

УДК 612.118+612.143+612.73+612.89.08

# СЫВОРОТКА КРОВИ СНИЖАЕТ ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМЫЙ РЕЛАКСИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ АЦЕТИЛХОЛИНА НА ЦИРКУЛЯРНЫХ ПОЛОСКАХ ПОЧЕЧНОЙ АРТЕРИИ КОРОВЫ

Р.Ю. Кашин, аспирант; В.И. Циркин, д.м.н., профессор

Кировская государственная медицинская академия

*В опытах с циркулярными полосками почечной артерии коровы ацетилхолин ( $5 \times 10^{-5}$  г/мл) проявляет релаксирующий эффект на фоне тонуса, вызванного адреналином ( $10^{-6}$  г/мл). Этот эффект снижается сывороткой крови человека (в разведениях 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500, 1 :  $10^3$  и 1 :  $10^4$ ), что говорит о наличии в ней эндогенного блокатора М-холинорецепторов (ЭБМХР), способного уменьшать эффективность активации М-ХР эндотелиоцитов.*

**Ключевые слова:** почечная артерия, ацетилхолин, сыворотка крови.

*In experiments with circular strips of a cow renal artery acetylcholine ( $5 \times 10^{-5}$  g/ml) shows relax effect against a tone caused by adrenaline ( $10^{-6}$  g/ml). This effect is decreased by human blood serum (at dilution 1:50, 1:100, 1:500, 1:10<sup>3</sup> and 1:10<sup>4</sup>). It testifies the presence of endogenous M-choline receptor blocker in it which is able to reduce activation efficiency of M-choline receptors of vessel endothelyocytes.*

**Keywords:** cow renal artery, acetylcholine, blood serum.

## Введение

Известно, что реакция миоцитов сосудов на воздействие ацетилхолина (АХ) зависит от продукции NO эндотелием [3, 8]. Показано, что сыворотка крови содержит эндогенный блокатор М-холинорецепторов (ЭБМХР), благодаря чему в разведениях 1 : 50, 1 : 100 и 1 : 500 сыворотка снижает эффективность активации М-ХР миоцитов матки, трахеи и желудка [1, 2, 5]. Вопрос о способности ЭБМХР снижать эффективность активации М-ХР эндотелиоцитов не исследовался. Изучение этого вопроса и стало целью работы. Объектом исследования мы выбрали почечную артерию, недостаточно изученную физиологами [1, 6].

## Материалы и методы

В 8 сериях исследовано 366 циркулярных полосок почечной артерии 31 коровы. В их числе полоски с интактным эндотелием, т.е. из артерий, полученных спустя 1-2 ч. от момента забоя животного (группа 1) и полоски с поврежденным эндотелием, т.е. из артерий, хранившихся 24 ч. при  $4^{\circ}\text{C}$ , у которых перед опытом механически ватным тампоном удалялся эндотелий (группа 2). Сокращения полосок регистрировали по методике [4] механотронами 6МХ1С на «Миоцитографе» при  $38^{\circ}\text{C}$ , постоянной перфузии раствором Кребса (0.7 мл/мин), и пассивной аэрации рабочих камер. Из венозной крови 19-50-летних женщин-доноров ( $n=26$ ) получили сыворотку (15-минутное центрифугирование при 1000 об/мин), которую исследовали спустя 2-4 ч. от момента забора крови, разводя ее в 50, 100, 500,  $10^3$  и  $10^4$  раз раствором Кребса. Он содержал (мм): NaCl – 136; KCl – 4.7;  $\text{CaCl}_2$  – 2.52;  $\text{MgCl}_2$  – 1.2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.6;  $\text{NaHCO}_3$  – 4.7;  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  – 11 (рН 7.4). Результаты обработаны статистически ( $M \pm m$ ); различия оценивали по критерию Стьюдента, считая их достоверными при  $p < 0.05$ .

## Результаты исследования

Полоски имели низкий базальный тонус (рис. 1).

