

ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ ГИПЕРПОЛЯРИЗАЦИЯ — НОВЫЙ ПУТЬ МОДУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

Г. И. Лобов*, член-корреспондент РАН Д. П. Дворецкий

Поступило 17.09.2018 г.

In vitro исследовали эндотелийзависимые механизмы релаксации гладкомышечных клеток капсулы брыжеечных лимфатических узлов быка, предварительно сокращённых фенилэфрином. Добавление в среду инкубации L-NAME и индометацина ингибировало продукцию эндотелием NO и простаглицина. Тетраэтиламмония хлорид и TRAM-34 увеличивали тонус лимфатических узлов. Таким образом, в брыжеечных лимфатических узлах быка функционирует механизм дилатации, опосредуемый эндотелиальной гиперполяризацией, реализуемый за счёт активации Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов большой и промежуточной проводимости.

Ключевые слова: лимфатический узел, эндотелий, эндотелиальная гиперполяризация, Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524845645-648>

В последние 30 лет опубликовано множество работ, в которых показано, что сосудистый эндотелий играет важную роль в регуляции тонуса артерий [4, 5, 13]. Увеличение напряжения сдвига на эндотелии и ряд биологически активных веществ вызывают образование в эндотелиоцитах вазоактивных субстанций, таких как оксид азота (NO), простаглицин (PGI_2) и эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF) [13]. Продуцируемые эндотелием NO и PGI_2 диффундируют к сосудистым гладкомышечным клеткам (ГМК), где они активируют внутриклеточные сигнальные пути, приводящие к вазодилатации [6, 7]. Позднее в некоторых артериях была обнаружена вазодилатация в ответ на ацетилхолин (АХ) и напряжение сдвига в присутствии ингибиторов NO-синтазы и циклооксигеназы, т.е. был найден третий путь эндотелийзависимой вазодилатации, заключающийся в гиперполяризации мембраны ГМК [7]. Продуцируемые эндотелием вещества (эпоксидэйкозатриеновые кислоты, пероксид водорода, сероводород и др.), воздействуя на мембрану ГМК, приводят к её гиперполяризации и расслаблению миоцитов [13]. Существуют также данные, свидетельствующие о том, что гиперполяризация эндотелиальных клеток может распространяться на ГМК через

миоэндотелиальные щелевые соединения [6, 7]. Позднее способность эндотелия вызывать гиперполяризацию и расслабление ГМК была выявлена и в некоторых венах [9, 15].

Вслед за кровеносными сосудами такие эндотелиальные вазодилататоры, как NO и PGI_2 , были обнаружены в эндотелии лимфатических сосудов (ЛС) [10, 11, 14] и лимфатических узлов (ЛУ) [1, 2]. Что касается третьего механизма эндотелийзависимой вазодилатации — посредством образования EDHF, то данных о его функционировании в ЛС и ЛУ до настоящего времени нет.

Цель настоящего исследования — выявление механизма релаксации капсулы ЛУ посредством эндотелиальной гиперполяризации и изучение его роли в реализации модулирующего влияния эндотелия на сократительную функцию ГМК ЛУ.

Исследовали брыжеечные ЛУ быков в возрасте 16–18 мес. Лимфоузлы извлекали через 15 мин после обескровливания животных, помещали в охлаждённый до 2–4°C физиологический раствор и доставляли в лабораторию. В лаборатории из ЛУ вырезали полоски капсулы ($n = 36$) длиной 8–10 мм и шириной 1 мм, сохраняя субкапсулярный синус. У 10 полосок субкапсулярный синус удаляли. Полоски капсулы помещали в камеру миографа с датчиком силы FORT 10 (“World Precision Instruments”, США). Эксперименты проводили в условиях непрерывного поступления оксигенированного физиологического солевого раствора следующего

Институт физиологии им. И.П. Павлова
Российской Академии наук, Санкт-Петербург

* E-mail: gilobov@yandex.ru

состава, мМ: NaCl — 120,4; KCl — 5,9; CaCl₂ — 2,5; MgCl₂ — 1,2; NaH₂PO₄ — 1,2; NaHCO₃ — 15,5; глюкоза — 11,5. Физиологический раствор сатурировали газовой смесью, состоящей из 95% O₂ и 5% CO₂ при температуре 37,0 ± 0,1°C. Подробно методика исследования была описана нами ранее [1]. Препараты подвергали исходному натяжению 0,45 мН/мм, что соответствовало трансмуральному давлению 50 мм вод. ст. и после 30-минутной стабилизации регистрировали параметры их сократительной активности. Использовали следующие агонисты и антагонисты: фенилэфрина гидрохлорид (“Sigma-Aldrich”, США, 1 · 10⁻⁵ М); хлорид ацетилхолина (“Sigma-Aldrich”, 1 · 10⁻⁹–1 · 10⁻⁵ М); метиловый эфир N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME, “MP Biomedicals”, США, 1 · 10⁻⁴ М); индометацин (“Sigma-Aldrich”, 1 · 10⁻⁵ М); тетраэтиламония хлорид (ТЭА, “Sigma-Aldrich”, 1 · 10⁻³ М); апамин (“Sigma-Aldrich”, 1 · 10⁻⁷ М); TRAM-34 (1-[(2-хлорфенил)дифенилметил]-1H-пиразол, “Sigma-Aldrich”, 1 · 10⁻⁷ М).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы STATISTICA 6.1.478 (“StatSoft”, США). Достоверность различий определяли с помощью критерия *t* Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при *p* ≤ 0,05.

