

А.В.Гурковська, Х.Ю.Суханова, В.О.Бурій, В.Ф.Сагач

Роль оксиду азоту в реакціях печеристих тіл, які викликані перекисом водню

Гладкие м'язи (ГМ) печеристих тел в основному перебувають в скороченому стані, яке складається з тонічного і тетанічного компонентів. Тетанічне скорочення є результатом суперпозиції фазних скорочень, що виникають спонтанно з частотою 5–27 в хвилину. Перекис водню в концентрації 10^{-3} моль/л викликає тимчасове збільшення тетанічного скорочення, яке триває від 5 до 8 хвилин і сменяється або відновленням спонтанної активності, або зменшенням частоти фазних скорочень і розслабленням м'язової смуги. При дії впродовж 30 хвилин специфічного блокатора NO-синтази, L-NAME, не спостерігається суттєвого зміни спонтанної активності ГМ печеристих тел, однак амплітуда і тривалість викликаного H_2O_2 скоротильної реакції збільшуються на $41,2 \pm 14,5$ і $52,5 \% \pm 22,8 \%$ ($n=9$) відповідно. Екзогенні донори NO нитроглицерин і нітропруссид натрію, навпаки, викликають угнетення спонтанної активності і розслаблення м'язової смуги. В цих умовах амплітуда і тривалість скорочення на дію H_2O_2 зменшуються на $8,7 \pm 3,7$ і $24,5 \% \pm 10,6 \%$ ($n=7$) відповідно порівняно з початковими значеннями. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що тетанічний компонент є важливою складовою тонуса ГМ печеристих тел, який знаходиться під впливом вільно радикальних форм кисню і контролюється NO-залежним механізмом.

ВСТУП

Ендотелій печеристих тіл відіграє важливу роль у розслабленні гладеньких м'язів (ГМ), яке є вирішальним фактором для початку та підтримання ерекції [1]. Окис азоту (NO), основний медіатор розслаблення, продукується ендотеліальними клітинами або донорами NO і викликає розслаблення ГМ, активуючи гуанілатциклазу, що спричинює збільшення внутрішньоклітинного вмісту циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ) [2]. Із збільшенням цГМФ пов'язано зменшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , що призводить до розслаблення ГМ, у тому числі і печеристих тіл. Показано, що ендотеліальними клітинами кровоносних судин також продукуються і деякі реактивні форми кисню. Вільні радикали інактивують NO та

впливають на тонуус кровоносних судин [4]. Перекис водню (H_2O_2) є важливою реактивною сполукою кисню, яка бере участь у скороченні судин і їх пошкодженні. Здатність H_2O_2 змінювати судинний тонуус була показана на ізольованих кровоносних судинах [3–8], але даних відносно впливу H_2O_2 на ГМ печеристих тіл ми не знайшли.

Метою нашої роботи було дослідження ролі ендотелію в реакціях ГМ печеристих тіл, викликаних дією перекису водню.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на самцях кролів масою 2–2,5 кг, у яких видаляли пеніс після проведення повітряної емболії. Поздовжні м'язові смужки печеристих тіл завдовжки до 6 мм і шириною до 2 мм розміщували в проточний розчин Кребса при $36,5^\circ C$. Ско-

© А.В.Гурковська, Х.Ю.Суханова, В.О.Бурій, В.Ф.Сагач

ротливу активність ГМ реєстрували в режимі, близькому до ізометричного за допомогою тензометричного датчика на чорнильному самописці. Розчин Кребса був такого складу (ммоль/л): NaCl – 120; KCl – 5,9; NaHCO₃ – 15,5; NaH₂PO₄ – 1,2; MgCl₂ – 1,2; CaCl₂ – 2,5; глюкоза – 11,5. Результати статистичної обробки експериментальних результатів наведено як середні арифметичні ± похибка середнього.

Для дослідів використовували: 1%-й розчин H₂O₂ (УкрФарм, Україна), NGnitro-l-arginin mehtyl ester (L-NAME) (“Sigma”, США), нітроглицерин (“Abbot Laboratories”, USA), нітропрурид (“P.P.H. Polskie Odczynniki Chemiczne Gliwice”, Польща).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами було показано, що ГМ печеристих тіл кролика мають спонтанну активність, яка характеризується швидкими фазними скороченнями. Частота скорочень варіює від 10 до 27 за хвилину в різних смужках. Характер спонтанної активності суттєво не змінюється за наявності специфічного блокатора NO-синтази L-NAME в концентрації 10⁻⁴ моль/л.