Поэтому для исследования релаксирующего эффекта АХ тонус повышали адреналином. Предварительно было показано (рис. 1, А), что адреналин ( $10^{-8}$ - $10^{-6}$  г/мл) дозозависимо повышает тонус полосок (серия 1). Поэтому в остальных сериях (2-8) его применяли в концентрации  $10^{-6}$  г/мл. Используя ницероголин, обзидан и атенолол ( $10^{-6}$  г/мл), мы показали (серии 2-4; рис. 1, Б), что тонотропный эффект адреналина ( $10^{-6}$  г/мл) преимущественно обусловлен активацией  $\alpha$ -адренорецепторов (АР) и в меньшей степени  $\beta_1$ -АР, в то время как активация  $\beta_2$ -АР частично снижает его. Это дало основание в сериях 5-8 индуцировать тонус адреналином на фоне блокады  $\beta_1$ -АР и  $\beta_2$ -АР обзиданом. В этих условиях, как показано в серии 5 (рис. 1, В и 2), тонус достигает максимальных значений к 10-й минуте (при этом у полосок с эндотелием тонус на 16-20% ниже, чем у полосок без эндотелия) и удерживается на этом уровне не менее

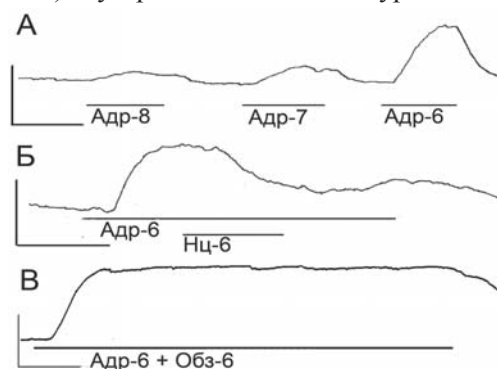


Рисунок 1 – Механограммы циркулярных полосок почечной артерии коровы, демонстрирующие величину их тонического ответа на воздействие адреналина в концентрациях  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$  г/мл (Адр-8, Адр-7 и Адр-6; панель А), адrenoблолирующий эффект ницероголина ( $10^{-5}$  г/мл, Ниц-6; панель Б) и стабильность тонуса при 60-минутной перфузии адреналином ( $10^{-6}$  г/мл, с обзиданом,  $10^{-6}$  г/мл). Калибровка – 10 мН, 10 мин.

Здесь и на рис. 3: горизонтальные линии под механограммами обозначают момент воздействия вещества

50 минут. Такая устойчивость тонуса позволяет изучать на этом фоне релаксирующий эффект АХ. Из результатов этой серии также следует, что NO лишь частично препятствует проявлению тонотропного эффекта адреналина, но сам по себе адреналин не влияет на продукцию NO. Это также важно в методическом отношении при изучении релаксирующего эффекта АХ. Попытка оценить возможность использования L-NAME ( $10^{-4}$  г/мл) в качестве ингибитора синтеза NO и модулятора релаксирующего эффекта АХ (серия 6) оказалась неудачной – вместо ожидаемого повышения тонуса, вызванного адреналином, L-NAME, наоборот, снижал его, что, вероятно, обусловлено способностью L-NAME блокировать  $Ca^{2+}$ -проницаемость миоцитов, как это было отмечено ранее [7]. Поэтому мы отказались от применения L-NAME в наших экспериментах. В целом, результаты серий 1-6 позволили прийти к заключению, что изучение эндотелийзависимого релаксирующего эффекта АХ и влияние на него сыворотки крови можно проводить на фоне тонуса, вызванного адреналином. Оно было проведено в сериях 7 и 8, которые отличались между собой последовательностью воздействия АХ и сыворотки.

