в плазме крови оценивали по содержанию малонового диальдегида – основного представителя ТБК-реактивных продуктов, определяемого в тесте с тиобарбитуровой кислотой [Владимиров Ю.А., Арчаков А.К., 1972]. Показатели неферментативного звена антиоксидантной защиты организма оценивали в эритроцитах – содержание восстановленного глутатиона по реакции с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) [Карпищенко А.И., 1998]. Показатели ферментативного звена антиоксидантной защиты определяли в эритроцитах [Карпищенко А.И., 1998] – активность каталазы по скорости утилизации пероксида водорода, глутатионредуктазы по НАДФ•Н-зависимому преобразованию окисленной формы глутатиона в восстановленную форму, глутатионпероксидазы по катализу реакции взаимодействия восстановленного глутатиона с гидроперекисью трет-бутила. В работе использовали реактивы фирм MP Biomedicals (США) и Диа М (Россия).

Метод моделирования бронхоспастических состояний. Моделирование гиперреактивности и гиперчувствительности воздухоносных путей у животных проводилось по методике, описанной Саркисовым Д. С. Животные экспериментальной группы сенсибилизировались трехкратно подкожными инъекциями 0,1 мл на 100 г. массы тела животного 0,25% раствора овальбумина в физиологическом растворе (промежуток между инъекциями 3-4 дня). На 21 день животные подвергались ингаляционному воздействию аэрозоля того же раствора. Ингаляции выполнялись с помощью ультразвукового небулайзера «Муссон-1М» (Россия); размер дисперсных частиц до 5 мкм. Такие размеры частиц являются оптимальными и проникают в дистальные бронхи. Животные контрольной группы подвергались воздействию по аналогичной схеме, вместо раствора овальбумина для инъекций и ингаляции использовался физиологический раствор. После окончания ингаляции животных умерщвляли, вскрывали грудную клетку, выделяли легкие, препарировали легочную артерию и воздухоносные пути.

Растворы и реактивы

Все растворы готовились на основе дистиллированной воды, удельное сопротивление которой было не менее 4 МОм*см. Нормальный раствор Кребса (мМ): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; MgCl₂ – 1,2; CaCl₂ – 2,5; глюкоза – 11,5; NaH₂PO₄ – 1,2; трис(оксиметил)-аминометан – 15,5. Гиперкалиевый раствор Кребса (мМ): готовили на основе нормального раствора Кребса эквимолярным замещением ионов натрия ионами калия в концентрациях 20, 40, 60, 80, 100 и 120 мМ. рН растворов поддерживался в пределах 7,35 – 7,40, температура 36,5 – 37,5 °С. Растворы аэрировались воздухом. Все соли для приготовления раствора Кребса – х.ч. (Реахим, РФ).

Используемые реактивы: фенилэфрин (мезатон), ацетилхолина гидрохлорид, пилокарпин, адреналин, норадреналин, теофиллин, димедрол, дипиридамо, сальбутамол (все Россия); верапамил, (финоптин, Орион, Финляндия); изопротеренол, метиленовый синий, нитропруссид натрия, 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX), L-NAME –N(G)-nitro-L-arginine methyl ester – (все Sigma); тетраэтиламмония хлорид (Serva); дибутирил-цАМФ (Boehringer Mannheim GmbH, Германия); кавинтон (Гедеон Рихтер), гистамин, форсколин, овальбумин (egg white) (ICN Biomedicals, Inc., США). Тестирующие растворы готовили на основе нормального раствора Кребса с добавлением соответствующих реактивов.

Эффекты биологически активных веществ оценивались в процентах от амплитуды контрольного сокращения сегментов (100%) на стандартную концентрацию KCl, которая составляла 40 мМ. Вклад эндотелия определяли, сопоставляя сократительные реакции интактных и деэндотелизированных сегментов легочной артерии.

Статистическая обработка результатов

Фактические данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее, m – ошибка среднего. Далее по тексту: n – объем анализируемой подгруппы, p – достигнутый уровень значимости. Критическое значение уровня значимости принималось равным 0,05. Анализ данных производился с помощью пакетов программ «SPSS 11.5» и «Statistica 6. 0 for Windows» фирмы Statsoft». Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Гипотезу о принадлежности сравниваемых независимых выборок к одной и той же генеральной совокупности или к совокупностям с одинаковыми параметрами проверяли с помощью рангового U – критерия Манна-Уитни. Когда члены сравниваемых выборок были связаны попарно (зависимые выборки), различия между ними оценивали с помощью рангового T -критерия Вилкоксона. Применение этого метода было необходимо для сравнения амплитуд сократительных и дилатационных реакций с исходным механическим напряжением и амплитудой предсокращения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности холинэргической регуляции гладких мышц легочной артерии морских свинок

В предварительной серии экспериментов были определены дозы предсокращающих факторов, вызывающие полумаксимальное сокращение деэндотелизированных сегментов ветвей легочной артерии. Такими величинами для гиперкалиевого раствора Кребса оказались 40 мМ KCl, а для фенилэфрина – 1 мкМ. Деэндотелизация позволила исключить влияние эндотелия на сократительные ответы сегментов.

Пилокарпин вызывал дозозависимое сокращение всех интактных сегментов здоровых морских свинок в концентрации 0,1 нМ – 100 мкМ. Максимум амплитуды сокращения наблюдался на 100 мкМ пилокарпина и составил $40,0 \pm 2,0\%$ ($n=8$), (рис. 1).

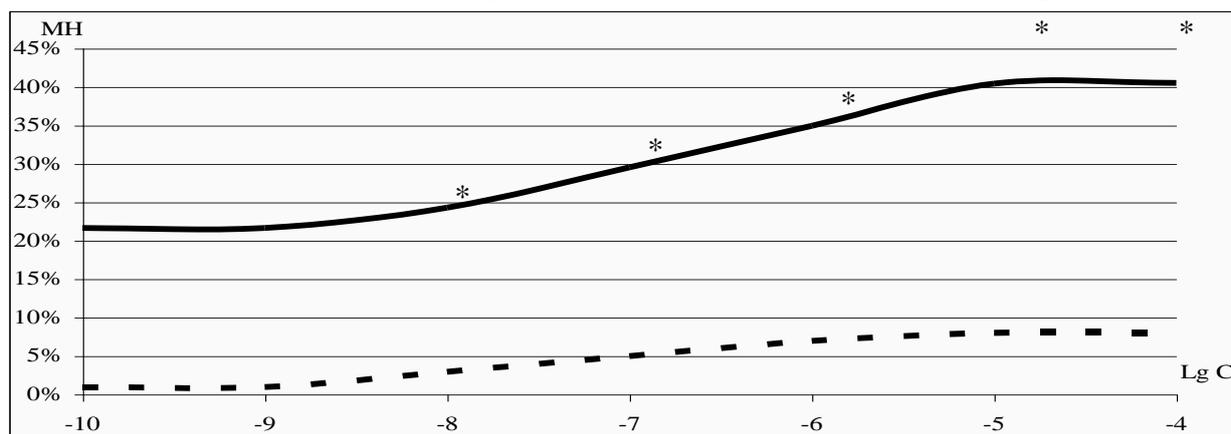


Рис. 1. Зависимость механического напряжения сегментов долевых ветвей легочной артерии морских свинок от концентрации пилокарпина

По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации пилокарпина. По оси ординат – механическое напряжение в процентах. Пунктирная линия – деэндотелизированные сегменты. Сплошная линия – сегменты с сохраненным эндотелием. * – статистическая значимость различий ($p<0,05$).

При действии пилокарпина на деэндотелизированные сегменты контрольной группы также наблюдалось дозозависимое сокращение всех сегментов в ответ на концентрации агониста 0,1 нМ – 100 мкМ. При этом максимальная амплитуда на 100 мкМ пилокарпина была достоверно меньше, чем у интактных сегментов и составила $8,3 \pm 2,0\%$ ($n=9$, $p<0,05$) (рис. 1).

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние пилокарпина на интактные сегменты сенсibilизированных морских свинок. Все исследуемые сегменты отвечали сокращением, максимальная амплитуда составила $23,00 \pm 1,36\%$ ($n=10$) на концентрацию пилокарпина 100 мкМ. Статистически значимое увеличение амплитуды сократительных реакций интактных сегментов контрольной группы было обнаружено по сравнению с интактными сегментами экспериментальной группы на концентрации пилокарпина 0,1 нМ – 100 мкМ ($p<0,05$) (рис. 2).

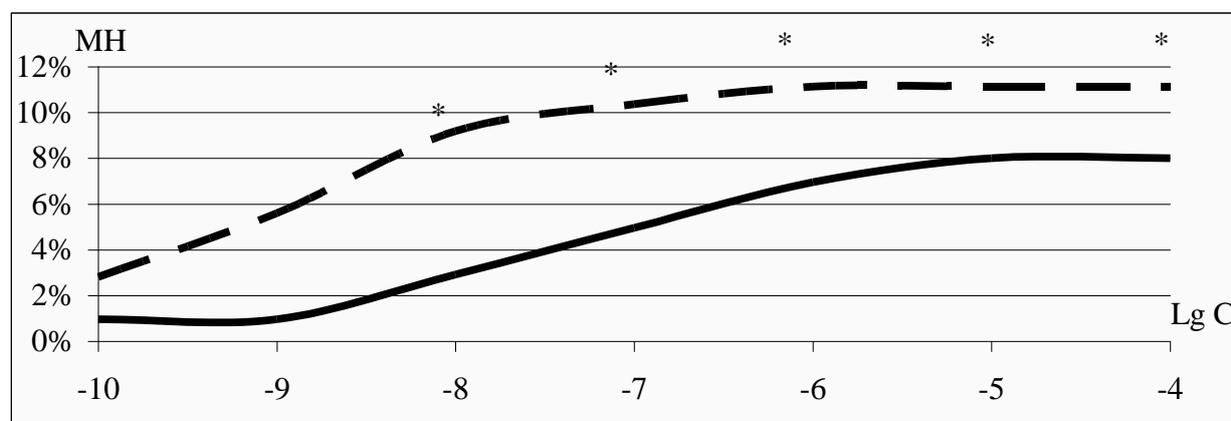


Рис. 2. Зависимость механического напряжения сегментов долевых ветвей легочной артерии морских свинок от концентрации пилокарпина

По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации пилокарпина. По оси ординат – механическое напряжение в процентах. Сплошная линия – интактные сегменты с

сохранным эндотелием. Пунктирная линия – сегменты с сохранным эндотелием сенсibilизированных животных. * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$) между группами.

Увеличение механического напряжения также наблюдалось при воздействии пилокарпина на деэндотелизированные сегменты сенсibilизированных морских свинок. Максимум сокращения наблюдался на 100 мкМ пилокарпина, амплитуда равнялась $11,0 \pm 3,0$ % ($n=10$).

В следующей серии экспериментов было изучено влияние карбохолина на интактные сегменты контрольной группы. Карбохолин вызывал незначительное сокращение всех интактных сегментов в концентрации 0,1 нМ – 100 мкМ. Максимум амплитуды сокращения наблюдался на 0,1 мкМ карбохолина и составил $15,0 \pm 3,0$ % ($n=9$) от амплитуды контрольного гиперкалиевого сокращения (рис. 3).

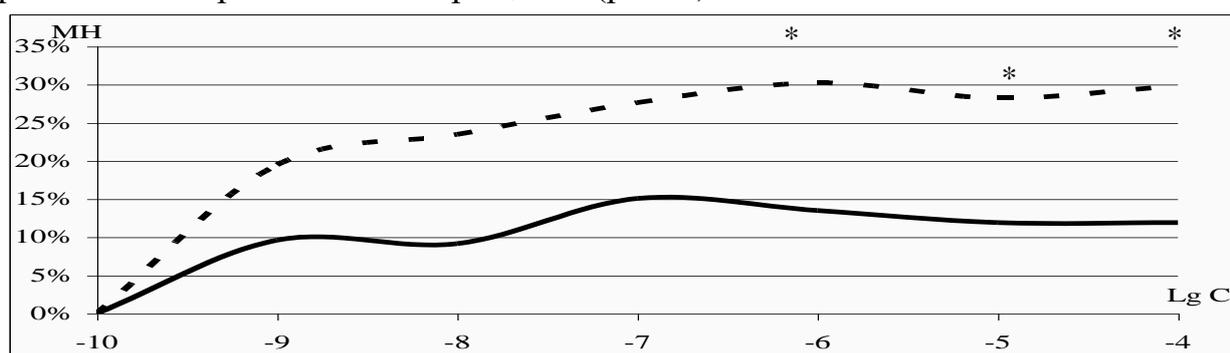


Рис. 3. Зависимость механического напряжения сегментов долевых ветвей легочной артерии морских свинок от концентрации карбохолина

По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации карбохолина. По оси ординат – механическое напряжение в процентах от контрольного гиперкалиевого сокращения. Пунктирная линия – деэндотелизированные сегменты. Сплошная линия – сегменты с сохранным эндотелием. * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$).

Увеличение механического напряжения наблюдалось и при воздействии карбохолина на деэндотелизированные сегменты морских свинок контрольной группы. Максимум сокращения наблюдался на 100 мкМ карбохолина и амплитуда равнялась $30,0 \pm 4,0$ % ($n=8$) (рис. 3).

Статистически значимое увеличение амплитуды сократительных реакций деэндотелизированных сегментов контрольной группы было обнаружено по сравнению с интактными сегментами контрольной группы на концентрации карбохолина 1 мкМ ($p < 0,01$), 10 мкМ ($p < 0,05$) и 100 мкМ ($p < 0,05$) (рис. 3). По всей видимости, механическое удаление эндотелия приводит к уменьшению действия релаксирующих факторов, выделяемых эндотелием при активации холинорецепторов.

В следующей серии экспериментов было изучено влияние карбохолина на интактные сегменты экспериментальной группы. Карбохолин вызывал дозозависимое сокращение всех сегментов на концентрации агониста 0,1 нМ – 100 мкМ. При этом максимальная амплитуда на 100 мкМ карбохолина составила $30,0 \pm 5,0$ % ($n=9$) (рис. 4).

При действии карбохолина на деэндотелизированные сегменты экспериментальной группы также наблюдалось дозозависимое сокращение всех сегментов в ответ на концентрации агониста 0,1 нМ – 100 мкМ. При этом максимальная амплитуда на 100 мкМ карбохолина была достоверно меньше, чем у интактных сегментов и составила $5,0 \pm 3,0$ % ($n=7$, $p < 0,05$) (рис. 4).

Увеличение амплитуды сократительных реакций интактных сегментов экспериментальной группы было обнаружено по сравнению с сегментами контрольной группы. На концентрации карбохолина 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ это увеличение было статистически значимым ($p < 0,05$). Полученные данные позволяют предположить, что при сенсibilизации, эндотелий, возможно, изменяет свою функцию: снижается выработка релаксирующих веществ и эффект констрикторных факторов становится превалирующим.

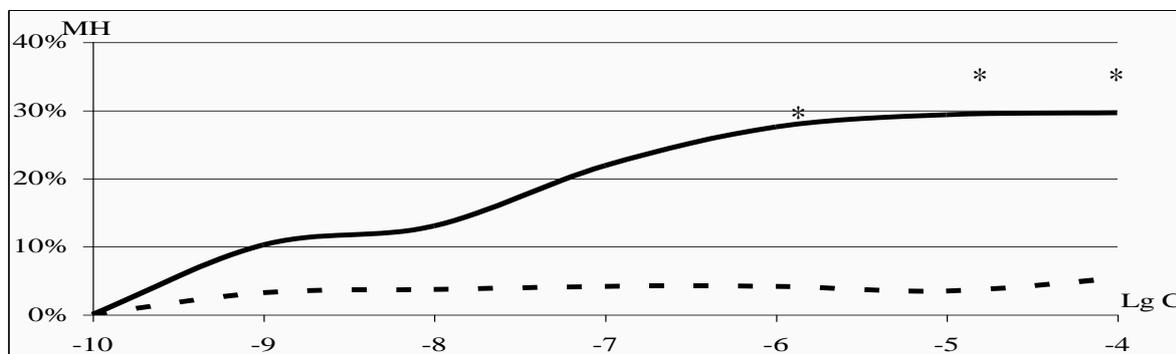


Рис. 4. Зависимость механического напряжения сегментов долевых ветвей ЛА сенсibilизированных морских свинок от концентрации карбохолина

По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации карбохолина. По оси ординат – механическое напряжение в процентах. Пунктирная линия – деэндотелизированные сегменты. Сплошная линия – сегменты с сохраненным эндотелием. * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$).

В следующей серии экспериментов изучалось влияние карбохолина на интактные сегменты экспериментальной группы, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса (КСI, 40 мМ). Было показано, что под действием карбохолина в концентрациях от 0,1 нМ до 100 мкМ, происходил прирост механического напряжения всех сегментов с интактным эндотелием. При этом максимальная амплитуда на 100 мкМ карбохолина составила $115,0 \pm 1,0$ % ($n=8$); максимальная амплитуда сокращения деэндотелизированных сегментов – $151,0 \pm 2,0$ % (рис. 5).

