

И. Л. Мончак<sup>1</sup>, О. И. Жуковский<sup>2</sup>, В. И. Поляков<sup>2</sup>,  
В. Н. Бондарь<sup>2</sup>, А. И. Соловьев<sup>1</sup>

## Влияние диизопропилфосфат- олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты на сократительную активность воротной вены крыс в условиях гипоксии *in vitro*

<sup>1</sup>ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», г. Киев

<sup>2</sup>Международный благотворительный фонд «Киевская Русь», г. Киев

**Ключевые слова:** гипоксия, воротная вена, гладкие мышцы, таурохолевая кислота

Координированная работа гладких мышц (ГМ) полых органов является основой гомеостатического регулирования в системе кровообращения, пищеварительного тракта и мочеполовой системы.

Гипоксия оказывает быстрое влияние на большинство ГМ, проявляющееся, в основном, в уменьшении силы и частоты сокращений. В норме такая реакция на снижение парциального давления кислорода в окружающей среде свойственна и ГМ сосудов, за исключением системы легочного кровообращения. Результатом гипоксической вазодилатации становится, как правило, улучшение кровоснабжения органов и тканей. Однако гипоксия может быть также причиной серьезных повреждений, когда она связана с такими патологическими состояниями, как атеросклероз, вазоспазм, геморрагический инсульт и т. п. Отдельно следует упомянуть состояние реоксигенации после гипоксии/ишемии, которое зачастую приводит к значительным повреждениям тканей.

Количество внутриклеточных процессов, участвующих в формировании и регуляции сократительной функции ГМ, очень велико, а результирующий эффект, то есть сила/частота сокращений или уровень тонического напряжения, зависит от их интегрального взаимодействия. Следовательно, и число процессов, вовлеченных в снижение

силы сокращений ГМ при гипоксии, также будет большим, что существенно затруднит идентификацию основных влияющих механизмов.

Механизмы реализации гипоксического влияния на ГМ можно разделить, в первую очередь, на  $Ca^{2+}$ -зависимые и  $Ca^{2+}$ -независимые. Первые связаны с уменьшением внутриклеточной концентрации кальция  $[Ca^{2+}]_i$ . Существует множество сообщений об участии ионных каналов в этом процессе. В работах [3, 13] представлены данные об открытии  $K^+$ -каналов при гипоксии, ведущему к снижению входа  $Ca^{2+}$  через потенциал-зависимые каналы и последующему расслаблению. В работах [7, 13, 20] показана возможность непосредственного влияния гипоксии на  $Ca^{2+}$ -каналы. Влияние на внутриклеточные кальциевые депо (саркоплазматический ретикулум, митохондрии) также может вести к изменению  $[Ca^{2+}]_i$  [1, 22, 25]. Существуют данные о  $Ca^{2+}$ -независимом расслаблении ГМ сосудов при гипоксии [2, 18, 20]. Одна из первых гипотез гипоксического расслабления связывала его с дефицитом энергетических ресурсов. Эта теория основывалась на снижении продукции АТФ митохондриями, вследствие чего происходило инактивирование актин-миозиновой АТФазы. Как показали последующие исследования, подобная теория не может быть применима к сосудистым ГМ [9, 16], так как запасы АТФ сохраняются в ГМ сосудов даже в состоянии глубокой гипоксии. Возможными «кандидатами» на роль регуляторов сосудистого тонуса при гипоксии являются

изменение рН [2, 18], концентрации неорганического фосфата Pi [6, 18].

В последние годы ведется широкий поиск веществ, обладающих антигипоксическим действием. Особое внимание уделяется дериватам продуктов жизнедеятельности организма. Такими продуктами могут являться, например, желчные (хенодезоксихолевая и холевая) кислоты (ЖК), а их производные – гликохолевая, дезоксихолевая, таурохолевая кислоты, их соли и другие соединения стали объектом пристального внимания исследователей. В лабораторной субстанции препарата Орион, представленного для исследования, основным действующим компонентом является диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты (ДПОГТК), и резонно было предположить, что именно таурохолевая кислота будет оказывать главное влияние на гладкие мышцы сосудов в условиях гипоксии.