Серию 7 проводили на полосках группы 1 (n=84) и на полосках группы 2 (n=44) по схеме: раствор Кребса → Адр,  $10^{-6}$  г/мл (1-й этап) → Адр + АХ,  $5 \times 10^{-5}$  г/мл (2-й этап) → то же + одно из 5 разведений сыворотки (3-й этап) → раствор Кребса. В опытах на полосках без эндотелия (группа 2) адреналин повышал тонус до 15.0-20.0 мН (рис. 3, Б), а вводимый на этом фоне АХ (вероятнее всего, за счет активации М-ХР миоцитов) достоверно (\* -  $p < 0.05$ ) повышал тонус, который к 5-й минуте уже достигал 127.9%\*-138.4%\* от его исходной величины. Но этот эффект АХ, как правило, был кратковременным, т.е. протекал с десенситизацией – уже к 10-й мин. воздействия тонус снижался до 115.9%-102.8% от исходного уровня. Сыворотка при воздействии на фоне тонуса, вызванного адреналином, и при наличии в среде АХ (т.е. на 3-м этапе) либо дополнительно повышала этот тонус (1 : 50, до  $135.4 \pm 10.0\%*$  от первоначального), либо не влияла на него (1 : 100, 1 : 500, 1 :  $10^3$ , 1 :  $10^4$ ). Следовательно, сыворотка не повышала и не уменьшала тонотропный эффект АХ. При этом эффект 50-кратного разведения сыворотки мы расценили как проявление б-адреносенсибилизирующей активности сыворотки за счет наличия в ней, как показано [1], эндогенного сенсибилизатора а-АР, или ЭСААР.

На полосках с эндотелием (группа 1) были получены иные результаты. На 1-м этапе адреналин также повышал базальный тонус, но на меньшую величину, чем в группе 2 (до 9.6-15.1 мН). Однако АХ, вводимый на фоне тонуса, вызванного адреналином (2-й этап опытов), не вызывал даже крат-

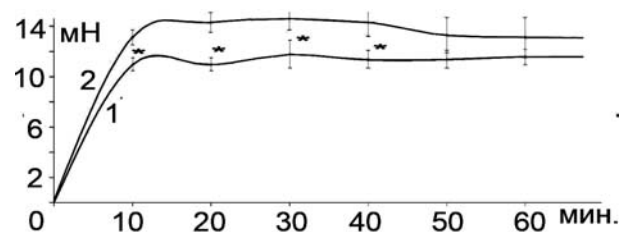


Рисунок 2 – Величина тонуса (мН) циркулярных полосок почечной артерии с эндотелием (1) и без эндотелия (2) на протяжении 60-минутной непрерывной перфузии адреналином ( $10^{-6}$  г/мл); \* - различие между группами достоверно ( $p < 0.05$ ) по критерию Стьюдента

ковременного его роста – тонус не изменялся ни к 5-й мин. (он составил 97.1-118.3% от первоначального), ни к 10-й мин. (88.0-101.1%). Более того, в отдельных опытах АХ снижал тонус (рис. 3, А). Очевидно, что в этих опытах АХ одновременно активировал М-ХР миоцитов и М-ХР эндотелиоцитов (т.е. повышал синтез NO), при этом эффект активации последних оказался сильнее, в связи с чем АХ не повышал тонус, вызванный адреналином, а даже снижал его. На 3-м этапе опытов было показано, что сыворотка может влиять на эффекты АХ, реализуемые с участием М-ХР эндотелиоцитов. Действительно, разведения 1 :  $10^3$  и 1 :  $10^4$  достоверно снижали тонус, вызванный адреналином и при наличии в среде АХ (соответственно, до  $81.6 \pm 6.9\%*$  и  $77.5 \pm 8.4\%*$  от первоначального уровня). Это можно объяснить отсутствием в крови ЭБМХР или содержанием в ней эндогенного сенсибилизатора М-ХР (ЭСМХР), повышающего эффективность взаимодействия АХ с М-ХР эндотелиоцитов (о существовании ЭСМХР указывают [2]). Остальные разведения (1 : 50, 1 : 100 и 1 : 500) не влияли на тонус – он оставался, соответственно, на уровне  $109.6 \pm 9.9\%$ ,  $107.3 \pm 8.0\%$  и  $85.5 \pm 10.3\%$  от первоначального. Очевидно, что в этих случаях содержащийся в сыворотке ЭБМХР либо блокировал способность АХ активировать синтез NO, либо препятствовал эффекту ЭСМХР. В целом, результаты серии 7 подтвердили наш вывод о возможности исследования эффектов АХ на фоне тонуса, вызванного адреналином, и о способности сыворотки изменять эффективность активации М-ХР эндотелиоцитов, в том числе снижать ее (в разведениях 1 : 50, 1 : 100 и 1 : 500 за счет наличия ЭБМХР) или повышать (в разведениях 1 :  $10^3$  и 1 :  $10^4$  за счет наличия ЭСМХР).