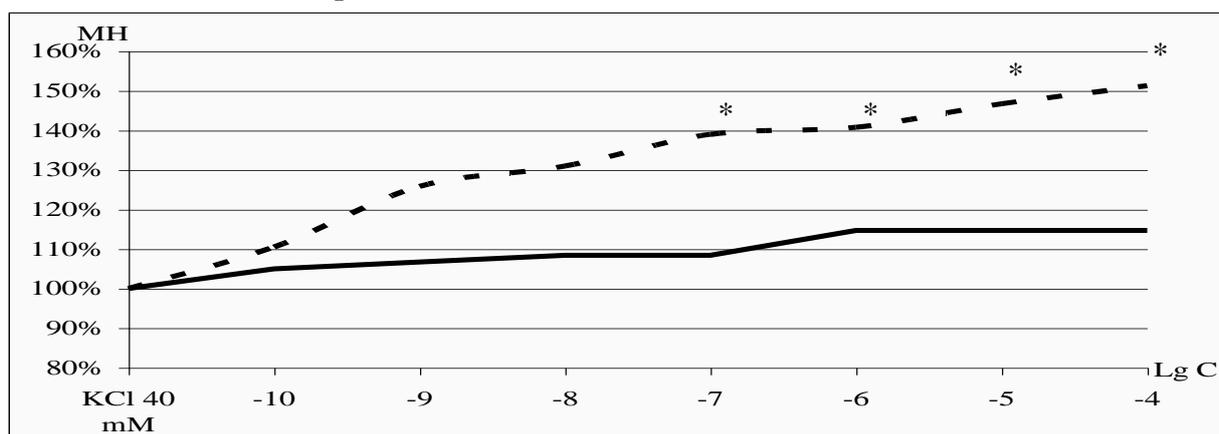


Рис. 5. Зависимость механического напряжения сегментов долевых ветвей легочной артерии сенсibilизированных морских свинок, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса (40 мМ КСI), от концентрации карбохолина

По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации карбохолина, По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного предсокращения. Пунктирная линия – деэндотелизированные сегменты. Сплошная линия – сегменты с сохраненным эндотелием. * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$).

Особенности гистаминэргической регуляции гладких мышц легочной артерии

Изучали влияние гистамина в концентрациях 1 нМ – 100 мкМ на сократительную активность интактных сегментов легочной артерии интактных морских свинок. Все сегменты отвечали на воздействие гистамина в концентрациях 0,01 мкМ – 100 мкМ дозозависимым сокращением. Максимальная амплитуда сокращения сегментов на гистамин в концентрации 100 мкМ составила $14,7\% \pm 4,2\%$ ($n=7$) от величины гиперкалиевой контрактуры (рис.6).

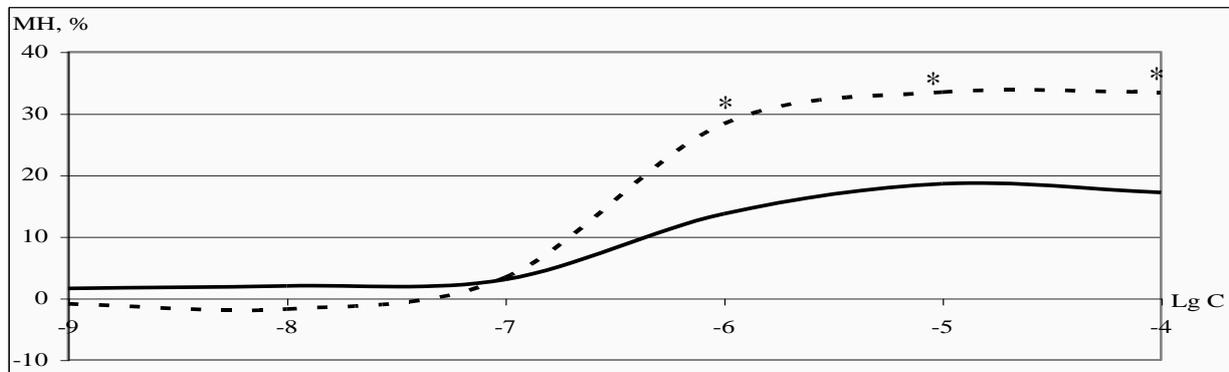


Рис. 6. Зависимость механического напряжения гладкомышечных сегментов легочной артерии интактных морских свинок от концентрации гистамина

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения. По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации гистамина. Сплошная линия – эндотелий сохранен. Пунктирная линия – деэндотелизированные сегменты. * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$).

При исследовании влияния гистамина на сократительную активность деэндотелизированных сегментов легочной артерии здоровых морских свинок было обнаружено, что сегменты отвечают дозозависимым сокращением на концентрации 0,01 мкМ – 100 мкМ. Максимальная амплитуда реакций на концентрацию гистамина 100 мкМ была выше амплитуды интактных сегментов ($p < 0,05$) и составила $39,4\% \pm 4,5\%$ ($n=9$) (рис.6). По всей видимости, в сосудах малого круга так же наблюдается стимуляция гистамином продукции эндотелиального релаксирующего фактора (оксида азота), однако, в отличие от сосудов большого круга кровообращения, здесь превалирует прямой контрактильный эффект на гладкомышечные клетки.

В следующей серии экспериментов изучались сократительные реакции интактных сегментов сенсibilизированных морских свинок на воздействие гистамина. Все исследуемые сегменты отвечали сокращением на воздействие гистамина в концентрациях 1 нМ – 100 мкМ, максимальная амплитуда которого составила $48,1 \pm 4,6\%$ ($n=8$) (рис.7). При этом на концентрации гистамина 10 и 100 мкМ, амплитуда сокращения сегментов экспериментальной группы была достоверно выше амплитуды сокращения сегментов контрольной группы ($p < 0,05$) (рис. 7).

По литературным данным в условиях сенсibilизации овальбумином на бронхах повышена экспрессия рецепторов гистамина первого типа [Richard W. et al., 1999]. Вероятно при сенсibilизации овальбумином увеличивается экспрессия рецепторов гистамина первого типа не только на бронхах, но и на сосудах малого круга кровообращения. Возрастание максимальной амплитуды сокращения сегментов сенсibilизированных животных может свидетельствовать об увеличении количества рецепторов к гистамину на мем-

бране. Этим можно объяснить более выраженный сократительный эффект гистамина на гладкие мышцы легочной артерии, полученных от животных экспериментальной группы.

При исследовании гистаминэргических сократительных реакций гладких мышц деэндотелизированных сегментов легочной артерии сенсibilизированных морских свинок было выявлено, что гладкие мышцы отвечают дозозависимым сокращением на воздействие гистамина в концентрациях 0,1 нМ – 100 мкМ. Максимальная амплитуда сокращения сегментов составила $58,3\% \pm 4,1\%$ ($n=11$).

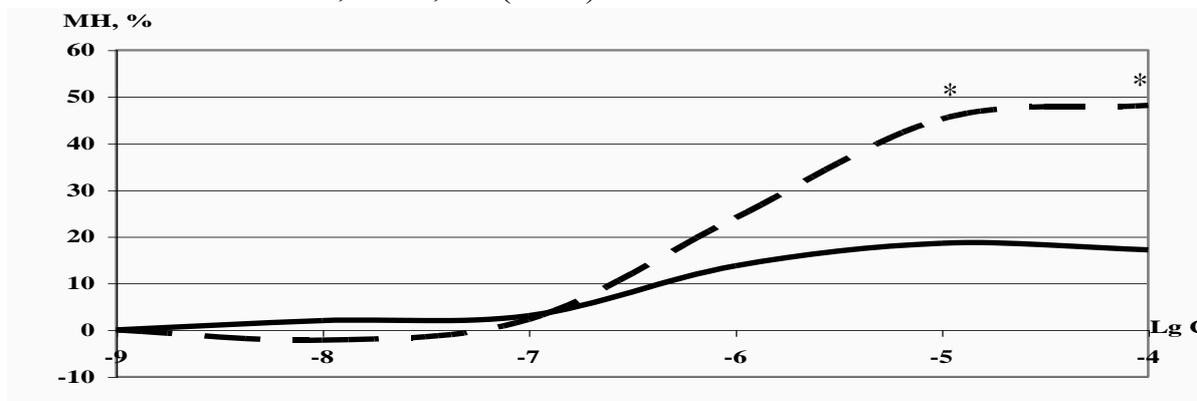


Рис. 7. Зависимость механического напряжения сегментов легочной артерии морских свинок от концентрации гистамина (эндотелий сохранен)

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса. По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации гистамина. Сплошная линия – интактные свинки. Пунктирная линия – сенсibilизированные свинки. * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$).

Амплитуда сокращения деэндотелизированных сегментов экспериментальной группы была несколько выше амплитуды сокращения интактных сегментов, но это различие не было достоверным. Вероятно, это может быть связано с тем, что при сенсibilизации морских свинок овальбумином эндотелий повреждается в первую очередь и снижается продукция релаксирующих факторов [Zou J. et al., 2002]. Различные эндотелиальные повреждения могут являться следствием высвобождения из эозинофилов основных белков, а также результатом высвобождения различными эффекторными клетками воспаления кислородных радикалов [Зинчук В.В., 2001].

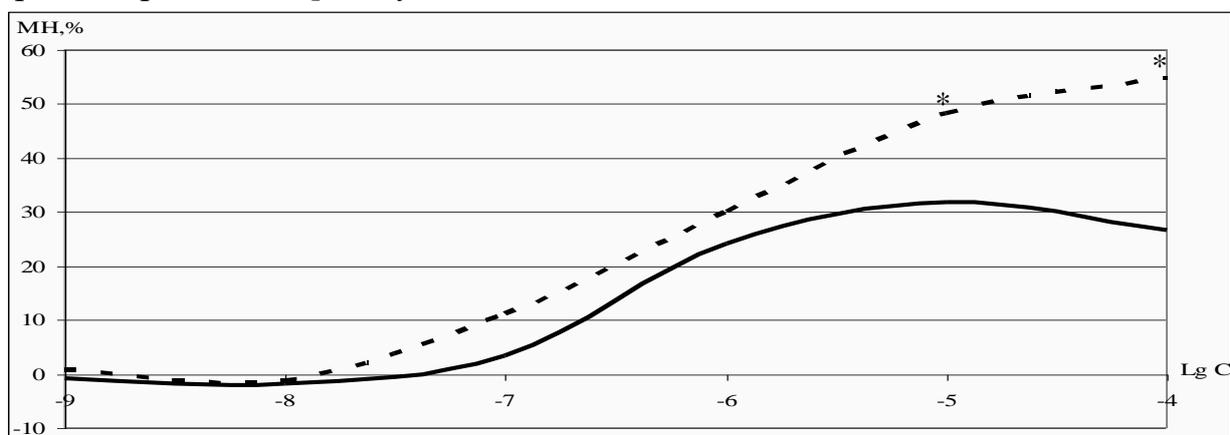


Рис. 8. Зависимость механического напряжения сегментов легочной артерии морских свинок от концентрации гистамина (эндотелий удалён)

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса. По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации гистамина. Сплошная линия – интактные свинки. Пунктирная линия – сенсibilизированные свинки. * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$).

Амплитуда сокращения сегментов без эндотелия, выделенных от сенсibilизированных животных, была достоверно выше амплитуды сокращения деэндотелизированных сегментов контрольной группы на концентрации гистамина 1 мкМ – 100 мкМ ($p < 0,05$), (рис. 8). Этот факт также может объясняться увеличением количества рецепторов к гистамину на мембране ГМ легочной артерии в условиях сенсibilизации [Richard W. et al., 1999].

Возрастание максимальной амплитуды сокращения сегментов сенсibilизированных животных может свидетельствовать об увеличении количества рецепторов к гистамину на них [Richard W. et al., 1999]. Это может объяснить более выраженный эффект действия гистамина на гладкие мышцы легочной артерии, полученных от животных экспериментальной группы.

При действии гистамина эндотелий может вырабатывать релаксирующие факторы, такие как оксид азота, и тем самым уменьшать амплитуду контрактильных реакций. При сенсibilизации происходит нарушение целостности эндотелиаля, возникают необратимые органические изменения эндотелия легочной артерии [Капилевич Л.В. и др., 2001; Пальцев М.А. и др., 2003]. Таким образом, это может быть причиной отсутствия различий между сократительными реакциями между сегментами с эндотелием и без эндотелия у сенсibilизированных морских свинок, тогда как у животных контрольной группы при сохраненной функции эндотелия амплитуда сокращения сегментов ниже, чем после его удаления.

Особенности адренэргической регуляции гладких мышц легочной артерии

В первой серии экспериментов было изучено влияние адреналина в концентрациях 0,001—100 мкМ на базальный тонус деэндотелизированных сегментов долевых ветвей легочной артерии. Было показано, что адреналин (0,1 – 100 мкМ) вызывал дозозависимое сокращение всех сегментов (рис. 9).

Для изучения роли эндотелия в реализации адренэргического сократительного ответа исследовалось влияние адреналина (0,001—100 мкМ) на базальный тонус сегментов легочной артерии с сохраненным эндотелием. Все сегменты при воздействии адреналина в концентрациях 0,1—100 мкМ отвечали сокращением, но амплитуда сокращения была ниже по сравнению с деэндотелизированными сегментами (рис. 9). Очевидно, что в стенке ЛА, как и в сосудах большого круга кровообращения, эндотелиальные клетки угнетают сократительную реакцию ГМК, продуцируя эндотелиальный релаксирующий фактор. Аналогичные результаты были получены в экспериментах с использованием норадреналина и агониста α -адренорецепторов фенилэфрина (в присутствии 10 мкМ блокатора β -адренорецепторов обзидана) в качестве сокращающих агентов. Фенилэфрин в концентрациях 0,01—100 мкМ вызывал сокращение сегментов, как деэндотелизированных, так и интактных. Эндотелий в обоих случаях также угнетал сократительные реакции сегментов. По всей видимости, активация α -адренорецепторов эндотелия приводит к входу ионов Ca^{2+} в эндотелиальные клетки. В ответ на повышение ионов кальция в цитоплазме происходит наработка эндотелием оксида азота, что, в конечном счете, снижает тонус ГМК сосуда. Результаты, полученные в описанных выше экспериментах, свидетельствуют, что α -адренэргическая регуляция ГМК легочных артерий принципиально не отлича-

ется от таковой в стенке сосудов большого круга кровообращения [Шуба М. Ф., Кочемасова Н. Г., 1988].

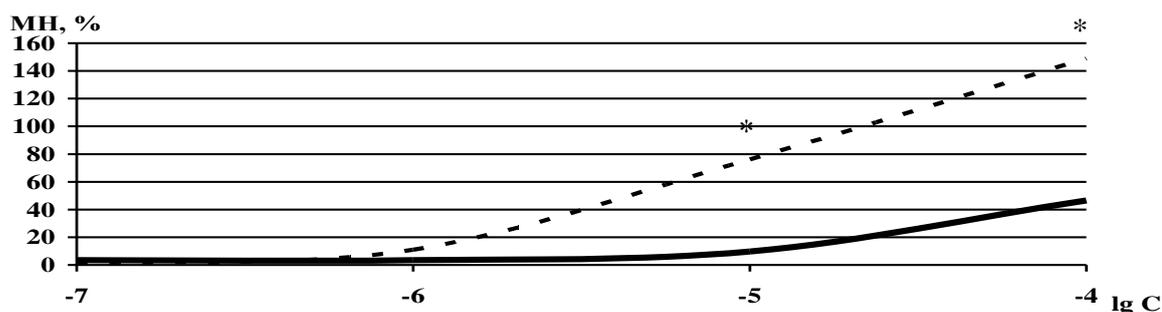


Рис. 9. Зависимость механического напряжения гладкомышечных сегментов легочной артерии кроликов от концентрации адреналина

Сплошная линия – интактные сегменты. Пунктирная линия – деэндотелизированные сегменты. По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации действующего вещества, по оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения (40мМ КСl). * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$).

Для изучения роли эндотелия в реализации адренэргического сократительного ответа исследовали влияние адреналина (1нМ—100 мкМ) на базальный тонус сегментов легочной артерии с сохраненным эндотелием. Все сегменты при воздействии адреналина в концентрациях 1нМ—100 мкМ отвечали сокращением, но амплитуда сокращения была ниже на 22% ($p < 0,05$) по сравнению с деэндотелизированными сегментами. Амплитуда максимального сокращения на воздействие адреналина в концентрации 100 мкМ составила $52,0 \pm 3,5\%$ ($n=6$).