По данным исследований, проводимых в различных странах, производные ЖК и сами ЖК обладают сосудорасширяющим действием [4, 12, 15]. Следует отметить, что механизмы такого действия до сих пор неясны и остаются предметом дискуссии. Так, например, отмечалось [10], что при действии деоксихолиглицина уменьшение амплитуды агонистиндуцированного сокращения и тонуса сосудов является независимым от мускариновых рецепторов, NO или активации  $K^+$  каналов. Другие исследователи связывают подобное влияние ЖК с воздействием последних на потенциал-зависимые и рецептор-связанные кальциевые каналы [5]. Некоторые исследования на несосудистых объектах демонстрируют возможность участия ЖК в синтезе реактивных форм кислорода [19], которые, как известно, обладают вазорелаксирующим действием [24]. На гладкомышечных препаратах кишечника собаки [11] и морской свинки [17] показана возможность модуляции ЖК и таурохолатом натрия неселективных катионных токов [11] и  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменного механизма [17]. ЖК в сосудах могут проявлять свое действие посредством активации выработки NO эндотелиальными клетками [14]. Когда было открыто,

что ЖК являются природными лигандами ядерных фарнезоидных X рецепторов (FXR), интерес к ним еще более возрос. Кроме того, FXR могут участвовать в ангиотензиновой регуляции тонуса сосудов [26].

*Цель исследования* – изучение потенциального противогипоксического действия ДПОГТК на воротной вене крыс, а также оценка возможности применения спектрального анализа Фурье как нового методического подхода для анализа сокращений воротной вены в условиях действия экстремальных факторов.

**Материалы и методы.** Опыты проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986 с изменениями по положениям Протокола ETS № 170 от 2005 года).

После усыпления взрослых самцов крыс линии Whistar подвергали декапитации с последующим обескровливанием. Быстро вскрывали брюшную полость, выделяли препарат воротной вены и помещали его в раствор Кребса, содержавшего (в ммоль/л): NaCl 133, KCl 4,7,  $CaCl_2$  2,5,  $MgCl_2$  1,2,  $NaHCO_3$  16,3,  $NaH_2PO_4$  1,38, D-глюкоза 7,8, рН = 7,38. Под микроскопом воротную вену отделяли от окружающей соединительной ткани. Затем препарат помещали на крючках в термостатированную при 37 °С проточную камеру. Препарат воротной вены подвергали предварительному растяжению в 300–500 мг, период вработывания длился 60 мин.

Регистрацию сократительной активности изолированных сосудистых препаратов проводили с помощью емкостных датчиков напряжения (Danish Myo Technology, Aarhus, Дания), сигнал от которых усиливался и фильтровался, далее преобразовывался в цифровую форму с помощью устройства LabTrax 4/16 (WPI, Inc). Цифровые данные регистрировали и фиксировали программой DataTrax2 (World Precision Instruments, Inc, США).

*Математическая обработка данных.* Системный анализ спонтанных сокращений воротной вены (vena porta, VP)

представляет собой довольно сложную задачу. Простейшими методами, используемыми с этой целью, являлись измерение средних амплитуды и частоты за определенный период времени, и оценка площади под кривой сокращений. Из-за того, что форма сокращений воротной вены по амплитуде и частоте довольно неоднородна, проследить изменения этих показателей под влиянием определенных факторов очень сложно. Нами был использован метод оценки частоты и амплитуды сокращений воротной вены с помощью быстрого преобразования Фурье. Этот метод получил распространение только в последние десятилетия благодаря быстрому развитию вычислительной техники и появлению интеллектуальных систем и программ. Для оценки *in vitro* спонтанно активных биологических объектов типа сосудов этот метод является новым и представляет значительный интерес. Необходимо отметить, что наши наблюдения и расчеты подтверждаются мультикомпонентной теорией сокращений объектов, обладающих спонтанной активностью. Теория была предложена в конце прошлого века (Johansson, Mellander, 1975, 1990), и предполагает существование нескольких основных частот в формировании и регуляции интегрального сокращения объекта. Природа происхождения этих частот, к сожалению, до сих пор непонятна, хотя и является одним из ключевых моментов в понимании возникновения ряда болезней и патологических состояний, в первую очередь, артериальной гипертонии и гипоксических реакций.

Второй метод – анализ площади под кривой сокращений – предоставляет собой интегрированную оценку (работу) за определенный промежуток времени. С помощью такого показателя возможным становится общий анализ влияния определенного вещества на сокращения воротной вены.

