ИЗМЕНЕНИЕ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЙ, УВЕЛИЧИВАЮЩИХ АКТИВНОСТЬ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА, И НОРМАЛИЗАЦИИ АКТИВНОСТИ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНОМ У САМЦОВ КРЫС ВИСТАР

Аннотация:
Исследовали изменение АД и ЧСС после воздействий, повышающих активность ангиотензинпревращающего фермента: ионизирующей радиации, ингибитора NO-синтазы (L-NAME) и дексаметазона. Также определяли влияние дигидрокверцетина и ингибитора ангиотензинпревращающего фермента эналаприла на активность данного фермента, АД и ЧСС при этих воздействиях. Крыс-самцов Вистар облучали рентгеновскими лучами дозой 2.5 Гр. Активность ангиотензинпревращающего фермента в сегментах аорты определяли по гидролизу Hip-His-Leu. АД и ЧСС регистрировали неинвазивным методом с помощью хвостовой манжеты на компьютерной установке "PowerLab 8/35". При увеличении активности ангиотензинпревращающего фермента после облучения АД и ЧСС не изменялись. При длительном действии (7 сут) ингибитора NO-синтазы и дексаметазона увеличение активности фермента сопровождалось увеличением АД и в случае с ингибитором NO-синтазы — снижением ЧСС. Дигидрокверцетин нормализовал активность фермента и снижал АД, но не до уровня нормы. Эналаприл нормализовал АД, увеличенное на фоне потребления раствора ингибитора NO-синтазы, при этом активность ангиотензинпревращающего фермента снижалась более чем в 2 раза от нормы. Ключевые слова: аорта, ангиотензинпревращающий фермент, артериальное давление, дигидрокверцетин. АД регулируется несколькими системами: барорецепторами в сосудах; ренин-ангиотензиновой системой, которая регулирует тонус сосудов, солевой баланс и объем крови; адренергической системой, регулирующей частоту и степень сердечных сокращений и тонус сосудов; вазореактивными факторами, образуемыми сосудами, вызывающими как релаксацию (NO), так и констрикцию сосудов (эндотелин-1 и АФК). Основным фактором регуляции АД в ренин-ангиотензиновой системе и существенным в системе вазореактивных факторов является активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ). АПФ превращает ангиотензин I в вазопрессорный ангиотензин II, разрушает вазодилататор брадикинин. Кроме того, увеличение активности АПФ активирует NADH-оксидазу, что приводит к увеличению АФК в сосудах. Ранее показано, что при воздействиях на крыс ингибитора NO-синтазы, гормона стресса дексаметазона и ионизирующей радиации активность АПФ в аорте увеличивается, а флавоноид дигидрокверцетин (ДГК) нормализует ее. Цель данной работы — исследовать изменение АД и ЧСС при этих воздействиях, а также при нормализации активности АПФ ДГК. МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ. В работе использовали крыс-самцов Вистар (n=32) массой 300-320 г в возрасте 9-10 нед (коллекция животных Института теоретической и экспериментальной биофизики, Пущино). Крыс содержали в клетках со свободным доступом к воде и стандартному крысиному корму (контрольная группа). В экспериментах следовали этическим нормам по работе с лабораторными животными. Опытные группы потребляли стандартный сухой корм и растворы L-NAME (1 мг/мл; "Sigma"), ДГК (1 и 3 мкг/мл; "Sigma") или эналаприла малеата (0.1 мг/мл; "Sigma"). Крысы выпивали 100±5 мл воды или растворов в сутки на 1 кг массы, за исключением