Способность ЭБМХР препятствовать релаксирующему действию АХ была выявлена и в серии 8. Ее проводили на 50 полосках группы 1 (исследуя разведения 1 : 50, 1 : 500, 1 :  $10^3$  и 1 :  $10^4$ ) и на 37 полосках группы 2 (1 : 50, 1 : 100 и 1 :  $10^3$ ) по схеме: раствор Кребса → Адр,  $10^{-6}$  г/мл (1-й этап) → Адр + разведение сыворотки (2-й этап) → то же + АХ,  $5 \times 10^{-5}$  г/мл (3-й этап) → раствор Кребса. Как и в серии 7, адреналин (рис. 3, В, Г) повышал

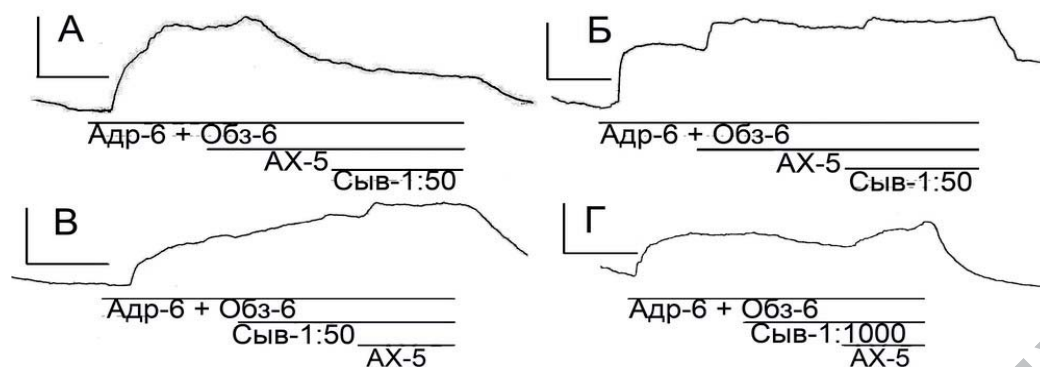


Рисунок 3 – Механограммы циркулярных полосок группы 1 (панели А, В и Г) и группы 2 (панель Б), демонстрирующие ответ полосок на воздействие адреналина ( $10^{-6}$  г/мл) с обзиданом ( $10^{-6}$  г/мл; Адр-6+Обз-6), ацетилхолина ( $5 \times 10^{-5}$  г/мл; АХ-5) и сыворотки крови (Сыв) в разведении 1 : 50 и 1 : 1000  
Калибровка – 5 мН, 5 мин

тонус полосок группы 1 (до 8,2-20,0 мН) и группы 2 (до 14,1-15,3 мН). В обеих группах введенная на фоне тонуса, вызванного адреналином, сыворотка в разведениях 1 : 500, 1 :  $10^3$ , 1 :  $10^4$  не изменяла его, а в разведениях 1 : 50 и 1 : 100 повышала, в том числе в группе 1 до  $137,3 \pm 15,8\%*$  от исходного уровня (1 : 50), а в группе 2 – до  $118,6 \pm 5,6\%*$  (1 : 50) и  $114,2 \pm 5,4\%*$  (1 : 100). Это повышение мы объясняем (как и в серии 7) наличием в крови ЭСААР. При этом однотипность реакции на разведение 1:50 со стороны полосок обеих групп позволяет утверждать, что NO не блокирует действие ЭСААР. На «ключевом» (3-м) этапе опытов показано, что на полосках без эндотелия (группа 2) введение АХ на фоне тонуса, вызванного адреналином, и в присутствии сыворотки (1 : 50, 1 : 100) вызывало достоверный ( $\#$ ,  $p < 0,05$ ), по сравнению со 2-м этапом, рост тонуса до  $146,1 \pm 8,2\%*\#$  (1 : 50) и  $152,9 \pm 9,8\%*\#$  (1 : 100) от исходного уровня (в 5 опытах с 1000-кратным разведением рост тонуса до  $131,2 \pm 18,3\%$  носил недостоверный характер, что, возможно, связано с малым числом наблюдений). Это означает, что ЭБМХР не препятствует активации М-ХР миоцитов сосуда под влиянием АХ. На полосках с эндотелием (группа 1) АХ, вводимый на фоне адреналина и сыворотки, не оказывал релаксирующего влияния, т.е. не активировал синтез NO, а (как и на полосках группы 2), вызывал дополнительный рост тонуса, в том числе на фоне разведений 1 : 50 (до  $206,2 \pm 37,6\%*$  от исходного уровня), 1 : 500 (до  $148,4 \pm 20,6\%*\#$ ), 1 :  $10^3$  (до  $128,4 \pm 10,2\%*\#$ ) и 1 :  $10^4$  (до  $144,7 \pm 11,7\%*\#$ ). Этот эффект можно объяснить тем, что ЭБМХР (даже при разведении сыворотки в  $10^4$  раз!) блокировал способность АХ повышать синтез NO в эндотелиоцитах, но не влиял на способность АХ активировать М-ХР миоцитов. Какова причина более низкой чувствительности М-ХР миоцитов к действию ЭБМХР, в сравнении с М-ХР эндотелиоцитов – пока не ясно. В то же время, сравнение результатов серии 7 и 8 дает основание полагать, что способность ЭБМХР блокировать М-