В следующей серии экспериментов изучали влияние селективного α -адреномиметика – фенилэфрина в концентрациях 1 нМ – 100 мкМ на сократительную активность интактных (эндотелий сохранен) сегментов легочной артерии морских свинок контрольной группы. Все сегменты отвечали на воздействие фенилэфрина в концентрациях 1 нМ – 100 мкМ дозозависимым сокращением. Максимальная амплитуда сокращения на фенилэфрин в концентрации 100 мкМ составила $71,5 \pm 7,8\%$ ($n=6$). При исследовании влияния фенилэфрина на сократительную активность деэндотелизированных сегментов контрольной группы было обнаружено, что сегменты отвечали дозозависимым сокращением на концентрации 1 нМ – 100мкМ. Максимальная амплитуда реакций на концентрацию фенилэфрина 100 мкМ была больше амплитуды сокращения интактных сегментов на 100,3% ($p < 0,05$) и составила $171,8 \pm 6,6\%$ ($n=7$).

В следующей серии экспериментов изучали сократительные реакции сегментов с сохраненным эндотелием сенсibilизированных морских свинок на воздействие фенилэфрина. Все исследуемые сегменты отвечали сокращением на воздействие фенилэфрина в концентрациях 1 нМ – 100 мкМ, максимальная амплитуда сокращения составила $48,1 \pm 3,8\%$ ($n=6$) (рис. 10). При этом на концентрацию фенилэфрина 100 мкМ, амплитуда сокращения сегментов экспериментальной группы была достоверно ниже амплитуды сокращения сегментов контрольной группы ($p < 0,05$) (рис. 10).

При исследовании сократительных реакций гладких мышц деэндотелизированных сегментов легочной артерии сенсibilизированных морских свинок было выявлено, что гладкие мышцы отвечают дозозависимым сокращением на воздействие фенилэфрина в концентрациях 1 нМ – 100 мкМ. Максимальная амплитуда сокращения сегментов соста-

вила $57,3 \pm 4,6\%$ ($n=6$). Амплитуда сокращения деэндотелизированных сегментов экспериментальной группы была выше амплитуды сокращения сегментов с сохраненным эндотелием на 9%, это различие не было достоверным.

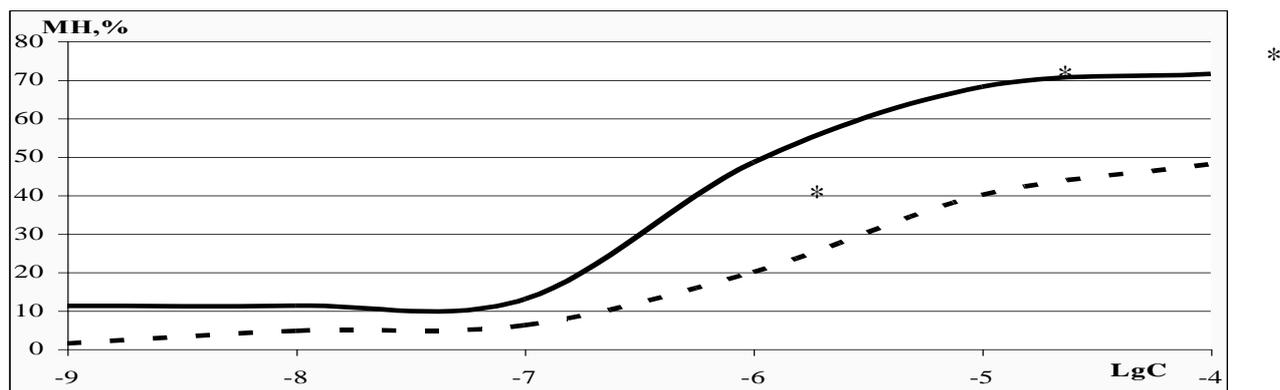


Рис. 10. Зависимость механического напряжения сегментов легочной артерии морских свинок от концентрации фенилэфрина (эндотелий сохранен)

Сплошная линия – сегменты легочной артерии интактных морских свинок. Пунктирная линия – сегменты легочной артерии сенсibilизированных морских свинок. По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на 40 мМ КСl. По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации фенилэфрина. * – уровень значимости различий ($p < 0,05$) по сравнению с сенсibilизированными.

Амплитуда сокращения сегментов без эндотелия, выделенных от сенсibilизированных животных, была достоверно ниже амплитуды сокращения деэндотелизированных сегментов контрольной группы на концентрации фенилэфрина 10 мкМ-100 мкМ ($p < 0,05$) (рис. 11). Этот факт также может объясняться снижением чувствительности α -адренорецепторов к адреномиметикам на мембране ГМ легочной артерии в условии сенсibilизации.

Результаты, полученные в описанных выше экспериментах, свидетельствуют, что α -адренэргическая регуляция ГМК легочных артерий принципиально не отличается от таковой в стенке сосудов большого круга кровообращения [Уэйр Е. К., Ривс Дж. Т., 1995].

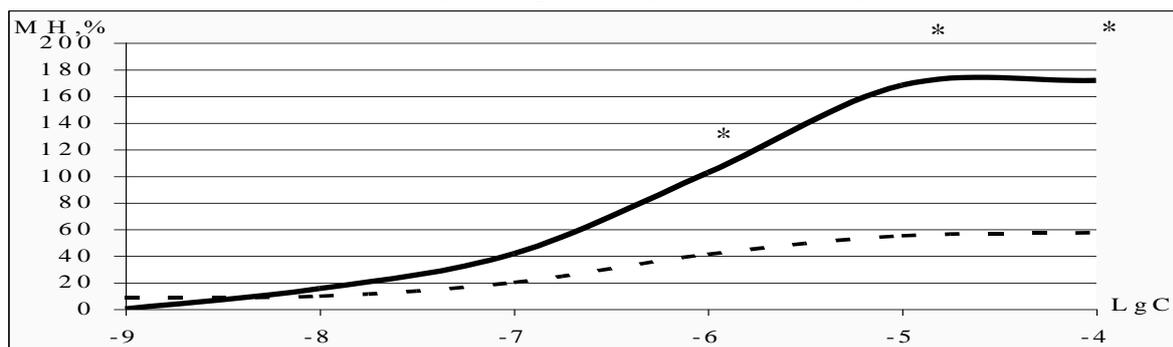


Рис. 11. Зависимость механического напряжения сегментов легочной артерии морских свинок от концентрации фенилэфрина (эндотелий удалён)

Сплошная линия - сегменты интактных морских свинок. Пунктирная линия - сегменты сенсibilизированных морских свинок. По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса. По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации фенилэфрина. * – уровень значимости различий ($p < 0,05$) по сравнению с сенсibilизированными.

Принципиально иные результаты были получены во второй серии экспериментов, где исследовались эффекты агониста β -адренорецепторов – изопротеренола. β -

адреномиметик изопротеренол вызывал двухфазный ответ как предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, так и интактных деэндотелизированных сегментов легочной артерии кролика. Лишь в диапазоне концентраций 0,01–1 мкМ его добавление вызывало незначительное расслабление сегментов, тогда в более высоких концентрациях (10 – 100 мкМ) – неожиданно регистрировался достоверный рост сократительных ответов [Капилевич Л. В. и др., 2003]. Амплитуда этого сокращения достигала $36,2 \pm 4,8$ % ($n=18$, $p<0,05$), от амплитуды контрольного предсокращения гиперкалиевым раствором Кребса (рис. 12). Даже если и согласиться с мнением об относительном преобладании β -адренорецепторов в ГМК легочного круга кровообращения [Уэйр Е. К., Ривс Дж. Т., 1995], считать это в качестве основной причины отличий адренэргических ответов весьма затруднительно. В доступной литературе не обнаружено сообщений о β -адренэргических контрактильных эффектах в ГМК сосудистой стенки.

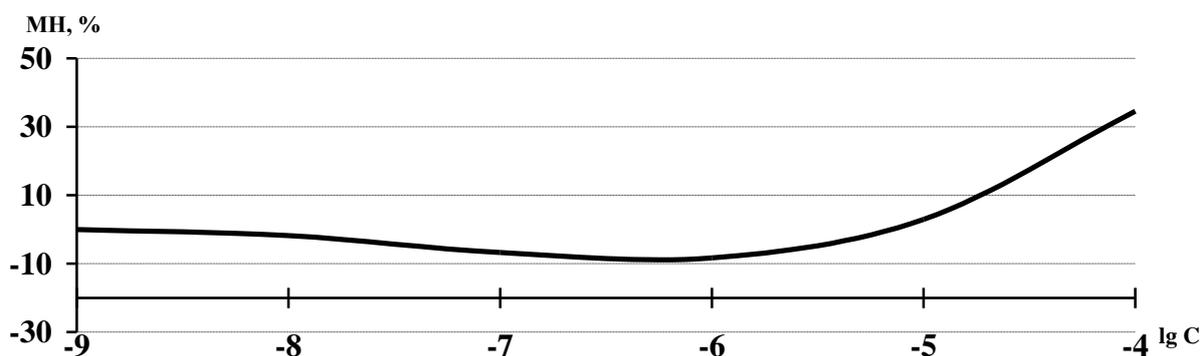


Рис. 12. Зависимость механического напряжения деэндотелизированных гладкомышечных сегментов легочной артерии кроликов от концентрации изопротеренола. Предсокращение гиперкалиевым раствором Кребса

По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации действующего вещества, по оси ординат – МН в процентах от амплитуды контрольного сокращения (40мМ КСl).

На фоне предсокращения ГМК гиперкалиевым раствором (КСl, 40 мМ), изопротеренол в концентрациях 0,01-100мкМ вызывал сокращение сегментов с сохраненным эндотелием и деэндотелизированных сегментов интактных морских свинок. Максимальная амплитуда сокращения на изопротеренол деэндотелизированных сегментов составила $141,6 \pm 6,5$ % ($n=8$). Удаление эндотелия приводило к увеличению сократительных реакций на 26% ($p<0,05$). Максимальная амплитуда сокращения сегментов интактных свинок с сохраненным эндотелием составила $115,0 \pm 8,1$ % ($n=6$).

В следующей серии экспериментов изучали сократительные реакции сегментов с сохраненным эндотелием сенсibilизированных морских свинок на воздействие изопротеренола на фоне предсокращения ГМК КСl, 40 мМ. Все исследуемые сегменты отвечали сокращением на воздействие изопротеренола в концентрациях 0,01мкМ – 100 мкМ, максимальная амплитуда сокращения составила $130,0 \pm 6,0$ % ($n=7$). При этом на концентрацию изопротеренола 100 мкМ, амплитуда сокращения сегментов сенсibilизированных животных была выше амплитуды сокращения сегментов интактных свинок на 15% ($p<0,05$) (рис. 13).

При исследовании сократительных реакций гладких мышц деэндотелизированных сегментов легочной артерии сенсibilизированных морских свинок было выявлено, что гладкие мышцы отвечают дозозависимым сокращением на воздействие изопротеренола в

концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ. Максимальная амплитуда сокращения сегментов составила $144,6 \pm 8,9\%$ ($n=5$). При этом амплитуда сокращения сегментов без эндотелия экспериментальной группы, была несколько выше амплитуды сокращения дезэндотелизированных сегментов контрольной группы на концентрации изопротеренола 0,01 мкМ-100 мкМ ($p>0,05$), но эти различия не были статистически значимыми.

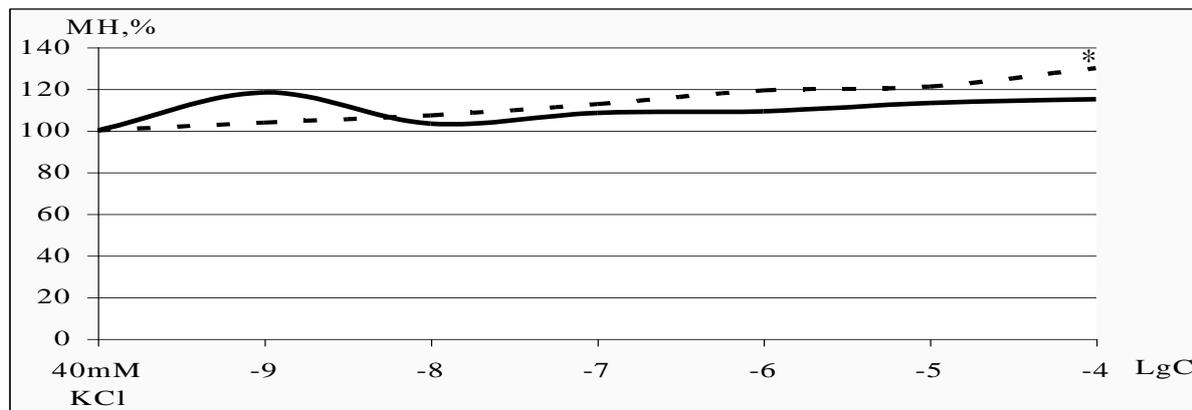


Рис. 13. Зависимость механического напряжения гладкомышечных сегментов легочной артерии морских свинок от концентрации изопротеренола на фоне предсокращения КСI (эндотелий сохранен)

Сплошная линия - сегменты легочной артерии интактных морских свинок. Пунктирная линия - сегменты легочной артерии сенсibilизированных морских свинок. По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на 40 мМ КСI. По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации изопротеренола. * – уровень значимости различий ($p<0,05$) по сравнению с интактными свинками

В гладких мышцах сосудов большого круга кровообращения активация β -адренорецепторов стимулирует аденилатциклазу, которая обеспечивает наработку циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Последний активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу, которая за счет фосфорилирования киназы легких цепей миозина потенцирует расслабление гладкомышечных клеток. Нарработка цАМФ приводит к гиперполяризации мембраны, что также приводит к расслаблению ГМК. Однако, повышение концентрации цАМФ в гладкомышечных клетках легочной артерии не приводит к релаксации.

На основании полученных данных можно выделить ряд гипотез, объясняющих констрикторный эффект β – адреномиметиков:

- Возможные перекрестные реакции с α -адренорецепторами.
- Сокращение вызывает вырабатываемый при действии изопротеренола на β -адренорецепторы эндотелия и клеток микроокружения, которые в ответ могут высвобождать констрикторные факторы.
- Вазоконстрикторный эффект связан с кальций-независимым увеличением механического напряжения гладких мышц, обусловленным повышением внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов в ГМК.

Для изучения причин констрикторного действия изопротеренола на ГМК сегментов легочной артерии морских свинок были проведены эксперименты с использованием блокатора α -адренорецепторов – фентоламина. Все сегменты на фоне предобработки фентоламином в концентрации 5 мкМ отвечали дозозависимым сокращением на воздействие изопротеренола в концентрациях 1 нМ-100 мкМ. Максимальная амплитуда сокращения на

изопротеренол в концентрации 100 мкМ составила $132,6 \pm 5,5\%$ ($n=6$). При этом амплитуда сокращения сегментов на изопротеренол на фоне предобработки фентоламином хоть и была несколько ниже амплитуды сокращения сегментов на изопротеренол на фоне предсокращения 40 мМ КСl, но все же на всем диапазоне концентраций наблюдался констрикторный эффект. Полученные данные опровергают гипотезу о перекрестных реакциях с α -адренорецепторами.

Для выяснения механизмов сокращения сегментов легочной артерии морских свинок на изопротеренол были также проведены эксперименты с использованием активатора АЦ – форсколина. По данным проведенных экспериментов форсколин приводит к констрикторному ответу сегментов легочной артерии морских свинок, что не соответствует общепринятому мнению (рис. 14).

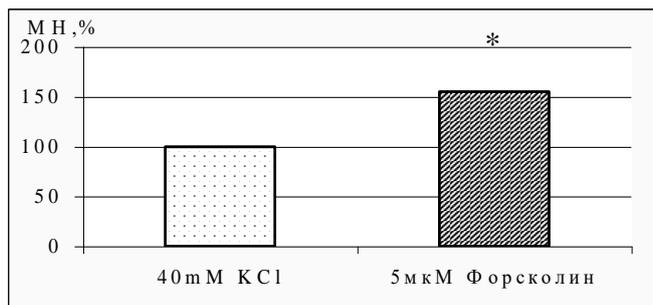


Рис. 14. Зависимость механического напряжения гладкомышечных сегментов легочной артерии морских свинок от концентрации форсколина
По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения.

Таким образом, исследование адренэргической системы регуляции тонуса гладких мышц легочной артерии показало сходство в реакциях на α -адреномиметики с таковыми сосудов большого круга кровообращения. Сенсibilизация животных приводит к снижению амплитуды сократительных реакций при воздействии фенилэфрина, что связано либо с уменьшением количества адренорецепторов, либо снижением чувствительности рецепторов.

