

В.О. Бурий, А.В. Гурковська, К.Ю. Суханова, В.Ф. Сагач

Участь потенціалзалежних калієвих каналів у реакціях печеристих тіл кроля на оксидативний стрес

Ранее нами было показано, что оксидативный стресс вызывает сложную реакцию гладкомышечных клеток (ГМК) печеристых тел, состоящую из кратковременного расслабления, сменяющегося сокращением. Мы воспользовались блокаторами кальций-зависимых калиевых каналов – тетраэтиламмонием и потенциалзависимых калиевых каналов – 4-аминопиридином, чтобы выявить возможную причастность этих каналов к формированию исходного тонуса ГМК печеристых тел и к опосредованию их сократительной реакции в условиях оксидативного стресса. Тетраэтиламмоний в концентрации 1 ммоль/л вызывал сокращение печеристых тел. Апликация перекиси водорода (H_2O_2) на фоне его действия вызывала такую же сократительную реакцию, как и в контроле. Это свидетельствует о непричастности кальцийзависимых калиевых каналов к сократительной реакции на действие H_2O_2 . С другой стороны, сокращение гладкомышечных полосок на фоне угнетения этих каналов указывает на участие последних в формировании исходного тонуса печеристых тел. 4-аминопиридин в концентрации 5 ммоль/л вызывал сокращение, как и тетраэтиламмоний. Таким образом, потенциалозависимые, как и кальцийзависимые калиевые каналы принимают участие в формировании исходного тонуса ГМК печеристых тел. На фоне действия 4-аминопиридина сократительная реакция на H_2O_2 существенно уменьшалась. Наиболее вероятная причина этого уменьшения состоит в том, что популяция каналов, которые модулируются этими веществами является общей для обоих факторов. Из предыдущих наших исследований известно, что сократительная реакция печеристых тел на действие H_2O_2 угнетается индометацином. Вместе эти результаты свидетельствуют, что сократительная реакция ГМК печеристых тел на действие H_2O_2 может быть результатом угнетения 4-аминопиридинчувствительных потенциалзависимых калиевых каналов и опосредоваться продуктами метаболизма арахидоновой кислоты через циклооксигеназный путь.

ВСТУП

Розслаблення гладеньких м'язів печеристих тіл під впливом окису азоту (NO), що продукується ендотеліальними клітинами і опосередковується ацетилхоліном [3] є вирішальним фактором для започаткування та підтримання ерекції. NO активує розчинну гуанілатциклазу, що призводить до збільшення внутрішньоклітинного вмісту циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ) [4], який є основним медіатором розслаблення гладеньких м'язів. З іншого боку, ацетилхолін окрім NO може одночасно активувати утворення й інших вазоактивних

факторів, наприклад простагландинів, які є продуктами метаболізму арахідонової кислоти через циклооксигеназний шлях [5, 7]. Крім того відомо, що активація NO ендотеліальними клітинами кровоносних судин також супроводжується утворенням і деяких реактивних форм кисню (РФК). Найважливішими з них є супероксид і перекис водню. В організмі супероксид метаболізується до перекису водню, який, у свою чергу, перетворюється на радикали гідроксилу. Перекис водню легко проникає через клітинні мембрани кровоносних судин і бере участь в їх оксидативному пошкодженні [6, 9–13]. При таких патологічних

© В.О. Бурий, А.В. Гурковська, К.Ю. Суханова, В.Ф. Сагач

станах, як діабет, атеросклероз, гіпертонія порушується баланс між створенням і нейтралізацією РФК. Цей дисбаланс називають оксидативним стресом. Він є причетним до судинних розладів і корелює з еректильною дисфункцією при згаданих патологічних станах. Механізм, що відповідає за цю кореляцію, вивчено недостатньо.

Раніше ми показали [1, 2], що перекис водню викликає складну реакцію гладеньких м'язів печеристих тіл, яка складається з скороминулого розслаблення, що змінюється тривалим скороченням. Було також встановлено, що реакція розслаблення є результатом залучення ендотеліозалежних механізмів через активацію гуанілатциклазного шляху. На відміну від розслаблення, скоротлива реакція на перекис водню виявилася чутливою до блокаторів циклооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти. Оскільки результатом скоротливої реакції є припинення ерекції, цілком імовірно, що реактивні сполуки кисню можуть бути причетними до еректильної дисфункції.

