УДК 612.015.31+612.397

В.П. Ляшенко, С.М. Лукашов

Вплив еналаприлу на ліпідний спектр крові і вміст кальцію в аорті та печінці за умов стресу

Исследовали возможные механизмы влияния агиотензинпревращающего фермента на динамику кальцигистии в аорте и печени, а также липидный спектр крови крыс в условиях длительного стресса. Показано, что блокада ангиотензинпревращающего фермента приводит к однотипным изменениям содержания кальция в изучаемых органах, но с разными количественными показателями. Содержание общего холестерина и липопротеидов высокой плотности тесно связано с содержанием кальция в печени. По-видимому, полученные результаты отражают наиболее оптимальный режим жизнеобеспечения клетки в условиях длительного стресса, который напрямую связан с кальциевым гомеостазом и его поддержкой за счет вне- и внутриклеточных резервов.

ВСТУП

Відомо, що система ренін – ангіотензин – альдостеронова є вагомим ланцюгом підтримання артеріального тиску. Активатором цієї системи може бути зменшення об'єму крові, зниження концентрації натрію в канальцевій сечі, артеріального тиску, а також симпатичні впливи, що реалізуються через β-рецептори [12]. Активація симпатичних впливів можлива за умов стресу, коли одночасно буде відбуватись і сенситизація β-рецепторів під впливом глюкокортикоїдів [10, 12]. Ці ефекти реалізуються внаслідок змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію та залучення кругообігу поліфосфатидилінозитолу, який мобілізує Ca^{2+} з позаклітинного середовища. Тобто концентрація внутрішньоклітинного Ca^{2+} підвищується як завдяки його притоку в клітину (чи гальмування його виходу з неї), так і під впливом інозитолтрифосфату [1]. Ці процеси викликають стимуляцію гладеньких м'язів і стероїдогенез за допомогою сенситизації рецепторів ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) [12].

Водночас кальцій бере участь у багатьох метаболічних реакціях, зокрема в обміні холестерину (ХС) і синтезі ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), який відбувається майже в усіх клітинах [1, 2, 7].

Слід зазначити, що практично всі згадані відомості, отримані при дослідженні культури тканин, не можуть відобразити загальну картину змін як кальцієвого, так і холестеринового гомеостазу за умов цілісного організму. Мета нашої роботи – вивчення динаміки ліпідного спектра крові й утримання кальцію в аорті та серці за умов стресу та блокування ангіотензинперетворювального ферменту.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на лабораторних щурах-самцях. Вік тварин на початок експерименту становив 2 міс. Всі тварини були поділені на три групи: I – контрольні тварини (n=58); II група (n=76) – тварини, у яких викликали стрес-реакцію обмеженням життєвого простору до 80–100 $см^2$ на одну тварину і доданням до їжі

© В.П. Ляшенко, С.М. Лукашов

NaCl (2 г/кг) [8]. Тварини III групи (n=36) на фоні стрес-реакції отримували блокатор ангіотензинперетворюювального ферменту еналаприлу в дозі 25 мг/кг на добу. Препарат вводили через зонд у фізіологічному розчині (1,5 мл) вранці, натще. Таке застосування препарату дало змогу виявити можливий вагомий внесок системи ренін – ангіотензин – альдостерон у відповіді на стрес і накопичення тканинного кальцію.

Експеримент тривав 21 тиж з реєстрацією результатів кожні 3 тиж. На цих часових інтервалах усіх тварин декапітували і повністю забирали аорту та печінку, в яких методом атомно-абсорбційної спектрометрії визначали вміст тканинного кальцію [11]. Паралельно у сироватці крові визначали вміст ХС і ХС ЛПВЩ. Вміст загального ХС у сироватці крові тварин виявляли за методом Ілька [9], ХС ЛПВЩ – після осадження ЛПНЩ і дуже низької щільності (ЛПДНЩ) гепарином за наявності іонів марганцю [5]. Всі проби з визначення вмісту кальцію, ХС і ХС ЛПВЩ досліджували три рази. Результати обробляли статистично методом парних порівнянь і оцінювали їх як вірогідні при $P<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Динаміка вмісту кальцію в аорті щурів досліджуваних груп представлена на рисунку, а. У тварин I (контрольної) групи спостерігалося плавне накопичення кальцію з 3-го по 15-й тиждень експерименту і плавне його зниження з 18-го по 21-й тиждень, що може бути пов'язано з функціональними характеристиками основних кальцій-транспортних систем гладенькоm'язових клітин, структурним станом їх мембран і механізмами трансмембранної передачі гормональних сигналів за фізіологічних умов. Слід зазначити, що отримані нами кількісні показники вмісту загального кальцію в аорті за фізіологічних умов дещо відрізняються від літературних даних [14]. Мабуть, такі відмінності можуть бути пов'язані з підготовкою досліджуваного матеріалу, породою тварин, віковими особливостями тощо.