Однако, принципиальной особенностью адренэргической регуляции гладких мышц легочной артерии являются зарегистрированные β -адренэргические контрактильные эффекты в ГМК сосудистой стенки. Как показали исследования, активация цАМФ-зависимой сигнальной системы в гладких мышцах ЛА способна оказывать констрикторный эффект. При этом достоверных различий амплитуды сократительных реакций на воздействие изопротеренола при сенсibilизации морских свинок, в сравнении с амплитудой сокращения сегментов ГМК легочной артерии здоровых животных, выявлено не было.

Наблюдаемые констрикторные реакции ГМК сегментов легочной артерии при воздействии форсколина свидетельствуют о цАМФ-зависимом механизме сокращения. Такой эффект цАМФ-зависимой системы может быть обусловлен продукцией вазоконстрикторных биологически активных веществ мигрирующими клетками (нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и др.), которые инфильтрируют стенки сосудов. Возможно так же, что здесь играет роль цАМФ-зависимое фосфорилирование кальциевых каналов, что приводит к активации кальциевой проводимости мембраны, и при определенных условиях в гладких мышцах сосудов малого круга кровообращения этот эффект становится превалирующим.

Роль циклических нуклеотидов в регуляции тонуса легочных артерий кролика

В проведенных исследованиях изучалось воздействие различных ингибиторов фосфодиэстераз: IBMX, винпоцетина, дипиридамола и теофиллина на сократительные реакции дезэндотелизированных гладкомышечных сегментов легочной артерии кроликов, как в исходном состоянии, так и в условиях предсокращения гиперкалиевым раствором Кребса.

В предыдущей серии экспериментов изопротеренол в концентрациях 0,1-1 мкМ вызывал расслабление интактных сегментов, но на воздействие препарата в концентрации от 10 до 100 мкМ все сегменты отвечали сокращением (рис. 12). В доступной литературе не обнаружено сообщений о β -адренэргических контрактильных реакциях ГМК сосудистой стенки. После предобработки сегментов блокатором гуанилатциклазы метиленовым синим полностью подавлялось расслабление сегментов, сократительный компонент при этом оставался неизменным (рис. 15). В гладких мышцах сосудов большого круга кровообращения активация β -адренорецепторов стимулирует аденилатциклазу, которая обеспечивает наработку циклического аденозинмонофосфата. Последний активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу, которая за счет фосфорилирования киназы легких цепей миозина потенцирует расслабление гладкомышечных клеток. Возможно, что в ГМК легочных артерий имеют место особенности оперирования и регуляторного воздействия цАМФ-зависимой сигнальной системы. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты экспериментов с проникающим аналогом циклического аденозинмонофосфата – дибутирил-цАМФ, который в концентрации 10 мкМ вызывал сокращение сегментов ЛА кроликов, предсокращённых гиперкалиевым раствором Кребса (40 мМ KCl), – $127,3 \pm 3,9 \%$ ($n=6$, $p<0,05$).

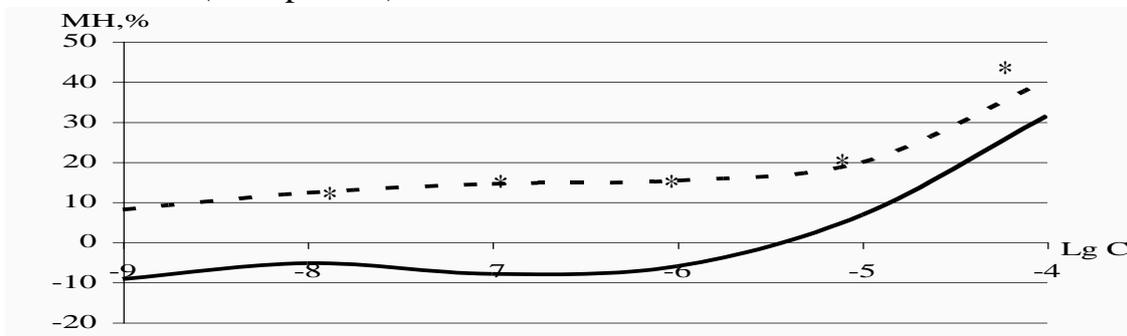


Рис. 15. Зависимость механического напряжения гладкомышечных сегментов легочной артерии кроликов от концентрации изопротеренола

По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации, по оси ординат – механическое напряжение гладкомышечного сегмента в процентах от амплитуды стандартного гиперкалиевого сокращения (40 мМ KCl). Сплошная линия – интактные сегменты; Пунктирная линия – сегменты, предобработанные метиленовым синим (10 мкМ).

* – уровень значимости различий ($p<0,05$) по сравнению с интактными сегментами.

Для исследования роли циклических нуклеотидов в регуляции тонуса легочных артерий кролика была проведена серия экспериментов с использованием блокаторов различных типов фосфодиэстераз (ФДЭ) циклических нуклеотидов.

В первом эксперименте было изучено влияние 1-изобутил 3-метилксантина (IBMX) – блокатора низкоселективной ФДЭ I типа. IBMX в концентрации 0,1-10 мкМ вызывал расслабление сегментов ЛА до $58,6 \pm 5,8\%$ ($n=9$, $p<0,05$) (рис. 16). После предобработки сегментов раствором метиленового синего (50 мкМ) эффект IBMX изменялся на проти-

воположный – регистрировалось сокращение сегментов ЛА до $152,6 \pm 3,5\%$ ($n=8$, $p<0,05$) при воздействии препарата в концентрации 0,1-1 мкМ.

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние теофиллина – блокатора ФДЭ, имеющей большее сродство к цАМФ. Все сегменты на воздействие теофиллина в концентрациях 0,01 – 10 мкМ отвечали дозозависимым расслаблением на $35,8 \pm 2,7\%$ ($n=9$, $p<0,05$). При исследовании эффектов теофиллина на фоне предобработки сегментов ЛА кролика раствором метиленового синего (50 мкМ), как и в предыдущем эксперименте, регистрировалось сокращение сегментов при концентрации теофиллина от 0,1 до 10 мкМ. Амплитуда сокращения достигала $82,8 \pm 3,8\%$ от амплитуды гиперкалиевой контрактуры ($n=7$, $p<0,05$), в более высоких концентрациях регистрировалось расслабление сегментов.

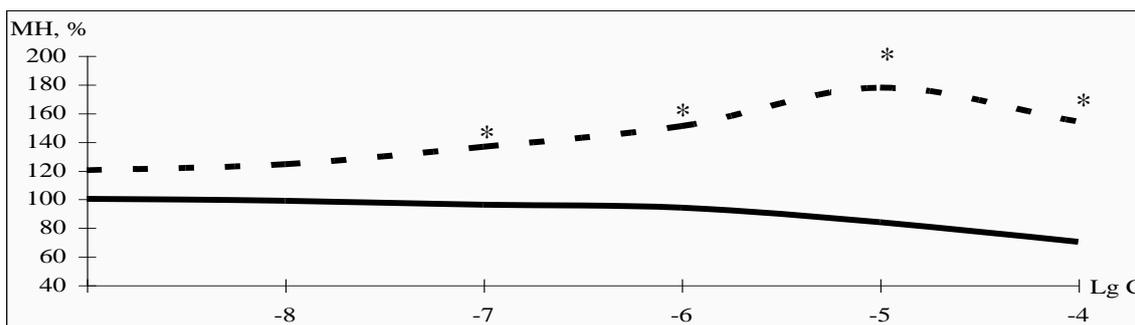


Рис. 16. Зависимость механического напряжения дезэндотелизированных гладкомышечных сегментов легочной артерии кроликов от концентрации IBMX. Предсокращение гиперкалиевым раствором Кребса

По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации, по оси ординат – механическое напряжение гладкомышечного сегмента в процентах от амплитуды стандартного гиперкалиевого сокращения (40 мМ КС1). Сплошная линия – интактные сегменты; Пунктирная линия – сегменты, предобработанные метиленовым синим (10 мкМ).

* – уровень значимости различий ($p<0,05$) по сравнению с интактными сегментами.

Дипиридамо́л (блокатор ФДЭ V типа) в концентрации 0,01-10 мкМ вызывал сокращение сегментов ЛА до $136,7 \pm 4,3\%$ ($n=8$, $p<0,05$), в более высоких концентрациях регистрировалось расслабление сегментов до исходного уровня (рис. 17). После предобработки сегментов блокатором гуанилатциклазы метиленовым синим (50 мкМ) сократительный эффект дипиридамола сохранялся, однако регистрировался лишь в концентрациях 1-20 мкМ (рис. 17). Аналогичные закономерности были выявлены и в экспериментах с кавинтоном (блокатор ФДЭ I типа) – интактные сегменты отвечали сокращением до $118,7 \pm 2,9\%$ ($n=7$, $p<0,05$) на воздействие последнего в концентрации 0,1 мкМ, а после предобработки сегментов метиленовым синим сокращение $113,5 \pm 2,2\%$ ($n=5$, $p<0,05$) регистрировалось при концентрации кавинтона 10 мкМ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация цАМФ-зависимой сигнальной системы в гладких мышцах ЛА при воздействии изопротеренола и негидролизуемых аналогов цАМФ способна оказывать констрикторный эффект.

При воздействии на интактные сегменты ЛА ингибиторов ФДЭ сокращение вызывали кавинтон и дипиридамо́л, которые обладают сродством к ФДЭ, гидролизующим преимущественно цГМФ. Угнетение активности гуанилатциклазы при воздействии метиленового синего приводило к увеличению концентрации названных препаратов, вызывающей максимальной сокращение. Неселективный ингибитор ФДЭ IBMX и ингибитор

ФДЭ, гидролизующей преимущественно цАМФ, теofilлин, вызывали снижение механического напряжения ГМК интактных сегментов ЛА. После предобработки метиленовым синим наблюдалась инверсия эффекта названных препаратов – во всех случаях регистрировался констрикторный эффект. Этот результат убедительно свидетельствует, что механизмы оперирования цАМФ – зависимой сигнальной системы в ГМК артерий малого круга, через посредство которой реализуются эффекты β -адреномиметиков, тесно связаны с активацией системы «гуанилатциклаза-цГМФ». Угнетение активности гуанилатциклазы оказывает значительное влияние на реализацию эффектов цАМФ в клетке.

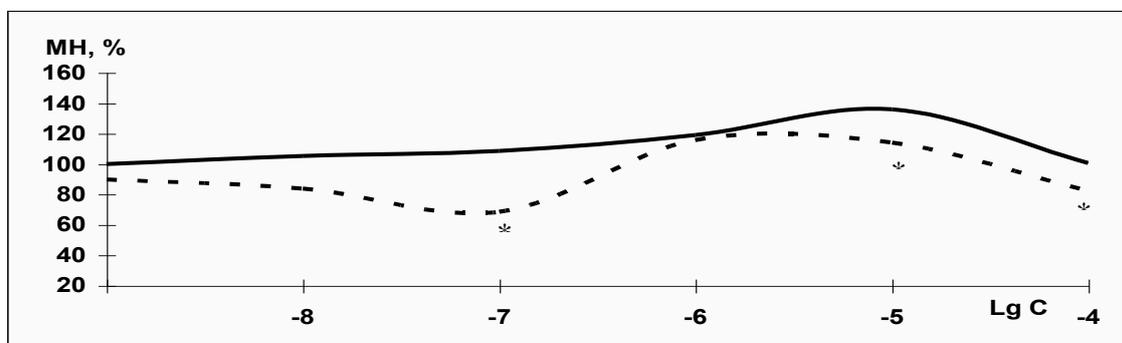


Рис. 17. Зависимость механического напряжения деэнтотелизированных гладкомышечных сегментов легочной артерии кроликов от концентрации дипиридамола. Предсокращение гиперкалиевым раствором Кребса

По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации, по оси ординат – механическое напряжение гладкомышечного сегмента в процентах от амплитуды стандартного гиперкалиевого сокращения (40 мМ КСl). Сплошная линия – интактные сегменты; Пунктирная линия – сегменты, предобработанные метиленовым синим (10 мкМ).

* – уровень значимости различий ($p < 0,05$) по сравнению с интактными сегментами.

По-видимому, механизмы цАМФ и цГМФ – зависимой регуляции сократительной активности гладкомышечных сегментов сосудов малого круга кровообращения кроликов осуществляются в тесном взаимодействии двух названных регуляторных систем. Ключевым звеном этого взаимодействия являются фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов. Соотношение активности различных субтипов данного фермента в ГМК может существенно модулировать адренэргические эффекты в стенке ЛА, вплоть до полной их инверсии. Эффекты ингибиторов фосфодиэстераз подтвердили нетипичный, противоречащий общепринятым представлениям рост сократительного ответа легочных артерий на ряд веществ – вазорелаксантов, ответственных за повышение внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов: изопротеренол, дипиридамола, винпоцетин и дибутирил-цАМФ, форсколин.

Особенности холинэргической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок

В первой серии экспериментов было изучено влияние агониста $M_{2,3}$ -холинорецепторов – пилокарпина на интактные сегменты контрольной группы. Пилокарпин вызывал дозозависимое сокращение всех интактных сегментов в концентрации 0,1 нМ – 100 мкМ. Максимум амплитуды сокращения наблюдался на 100 мкМ пилокарпина и составил $69,87 \pm 2,54$ % ($n=12$).

При действии пилокарпина на деэнтотелизированные сегменты контрольной группы также наблюдалось дозозависимое сокращение всех сегментов в ответ на концентрации

агониста 0,1 нМ – 100 мкМ. При этом максимальная амплитуда на 100 мкМ пилокарпина была достоверно меньше, чем у интактных сегментов и составила $43,27 \pm 3,24$ % ($p < 0,001$, $n=18$). Полученные данные позволяют предположить, что при холинэргической стимуляции бронхов эпителий может либо усиливать выработку констрикторных факторов, либо угнетать – релаксирующих, как и в случае адренэргической стимуляции при предсокращении гиперкалиевым раствором Кребса.

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние пилокарпина на интактные сегменты сенсibilизированных морских свинок. Все исследуемые сегменты отвечали сокращением, максимальная амплитуда составила $58,54 \pm 1,36$ % ($n=9$) на концентрацию пилокарпина 100 мкМ. Достоверной разницы между амплитудами сократительных реакций интактных сегментов контрольной и экспериментальной группами выявлено не было.

Увеличение механического напряжения также наблюдалось при воздействии пилокарпина на деэпителизованные сегменты сенсibilизированных морских свинок. Максимум сокращения наблюдался на 100 мкМ пилокарпина, амплитуда равнялась $74,46 \pm 3,71$ % ($n=13$). Достоверных различий между амплитудами сокращения интактных и деэпителизованных сегментов экспериментальной группы выявлено не было. Данные этой серии экспериментов также подтверждают угнетение функций эпителия при сенсibilизации.

Статистически значимое увеличение амплитуды сократительных реакций деэпителизованных сегментов экспериментальной группы было обнаружено по сравнению с деэпителизованными сегментами контрольной группы на концентрации пилокарпина 0,1 – 100 мкМ ($p < 0,05$) (рис. 18).

По всей видимости, при сенсibilизации повышается реактивность ГМ респираторного тракта на пилокарпин, что проявляется в увеличении амплитуды сократительных реакций деэпителизованных сегментов.

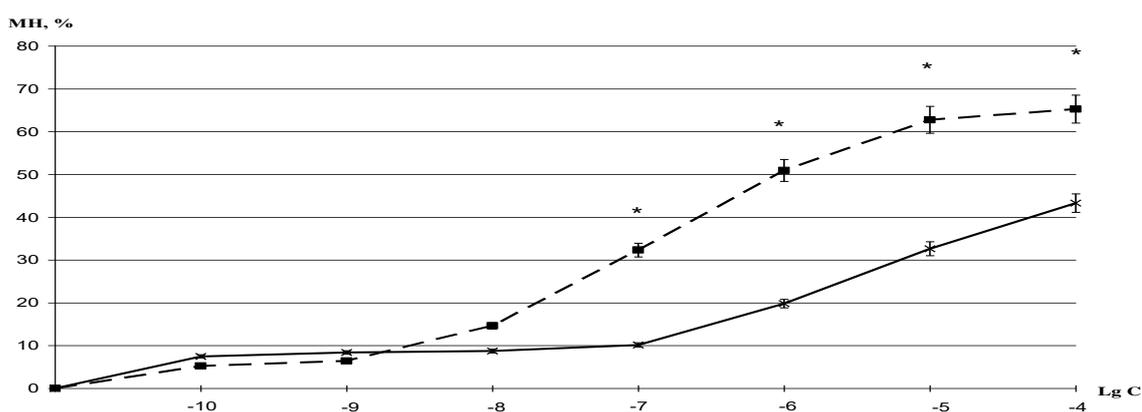


Рис. 18. Зависимость механического напряжения гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации пилокарпина (эпителий удалён)

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы. Пунктирная линия – сегменты сенсibilизированных морских свинок. По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса. По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации пилокарпина. * – статистическая значимость различий в амплитудах сократительных реакций сегментов здоровых и сенсibilизированных морских свинок.