Метою нашої роботи було дослідження механізмів скоротливої реакції гладеньких м'язів печеристих тіл, викликані дією вільних радикалів. Зокрема, було проведено дослідження можливої причетності до механізмів скоротливої реакції потенціал- і кальційзалежних калієвих каналів.

МЕТОДИКА

Досліди проводили 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 проточному розчині Кребса при 36,5 °С. Скоротливу активність гладеньком'язових смужок реєстрували на чорнильному самописці за допомогою тензометричного датчика в режимі, близькому до ізометричного. Паралельно сигнал з тензометричного

датчика оцифровували через цифро-аналоговий перетворювач „Граніт” (МВВ-16.8.14.003) і в цифровій формі зберігали для подальшого аналізу.

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.

Для дослідів використовували 1%-й розчин H₂O₂ (УкрФарм, Україна), тетраетиламоній і 4-амінопіридин (“Sigma”, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як і в інших типах гладеньких м'язів, скоротливість гладеньких м'язів печеристих тіл тісно пов'язана з активністю іонних каналів мембрани. Відомо, що оксиданти, залежно від типу судин, можуть збільшувати або зменшувати активність калієвих каналів мембрани гладеньком'язових клітин. Калієві канали беруть участь у формуванні потенціалу спокою, від якого залежить ступінь активації потенціалзалежних кальцієвих каналів гладеньком'язових клітин, а відтак, кальційзалежна активація скоротливого механізму. Для дослідження можливої причетності потенціал- та кальційзалежних калієвих каналів до механізмів скоротливої реакції печеристих тіл на перекис водню ми використовували блокатори відповідних калієвих каналів.

За відсутності зовнішніх подразників більшість м'язових смужок печеристих тіл проявляла спонтанну ритмічну скоротливу активність. Фазні скорочення повторювалися з частотою 10–27/хв і формували зубчастий тетанус (рис. 1). В цьому скороченому стані гладеньком'язові клітини печеристих тіл вірогідно перебувають більшість часу між періодами ерекції. Тетраетиламоній, який у невеликих концентраціях блокує переважно кальційзалежні калієві канали великої провідності, в концентрації 1 ммоль/л, що є субмакси-

мальною для каналів цього типу, викликав сумарну скоротливу реакцію печеристих тіл, яка супроводжувалася підвищенням частоти фазних скорочень (див. рис. 1).

Скоротлива реакція на блокування кальційзалежних калієвих каналів вказує на їх участь у формуванні вихідного тону печеристих тіл. Зменшення калієвої провідності мембрани за наявності тетраетиламонію, як відомо, спричиняє деполяризацію, підвищує збудливість мембрани галаденокм'язових клітин, що є причиною підвищення їх скоротливої активності. Якщо скоротлива реакція на перекис водню також опосередкована пригніченням тетраетиламонійчутливих калієвих каналів, то на фоні тетраетиламонію ця реакція не повинна проявлятися, оскільки канали вже ним заблоковані. Досліди, проілюстровані на рис. 1 (n=5) показують, що це не так. При аплікації перекису водню на фоні дії тетраетиламонію, скоротливі реакції на обидва подразники сумуються. Це може свідчити про непричетність кальційзалежних калієвих каналів до скоротливої реакції на перекис водню.

В іншій серії дослідів (n=3) проілюстрованій на рис.2, порядок аплікації перекису

водню та тетраетиламонію було змінено. Крім того, в цих дослідях використовувалися м'язові смужки, які не проявляли спонтанної активності та початково перебували в розслабленому стані. Аплікація перекису водню започатковувала спонтанну активність і переводила смужки в стан зубчасто-тетанічного скорочення. На цьому фоні тетраетиламоній викликав додаткове скорочення, що сумувалося зі скороченням, яке було викликане перекисом водню. Результати цих дослідів означають, що перекис водню використовує для скорочення інший механізм, ніж пригнічення кальційзалежних калієвих каналів.

4-амінопіридин, який є блокатором потенціалзалежних калієвих каналів, у концентрації 5 ммоль/л спричиняв скоротливу реакцію печеристих тіл подібну до тієї, що викликала тетраетиламонієм (рис.3). Таким чином, потенціалзалежні калієві канали, так само, як і кальційзалежні беруть участь у формуванні вихідного тону печеристих тіл. Після того, як потенціалзалежні калієві канали були пригнічені 4-амінопіридином, перекис водню викликав значно меншу скоротливу реакцію, ніж після пригнічення тетраетиламонієм кальційзалежних калієвих каналів.