У тварин II групи спостерігалась аналогічна динаміка вмісту кальцію в аорті, тільки кількісні показники цієї динаміки перевищували контрольні значення в 3–6 разів на 3–18-му тижнях і майже відповідали контрольним значенням на 21-му тижні. На наш погляд, така ситуація пов'язана з адаптаційно-компенсаторною реакцією на стрес [10, 13]. Така захисна реакція проявляється виникненням стійкої гіперхолестеринемії, підвищенням жорсткості мембран, гальмуванні роботи Ca^{2+}-АТФаз, ендотеліальній дисфункції, збільшенні кількості продуктів перекисного окиснення, зменшенні вмісту антиоксидантів тощо [1, 7]. Всі ці процеси своєю прямою чи опосередкованою дією можуть призводити до збільшення вмісту внутрішньоклітинного кальцію [3]. Оскільки вони залучаються до роботи безпосередньо під впливом стресових агентів, можна зробити припущення саме про внутрішньоклітинне накопичення кальцію на 3–18-й тижні дослідження. Таке надмірне перевантаження клітин кальцієм може викликати апоптотичні та некротичні процеси і зміни чутливості та спорідненості мембранних рецепторів до певних гормонів. Враховуючи ці реакції, а також зсуви гормонального фону за умов перебігання стадій стресу, можна прогнозувати наявність так званого "тканинного остеопорозу", що проявлялося в поступовому зниженні вмісту кальцію на 21-му тижні майже до вихідних значень.

Для виявлення можливого кількісного внеску системи ренін – ангіотензин – альдостерон у підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію за умов стресу ми використовували блокатор ангіотензин-

перетворювального ферменту (АПФ) – еналаприл. Застосування даного препарату пояснюється розповсюдженістю рецепторів ангіотензину-II у гладеньком'язових клітинах, серці, надниркових залозах, гепатоцитах, тканинах мозку [1, 3, 12]. Але слід зазначити, що дія ангіотензину-II опосередкована в цих органах рецепторами різних типів – АТ1 і АТ2. За умов блокування АПФ на перших тижнях дослідження вміст кальцію в аорті перевищував контрольні значення в 15–30 разів і навіть значення відповідних показників у тварин II групи в 6–8 разів. На 12–15-му тижнях спостерігалося різке зниження вмісту кальцію навіть нижче контрольних значень, а 18–21-му тижні вміст був приблизно таким, як на початку експерименту (див. рисунок, а).

Слід зазначити, що динаміка вмісту кальцію в печінці щурів фізіологічних умов і за умов стресу була аналогічна змінам вмісту кальцію в аорті досліджуваних тварин (див. рисунок, б). Така аналогія може відображати паралельні процеси, що відбуваються в різних клітинах за певних умов. Тобто активація симпато-адреналової системи [13], підсилення перекисного окиснення ліпідів мембрани клітин печінки та зниження вмісту антиоксидантів [6], а також відповідні зсуви гормонального фону [8, 16], що спостерігаються на перших етапах розвитку стресу, зумовлюють відповідні зміни кальцієвого гомеостазу печінки. Виснаження енергетичних ресурсів, що відбувається на останній стадії стресу, а також руйнування ферментативних реакцій відображають зміни вмісту кальцію на 15–21-му тижнях дослідження. Можливо, що вже на цьому етапі досягається пік процесів деструкції клітин.

Застосування еналаприлу істотно змінює кальцієвий гомеостаз печінки. Спостерігається різке збільшення вмісту кальцію в 10–12 разів порівняно з контролем на 3–6-му тижнях дослідження та зниження його концентрації майже до відповідних значень контрольної групи на 9–21-му тижнях. Тобто під впливом блокади АПФ вміст тканинного кальцію в аорті та печінці змінюється так, щоб забезпечити функціонування клітин. Деякі розбіжності в динаміці можуть бути зумовлені різними типами рецепторів до ангіотензину-II. Ці рецептори відрізняються як роз-