ХР эндотелиоцитов выше в том случае, если эти рецепторы свободны, т.е. не оккупированы АХ (в серии 7 сыворотка проявляла ЭБМХР-активность при её в разведении в 500 раз, а в серии 8 – в 10000 раз).

В целом, результаты серий 7 и 8 позволяют заключить, что 1) сыворотка крови снижает эндотелийзависимый релаксирующий эффект АХ в опытах с циркулярными полосками почечной артерии коровы и обусловлено способностью содержащегося в ней ЭБМХР блокировать М-ХР эндотелиоцитов; 2) чувствительность к ЭБМХР у М-ХР эндотелиоцитов выше, чем у М-ХР миоцитов. С этих позиций мы не исключаем, что при высоком уровне в крови ЭБМХР (вследствие снижения способности АХ вызывать эндотелийзависимую вазодилатацию) возрастает риск развития артериальной гипертензии.

#### Литература

1. Демина Н.Л., Циркин В.И., Тарловская Е.И., Кашин Р.Ю.  $\alpha$  и  $\beta$ -адрено-, М-холинотомодулирующая активность сыворотки крови при артериальной гипертензии // Кардиоваск. терапия и профилактика. - 2008. - №2. - С.16-22.
2. Сизова Е.Н., Циркин В.И. Физиологическая характеристика эндогенных модуляторов  $\beta$ -адрено- и М-холинореактивности. - Киров: ВСЭИ, 2006. - 183 с.
3. Хлыбова С.В., Циркин В.И., Дворянский С.А. Роль системы L-аргинина-оксида азота в регуляции висцеральных функций в обеспечении гестационного процесса. - Киров: КГМА, 2007 - 178 с.
4. Циркин В.И., Дворянский С.А., Ноздрачев А.Д. и др. Адреномодулирующие эффекты крови, ликвора, мочи, слюны и околоплодных вод человека // ДАН. - 1997. - Т. 352, № 1. - С. 124-126.
5. Циркин В.И., Ноздрачев А.Д., Куншин А.А. Влияние сыворотки крови человека на М-холинореактивность гладких мышц желудка крысы // ДАН. - 2007. - Т. 414, № 3. - С. 419-422.
6. Enkhjargal B., Hashimoto M., Kinoshita H., Sakai Y. Characteristics of contractile activity in the renal artery of ovariectomized rats. // J. Smooth Muscle Res. - 2008. - Vol.44, № 1. - P. 17-28.
7. Lypcz R., Orthz C., Ruiz A. et al. Impairment of smooth muscle function of rat thoracic aorta in an endothelium-independent manner by long-term administration of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester // Fundam. Clin. Pharmacol. - 2004. - Vol.18, № 6. - P. 669-677.
8. Vanhoutte P. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. // J. Clin. Invest. - 2001. - Vol.107, № 1. - P. 23-25.

Поступила 08.04.09