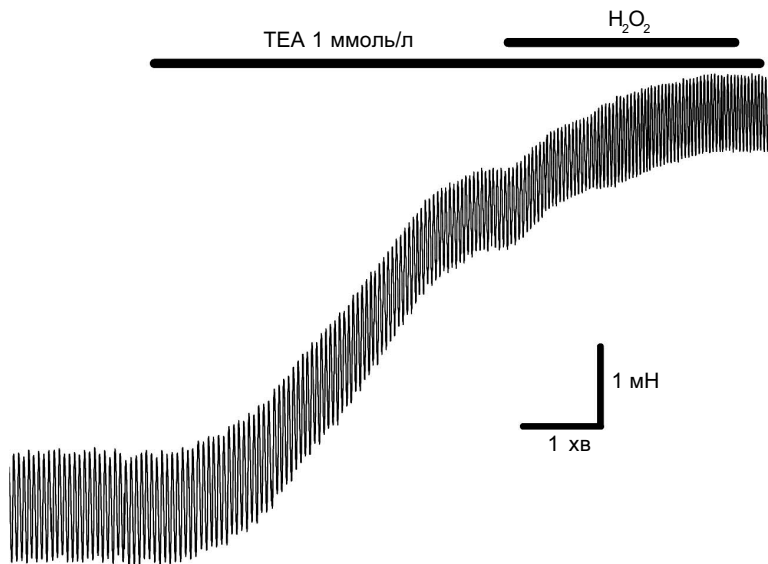


Рис. 1. Сумація скоротливих реакцій галаденокм'язових клітин печеристих тіл на тетраетиламоній і перекис водню

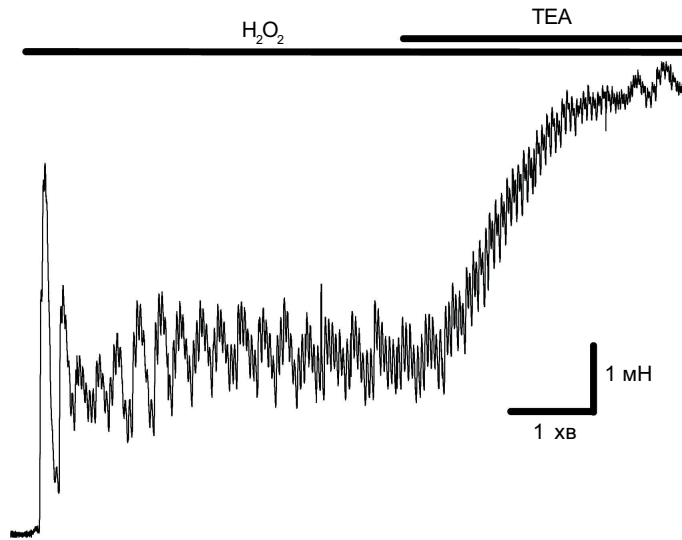


Рис. 2. Скоротлива реакція гладеньком'язових клітин печеристих тіл на тетраетиламоній на фоні дії перекису водню

При зворотному порядку аплікації 4-амінопіридину скоротлива реакція на 4-амінопіридин на фоні дії перекису водню була також значно меншою, ніж за відсутності H_2O_2 (рис.4). Зменшення реакції на 4-амінопіридин не є результатом насичення скоротливого механізму перекисом водню, оскільки, як видно із рис.2, тетраетиламоній на фоні дії такої самої концентрації H_2O_2 викликає потужну скоротливу реакцію, яка

сумується з реакцією на H_2O_2 . Найбільш вірогідне пояснення цих результатів полягає в тому, що популяція каналів, які модулюються перекисом водню і 4-амінопіридином є спільною для обох чинників.