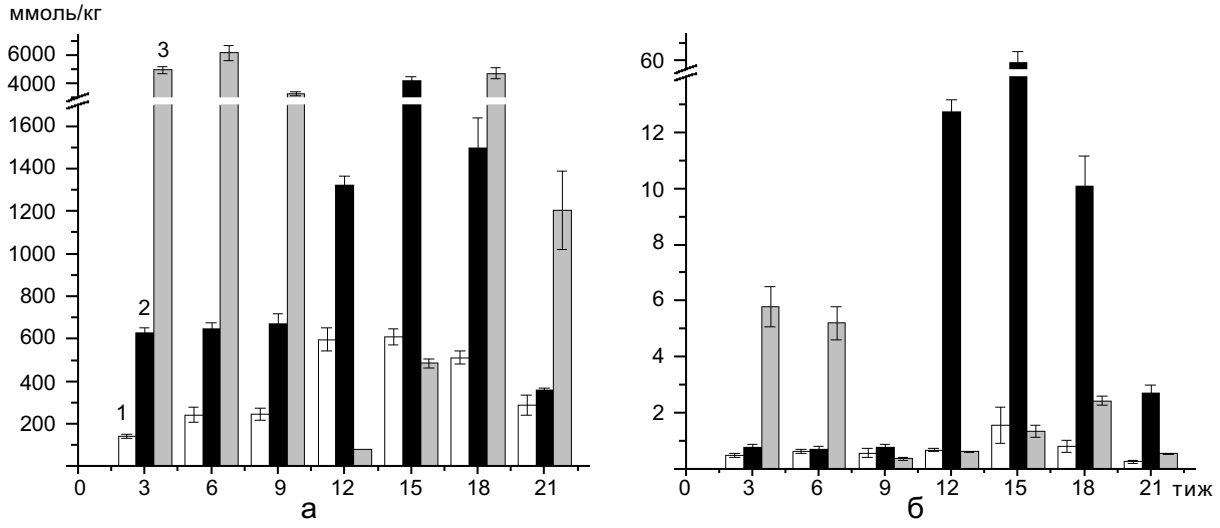

Рис. Динаміка вмісту кальцію в аорті (а) та печінці (б) щурів: 1 – I група, 2 – II група, 3 – III група

повсюдженістю в органах, так і механізмом роботи – через інозитолтрифосфат і Ca^{2+} чи інгібуванням аденілатциклази та протеїнкіназ [1, 12]. В будь-якому випадку, дія ангіотензину-II призводить до підвищення вмісту внутрішньоклітинного кальцію як внаслідок його входу (чи гальмування виходу) з позаклітинного середовища, так і через мобілізації з внутрішньоклітинних запасників [3]. Ці два способи надходження кальцію в цитоплазму характерні для різних типів клітин і для багатьох гормонів, які реалізують свою дію за допомогою активації фосфоінозитидного обміну. Специфічність дії цих способів проявляється в різній кінетиці та вагомому внеску зовнішнього і внутрішньоклітинного кальцію в рецепторзалежне підвищення його цитозольної концентрації. Дослідження, проведені на ізольованій клітині, показали, що мобілізація кальцію з внутрішньоклітинних депо забезпечує швидке та короткотривале підвищення концентрації кальцію. Для тривалого підтримання такого стану необхідний вхід кальцію ззовні [1]. Відкритим залишається питання про співвідношення наведених вище шляхів підвищення концентрації цитозольного кальцію. Можливі декілька варіантів розвитку цих процесів. Зовнішній кальцій може виконувати лише тригерну функцію до депонованого кальцію клітин. Може скластись ситуація, коли зовнішній кальцій буде надходити в клітину тільки в момент спустошення внутрішньоклітинних кальцієвих депо. При цьому внесок зовнішнього кальцію може бути визначальним [15].

Зовнішній кальцій може надходити до клітини через потенціалзалежні кальцієві канали, оскільки під дією ангіотензину-II G-білок може безпосередньо їх активувати [1]. Таке детальне вивчення механізму дії ангіотензину-II необхідне для зрозуміння отриманих результатів. На наш погляд, стрімке підвищення концентрації кальцію в аорті та печінці на початку експерименту в III групі тварин зумовлене його входом із позаклітинного середовища. Таке припущення ми могли зробити завдяки застосуванню атомно-абсорбційного методу дослідження, оскільки він визначає вміст загального кальцію (як зв'язаного, так і вільного). Тобто за умов дії еналаприлу, коли вихід кальцію з внутрішньоклітинних депо за допомогою інозітолтрифосфату буде заблоковано, кількість цього депонованого кальцію все одно буде відображатися в наших результатах. Блокування виходу кальцію з внутрішньоклітинних депо буде викликати масовий його вхід із позаклітинного простору, оскільки відомо [1]: якщо депо кальцію будуть спустошені (чи заблоковані як у нашому експерименті), то вхід зовнішнього кальцію буде в декілька разів більший, ніж за фізіологічних умов. Такий високий вміст кальцію в цитозолі буде активувати механізми його виведення.