Данные, полученные на интактных сегментах морских свинок контрольной группы, позволяют предположить, что при холинэргической стимуляции бронхов эпителий может вырабатывать констрикторные факторы, как и в случае адренэргической стимуляции при предсокращении гиперкалиевым раствором Кребса. Британскими учеными показано, что эпителий мышц при стимуляции может выделять ацетилхолин, который сокращает подлежащие гладкие мышцы [Moffatt J. D. et al., 2004], возможно, что этот механизм реализуется в этой серии экспериментов. При повреждении в результате сенсibilизации эпителий утрачивает такую способность.

Особенности гистаминэргической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок

Все сегменты отвечали на воздействие гистамина в концентрациях 0,01 мкМ – 100 мкМ дозозависимым сокращением. Максимальная амплитуда сокращения сегментов на гистамин в концентрации 100 мкМ составила $40,96 \pm 2,44$ % (n=15). При исследовании влияния гистамина на сократительную активность деэпителизированных сегментов контрольной группы было обнаружено, что сегменты отвечают дозозависимым сокращением на концентрации 0,01 мкМ – 100 мкМ (рис. 19). Максимальная амплитуда реакций на концентрацию гистамина 100 мкМ была выше амплитуды интактных сегментов и составила $53,65 \pm 1,82$ % (p<0,05, n=9).

В следующей серии экспериментов изучались сократительные реакции интактных сегментов сенсibilизированных морских свинок на воздействие гистамина. Все исследуемые сегменты отвечали сокращением на воздействие гистамина в концентрациях 0,1 нМ – 100 мкМ (рис. 19), максимальная амплитуда сокращения составила $73,36 \pm 5,32$ % (n=13). При этом на концентрации гистамина 10 и 100 мкМ, амплитуда сокращения сегментов экспериментальной группы была достоверно выше (p<0,05) амплитуды сокращения сегментов контрольной группы (рис. 19).

В условиях сенсibilизации овальбумином в бронхах повышена экспрессия рецепторов гистамина первого типа [Richard W. C. et al., 1999]. Этим можно объяснить более выраженный сократительный эффект гистамина на гладкие мышцы бронхов, полученных от животных экспериментальной группы. При исследовании гистаминэргических сократительных реакций гладких мышц деэпителизированных сегментов воздухоносных путей сенсibilизированных морских свинок было выявлено, что гладкие мышцы отвечают дозозависимым сокращением на воздействие гистамина в концентрациях 0,1 нМ – 100 мкМ. Максимальная амплитуда сокращения сегментов составила $89,74 \pm 6,49$ % (n=18).

Амплитуда сокращения деэпителизированных сегментов экспериментальной группы была несколько выше амплитуды сокращения интактных сегментов, но это различие не было достоверным. Вероятно, это связано с тем, что при сенсibilизации морских свинок овальбумином эпителий повреждается в первую очередь и снижается продукция релаксирующих факторов [Busse W.W., Sedgwick J.B., 1992; Zou J. et al., 2002].

Таким образом, различия в величине амплитуды гистаминэргических сократительных реакций интактных и деэпителизированных сегментов воздухоносных путей морских свинок в условиях сенсibilизации отсутствуют. При этом амплитуда сокращения сегментов без эпителия, выделенных от сенсibilизированных животных, была достоверно выше амплитуды сокращения деэпителизированных сегментов контрольной группы

на концентрации гистамина 10 и 100 мкМ ($p < 0,05$) (рис. 19). Этот факт также может объясняться увеличением количества рецепторов к гистамину в мембране ГМ воздухоносных путей в условиях сенсibilизации. Подобная картина была получена и в серии экспериментов, при исследовании влияния гистамина на сегменты, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса.

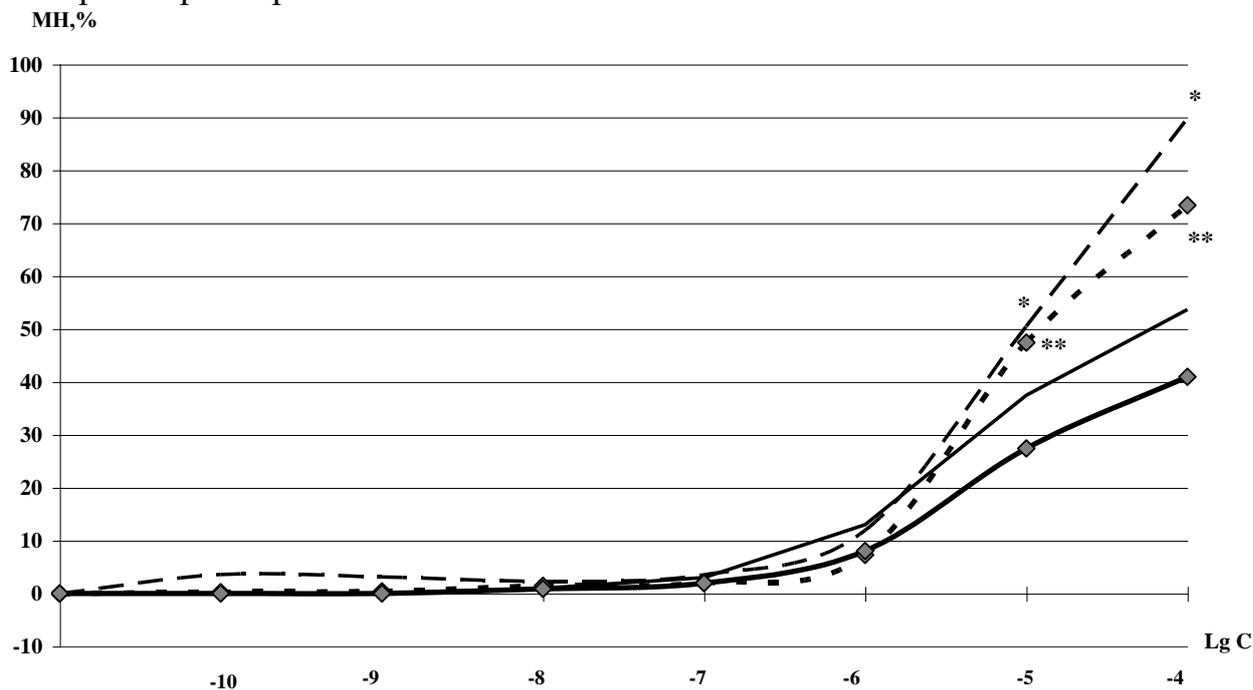


Рис. 19. Зависимость механического напряжения гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы. Пунктирная линия – сегменты сенсibilизированных морских свинок. Линии с серым ромбовидным маркером – эпителий сохранен. По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса. По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации гистамина.

*, ** – статистическая значимость различий в амплитудах сократительных реакций сегментов морских свинок контрольной группой и сенсibilизированных.

После удаления эпителия у сегментов контрольной группы, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, наблюдался дозозависимый прирост механического напряжения на воздействие гистамина в концентрациях 10 нМ – 100 мкМ, максимальная амплитуда сокращения деэпителизированных сегментов составила $121,3 \pm 3,36$ % ($n=10$). При сравнении амплитуды сократительных реакций интактных и деэпителизированных сегментов морских свинок контрольной группы отмечается повышение реактивности после удаления эпителия на концентрации гистамина 1 нМ – 100 мкМ ($p < 0,05$). Полученные результаты, по-видимому, связаны со способностью эпителия продуцировать релаксирующие факторы, которые нивелируют сократительные эффекты гистамина.

В норме тонус гладкой мускулатуры бронхов в основном определяется динамическим дисбалансом образующегося в эпителии оксида азота и секретируемого тучными клетками гистамина, то есть при действии гистамина эпителий может вырабатывать релаксирующие факторы, такие как оксид азота, и тем самым уменьшать амплитуду контрактильных реакций [Ellis J. L., Conanan N., 1994]. При сенсibilизации происходит нарушение целостности эпителия, возникают необратимые органические изменения

стенки воздухоносных путей, это ведет к дефициту нитроксидаэргической бронхорелаксации [Сепиашвили Р. И. и др., 2003]. Таким образом, это может быть причиной отсутствия различий сократительных реакций между сегментами с эпителием и без эпителия у sensibilizированных морских свинок, тогда как у интактных морских свинок при сохраненной функции эпителия амплитуда сокращения сегментов ниже, чем после его удаления.

Особенности адренэргической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок

У интактных сегментов животных контрольной группы β_2 -агонист сальбутамол в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ вызывал дозозависимое снижение механического напряжения (рис. 20), максимальная величина расслабления на концентрацию сальбутамола 10 мкМ в контрольной группе достигала $81,42 \pm 2,66$ % от амплитуды предсокращения (n=14).

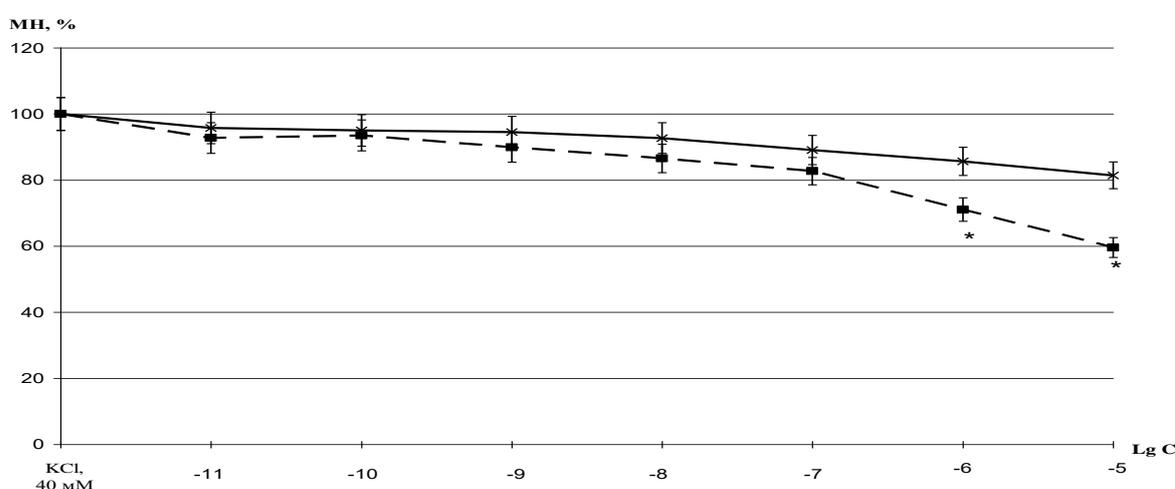


Рис. 20. Зависимость механического напряжения гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, от концентрации сальбутамола

Сплошная линия – сегменты с сохраненным эпителием. Пунктирная линия – сегменты без эпителия. По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор Кребса. По оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации сальбутамола. * – статистическая значимость различий в амплитудах ответных реакций сегментов с сохраненным эпителием и без эпителия.

При изучении воздействия сальбутамола на деэпителизованные сегменты морских свинок контрольной группы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса, было выявлено дозозависимое расслабление всех сегментов на концентрации 0,01 нМ – 10 мкМ, максимальная амплитуда расслабления составила $59,59 \pm 3,05$ % (n=11). При этом степень расслабления на воздействие сальбутамола была достоверно больше (рис. 20) у деэпителизованных сегментов на концентрации 1 – 10 мкМ (p<0,05).

Таким образом, удаление эпителия приводило к усилению дилатационных реакций сегментов воздухоносных путей морских свинок контрольной группы. Можно предположить, что катехоламины на фоне предсокращения гиперкалиевым раствором Кребса модулируют влияние эпителия либо за счет угнетения выработки релаксирующих факторов, либо – усиления продукции констрикторных, на роль которых претендуют простагландины, лейкотриены.

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние салбутамола на интактные сегменты сенсibilизированных овальбумином морских свинок, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса. Интактные сегменты отвечали дозозависимым расслаблением на воздействие салбутамола в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ, максимальная величина расслабления достигала $70,42 \pm 2,06$ % от амплитуды предсокращения ($n=8$). На концентрации салбутамола 1 мкМ и 10 мкМ дилатационные реакции интактных сегментов экспериментальной группы были достоверно сильнее, чем сегментов контрольной группы.

При исследовании влияния салбутамола на деэпителизированные сегменты сенсibilизированных морских свинок было выявлено, что все сегменты отвечали дозозависимым расслаблением на воздействие салбутамола в концентрациях 0,1 нМ – 10 мкМ. Максимальное расслабление на воздействие салбутамола в концентрации 10 мкМ составило $77,99 \pm 3,41$ % от амплитуды предсокращения ($n=14$). При сравнении величины расслабления интактных и деэпителизированных сегментов экспериментальной группы достоверной разницы выявлено не было. Это может быть связано с тем, что при повреждении, связанном с развитием патологического состояния, эпителий теряет способность модулировать ответные реакции гладких мышц на α -адренэргические воздействия [Brottman G. M. et al., 1996]. Но при сравнении амплитуд расслабления деэпителизированных сегментов контрольной и экспериментальной групп было обнаружено достоверно более сильное расслабление сегментов животных контрольной группы на концентрации салбутамола 1 – 10 мкМ ($p < 0,05$). Таким образом, при сенсibilизации изменяется адренэргическая регуляция в сторону уменьшения дилатационных реакций.

β_2 -агонисты рассматриваются как функциональные агонисты, обуславливающие обратное развитие бронхоконстрикции вне зависимости от имевшего место констрикторного воздействия [Jonson M., Coleman R., 1995], что и наблюдали мы в своей работе. Это обстоятельство представляется чрезвычайно важным, так как многие медиаторы (медиаторы воспаления и нейротрансмиттеры) обладают бронхоконстрикторным действием. При сенсibilизации эпителий «выключается» из адренэргических реакций, не оказывая существенного вклада в ответные реакции, что может быть объяснено повреждением эпителия морфологического и функционального характера и потерей им эндокринных функций [Busse W. W., Sedgwick J. B., 1992; Zou J. et al., 2002]. Эпителий утрачивает способность модулировать ответные реакции гладких мышц на различные воздействия. Таким образом, это может быть причиной отсутствия различий между сократительными реакциями сегментов с эпителием и без эпителия у сенсibilизированных морских свинок.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ГЛАДКИХ МЫШЦ ЛЕГОЧНЫХ АРТЕРИЙ И ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ БРОНХОСПАЗМА

Особенности мембранного потенциала гладкомышечных клеток легочных артерий морских свинок

Изучение электромеханического сопряжения сосудистых гладких мышц методом сахарозного моста представляет большую трудность из-за особенностей морфологиче-

ского строения сосудов, описываемых в литературе и в настоящем исследовании. При приготовлении из сосуда гладкомышечной полоски приходится перерезать практически все концентрические и часть косых гладкомышечных клеток, остаются целыми лишь незначительная часть косых ГМК. Этот факт может объяснить практически полное отсутствие сократительных реакций гладкомышечных полосок, исследуемых данным методом. Еще одним фактором, затрудняющим изучение электрической активности сосудистых гладких мышц, является высокая проницаемость ГМК легочной артерии для ионов K^+ . Но не смотря на описанные выше сложности нам удалось провести исследование гладких мышц легочной артерии методом «двойного сахарозного моста».

При исследовании влияния электрической стимуляции на гладкомышечные полоски легочной артерии интактных и сенсibilизированных овальбумином морских свинок отмечено отсутствие потенциалов действия на всем диапазоне стимуляции. Однако отмечаются явления выпрямления – при увеличении амплитуды стимулирующего тока растет амплитуда анэлектротонов и в меньшей степени – амплитуда катэлектротонов. Статистически значимых различий между группами свинок не наблюдалось. Однако при применении блокатора калиевых каналов ГМК – тетраэтиламмония гидрохлорида (ТЭА) в концентрации 50 мМ происходит незначительная деполяризация мембран гладких мышц легочной артерии интактных животных и при увеличении силы раздражающего стимула (до 1,5 – 1,7 мкА) происходит возникновение потенциала действия. При сенсibilизации морских свинок овальбуминов ПД не возникает вообще.

Таким образом, полученные данные показывают, что при развитии сенсibilизации происходят изменения не только со стороны воздухоносных путей, но изменения носят системный характер и изменяют ионную проницаемость мембран легочных артерий.

Особенности ионной проводимости мембран эритроцитов

При исследовании мембранного потенциала эритроцитов крови морских свинок методом рН-метрии были получены следующие данные. Потенциал покоя мембраны эритроцитов здоровых свинок составил $-7,25 \pm 1,12$ мВ, величина гиперполяризации на аппликацию кальциевого ионофора А23187 составила $-50,31 \pm 6,50$ мВ. Скорость развития гиперполяризации составила $3,62 \pm 0,87$ мэкв OH^+ /мин · л клеток, скорость восстановления мембранного потенциала составила $1,79 \pm 0,21$ мэкв H^+ /мин · л.