Перекис водню у концентрації 10⁻³ моль/л уже на першій хвилині дії викликає складну реакцію м'язової смужки. В основному, спочатку спостерігається короткочасне тетаничне скорочення ГМ (2–8 хв), яке в деяких випадках змінюється пригніченням фазних скорочень і подальшим розслабленням м'язової смужки (рис 1, а), а в деяких – відновленням фазної скоротливої активності (рис 2, а). Короткочасне розслаблення м'язового препарату спостерігалось і перед скороченням, яке викликав H₂O₂. Дія останнього має зворотний характер і спонтанна активність м'язової смужки відновлюється після 15–20 хв відмивання нормальним розчином.

Для визначення ролі NO в реакціях печеристих тіл, викликаних H₂O₂, було досліджено дію L-NAME на ці реакції. Якщо м'язові смужки витримати якнайменш 30 хв у розчині Кребса, який містить L-NAME (10⁻⁴ моль/л), реакція на H₂O₂ змінюється. Як правило, збільшується амплітуда та тривалість скоротливої реакції, зникає розслаблення, яке спостерігалось перед скороченням, а тривалість розслаблення м'язової смужки після скорочення значно зменшується (див. рис. 1, б).

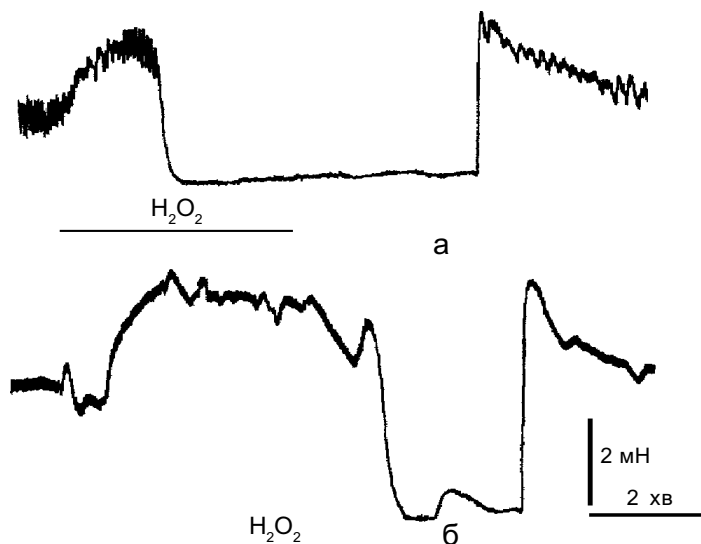


Рис. 1. Реакція гладеньких м'язів печеристих тіл, яка викликана дією H₂O₂ у нормальному розчині (а) і на 30-й хвилині дії L-NAME (б)

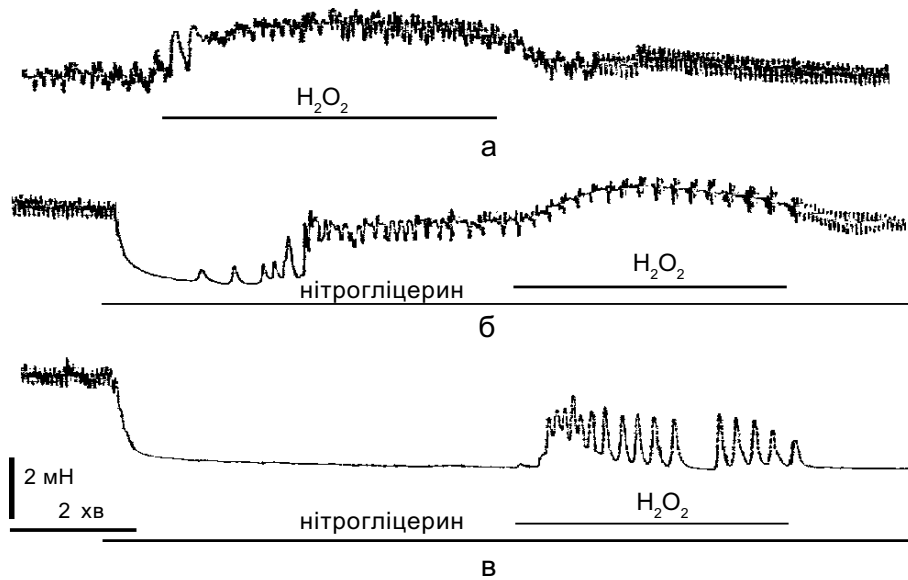


Рис. 2. Вплив нітрогліцерину на реакції гладеньких м'язів печеристих тіл, які викликані дією H_2O_2 у нормальному розчині (а), на фоні нітрогліцерину в концентрації 10^{-6} моль/л (б) і на фоні нітрогліцерину в концентрації $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л (в)

Подібні дані було отримано на аорті щурів. H_2O_2 викликав скорочення м'язових смужок, яке не залежало від наявності ендотелію, видаленого механічно [5].