Через 30 мин выдержки в физиологическом растворе полоски капсулы ЛУ (34 из 36) начинали ритмически сокращаться. Параметры этих фазных сокращений были описаны ранее [1]. Добавление к раствору с полосками капсулы фенилэфрина

привело к быстрому повышению тонического напряжения, которое через 2–3 мин стабилизировалось на новом уровне. Затем в раствор вводили АХ в нарастающих концентрациях (1 · 10⁻⁹–1 · 10⁻⁵ М) и оценивали релаксацию полоски ЛУ (рис. 1). Ацетилхолин в концентрациях 1 · 10⁻⁹ и 1 · 10⁻⁸ М не оказывал влияния на тонус полосок ЛУ. Повышение его концентрации до 1 · 10⁻⁶ М привело к снижению тонуса препаратов, а АХ в концентрации 1 · 10⁻⁵ М индуцировал максимальную релаксацию, которая достигла 51,4 ± 4,6% от сокращения, вызванного фенилэфрином (рис. 1). Реакция препаратов на АХ в концентрации 1 · 10⁻⁴ М не имела достоверных отличий от таковой при концентрации АХ, равной 1 · 10⁻⁵ М. Исследование деэндотелизированных полосок капсулы ЛУ, проведённое по этой же схеме, показало отсутствие реакции на АХ. Тонус деэндотелизированных полосок при действии АХ не претерпевал значимых изменений, что указывает на то, что релаксация капсулы ЛУ, вызванная АХ, является зависимой от эндотелия. Усреднённые результаты этих экспериментов представлены на рис. 2.

В последующих опытах за 20 мин до воздействия АХ в раствор добавляли L-NAME (ингибитор NO-синтазы), индометацин (Indo, ингибитор циклооксигеназы) и специфические блокаторы K⁺-каналов — ТЭА (блокатор Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов большой проводимости), TRAM-34 (блокатор Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов промежуточной проводимости) и апамин (блокатор Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов малой проводимости) в разных комбинациях. Результаты этой

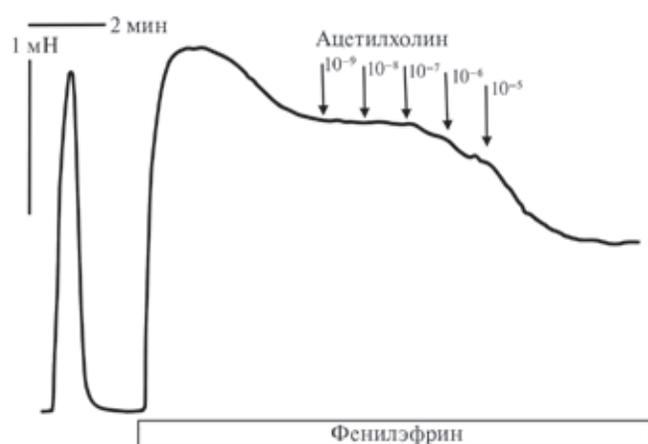


Рис. 1. Действие ацетилхолина в зависимости от концентрации на предварительно сокращённую фенилэфрином капсулу брыжеечного лимфатического узла быка. Слева на кривой представлено одиночное спонтанное фазное сокращение капсулы ЛУ. По оси абсцисс — концентрация, М. По оси ординат — напряжение.