При моделировании условий воспалительного процесса, в результате овальбуминовой сенсibilизации морских свинок, произошли некоторые изменения потенциала мембран эритроцитов морских свинок и скоростей развития гиперполяризации и восстановления. Так мембранный потенциал покоя незначительно возрос по амплитуде и составил $-8,50 \pm 1,45$ мВ, величина гиперполяризации так же незначительно возросла по амплитуде до значений $-54,58 \pm 11,58$ мВ. Однако, статистически значимо возросли скорости ответов: для гиперполяризации скорость составила $5,99 \pm 1,80$ мэкв OH^+ /мин · л ($z = 2,487$, $p = 0,0128$), а скорость восстановления мембранного потенциала (реполяризации) составила $2,14 \pm 0,32$ мэкв H^+ /мин · л ($z = 2,116$, $p = 0,0342$).

Таким образом, полученные данные позволяют сделать заключение, что при сенсibilизации морских свинок овальбумином происходит увеличение кальций-активируемого K^+ тока. Эти изменения приводят к снижению способности эритроцитов

транспортировать газы крови, что характеризует снижение оксигенации крови и увеличение содержания углекислого газа при бронхоспастических состояниях.

Биохимия крови морских свинок

Особенности газового состава крови морских свинок

Нами было проведено исследование газового состава крови. С помощью газового автоматического анализатора определили несколько основных параметров, отражающих транспортную функцию крови морских свинок для кислорода и углекислого газа (Таблица 1). Кровь забиралась сразу после умерщвления животного (на 1 – 2-ой минуте) внутрисердечно, из левого желудочка сердца.

Таблица 1

Показатели газового, ионного и биохимического состава артериальной крови интактных и сенсibilизированных морских свинок

| Показатель крови | М (инт.) | М (сенс.) | n (инт.) | n (сенс.) | ±m (инт.) | ±m (сенс.) | Z | p-level * |
|---|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------|---------------|--------|-----------|
| PCO ₂ , (мм.рт.ст.) | 40,618 | 60,033 | 11 | 12 | 1,449 | 3,163 | -3,570 | 0,00036 |
| PO ₂ , (мм.рт.ст.) | 61,264 | 41,575 | 11 | 12 | 4,499 | 7,325 | 2,093 | 0,03639 |
| HCO ₃ ⁻ , (мМоль/л) | 25,327 | 32,500 | 11 | 12 | 1,314 | 2,153 | -2,708 | 0,00677 |

- Статистическая значимость различий между группами интактных (инт.) и сенсibilизированных овальбумином (сенс.) морских свинок, М – среднее, m – ошибка среднего.

Как видно из таблицы, у сенсibilизированных животных статистически значимо снижается напряжение кислорода и возрастает напряжение углекислого газа крови, увеличивается концентрация гидрокарбонат-ионов.

Так, в результате сенсibilизации и развития бронхоспастического состояния (моделирование бронхиальной астмы) происходит снижение насыщения артериальной крови кислородом с 61,264±4,499 мм. рт. ст. до 41,575±7,325 мм. рт. ст. и увеличение напряжения углекислого газа с 40,61±1,449 мм. рт. ст. до 60,033±3,163 мм. рт. ст.. Соответственно увеличению напряжения углекислого газа увеличивается и концентрация гидрокарбонат-ионов на 28%.

Полученные данные показывают, что в результате сенсibilизации морских свинок развивается не только гиперреактивность воздухоносных путей, но и появляются другие признаки, характерные модели бронхоспастических состояний – наблюдаются системные нарушения, сопровождающиеся снижением оксигенации крови. Это позволяет утверждать, что была выбрана адекватная модель на морских свинках, процесс сенсibilизации был проведен успешно, развившееся изменение физиологического состояния носит системный характер.

Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у морских свинок

Состояние перекисного окисления липидов оценивали по уровню конечных метаболитов – ТБК-реактивных продуктов. Так, содержание ТБК-реактивных продуктов в плазме крови повышалось на 119,35% при сенсibilизации овальбумином (p=0,000370) по сравнению с соответствующими показателями в группе интактных свинок.

Важную роль в антиоксидантной защите играют SH-содержащие соединения, к которым относится восстановленный глутатион [Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.,

1990]. Основной антиоксидантный эффект восстановленного глутатиона реализуется не только за счет наличия в его структуре SH-групп, но посредством его участия в качестве субстрата в работе глутатинзависимых ферментов [Новицкий В.В., 2004; Udupi V., Rice-Evans C., 1992; Siems W., Brenke R., 1992].

Сенсибилизация овалбумином сопровождалась выраженным снижением (на 37,2%, $p=0,0097$) концентрации восстановленного глутатиона по сравнению с концентрацией установленной у интактных животных. Механизм антиоксидантного действия восстановленного глутатиона заключается в том, что SH-группа этого вещества окисляется гораздо легче, чем SH-группы в белковых молекулах, и, таким образом, реализуется защита биополимеров от окислительной модификации [Зайцев В.Г., Закревский В.И., 1998].

При интенсификации процессов перекисного окисления необходима адекватная скорость регенерации в клетках восстановленного глутатиона с помощью глутатионредуктазы [Новицкий В.В., 2004]. В организме млекопитающего уровень восстановленного глутатиона поддерживается как синтезом *de novo*, так и восстановлением окисленной формы этого соединения в сопряженной системе НАДФН•Н⁺-глутатионредуктаза [Зенков Н.К., 2001; Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 1990].

Сенсибилизация овалбумином сопровождалась увеличением активности глутатионредуктазы на 72,3% ($p=0,0007$) относительно активности установленной у интактных животных. Данный факт объясняется не только возрастающей потребностью в восстановленном глутатионе, но и дополнительной необходимостью элиминировать накапливающийся окисленный глутатион, обладающий прямым повреждающим и токсическим действием на белковые структуры клетки [Аруин М., 2000; Boldyrev A. et al., 1997].

Регенерируемый в глутатионредуктазной реакции восстановленный глутатион, активно расходовался в качестве субстрата для эффективной работы глутатионпероксидазы, направленной на инактивацию гидроперекисей липидов, чрезмерно образующихся при интенсификации перекисного окисления липидов в ответ на сенсибилизацию овалбумином организма животного.

Нами выявлено увеличение активности глутатионпероксидазы в эритроцитах на 136,1% ($p=0,0017$) на фоне сенсибилизации овалбумином относительно данных у интактных животных. Глутатионпероксидаза является основным ферментом антиперекисной защиты в клетках при неинфекционном воспалении [Garcia Callejo F.J. et al., 2002]. Ее оптимальное функционирование по нейтрализации избыточных количеств H₂O₂ осуществляется в комплексе с другими ферментами, в частности – с каталазой [Eaton J.W., 1991].

В защите клеток от окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями H₂O₂ ключевая роль принадлежит каталазе [Eaton J.W., 1991]. В наших исследованиях происходило увеличение активности каталазы на 168,9% ($p=0,003$) у животных сенсибилизированных овалбумином относительно значений активности зарегистрированной у интактных свинок. При высоком содержании перекиси водорода акцент в работе глутатионпероксидазы, вероятно, смещается в сторону преимущественного использования в качестве субстрата гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот. Так, ингибируется этап инициации перекисного окисления липидов и глутатионпероксидаза оказывает мембранопротекторный эффект.

Таким образом, установлено увеличение конечного продукта перекисного окисления липидов и активацию компонентов антиоксидантной защиты в ответ на сенсibilизацию овальбумином. Это необходимо для осуществления жизненно важных внутриклеточных процессов. Необходимо отметить, что установленный расход внутриклеточного восстановленного глутатиона, активация глутатионзависимых ферментов, а также каталазы может расцениваться как формирование адаптационной реакции организма животного в ответ на сенсibilизацию овальбумином.

Гистологические изменения в стенке воздухоносных путей морских свинок при формировании гиперреактивности бронхов

На гистологических препаратах определялась слизистая, собственная пластинка слизистой, волокнисто-хрящевая оболочка. В слизистой оболочке эпителиальный пласт сохраняет свою целостность. Среди эпителиальных клеток преобладали эпителиоциты с признаками дистрофии (у них отсутствовали реснички на апикальной стороне, грубая зернистость в цитоплазме, глыбчатость хроматина, пикноз ядра). Базальная мембрана извита и местами утолщена (косвенное свидетельство отложения в ней иммунных комплексов).

В собственной пластинке слизистой оболочки мощный отек, скопление отечной жидкости отмечается под базальной мембраной и периваскулярно. Полнокровие сосудов отмечается на всем протяжении собственной пластинки слизистой оболочки, эндотелиальные клетки в капиллярах набухшие, отмечается стаз полиморфноядерных лейкоцитов внутри сосудов (среди лейкоцитов определялись и эозинофилы). Венозная гиперемия, мышечная стенка в некоторых венах гипертрофированна, что свидетельствует о хроническом застойном процессе в бронхах. В клеточном инфильтрате пластинки слизистой оболочки определялись дегранулированные эозинофилы и тучные клетки, которые локализовались, преимущественно, под базальной мембраной. Зоны локализации клеточного инфильтрата сочетались с эксфолиацией бронхиального эпителия в просвет бронха. Мышечные волокна собственной пластинки слизистой оболочки гипертрофированны.

Особенности согласованной регуляции механического напряжения гладких мышц легочной артерии и воздухоносных путей

Учитывая все особенности функционирования гладких мышц легочной артерии и воздухоносных путей, а так же морфологическую и гистологическую близость ГМК артерий и бронхов, общее пространство соединительной ткани (куда мигрируют клетки из просвета легочной артерии и слизистой бронхов) возникают предпосылки рассматривать регуляцию сократительной активности согласованной.

Обобщая полученные ранее результаты и морфологическую общность легочной артерии и бронхов следует рассмотреть согласованность сократительных реакций легочных сосудов и воздухоносных путей на различные ФАВ и БАВ. Так на неселективный агонист β -адренорецепторов изопротеренол и легочная артерия и бронхи, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса, отвечают сокращением. При этом ГМК легочной артерии отвечают большей амплитудой сокращения, чем бронхи. В условиях сенсibilизации морских свинок овальбумином происходит увеличение сократительного ответа легочных артерий на β -адренэргическую стимуляцию, тогда как ГМК воздухоносных путей сенсibilизированных животных отвечают дилатацией (рис. 21). Полученные результаты

свидетельствуют о развитии гиперреактивности легочных артерий к адренэргическим воздействиям с одной стороны, и в то же время инверсии сократительного ответа со стороны гладких мышц бронхов. Это может иметь двойное значение: дилатационный ответ воздухоносных путей можно рассматривать как адаптационную реакцию на возникновение бронхоспастических состояний, а усиление констрикторного ответа легочных артерий – как одно из звеньев патогенеза осложнений при бронхоспастических состояниях – развитие легочной гипертензии.

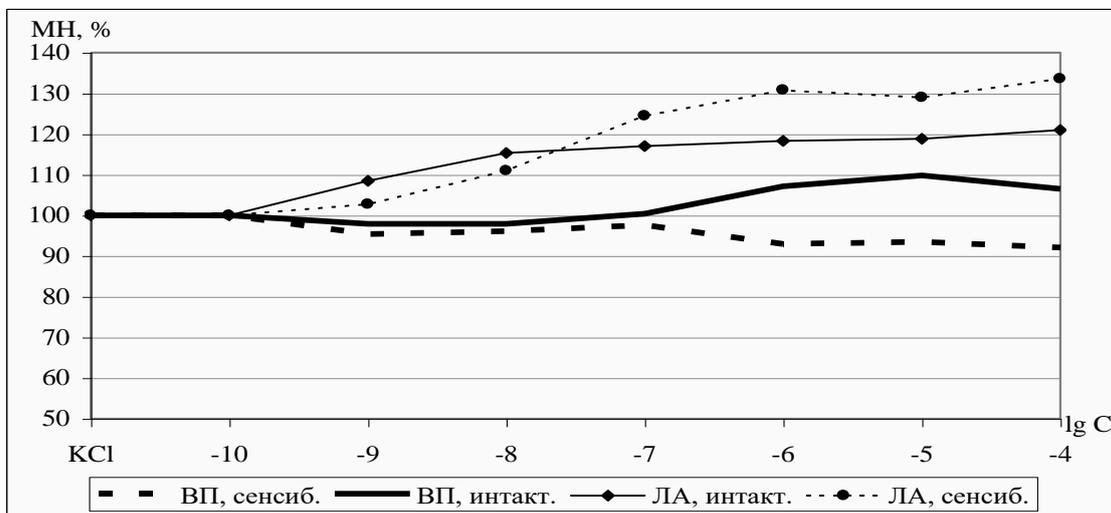


Рис. 21. Зависимость механического напряжения дезэнтотелизированных предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса гладкомышечных сегментов воздухоносных путей (ВП) и легочных артерий (ЛА) от концентрации изопротеренола у интактных и сенсibilизированных морских свинок

Это можно объяснить различием экспрессии холинорецепторов на мембране ГМК легочной артерии и бронхов. Обращает на себя внимание согласованность изменений при моделировании на морских свинках бронхоспастических состояний: как ГМК воздухоносных путей, так и легочных артерий на аппликацию пилокарпина отвечают большей амплитудой сокращения (рис. 22).

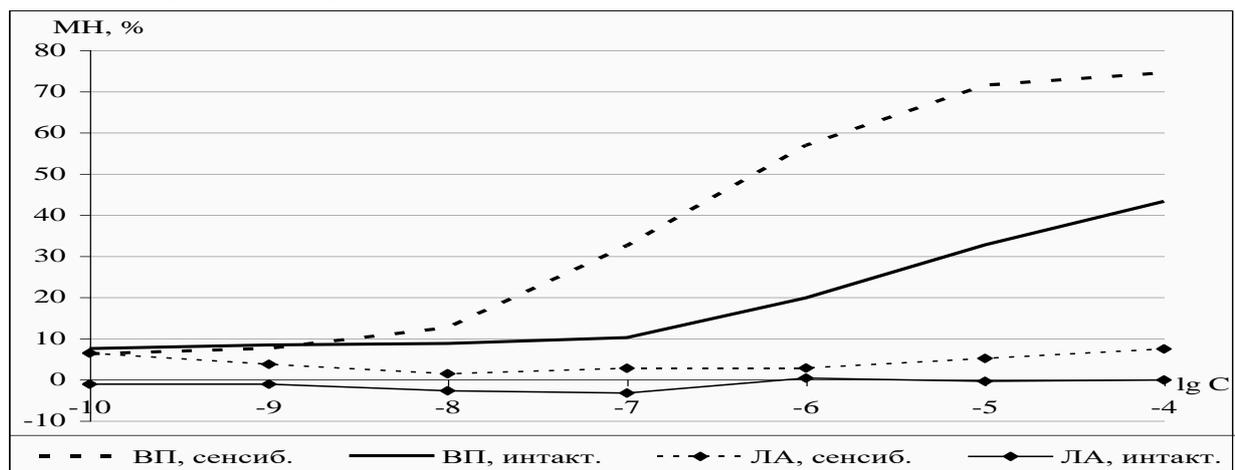


Рис. 22. Зависимость механического напряжения дезэнтотелизированных гладкомышечных сегментов воздухоносных путей (ВП) и легочных артерий (ЛА) от концентрации пилокарпина у интактных и сенсibilизированных морских свинок

Такое изменение чувствительности гладких мышц к холинэргическому воздействию объясняется увеличением экспрессии холинорецепторов на мембране ГМК – т.е. развива-

ется гиперреактивность. При исследовании гистаминэргической регуляции тонуса гладких мышц воздухоносных путей и сосудов легких отмечается большая чувствительность к гистамину бронхов, нежели легочной артерии (рис. 23). При сенсibilизации свинок овалбумином отмечается рост амплитуды сократительных ответов на аппликацию гистамина как ГМК легочных артерий, так и ГМК воздухоносных путей (рис. 23). Учитывая, что гистамин является медиатором воспаления, и развивается гиперреактивность гладких мышц легочной артерии и бронхов, можно заключить, что эти изменения имеют патологический характер и являются патогенетическими звеньями в развитии заболеваний аппарата внешнего дыхания.