Кількісні показники кальцигістії в аорті та печінці під час прийняття еналаприлу на 18–21-му тижнях декілька відрізняються. В аорті вони перевищують значення як у I, так і в II групі тварин. У печінці ці значення нижчі від таких у II групі і майже збігаються зі значеннями у I (контрольній) групі. Обґрунтування механізмів, що спостерігалися, неможливе без розгляду змін ліпідного спектра крові, оскільки кальцій печінки бере участь не тільки у вторинному опосередкуванні гормональних реакцій. Як активатор певних ферментів [3], він підтримує гомеостаз ХС в організмі.

У тварин II групи стресовий фактор викликає розвиток захисно-компенсаторної реакції (табл. 1), одним з проявів якої є виникнення ендогенної гіперхолестеринемії [7]. Саме така ситуація частково стабілізує ліпідний бішар мембран, що підвищує резистентність до електропробою та дезінтеграції. З іншого боку, переван-

Таблиця 1. Динаміка вмісту холестерину (мг %) у сироватці крові щурів

Група тварин	3 тиж	6 тиж	9 тиж	12 тиж	15 тиж	18 тиж	21 тиж
I	60,33±4,16	76,83±1,95	83,58±3,22	94,42±10,00	100,50±6,84	122,37±8,75	107,83±7,29
II	209,29±4,61*	104,29±2,86*	129,90±8,45*	284,76±3,86*	274,29±12,97*	272,86±4,65*	279,29±0,72*
III	91,43±6,23*	80,86±7,53*	134,29±5,41*	248,09±5,49*	254,29±2,15*	276,79±7,32*	162,38±6,76*

Примітка. Тут і в табл. 2. * P<0,05 порівняно з контролем

таження мембран ХС підвищує їх в'язкість, знижує реакційну спроможність, гальмує роботу Ca^{2+}-АТФаз [4, 7], що порушує проникність мембран, гомеостаз клітин і їх життєдіяльність. За умов блокади АПФ динаміка вмісту ХС мало відрізняється від такої інших груп, але механізми явищ, що спостерігаються, інші. Початкове зниження вмісту ХС за таких умов зумовлено інтенсивним поглинанням ХС ЛПНЩ і утворенням ХС ЛПВЩ як у печінці, так і в інших тканинах і органах. Це підтверджується значенням вмісту ХС ЛПВЩ у сироватці крові щурів досліджуваних груп (табл. 2), коли вміст ХС ЛПВЩ на перших тижнях дослідження в III групі тварин становив близько 60 % від загального вмісту ХС. Напевно, енергозабезпечення клітини за таких умов не може тривало підтримувати цей темп і ендогенна гіперхолестеринемія, що виникає, може призводити до деградації клітинних мембран, їх рецепторів і каналів, особливо лігандзалежних. Тому наприкінці дослідження кальцієвий гомеостаз буде забезпечуватися головним чином внаслідок активації потенціалзалежних каналів. Такі канали у великій кількості існують в гладеньком'язових клітинах аорти, в печінці їх існування не доведено [2]. Тому збільшення вмісту кальцію в аорті у тварин III групи на 18–21-му тижнях дослідження зумовлено більшою мірою активацією потенціалзалежних каналів, які, мабуть, більш стійкі до структурно-функціональних змін мембрани. До того ж, як було зазначено вище, різке зниження вмісту ангіотензину-II не дає змоги повною мірою реалізуватися можливому циклу реакцій ангіотензину-II – G-білок – активація кальцієвих каналів L-типу [16]. Тому наприкінці дослідження вміст кальцію в печінці у тварин III групи значно нижчий порівняно зі значеннями у I та II груп. Це може призводити до зниження активності ферментативних реакцій і зменшення фракції ХС ЛПВЩ, відсоток якої у тварин III групи в цей час значно знижується.