Слід зазначити, що донори NO нітрогліцерин і нітропрурид викликали схожі дозозалежні реакції ГМ печеристих тіл. При дії нітрогліцерину в концентрації 10^{-6} моль/л фазні скорочення пригнічуються, що призводить до розслаблення смужки, проте через деякий час ГМ знов генерують фазні скорочення, але з меншою частотою (див. рис. 2,б). Збільшення концентрації нітрогліцерину до $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л спричинює стійке пригнічення фазних скорочень і розслаблення м'язової смужки (див. рис. 2,в). Скоротлива реакція, викликана H_2O_2 на фоні дії донорів NO, теж залежить від їх концентрації.

На діаграмі (рис. 3) показано амплітуду та тривалість скоротливих реакцій м'язових смужок, що викликані H_2O_2 на фоні дії L-NAME та нітрогліцерину. За 100 % брали скоротливу реакцію на H_2O_2 у нормальному роз-

чині Кребса. Видно, що на фоні дії L-NAME амплітуда тонічного скорочення та його тривалість збільшуються на $41,2 \pm 14,5$ і $52,5 \% \pm 22,8 \%$ (n=9) відповідно.

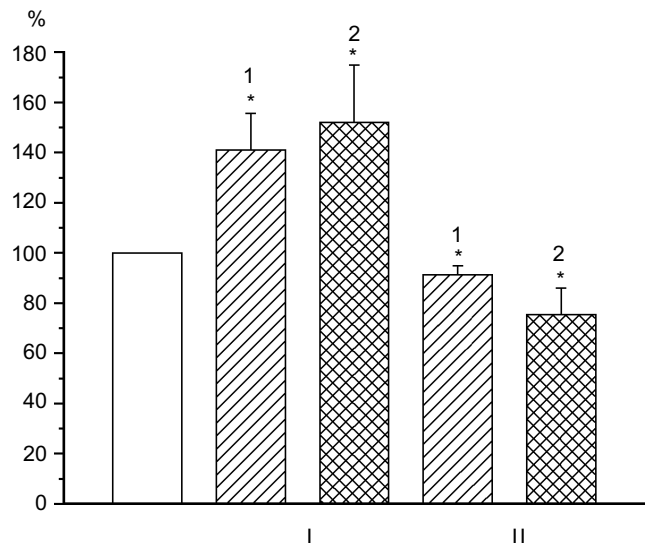


Рис. 3. Вплив L-NAME і нітрогліцерину на амплітуду (1) та тривалість (2) скоротливої реакції гладеньком'язових смужок печеристих тіл кроля, що викликані дією H_2O_2 : I – L-NAME і H_2O_2 , II – нітрогліцерин і H_2O_2 . За 100 % прийнято реакції скорочень, що викликані дією H_2O_2 у нормальному розчині (білий стовпчик)

Протилежні зміни амплітуди та тривалості скорочення виявлені при дії H_2O_2 при наявності донорів NO. За цих умов амплітуда зменшується на $8,7\% \pm 3,7\%$, а тривалість – на $24,5\% \pm 10,6\%$ ($n=7$).

Подібні дані було отримано на кровоносних судинах. Так, на кільцях ізольованої аорти щура [5, 6, 8] і мезентеріальній артерії [4] показано, що видалення ендотелію механічним шляхом, чи при витриманні кільця у розчині з L-NNA блокаторм NO-синтази, скоротлива реакція на H_2O_2 значно збільшується. Але є також відомості про те, що видалення ендотелію з кілець мозкової артерії собаки призводить до зменшення скорочення, викликаного H_2O_2 [7].