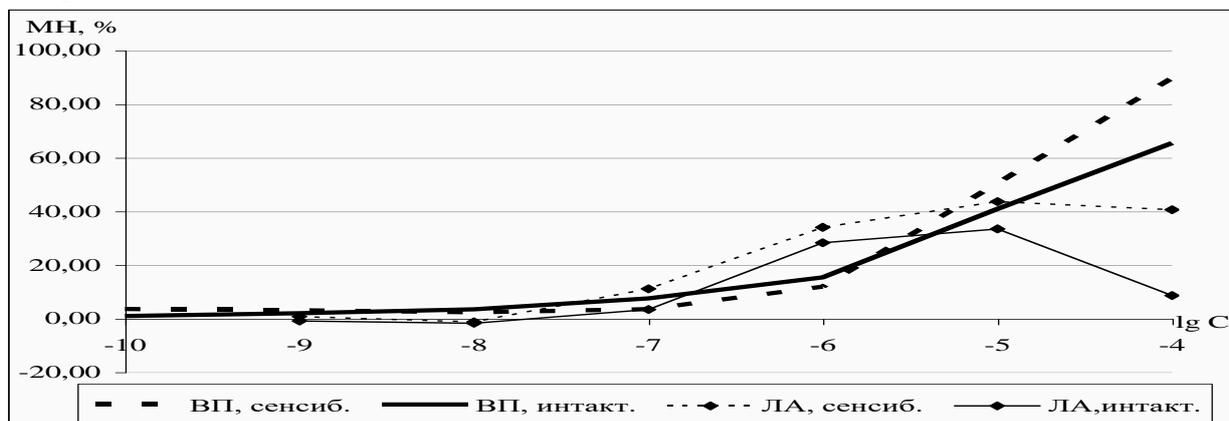


Рис. 23. Зависимость механического напряжения дезэндотелизированных гладкомышечных сегментов воздухоносных путей (ВП) и легочных артерий (ЛА) от концентрации гистамина у интактных и сенсibilизированных морских свинок

Рассматривая серотонинэргическую регуляцию сократительной активности ГМК легочных артерий и бронхов можно отметить низкую чувствительность этих гладких мышц к серотонину, тогда как на воздействие других ФАВ сократительные реакции имеют большую амплитуду. ГМК легочной артерии на добавление серотонина начиная от 0,01 мкМ до 100 мкМ отвечают сокращением, максимальная амплитуда которого достигает 23% от величины гиперкалиевой контрактуры. Бронхи оказались менее восприимчивы – всем протяжении концентраций добавляемого серотонина не наблюдается достоверного изменения механического напряжения гладких мышц (рис. 24).

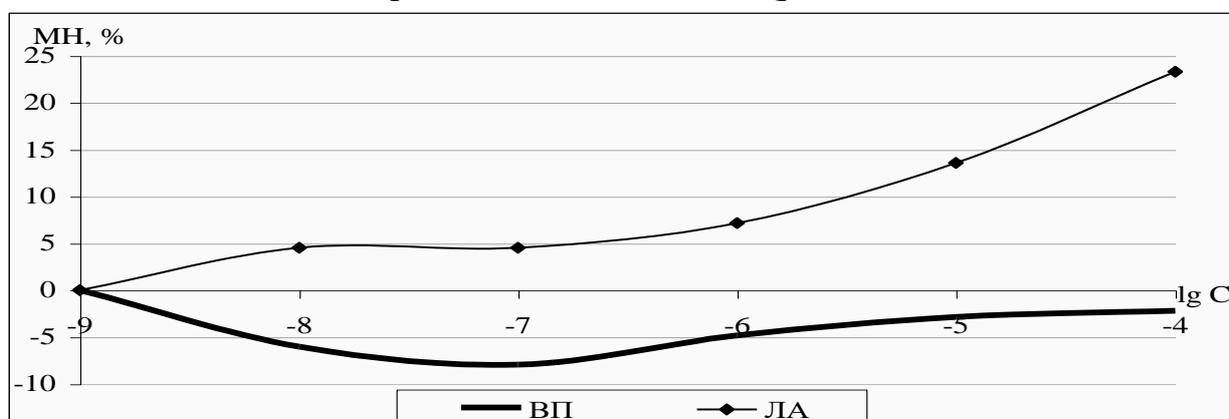


Рис. 24. Зависимость механического напряжения гладкомышечных сегментов с сохраненным эпителием(эндотелием) воздухоносных путей (ВП) и легочных артерий (ЛА) интактных морских свинок от концентрации серотонина

Таким образом, на выброс серотонина при воспалительных реакциях клетками микроокружения в большей степени будет изменяться тонус легочных сосудов, нежели бронхов. При этом легочная артерия отвечает на серотонинэргическое воздействие вазоконстрикцией.

Ранее уже рассматривались особенности регуляции сократительной активности гладких мышц циклическими нуклеотидами. Для этого использовались такие подходы изменения внутриклеточной концентрации цАМФ и цГМФ как ингибирование различных видов фосфодиэстераз, активация гуанилат циклазы нитропруссидом натрия, активация аденилатциклазы форсколином. Все названные вещества являются БАВами. Был применен еще один подход – использовали нитрозоглутатион. Это вещество является ФАВ, наименее ядовито для клетки, проникает через мембрану и может образовываться в клетке (эндогенное соединение). Нитрозоглутатион образуется из глутатиона и оксида азота. Известно, что NO – короткоживущий радикал, но его соединение с глутатионом намного более устойчиво. Предполагается транспортная и депонирующая NO функция нитрозоглутатиона, так как он может легко распадаться на глутатион и оксид азота в цитоплазме клетки. Эффекты нитрозоглутатиона сходны эффектам NO – происходит активация гуанилатциклазы и повышение внутриклеточной концентрации цГМФ.

Полученные результаты применения нитрозоглутатиона для повышения внутриклеточной концентрации циклического ГМФ подтверждают данные, полученные при использовании других подходов. На воздействие нитрозоглутатиона предсокращенные ГМК легочных артерий отвечают сократительной реакцией, амплитуда которой растет на диапазоне концентраций от 0,01 мкМ до 10 мкМ и достигая максимума $123 \pm 11\%$ ($n=11$), затем на концентрацию 100 мкМ падает до $111,1 \pm 8,4\%$ ($n=11$) от амплитуды гиперкалиевого сокращения. Сенсбилизация приводит к снижению констрикторных ответов (рис. 25). В то же время, бронхи на воздействия нитрозоглутатиона отвечают противоположно легочным артериям. На всем диапазоне концентраций нитрозоглутатиона наблюдается релаксация, в максимуме достигающая $83 \pm 4\%$ от величины предсокращения гиперкалиевым раствором Кребса ($n=12$).

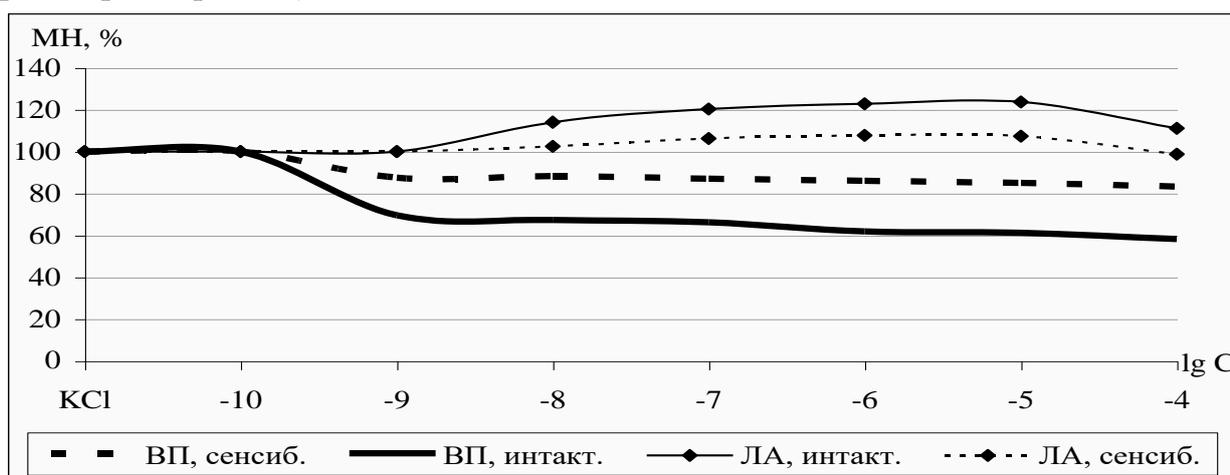


Рис. 25. Зависимость механического напряжения деэндотелизированных предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса гладкомышечных сегментов воздухоносных путей (ВП) и легочных артерий (ЛА) от концентрации нитрозоглутатиона у интактных и сенсбилизированных морских свинок

Сенсибилизация морских свинок овалбумином приводит к ослаблению релаксирующего влияния нитрозоглутатиона на гладкие мышцы воздухоносных путей (рис. 25). Полученные данные можно трактовать следующим образом: при развитии таких бронхоспастических состояний, например, таких как бронхиальная астма, сопровождается увеличенной выработкой оксида азота индуцибельными NO-синтетазами. Наблюдаемое снижение сократительного ответа легочных артерий на воздействие нитрозоглутатиона при таких состояниях является адаптационной реакцией гладкомышечных клеток, цель которого предотвратить излишнее повышение давления в легочном сосудистом русле. Снижение же релаксирующих ответов наблюдаемое на бронхах носит, скорее всего, декомпенсационный характер. Оба процесса снижения чувствительности к нитрозоглутатиону в результате моделирования бронхоспастических состояний могут являться следствием развития толерантности гладкомышечных клеток в условиях повышенной выработки оксида азота.

Таким образом, рассматривая различия и сходства регуляции сократительной активности гладких мышц легочной артерии и воздухоносных путей можно отметить следующее. Гладкомышечные клетки легочной артерии обладают большей склонностью к сократительным ответам на различные воздействия, тогда как ГМК воздухоносных путей более склонны к дилатации. Склонность легочной артерии к констрикции находит отражение в высокой частоте встречаемости легочной гипертензии различной этиологии, как самостоятельного заболевания, так и осложнения при различных патологиях аппарата внешнего дыхания. Большая подверженность ГМК бронхов к дилатации имеет приспособительно-адаптационное значение, так как организму при различных воздействиях не выгодно отвечать бронхоконстрикцией в условиях возрастающей потребности в кислороде. Однако, полученные экспериментальные данные на сенсибилизированных морских свинках, показывают недостаточность и/или несостоятельность адаптационной реакции, быстро переходящей в декомпенсацию, что сопровождается гиперреактивностью ГМК трахеи и бронхов, приводит к бронхоконстрикции со всеми вытекающими последствиями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все выше изложенное позволяет заключить, что в сосудах малого круга кровообращения просматривается предрасположенность к повышенному механическому напряжению, что может быть связано с физиологической ролью малого круга кровообращения, обреченного на сочетанную работу и, по-видимому, гуморальную регуляцию, с миокардом и воздухоносными путями.

Артерии малого круга кровообращения, в отличие от системных артерий, выполняет особую роль в связи с её функциональным предназначением. Весь объём крови большого круга протекает через легочные артерии. Однако, при изменении кровяного давления в большом круге и при физиологических перераспределениях крови давление в малом круге практически не изменяется. В связи с этим, механизмы регуляции сосудистого тонуса легочной артерии имеют отличия от таковой в большом круге кровообращения. Особое значение регуляция сосудистого тонуса имеет в поддержании адекватных вентиляционно-перфузионных отношений, обеспечивающих поддержание гомеостаза в норме и при физиологических нагрузках.

Можно отметить особенности в регуляции механического напряжения легочной артерии. Это сократительные ответы на гистаминэргические и адренэргические воздействия. Модулирующее влияние эндотелия в процессах гистаминэргической и адренэргической регуляции тонуса легочной артерии заключается в снижении силы сократительного ответа, но степень релаксации сосудов малого круга отличается от магистральных сосудов большого круга кровообращения.

Эндотелий в ответ на стимуляцию катехоламинов, гистамина и холиномиметиков выделяет расслабляющий гладкие мышцы сосудов фактор, на роль которого претендует NO, оксид азота. По всей видимости, – это защитный механизм, направленный на поддержание оптимального сосудистого тонуса при воздействии на сосуды различных эндогенных физиологически активных соединений, реализуя принцип обратной отрицательной связи.

Проведённые исследования позволили предположить, что важной особенностью гистаминэргической регуляции сократительной активности гладкомышечных сегментов легочной артерии кролика и морских свинок является прямой сократительный эффект гистамина, что не присуще гладким мышцам сосудов большого круга кровообращения. Присутствие интактного эндотелия оказывает угнетающее действие на гистаминэргическое сокращение гладких мышц легочной артерии кролика.

Исследование адренэргической системы регуляции тонуса гладких мышц легочной артерии показало сходство в реакциях на α -адреномиметики с таковыми сосудов большого круга кровообращения. Однако, принципиальной особенностью адренэргической регуляции гладких мышц легочной артерии являются зарегистрированные β -адренэргические контрактильные эффекты в ГМК сосудистой стенки. Как показали исследования, активация цАМФ-зависимой сигнальной системы в гладких мышцах ЛА способна оказывать констрикторный эффект. Чтобы проверить наше предположение о контрактильных эффектах цАМФ были проведены серии экспериментов с блокаторами фосфодиэстераз.

При исследовании воздействия на интактные сегменты ЛА ингибиторов ФДЭ сокращение вызывали кавинтон и дипиридамола, которые обладают сродством к ФДЭ, гидролизующим преимущественно цГМФ. Угнетение активности гуанилатциклазы при воздействии метиленового синего приводило к увеличению концентрации названных препаратов, вызывающей максимальное сокращение. Неселективный ингибитор ФДЭ IBMX и ингибитор ФДЭ, гидролизующий преимущественно цАМФ, теofilлин, вызывали снижение механического напряжения ГМК интактных сегментов ЛА. Однако после предобработки метиленовым синим, наблюдалась инверсия эффекта названных препаратов – во всех случаях регистрировался констрикторный эффект. Этот результат убедительно свидетельствует, что механизмы оперирования цАМФ – зависимой сигнальной системы в ГМК артерий малого круга, через посредство которой реализуются эффекты β -адреномиметиков, тесно связаны с активацией системы «гуанилатциклаза-цГМФ». Угнетение активности гуанилатциклазы оказывает значительное влияние на реализацию эффектов цАМФ в клетке. Таким образом, механизмы цАМФ и цГМФ – зависимой регуляции сократительной активности гладкомышечных сегментов сосудов малого круга кровообращения кроликов осуществляются в тесном взаимодействии двух регуляторных систем – «ГЦ – цГМФ» и «АЦ – цАМФ». Ключевым звеном этого взаимодействия являют-

ся фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов. Соотношение активности различных субтипов данного фермента в ГМК может существенно модулировать адренэргические эффекты в стенке ЛА, вплоть до полной их инверсии.

Констрикторный эффект системы, связанной с метаболизмом циклических нуклеотидов, может быть обусловлен продукцией вазоконстрикторных биологически активных веществ мигрирующими клетками (нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и др.), которые инфильтрируют стенки сосудов. Возможно так же, что здесь играет роль цАМФ-зависимое фосфорилирование кальциевых каналов, что приводит к активации кальциевой проводимости мембраны, и при определенных условиях в гладких мышцах сосудов малого круга кровообращения этот эффект становится превалирующим.

Особое внимание заслуживают сократительные реакции изолированных сегментов легочной артерии в ответ на воздействие нитрозоглутатиона, изопротеренола и блокаторов фосфодиэстераз циклических нуклеотидов. Увеличение концентрации цАМФ и/или цГМФ, по общепринятым представлениям, не может объяснить сократительные ответы гладкомышечных сегментов. По всей видимости, сократительные реакции легочной артерии на воздействие биологически активных веществ являются более сложным совокупным процессом взаимодействия гладкомышечных клеток, эндотелия и клеток микроокружения. Одной из возможных гипотез сократительных реакций является активация циклическим аденозинмонофосфатом высвобождения вазоактивных констрикторных веществ клетками микроокружения.

Другой причиной сократительных реакций могут быть особенности оперирования внутриклеточных сигнальных систем, что в некоторых висцеральных ГМК приводит к аналогичным эффектам [Капилевич Л. В. и др., 2003; Ковалев, И.В. и др., 2004]. Точкой приложения может быть повышение уровня и изменение соотношения концентраций циклических нуклеотидов в цитоплазме гладкомышечных клеток, которое на фоне так называемых кальцийнезависимых механизмов активации сокращения гладких мышц, за счет деятельности различных протеинкиназ (протеинкиназа С, Мар-киназы, Rho-киназы и др.), вызывает рост механического напряжения легочных сосудов. Известно, что ряд ФАВ реализуют свои эффекты в ГМК, в том числе легочных сосудов, и по такому пути [Boer C. et al., 2002; Damron D.S. et al., 2002; Hartshorne D. et al., 2004; Wooldridge A. et al., 2004].

Выявленное увеличение максимальной амплитуды сокращения сегментов сенсibilизированных животных может свидетельствовать об увеличении в них количества рецепторов к гистамину. Это может объяснить более выраженное действие гистамина на гладкие мышцы бронхов, полученных от животных экспериментальной группы. В основе острых аллергических реакций, например, бронхоспазма, лежит гиперчувствительность немедленного типа. Ее опосредуют биологически активные вещества, которые высвобождаются тучными клетками при взаимодействии аллергена с IgE на поверхности клеток: гистамин, триптаза и др. [Тузлукова Е. Б. и др., 2002]. При бронхоспастических состояниях в бронхах повышена экспрессия рецепторов гистамина первого типа [Richard W.C. et al., 1999].