Отримані результати показали, що скоротлива реакція гладеньких м'язів печеристих тіл на перекис водню може бути наслідком пригнічення 4-амінопіридинчутливих потенціалзалежних калієвих каналів. Оскільки, як

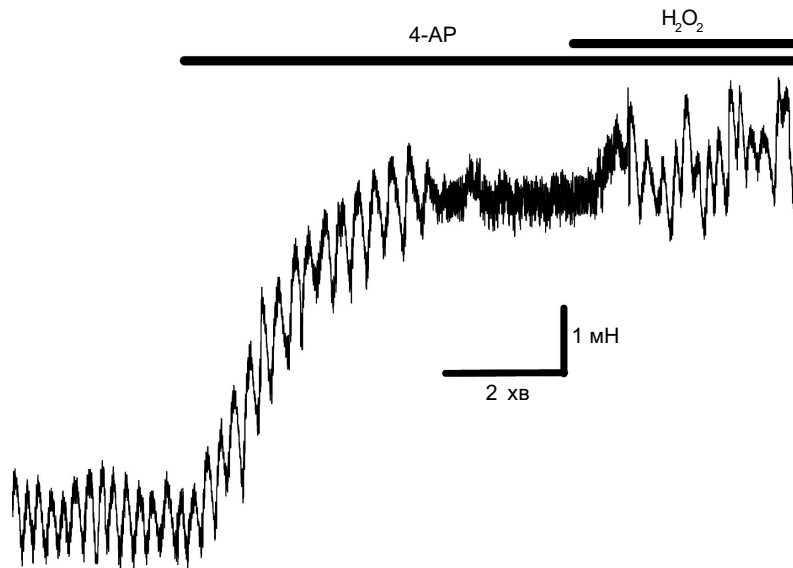


Рис. 3. Скоротлива реакція гладеньком'язових клітин печеристих тіл на перекис водню на фоні дії 4-амінопіридину

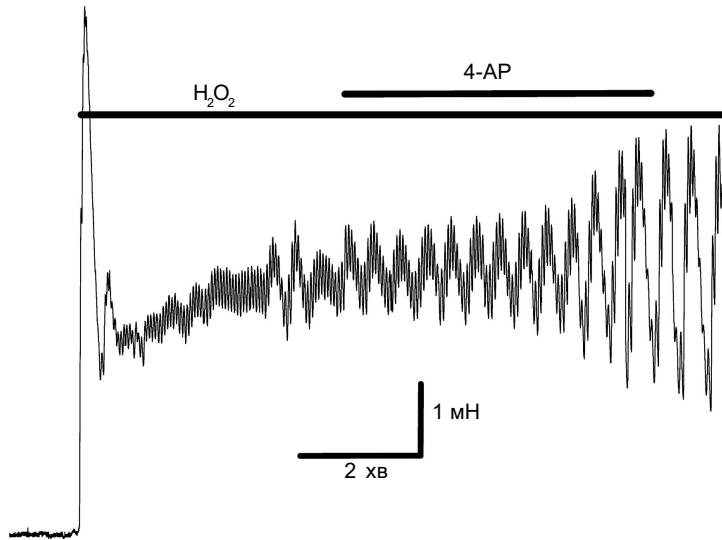


Рис. 4. Скоротлива реакція гладеньком'язових клітин печеристих тіл на 4-амінопіридин на фоні дії перекису водню

показано нами в попередніх дослідженнях [1, 2], скоротлива реакція є чутливою до індометацину, можна аргументувати, що це пригнічення не є прямою дією РФК на калієві канали, а опосередковане продуктами метаболізму арахідонової кислоти через циклооксигеназний шлях.

Щоб дослідити можливість додаткової прямої дії РФК на калієві канали, ми вивчали вплив скавенджера аніонів супероксиду – супероксиддисмутази та скавенджера гідроксиду – диметилсульфоксиду (ДМСО). Очікувалося, що в разі прямої оксидації калієвих каналів вільними радикалами супероксиду чи гідроксиду, 4-амінопіридинчутлива скоротлива реакція на перекис водню буде пригнічуватися одним із скавенджерів. Якщо ж модуляція калієвих каналів опосередковується лише через продукти метаболізму арахідонової кислоти, яка вивільнюється завдяки активації перекисом водню фосфоліпази А, то скавенджери супероксиду та гідроксиду будуть малоефективними.

Дослідження показало, що 20-хвилинне витримання препаратів у розчині, що містив 150 од/мл супероксиддисмутази чи 7 ммоль/л ДМСО не впливало на скорот-

ливу реакцію гладеньком'язових клітин печеристих тіл на перекис водню.