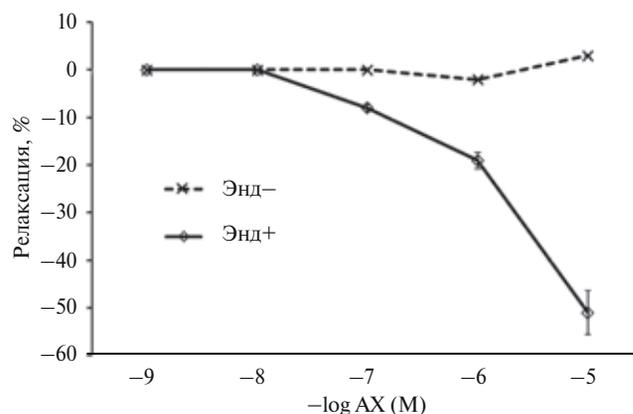


Рис. 2. Релаксация предварительно сокращённых фенилэфрином (1 · 10⁻⁵ М) полосок капсулы ЛУ при действии ацетилхолина (АХ) в концентрации 1 · 10⁻⁹–1 · 10⁻⁵ М. “Энд+” — капсула ЛУ с эндотелием, *n* = 12, “Энд-” — деэндотелизированная капсула ЛУ, *n* = 10. Данные (*M* ± *m*) представлены в процентах от величины амплитуды сокращения на фенилэфрин.

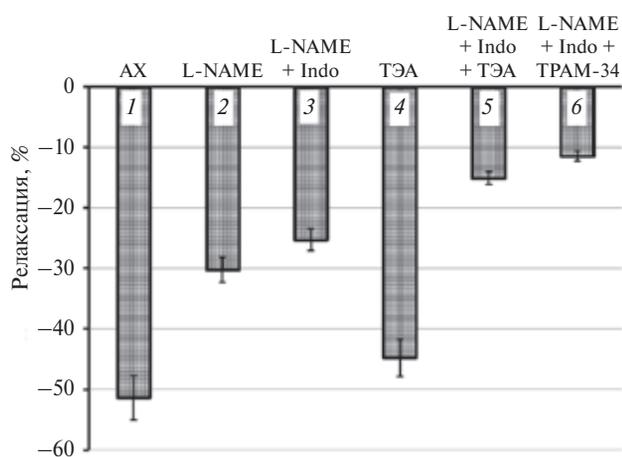


Рис. 3. Влияние ингибиторов NO-синтазы (L-NAME), циклооксигеназы (Indo) и специфических блокаторов Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов (ТЭА и TRAM-34) на AX-индуцируемую релаксацию полосок капсулы ЛУ. AX — 1, L-NAME — 2, Indo — 3, ТЭА — 4. На фоне действия L-NAME + Indo и релаксации, вызванной AX, в раствор вводили ТЭА (5) или TRAM-34 (6).

серии экспериментов представлены на рис. 3. В растворе с L-NAME релаксация предварительно сокращённой фенилэфрином капсулы ЛУ при действии AX была существенно снижена (до $34,2 \pm 2,9\%$), что доказывает важную роль NO в реализации релаксирующего эффекта AX на полоски капсулы ЛУ. Такие же данные при исследовании NO-зависимой регуляции сократительной функции капсулы ЛУ были получены нами ранее [1, 2]. Чтобы оценить роль PGI_2 в AX-индуцированной релаксации, капсулу ЛУ обрабатывали двумя ингибиторами (L-NAME + Indo). В этом случае релаксация капсулы ЛУ, вызванная AX, была меньше по сравнению с эффектом только L-NAME ($28,3 \pm 2,4\%$), однако это отличие было несущественным, что указывает на небольшую роль PGI_2 в релаксации капсулы ЛУ.

Несмотря на ингибирование продукции эндотелиоцитами NO и PGI_2 , AX всё ещё вызывал значительную релаксацию капсулы ЛУ, сокращённой после действия фенилэфрина. Этот факт давал основания предположить существование ещё одного сигнального пути релаксации в капсуле ЛУ. К настоящему времени в артериях и венах такой путь хорошо известен и связан с эндотелийзависимой гиперполяризацией, запускаемой активацией Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов [7, 9]. На первом этапе исследования возможного вовлечения Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов в релаксацию капсулы ЛУ мы применили ТЭА и зарегистрировали некоторое уменьшение релаксации на AX (рис. 3). В этих экспериментах

величина релаксации была незначительной, на границе статистической достоверности. В литературе имеются данные о том, что в физиологических условиях эндотелиальные вазодилататоры часто образуются в избыточных количествах и эти вазодилататоры могут оказывать влияние на продукцию или эффект других вазодилататоров. Так, ранее при исследовании коронарной микроциркуляции у собак было показано, что экзогенный NO ингибирует продукцию или действие EDHF [9]. Также было установлено, что у крыс линии Sprague Dawley как эндогенный, так и экзогенный NO значительно снижают величину EDHF-опосредованной депрессорной реакции [8]. С учётом этих данных мы провели исследование эффектов ТЭА в растворе, содержащем L-NAME + Indo. В этих опытах мы зафиксировали значительное уменьшение AX-индуцируемой релаксации полосок капсулы ЛУ по сравнению с таковой в растворе, содержащем только L-NAME + Indo (амплитуда релаксации составила $15,1 \pm 1,9\%$ от амплитуды вызванного фенилэфрином сокращения против $25,3 \pm 3,1\%$ в растворе с L-NAME + Indo, рис. 3).