раствора L-NAME+эналаприл: 85 мл/сут на 1 кг массы. При таком потреблении растворов крысы получали 100 мг L-NAME, 100 и 300 мкг ДГК на 1 кг массы в сутки; в случае с раствором L-NAME и эналаприлом — 85 мг L-NAME и 8.5 мг эналаприла на 1 кг массы в сутки. Крыс облучали при комнатной температуре рентгеновскими лучами на установке Института биофизики клетки РАН РУТ-250-15-1 (20 мА, фильтры: 1 мм Al, 1 мм Cu) дозой 2.5 Гр при мощности дозы 1 Гр/мин. Дексаметазон ("KRKA") вводили подкожно 1 раз в сутки в дозе 30 мкг/кг. В ходе исследования у животных регистрировали систолическое АД и ЧСС неинвазивным методом с помощью хвостовой манжеты на компьютерной установке "Power Lab 8/35" ("AD Instruments Pty Ltd"). Из 3 измерений определяли средние значения АД и ЧСС. АД и ЧСС регистрировали за 1 сут до начала опытов для адаптации животных к процедуре измерения, непосредственно перед воздействиями облучением или указанными выше агентами и через 2,4 и 24 ч после облучения или через 1 нед после введения дексаметазона и потребления исследуемых растворов. Обнаружена существенная индивидуальная вариабельность ЧСС (от 350 до 430 уд/мин) и АД (от 90 до 120 мм рт. ст), поэтому средние значения этих показателей в сформированных группах варьировали: ЧСС — от 355 до 400 уд/мин, АД — от 98 до 116 мм рт. ст. в зависимости от того, какие животные попали в группы (таблица). Среднее АД в группах различалось, но было одинаковым в одной и той же группе при первом и втором измерении (таблица). Эти данные указывают на то, что АД является устойчивой характеристикой группы животных, и при расчете эффектов воздействий необходимо использовать среднее АД в данной группе, а не среднее АД по всем группам. Среднее значение ЧСС также варьировало в группах, но в отличие от АД было увеличено в среднем на 3-4% при первом измерении по сравнению со вторым (таблица). По-видимому, у некоторых восприимчивых животных (65%) впервые проводимые манипуляции вызывают увеличение ЧСС. Учитывая неоднородность групп животных по параметрам ЧСС и АД, эффекты воздействий определяли по отношению к их средним значениям в группе, определенным непосредственно перед опытом (т.е. не в первом предварительном измерении). По окончании воздействий измеряли ЧСС и АД, после чего крысам под эфирной анестезией вскрывали грудную клетку, вводили в сердце гепарин (500 Ед) для предотвращения свертывания крови и удаляли с аорты прилегающий жир. Затем аорту отсекали у основания дуги и ответвления почечной артерии, промывали холодным (4°C) раствором Хенкса с HEPES pH 7.4 и помещали в такой же раствор. Время от начала операции до удаления аорты занимало около 3 мин. Аорту разрезали на сегменты длиной 4-5 мм, начиная с участка, где она становится параллельной позвоночнику. Сегменты аорты нумеровали от 1 до 8, начиная с ближайшего к дуге аорты. Части аорты разрезали вдоль и привязывали синтетической нитью к пластиковому наконечнику пипетки эндотелием наружу. После измерения активности АПФ сегменты аорты снимали и измеряли линейные размеры с точностью 0.1 мм для определения площади. Дополнительно использовали 6 крыс для определения активности АПФ в аорте контрольных крыс. Активность АПФ определяли по гидролизу Hip-His-Leu ("Sigma") по модифицированному методу. Изолированные отрезки аорты помещали в раствор Хенкса с HEPES pH 7.4 (450 мкл) и инкубировали 10 мин при 37°C и встряхивании (25 Гц, амплитуда 1 мм) для адаптации перед добавлением субстрата АПФ. Реакцию начинали добавлением 10 мМ Hip-His-Leu (50 мкл). Через 30 мин инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением 1000 мкл