Відомо, що нативна супероксиддисмутаза розташована на зовнішній поверхні судинних ендотеліальних клітин [8], де прив'язується до гепаринсульфат-протеоглікану і суттєво знижує можливість реагування супероксиду з перекисом водню через реакцію Фентона в результаті якої утворюється радикал гідроксиду. Тому відсутність ефекту супероксиддисмутази та ДМСО може означати, що ні аніони супероксиду, ні радикали гідроксиду, які потенційно могли б прямо пошкоджувати калієві канали мембрани, не залучаються до скоротливої реакції на перекис водню. Найбільш вірогідним механізмом скоротливої реакції гладеньких м'язів печеристих тіл на перекис водню є пригнічення калієвих каналів головним чином через циклооксигеназний шлях.

ВИСНОВКИ

1. У формуванні вихідного тону печеристих тіл беруть участь як потенціалзалежні так і кальційзалежні калієві канали.
2. Кальційзалежні калієві канали гла-

деньких м'язів печеристих тіл нечутливі до оксидативного стресу.

3. Скоротлива реакція гладеньких м'язів печеристих тіл на перекис водню може бути результатом пригнічення 4-амінопіридин-чутливих потенціалзалежних калієвих каналів і опосередковуватися продуктами метаболізму арахідонової кислоти через циклооксигеназний шлях.

**V.A.Bouryi, A.V.Gourkovska,
K.Yu.Sukhanova, V.F.Sagach**

INVOLVEMENT OF VOLTGE DEPENDENT POTASSIUM CHANNELS IN RABBIT CORPUS CAVERNOSUN RESPONCES TO OXIDATIVE STRESS

Previously we have demonstrated that oxidative stress produces a complex response of the rabbit corporal smooth muscle cells consisting of transient relaxation followed by contraction. We used 4-AP and TEA, selective blockers for voltage- and Ca^{2+} -dependent K^+ channels to investigate possible contribution of these channels in maintaining of basal cavernosal tone as well as in mediating of contractile response caused by oxidative stress. TEA in concentration of 1 mmol/l caused contraction of corporal smooth muscle. Application of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the presence of TEA caused contraction similar to that in control conditions. This argues against involvement of Ca^{2+} -dependent K^+ channels in contractile response caused by oxidative stress. On the other hand, contractile response on inhibition of Ca^{2+} -dependent K^+ channels suggests their contribution in maintaining of corporal tone. 4-AP in concentration of 5 mmol/l caused contraction resembling that, evoked by TEA. Thus, voltage-dependent similar to Ca^{2+} -dependent K^+ channels contribute to corporal tone. In the presence of 4-AP H_2O_2 induced contraction was essentially decreased. The most probable explanation of this result is that population of channels modulated by 4-AP and H_2O_2 is common for both factors. We previously reported that H_2O_2 induced contraction could be inhibited by indometacine. Together these results suggest, that H_2O_2 induced contraction could be a result of inhibition of 4-AP-sensitive voltage-dependent K^+ channels that is mediated by metabolite products of arachinoide acid via cyclooxygenase pathway.

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гурковская А.В., Суханова К.Ю., Бурый В.А., Сагач В.Ф. Реакция гладких мышц пещеристого тела кролика на действие активных форм кислорода. // Тавр. медико-биол. вестн. – 2004 – 7, № 1. – С. 51–54.
2. Гурковська А.В., Суханова К.Ю., Бурій В.О., Сагач В.Ф. Роль ендотелію в реакціях печеристих тіл, які викликані перекисом водню // Фізіол. журн. – 2004. – 50, № 6. – С. 27–31
3. Barnett A.L. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology // J. Urol. – 1997. – 157. – P. 320–324.
4. Bennani S., Benjelloun S. The endothelium of corpus cavernosum. // J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. – 1994. – 23, № 7. – P. 757–761.
5. Fujiwara M., Usui H., Kurahashi K. et al. Endothelium dependent contraction produced by acetylcholine and relaxation produced by histamine in monkey basilar arteries // J. Cardiovasc. Pharm. – 1992. – № 20, (Suppl. 12). – S. 114–116.
6. 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.
7. Ito T., Kato T., Iwama Y. et al. Prostaglandin H2 as an endothelium derived contracting factor and its interaction with endothelium derived nitric oxide // J. Hyperten. – 1991, № 9. – P. 729–736.
8. Karlsson K. Pharmacokinetics of extracellular- superoxide dismutase in the vascular system // Free Radic. Biol Med. – 1993. – 14, № 2. – P. 185–190.
9. 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.
10. Shen J.Z., Zheng X.F., Kwan C.Y. Differential contractile 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 31.07.2006