Увеличение амплитуды сократительных реакций изолированных гладких мышц воздухоносных путей на холинэргические воздействия при сенсibilизации может также объясняться повышением количества M₃-холинорецепторов [Tohda Y. et al., 2002].

Уменьшение степени расслабления гладкомышечных сегментов сенсibilизированных животных при действии β_2 -адреномиметика, вероятно, связано с уменьшением количества β_2 -адренорецепторов.

При сенсibilизации происходит нарушение целостности эпителия, возникают необратимые органические изменения стенки воздухоносных путей, это ведет к дефициту нитроксидэргической бронхорелаксации, потере эпителием эндокринных функций [Сепиашвили Р.И. и др., 2003; Zou J. et al., 2002; Busse W. W., Sedgwick J. B., 1992]. Эпителий утрачивает способность модулировать ответные реакции гладких мышц на различные воздействия. Таким образом, это может быть причиной отсутствия различий между сократительными реакциями сегментов с эпителием и без эпителия у сенсibilизированных морских свинок.

Сопоставляя данные биохимических исследований и механографии, проводя системный анализ происходящих процессов во всем организме, появляется возможность объяснить некоторые изменения сократительной активности, происходящие при формировании бронхоспастических состояний. Так при сенсibilизации развивается аллергическое воспаление, сопровождающееся повышенной выработкой активных форм кислорода. На защиту организма от активных форм кислорода начинает тратиться глутатион. В то же время, глутатион участвует не только в антиперекисной защите организма, но и является веществом, продляющим время жизни NO путем соединения с ним и образованием нитрозоглутатиона. Как было показано, нитрозоглутатион оказывает сходный NO эффект на сократительную активность гладких мышц. Таким образом, снижение концентрации глутатиона приводит к снижению образования нитрозоглутатиона (который кстати имеет меньший токсический эффект на клетку, чем NO). В то же время, повышенная выработка окиси азота индуцибельными NO-синтетазами не приводит к усилению дилатационных ответов ГМК, т.к. этот радикал коротко живущий и очень реакционно-способный. В таких условиях, в особенности при повышенном образовании активных форм кислорода, активно нарабатываемый NO оказывает больше не релаксирующее влияние, а токсическое. Именно этим можно объяснить прогрессирующий бронхоспазм при высокой концентрации NO в выдыхаемом воздухе больными бронхиальной астмы.

ВЫВОДЫ

1. Особенностью адренэргической регуляции механического напряжения ГМК легочных артерий является констрикторный ответ на изопротеренол, в то же время гладкие мышцы воздухоносных путей отвечают дилатацией. Холиномиметики карбохолин и пилокарпин оказывают констрикторное действие на гладкие мышцы легочной артерии и воздухоносных путей. Гистамин оказывает констрикторное действие на ГМК легочных артерий и воздухоносных путей, потенцирует релаксирующее влияние нитропруссид натрия.
2. Модуляторы внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов (нитрозоглутатион, изопротеренол, ингибиторы фосфодиэстераз) оказывают констрикторное действие на ГМК легочных артерий, гладкие мышцы воздухоносных путей отвечают дилатацией.
3. Эндотелий легочных артерий способен оказывать как релаксирующее модулирующее действие, так и констрикторное. Релаксирующее влияние эндотелий оказывает на адренэргические, гистаминэргические и серотонинэргические воздействия. Сокращение, вызванное холиномиметиком карбохолином, сохраненный эндотелий потенцирует.
4. Сенсibilизация морских свинок овальбумином приводит к развитию системного воспалительного процесса: снижается напряжение кислорода в крови, снижается концентрация восстановленного глутатиона; возрастает напряжение углекислого газа в крови, ТБК продуктов концентрация; наблюдается повышенная инфильтрация тканей бронхов и легочной артерии эозинофилами и тканевыми макрофагами. Сенсibilизация приводит к потенцированию констрикторных ответов гладких мышц бронхов и легочных артерий на воздействие гистамина, пилокарпина; и в то же время к ослаблению дилатирующего влияния эндотелия и эпителия, а так же сальбутамола (на тонус бронхов).
5. В условиях развития бронхиальной гиперреактивности происходит усиление констрикторных эффектов на гладкие мышцы легочных артерий и воздухоносных путей веществ, увеличивающих внутриклеточную концентрацию циклических нуклеотидов – изопротеренола, нитрозоглутатиона.
6. Моделирование бронхиальной реактивности у морских свинок оказывает воздействие на ионную проницаемость мембраны эритроцитов, увеличивая кальций-активируемую калиевую проницаемость. Не развиваются вызванные потенциалы действия ГМК при блокировании калиевой проводимости мембран.
7. Гладкие мышцы легочных артерий в большей степени подвержены констрикторным ответам, нежели ГМК воздухоносных путей – легочные артерии отвечают сокращением на β -адренэргические воздействия, на нитрозоглутатион, на воздействие ингибиторов фосфодиэстераз дипиридамол, теofilлин, IBMX, в то время, как на нитрозоглутатион и β -адренэргические воздействия ГМК воздухоносных путей отвечают дилатацией.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Особенности холинэргической регуляции гладких мышц легочных артерий кролика. // Бюлл. exper. биол. и мед.- 2000.- Т.130, № 8.-С.134-136. (Соавт. Капилевич Л.В., Анфиногорова Я.Д., Баскаков М.Б., Ковалёв И.В., Медведев М.А.).
2. Адренэргическая регуляция гладких мышц легочных сосудов. // «НАУКИ О ЧЕЛОВЕКЕ» - Материалы второго конгресса молодых учёных и специалистов «Научная молодёжь на пороге XXI века». Томск, 17-18 мая 2001, С. 79. (Соавт. Дьякова Е.Ю.).
3. Особенности гистаминэргической регуляции гладких мышц легочных артерий кролика. // Бюлл. exper. биол. и мед.-2001. - Т.132, № 8. - С.142-144. (Соавт. Капилевич Л.В., Анфиногорова Я.Д., Баскаков М.Б., Дьякова Е.Ю., Ковалёв И.В., Медведев М.А.).
4. Морфофункциональная характеристика сосудистой стенки легочной артерии кролика. // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии под редакцией профессора С.В. Логвинова. - Томск: СГМУ, 2002. Вып. 2, С. 128 (сборник научных трудов, посвященный 150-летию член.-корр., профессора А.С. Догеля. (Соавт. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Анфиногорова Я.Д., Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Фролов В.Н., Михуля Е.П.).
5. Особенности регуляции тонуса гладких мышц легочной артерии кролика. // Материалы третьего международного конгресса молодых учёных и специалистов - «НАУКИ О ЧЕЛОВЕКЕ». Томск, 16-17 мая 2002, С. 186-187. (Соавт. Дьякова Е.Ю.).
6. Особенности регуляции гладких мышц сосудистой стенки легочной артерии кролика. // Рос. Физ. ж. им. И.М. Сеченова - 2002 - Т.88, № 4, - С.452-459. (Соавт. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Баскаков М.Б., Анфиногорова Я.Д., Ковалёв И.В., Фролов В.Н., Медведев М.А.).
7. Особенности адренэргической регуляции гладких мышц легочных артерий кролика. // Бюлл. exper. биол. и мед. - 2002. - Т.133, № 3. - С. 254-256. (Соавт. Капилевич Л.В., Анфиногорова Я.Д., Баскаков М.Б., Дьякова Е.Ю., Ковалёв И.В., Медведев М.А.).
8. Особенности фармакологической регуляции тонуса легочных артерий. // Сборник статей IV ежегодного семинара «Актуальные вопросы фармакотерапии и хирургического лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы».- Томск 2003, С.74-78.
9. Особенности регуляции тонуса гладких сосудистых мышц легочной артерии. // Вестник Российского государственного медицинского университета №2 (28), Москва 2003. С. 191.
10. Особенности регуляции сократительной активности легочной артерии циклическими нуклеотидами. // Научные труды 4-ой международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке». – Москва 23-25 мая 2003. - С. 459-460. (Соавт. Султанова А.Н.).
11. Сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей при бронхиальной астме в эксперименте. // Бюллетень Сибирской медицины: Научно-практический журнал. - Томск: СГМУ, 2003. – Том 2, №1. – С. 35-38. (Соавт. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Сазонов А.Э., Геренг, Е.А.).
12. Исследование роли циклических нуклеотидов в регуляции механического напряжения сегментов легочных артерий кролика. // Сборник статей по материалам IV конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». Томск, 15-16 мая 2003 г. С. 167-168. (Соавт. Дьякова Е.Ю., Султанова А.Н.).
13. Морфологические особенности и механизмы регуляции тонуса стенки легочных артерий. // Пульмонология. – 2003. – Т13, №4. – С. 51-57. (Соавт. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Фролов В.Н., Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Анфиногорова Я.Д., Медведев М.А.).
14. Роль циклических нуклеотидов в регуляции тонуса легочных артерий кролика. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т.135, №6. – С. 74-77. (Соавт. Капилевич Л.В., Ковалев И.В., Дьякова Е.Ю., Баскаков М.Б.).
15. Peculiarities of the vascular smooth muscle tone regulation in pulmonary artery: role of cyclic nucleotides. // The 13th European Meeting on Hypertension. Milan, Italy, June 13–17, 2003. (Соавт. Капилевич Л.В.).

16. Особенности регуляции тонуса сосудистых гладких мышц легочной артерии. // Вестник Российского государственного медицинского университета. – Т. 34, №3. – 2004. – С. 174. (Соавт. Дьякова Е.Ю.).
17. Эффект гистамина на сократительную активность воздухоносных путей при модельной бронхиальной астме. // Сборник статей по материалам V конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». – Томск, 20-21 мая 2004 г., С. 282-283. (Соавт. Зайцева Т.Н., Дьякова Е.Ю.).
18. Эффект метиленового синего на сократительную активность гладких мышц легочной артерии при воздействии блокаторов фосфодиэстераз. // Сборник статей по материалам V конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». – Томск, 20-21 мая 2004 г., С. 308-309. (Соавт. Давлетьярова К.В., Дьякова Е.Ю.).
19. Особенности регуляции механического напряжения легочных артерий адреномиметиками // Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц: Материалы симпозиума. / Под ред. М.А.Медведева, М.Б.Баскакова. – Томск, 2004 – С. 79-80. (Соавт. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю.).
20. cGMP-dependent mechanisms in regulation of electric and contractile activity in smooth muscles. // Biological motility. – Pushchino, 2004. – 131-133. (Соавт. Kapilevich L.V., Kovalev I.V., Medvedev M.A., Baskakov M.B., Kilin A.A., Borodin U.L., Popov A.G., Panov A.A., Minochenko I.L., Anfinogenova Y.J.).
21. Peculiarities of contractile regulation of vascular smooth muscle in rabbit pulmonary artery. // Biological motility. – Pushchino, 2004. – P. 142-143. (Соавт. L.V. Kapilevich, E.Y. Dyakova, Y.D. Anfinogenova, I.V.Kovalev, M.B.Baskakov, M.A.Medvedev).
22. The regulation of mechanical tension of pulmonary artery smooth muscle by α - and β -adrenoceptor agonists. // 3-rd Congress of European Region International Union against Tuberculosis and Lung Diseases (IUATLD), Moscow, 2004. – P. 102. (Соавт. Kapilevich L.V., Dyakova E.Y., Anfinogenova Y.J., Kovalev I.V., Baskakov M.B.).
23. Influence of interleukine-5 and interleukine-5 receptor on airway smooth muscle contractility in the experimental model of bronchial asthma. //3-rd Congress of European Region International Union against Tuberculosis and Lung Diseases (IUATLD), Moscow, 2004. – P. 187. (Соавт. Kapilevich L.V., Dyakova E.Y., Zaytseva T.N., Anfinogenova Y.J., Sazonov A.E., Ogorodova L.M.).
24. Сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей при экспериментальной бронхиальной астме: роль интерлейкина 5 в формировании гиперреактивности бронхов. // Российский физиологический журнал им. Сеченова И.М. – 2004, Т.90, №10. – С.1262-1269. (Соавт. Капилевич Л.В., Огородова Л.М., Сазонов А.Э., Дьякова Е.Ю., Попова И.С.).
25. Особенности сократительной активности гладких мышц легочных артерий при формировании гиперреактивности воздухоносных путей. // X Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине». Тезисы докладов – Казань: ООО Изд. Дом «Медок», 2005. – С. 221. (Соавт. Зайцева Т.Н., Давлетьярова К.В.).
26. Регуляция сократительных свойств легочной артерии в норме и при патологии. // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2005. – Т.34, №3. – С. 174. (Давлетьярова К.В., Зайцева Т.Н.).
27. Изменение сократительной активности гладких мышц легочной артерии и активности ферментов при сенсibilизации морских свинок овальбумином. // Материалы XI межвузовской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», 21-22 апреля 2005. – СПб.– часть 2. С. 31-33. (Соавт. Зайцева Т.Н., Давлетьярова К.В.).
28. Влияние интерлейкина-5 на адренэргические реакции бронхов при модельной бронхиальной астме. // Сборник статей по материалам VI конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». Томск, 19-20 мая 2005. – С. 73-74. (Соавт. Дьякова Е.Ю., Зайцева Т.Н.).
29. Изучение сократительной активности гладких мышц легочных сосудов при сенсibilизации морских свинок овальбумином. // Сборник статей по материалам VI конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». Томск, 19-20 мая 2005. – С. 79. (Соавт. Зайцева Т.Н., Давлетьярова К.В., Дьякова Е.Ю.).

30. Сократительные свойства гладких мышц бронхов при формировании гиперреактивности воздухоносных путей. // Российский физиологический журнал им. Сеченова И.М.-2005, Т.91, №7, С. 832-843. (Соавт. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Огородова Л.М., Зайцева Т.Н., Сазонов А.Э.).
31. Изменение активности глутатион-зависимых ферментов крови при моделировании бронхиальной астмы на морских свинках. // Бюллетень Сибирской медицины.- 2005, Приложение 1 (Тезисы докладов V Сибирского физиологического съезда).- С. 40. (Соавт. Капилевич Л.В., Зайцева Т.Н., Дьякова Е.Ю.).
32. Сократительная активность гладких мышц легочной артерии и активность ферментов крови при сенсibilизации морских свинок овалбумином. // Бюллетень Сибирской медицины.- 2005, Приложение 1 (Тезисы докладов V Сибирского физиологического съезда).- С. 117. (Капилевич Л.В., Зайцева Т.Н., Давлетьярова К.В.).
33. Роль респираторного эпителия в формировании гиперреактивности гладких мышц бронхов. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2005. Т.140, №9, С. 250-252. (Соавт. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Огородова Л.М., Зайцева Т.Н., Сазонов А.Э.).
34. Физиологические особенности гладких мышц сосудов малого круга кровообращения. // Успехи физиологических наук. - 2006. - Т. 37, №1. - С. 37-49. (Соавт. Капилевич Л.В., Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Дьякова Е.Ю., Медведев М.А.).
35. Особенности фармакологической чувствительности гладких мышц сосудистой стенки артерий малого круга кровообращения. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – Т. 69, № 2. - С. 22-26. (Соавт. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А.).
36. Влияние нитрозоглутатиона на механическое напряжение гладких мышц легочной артерии и бронхов морских свинок в норме и при сенсibilизации овалбумином. // Сборник статей по материалам VII конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». Томск, 18-19 мая 2006. - С. 102-104. (Соавт. Давлетьярова К.В., Левинская О.С., Дьякова Е.Ю.).
37. Роль системы глутатиона в антиперекисной защите организма при сенсibilизации морских свинок овалбумином. // Сборник статей по материалам VII конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». Томск, 18-19 мая 2006. - С. 114.
38. Серотонинэргическая регуляция механического напряжения гладких мышц легочных артерий и бронхов морских свинок. // Сборник статей по материалам VII конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». Томск, 18-19 мая 2006. - С. 115-116. (Соавт. Давлетьярова К.В., Левинская О.С.).
39. Peculiarities of the vascular smooth muscle tone regulation in pulmonary artery in conditios of ovalbumin sensitization. // The 16th European Meeting on Hypertension. Madrid, Spain, June 12–15, 2006. – P. S387-S388. (Соавт. Kapilevich L.V., Davletjarova K.V., Dyakova E.Y.).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям, контракт № 02.438.11.7018 , а так же гранта молодых ученых СибГМУ и гранта молодых ученых Томской области (20.12.2002 г.№ 25, заключенного в соответствии с распоряжением Главы Администрации (Губернатора) Томской области от 09.12.2002 № 547-р)

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии ГОУ ВПО СибГМУ
Подписано к печати:

Заказ №

Тираж 100 экземпляров