0.1 N NaOH. После перемешивания реакционной смеси отрезки аорты вынимали из раствора и определяли их размеры. Оставшийся раствор (200 мкл) инкубировали с 50 мкл о-фталевого диальдегида (20 мг/мл; "Sigma") в течение 30 мин при 37°С. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 0.8 N HCl. Образцы центрифугировали 8 мин при 3000д, 2°С и измеряли флюоресценцию с помощью флюориметра MF44 ("Perkin-Elmer") при длинах волн возбуждения и эмиссии 360 и 500 нм соответственно. Для определения активности АПФ использовали стандартную кривую зависимости флюоресценции от концентрации His-Leu. Активность АПФ выражали в пмоль Hip-His-Leu, гидролизованного в 1 мин на 1 мм2 внутренней поверхности аорты. Статистический анализ проводили в программе "Origin" с помощью ANOVA. Результаты представлены в виде среднего значения±стандартная ошибка среднего. Различия считались статистически значимыми при $p<0.05$. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Данные по относительному изменению ЧСС и АД представлены на рисунке 1. Ранее показано, что активность АПФ существенно увеличивалась (в 1.5 раза) через 2 ч после облучения, а затем постепенно снижалась и достигала почти контрольного уровня через 2 сут. ЧСС и АД при этом не изменялись (рис. 1). Очевидно, существенное, но кратковременное увеличение активности АПФ не приводит к изменениям ЧСС и АД благодаря компенсаторной реакции барорецепторов в сосудах и адренергической системы регуляции АД. При продолжительном действии (7 сут) факторов, увеличивающих АПФ — дексаметазона и ингибитора NO-синтазы — АД также возрастало (рис. 2,3). Активность АПФ в аорте контрольных крыс в этих опытах составляла 20.8±0,9 пмоль/мин/мм2. ЧСС слегка и недостоверно снижалась при действии дексаметазона (рис. 2), но достоверно снижалась (на 13%) при действии L-NAME (рис. 3). ДГК в дозе 100 мкг/кг снижал активность АПФ при действии L-NAME почти до нормы (рис. 3), а ДГК в дозе 300 мкг/кг нормализовал активность АПФ при обоих вариантах воздействия (рис. 2,3). При этом АД снижалось, но не до контрольного уровня (рис. 2,3), а ЧСС оставалась сниженной на фоне обеих доз ДГК (рис. 3). Нормализация АД и увеличение ЧСС происходили лишь при действии ингибитора АПФ энапаприла, когда активность АПФ снижалась более чем в 2 раза от нормы (рис. 3). ЧСС в норме определяется балансом активности между симпатической и парасимпатической (блуждающий нерв) регуляцией сердца: увеличение симпатической активности — тахикардия, парасимпатической — брадикардия. При повышении давления крови в аорте или сонной артерии, вызванном потреблением L-NAME, раздражаются прессорецепторы. Возникшее в них возбуждение приходит в ЦНС и повышает возбудимость центра блуждающих нервов, вследствие чего увеличивается количество идущих по ним тормозящих импульсов, что приводит к замедлению и ослаблению сердечных сокращений. Гипертония, индуцируемая ингибитором NO-синтазы и дексаметазоном, обусловлена в основном одними и теми же факторами: дефицитом NO и увеличением концентрации ангиотензина II. Последнее является результатом увеличения активности АПФ (рис. 2, 3). Дефицит NO возникает по двум причинам. Во-первых, из-за снижения скорости его образования за счет подавления активности всех NO-синтаз L-NAME и только индуцибельной — дексаметазоном. Во-вторых, из-за увеличения скорости деградации N0 благодаря увеличению активно взаимодействующих с ним АФК, количество которых возрастает при активации АПФ. Известно, что NO оказывает как непосредственное вазодилатирующее действие на сосуды, так и опосредованное — через подавление

активности симпатической нервной системы. Снижение концентрации NO в организме при действии ингибитора NO-синтазы и дексаметазона вызывает гипертонию, обусловленную снижением непосредственного и опосредованного через симпатическую иннервацию сосудов вазодилататорного эффекта NO. Кроме того, повышение активности АПФ приводит к увеличению вазопрессорного ангиотензина II. ДГК снижает активность АПФ (уменьшение ангиотензина II) и нормализует количество АФК в сосудах, последнее приводит к уменьшению деградации N0. В результате концентрация NO повышается и АД снижается, но не нормализуется. По-видимому, ДГК не восстанавливает концентрацию NO до нормы. Ингибитор АПФ эналаприл нормализует АД (рис. 3). Кроме очевидного эффекта ингибиторов АПФ (снижения ангиотензина II, повышения концентрации вазодилататора брадикинина), они еще увеличивают концентрацию кининов в организме и индуцируют экспрессию эндотелиальной NO-синтазы. Оба эффекта способствуют снижению АД. Однако активность АПФ при действии эналаприла снижается более чем в 2 раза по сравнению с нормой (рис. 3), что вызывает соответственное снижение концентрации ангиотензина II. Поскольку ангиотензин II участвует не только в регуляции АД, но и во многих других процессах в организме, то такое резкое отклонение концентрации ангиотензина II от нормы может негативно сказаться на этих процессах и проявиться в различных отрицательных побочных эффектах ингибиторов АПФ. Таким образом, при кратковременном (в пределах 1 сут) повышении активности АПФ в аорте при воздействии ионизирующей радиации АД и ЧСС не изменяются. При длительном (1 нед) воздействии агентов (L-NAME, дексаметазон) увеличение активности АПФ сопровождается увеличением АД. ДГК в дозах 100 и 300 мкг/кг снижает АД, увеличенное при действии этих агентов.

Авторы:
Корыстова А.Ф.
Кублик Л.Н.
Левитман М.Х.
Шапошникова В.В.
Ким Ю.А.
Слащева Г.А.
Лобанов А.В.
Туховская Е.А.
Корыстов Ю.Н.

Издание: Бюллетень экспериментальной биологии и медицины
Год издания: 2018
Объем: 5с.
Дополнительная информация: 2018.-N 7.-С.36-40. Библ. 13 назв.
Просмотров: 4