Ещё большее ингибирование релаксации капсулы ЛУ, вызванной AX (рис. 3), мы наблюдали при добавлении TRAM-34 в раствор, содержащий L-NAME + Indo (амплитуда релаксации составила $11,4 \pm 1,52\%$ от амплитуды индуцированного фенилэфрином сокращения). Добавление апамина в раствор, содержащий L-NAME + Indo, не привело к достоверным изменениям релаксационного ответа капсулы ЛУ на AX (данные не представлены).

Анализ литературных данных показывает, что действие вазодилататоров (NO, PGI_2 и EDHF) в разных сосудистых регионах у животных разных видов довольно сильно различается [3, 13]. В ряде работ, например в [12], показано, что в крупных артериях основным вазодилататором, продуцируемым эндотелием, является NO, в то время как в мелких артериях вазодилатацию опосредует главным образом EDHF. Химическая природа EDHF до настоящего времени не определена, однако общепризнано, что конечным результатом его действия является открывание Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов с последующей гиперполяризацией мембраны сосудистых ГМК и их расслаблением.

Результаты нашего исследования показывают, что в брыжеечных ЛУ быка наряду с NO- и PGI_2 -опосредуемыми механизмами функционирует эндотелийзависимый механизм релаксации, опосредуемый эндотелиальной гиперполяризацией. Поскольку AX-индуцируемая

релаксация существенно уменьшалась при применении ТЭА и TRAM-34, мы полагаем, что опосредуемый EDHF механизм релаксации в капсуле ЛУ реализуется через активацию Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов большой и промежуточной проводимости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лобов Г.И., Панькова М.Н. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2012. Т. 98. № 11. С. 1350–1361.
2. Унт Д.В., Лобов Г.И. // Бюл. экспер. биологии и медицины. 2017. Т. 164. № 8. С. 145–149.
3. Brandes R.P., Schmitz-Winnenthal F.H., Félétou M., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 17. P. 9747–9752.
4. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. // Nature. 1980. V. 288. № 5789. P. 373–376.
5. Furchgott R.F., Cherry P.D., Zawadzki J.V., Jothanandan D. // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1984. V. 6. Suppl. 2. P. S 336–S343.
6. Hurjui L., Serban. I.L., Oprea C., et al. // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. 2011. V. 115. № 1. P. 168–170.
7. Jin X., Satoh-Otonashi Y., Zamami Y., et al. // J. Pharmacol. Sci. 2011. V. 116. № 4. P. 332–336.
8. Kobuchi S., Miura K., Iwao H., Ayajiki K. // Eur. J. Pharmacol. 2015. V. 762. P. 26–34.
9. Liu Z.G., Ge Z.D., He G. W. // Circulation. 2000. V. 102. № 19. Suppl. 3. P. 296–301.
10. Nishikawa Y., Stepp D.W., Chilian W.M. // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2000. V. 279. № 2. P. H459–H465.
11. Reeder L.B., Yang L.H., Ferguson M.K. // J. Surg. Res. 1994. V. 56. № 6. P. 620–625.
12. Shimokawa H., Yasutake H., Fujii K.J., et al. // Cardiovasc. Pharmacol. 1996. V. 28 P. 703–711.
13. Vanhoutte P.M., Shimokawa H., Tang E.H., Félétou M. // Acta Physiol. 2009. V. 196. № 2. P. 193–222.
14. Yokoyama S., Ohhashi T. // Amer. J. Physiol. 1993. V. 264. № 5. Pt 2. P. H1460–H1464.
15. Zhang R.Z., Yang Q., Yim A.P., et al. // Vascul. Pharmacol. 2006. V. 44. № 3. P. 183–191.

ENDOTHELIUM-DEPENDENT HYPERPOLARIZATION-MEDIATED RELAXATION PATHWAY IN BOVINE MESENTERIC LYMPH NODES

G. I. Lobov, Corresponding Member of the RAS D. P. Dvoretzkii

Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation

Received September 17, 2018

In vitro, endothelium-dependent relaxation mechanisms of smooth muscle cells of the bovine mesenteric lymph node capsule have been studied. The addition of L-NAME and indomethacin to physiological saline inhibited the production of endothelium NO and prostacyclin. In this solution, tetraethylammonium chloride and TRAM-34 increased the tone of the precontracted lymph nodes. Thus, in bovine mesenteric lymph nodes there is an relaxation mechanism mediated by endothelial hyperpolarization, realized by activating Ca^{2+} -dependent K^+ -channels of large- and intermediate conductance.

Keywords: lymph node, endothelium, endothelial hyperpolarization, Ca^{2+} -activated K^+ -channels.