Таким чином, вміст тканинного кальцію на завжди корелює з динамікою ліпідного спектра крові. На наш погляд, певна кореляція може існувати в тканинах за функціональних умов. У тканинах, що зазнали будь-яких структурно-функціональних змін за умов стресу, виникає особлива ситуація, яка найбільш притаманна даним умовам і є найбільш енергозберігаючою. Для реалізації такої ситуації клітина буде підтримувати необхідний гомеостаз кальцію, регулюючи його концентрацію за до-

Таблиця 2. Динаміка вмісту холестерину ліпопротеїдів високої щільності (мг %) у сироватці крові щурів

Група тварин	3 тиж	6 тиж	9 тиж	12 тиж	15 тиж	18 тиж	21 тиж
I	32,86±2,18	42,52±3,10	47,14±4,19	58, 57±2,15	65,71±5,12	87,14±3,24	77,14±2,19
II	150,00±11,69*	88,57±2,86*	119,72±13,83*	196,43±6,43*	122,86±18,57*	149,29±9,29*	183,57±17,86*
III	55,24±2,90*	64,57±6,44*	72,86±2,86*	126,43±5,00*	100,72±11,43*	83,14±7,33*	83,58±10,72*

помогою діючих на цей час механізмів, тобто блокування одного механізму включає інтенсивну роботу інших. Така картина, ймовірно, буде спостерігатися в цілісному організмі та виражатися в неспецифічній адаптаційній реакції, яка забезпечує зберігання життєдіяльності за умов постійно діючих факторів зовнішнього середовища.

V. P. Lyashenko, S. N. Lukashev

EFFECT OF ENALAPRYL, THE BLOCKER OF ANGIOTENSINCONVERTING ENZYME, ON THE LIPID SPECTRUM OF BLOOD AND CALCIUM CONTENTS IN THE AORTA AND LIVER IN STRESS CONDITION

Possible mechanisms of influence of the angiotensinconverting enzyme in the calcigistia dynamics in the aorta and liver and lipid spectrum of the rat blood upon the long-live stress exposure were investigated. It is shown, that the blockade of the angiotensinconverting enzyme leads to the one-type changes of the calcium contents in organs studied, but with different quantity indicators. The contents of general cholesterol and high-density lipoproteins is intimately connected with the calcium contents in liver. Apparently, the results obtained mirror the most optimal mode of the cell survival in a long-term stress conditions, which are directly connected to a calcium homeostasis and its support by extra- and intracellular reserves.

Dnepropetrovsk National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авдонин П. В., Ткачук В. А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. – М.: Наука, 1994. – 288 с.
2. Гулак П. В., Дудченко А. М., Зайцев В. В. и др. Гепатоцит: функционально-метаболические свойства. – М.: Наука, 1985. – 272 с.
3. Дьячук Г. И. Возможные пути регуляции кальциевого обмена // Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова. – 1991. – **77**, №11. – С.117 – 125.
4. Климов А. И., Никульчева Н. Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. – СПб. :Питер, 1995. – 298 с.
5. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. –Минск. :Бєларусь, 1982. – 360 с.
6. Логинов А. С., Митюшин Б. Н. Внутриклеточная активация кислорода и молекулярне механизмы автоокислительного повреждения печени //Вест. РосАМН. – 1994. – № 5. – С. 3 – 8.
7. Лопухин Ю.М., Арчаков А.И., Владимиров Ю.А., Коган Э. М. Холестериноз. – М.: Медицина, 1983. – 352 с.
8. Ляшенко В. П., Лукашов С.М., Зорова Ж. В., Політаєва В. І. Спосіб моделювання атеросклерозу // Промислова власність. – 2002. – Бюл. №1. – С. 481.
9. Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике. – М. :Медицина, 1987. – 368 с.
10. Никонов В. В. Стресс: современный патофизиологический подход к лечению. –Харьков. :Консум, 2002. –240 с.
11. Славин У. Атомно-абсорбционная спектроскопия. – Л. :Химия, 1989. – 296 с.
12. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. – М. :Мир,1989. – 656 с.
13. Фурдуй Ф. И. Современные представления о физиологических механизмах развития стресса. – В кн.: Механизмы развития стресса. – Кишинев. :Штиинца,1987. – С. 8 – 33.
14. Niederhoffer N., Bobryshev Y.V., Lartand – Idjouadiene I. et al. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine //J. Vasc. Res. –1997. – **34**, № 5. – P.386 – 398.
15. Rottingen J., Iversen J. G. Ruled by waves? Intracellular and intercellular calcium signaling //Acta. Physiol. Scand. – 2000. – **169**, № 3. – P.203 – 219.
16. Tordjmann T., Combettes L., Berthon B. et al. Hormone-mediated calcium responses of rat and human hepatocytes. Study of multicellular systems videomicroscopy // Gastroenterol. Clin. Biol. – 1995. – **19**, № 12. – P.980 – 990.

Дніпропетров. нац. ун-т М-ва освіти України

Матеріал надійшов до редакції 04.08.2003