Дослідження, проведені на ГМ мезентеріальної артерії свідчать, що H_2O_2 є ендотеліозалежним, гіперполяризуючим і розслаблюючим фактором, але гіперполяризація мембрани та розслаблення ГМ спостерігається при дії екзогенного H_2O_2 на кровоносні судини зі збереженим ендотелієм [4]. У дослідах, проведених на ГМ кровоносних судин показано, що H_2O_2 викликає розслаблення через активацію кальційзалежних калієвих каналів, опосередковану частково прямою дією на канали і частково активацією розчинної гуанілатциклази з подальшим збільшенням вмісту цГМФ [3, 4].

Механізм дії H_2O_2 на ГМ печеристих тіл не досліджувався. Стосовно кровоносних судин є припущення, що різні види реактивних форм кисню, в тому числі і H_2O_2 , можуть викликати нестійке скорочення ГМ судин, активуючи рецептори АТФ [5].

Таким чином, на підставі отриманих результатів можна вважати, що збільшення амплітуди та тривалості скорочення ГМ печеристих тіл, яке викликане H_2O_2 на фоні дії L-NAME і зменшення значень цих показників при наявності нітрогліцерину, є свідченням того, що H_2O_2 викликає як NO-залежне, так і NO-незалежне скорочення ГМ

печеристих тіл. Під впливом NO, знаходяться і реакції розслаблення м'язової смужки, які спостерігаються при дії H_2O_2 .

A.V.Gurkovska, K.Yu.Sukhanova, V.A.Bouryi, V.F.Sagach

ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE CORPUS CAVERNOSUM REACTIONS EVOKED BY HYDROGEN PEROXIDE

Corpus cavernosum smooth muscle spends the majority of its time in the contracted state consisting of tonic and tetanic components. Tetanic component is a result of superposition of phasic contractions occurring spontaneously with a frequency of 5 - 27/minute. Hydrogen peroxide (H_2O_2) in concentration of 10^{-3} mol/l causes a transient increase in tetanic contraction lasting 5 to 8 minutes, followed by either recovery of spontaneous activity or inhibition of its frequency and muscle strip relaxation. 30 minutes pretreatment with the specific blocker of NO syntase, L-NAME, does not affect the intrinsic spontaneous activity parameters but enhances H_2O_2 evoked reaction, increasing both the amplitude and duration of the transient contraction by $41,2 \pm 14,5$ and $52,5\% \pm 22,8\%$ ($n=9$) correspondingly. By contrast, the exogenous NO donors nitroglycerin and sodium nitroprusside, cause spontaneous activity inhibition and muscle strip relaxation resulting in the decrease of H_2O_2 evoked contraction and duration by $8,7 \pm 3,7$ and $24,5\% \pm 10,6\%$ ($n=7$) correspondingly. These results suggest that tetanic contraction is an important component of corpus cavernosum smooth muscle tone which is modulated by free radical oxygen species and controlled by NO dependent mechanism.

A.A.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of the Ukraine, Kiev

Institute of Applied Problems of Physics and Biophysics, National Academy of Sciences of the Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Barnett A.L. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology // J. Urol. – 1997. – **157**. – P. 320–324.
2. Bennani S., Benjelloun S. The endothelium of corpus cavernosum // J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. – 1994. – **23**, №7. – P. 757–761.
3. Hayabuchi Y., Nakaya Y., Matsuoka S. et al. Hydrogen peroxide-induced relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca^{2+} -activated K^+ channels // Heart Vessels. – 1998. – **13**, №1. – P. 9–17.
4. Matoba T., Shimokawa H., Nakashima M. et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice // J. Clin. Invest. – 2000. – **106**, №12. – P. 1521–1530.
5. Shen J.Z., Zheng X.F., Kwan C.Y. Differential con-

- tractile actions of reactive oxygen species on rat aorta: selective activation of ATP receptor by H_2O_2 // *Life Sci.* – 2000. – **66**, №21. – P.291–296.
6. Sotnikova R. Investigation of the mechanisms underlying H_2O_2 -evoked contraction in the isolated rat aorta // *Gen. Pharmacology.* – 1998. – **31**, №1. – P. 115–119.
7. Yang Z.W., Zheng T., Wang J. et al. Hydrogen peroxide induces contraction and raises $[Ca^{2+}]_i$ in canine cerebral arterial smooth muscle: participation of cellular signalling pathways // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 1999 – **360**, №6. – P.646–653.
8. Yang Z.W., Zheng T., Zhang A. et al. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta // *Eur. J. Pharmacol.* – 1998 – **344**, №2–3. – P.169–181.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Ин-т приклад. проблем фізики і біофізики НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 02.04.2004*