В работе при обработке данных применялись оба метода, а конечные результаты оценивались параллельно.

**Результаты и их обсуждение.** На первом этапе обработки полученных данных оценивали работу, произведенную гладкими мышцами воротной вены

за определенное время, то есть развиваемую мощность при сокращении в нормальных условиях, под влиянием гипоксии и/или исследуемого вещества. Результаты обработки, представленные на рисунке 1, демонстрируют «двухфазную» зависимость мощности сокращений воротной вены при гипоксии от концентрации ДПОГТК. Уже в концентрации  $10^{-7}$  моль/л мощность сокращений возрастает более чем на четверть (по сравнению с развиваемой при гипоксии). Далее мощность продолжает увеличиваться при концентрации  $10^{-6}$  моль/л, транзиторно падает при  $10^{-5}$  моль/л и значительно увеличивается при действии вещества в концентрации  $10^{-4}$  моль/л. На первый взгляд, транзиторное падение мощности на фоне дозозависимого прироста может показаться парадоксальным. Однако, следует помнить, что развиваемая мощность зависит как от амплитуды, так и от частоты сокращений гладких мышц.

Следовательно, 2-й этап обработки данных – оценка частотных характеристик сокращений – предоставляет возможность конкретизировать механизмы влияния исследуемого вещества на изменение мощности воротной вены. Анализ сокращений воротной вены в условиях нормальной оксигенации демонстрирует наличие трех основных водителей ритма в формировании полного сокращения. Так, в примере сокращения на рисунке 2 их частоты составили 0,036; 0,073; 0,113 Гц.

В условиях гипоксии ( $pO_2$  – 20–25 мм рт. ст.) в гладких мышцах регистрировались лишь 1–2 ведущие частоты (в

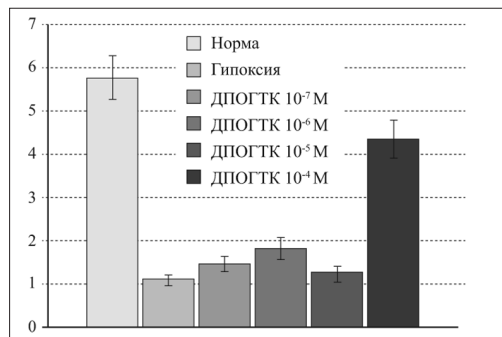
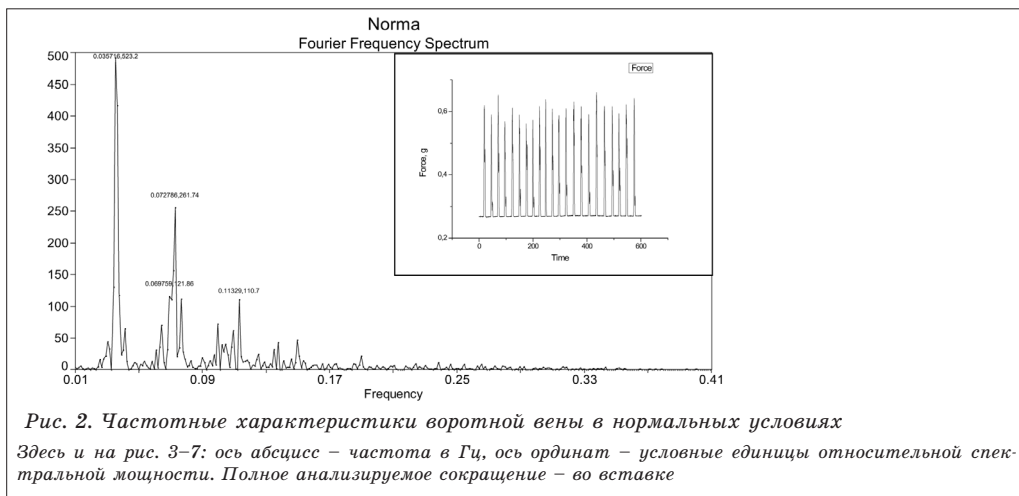


Рис. 1. Влияние ДПОГТК на мощность, развиваемую воротной веной при сокращениях в условиях гипоксии  
Ось ординат – у. е. мощности



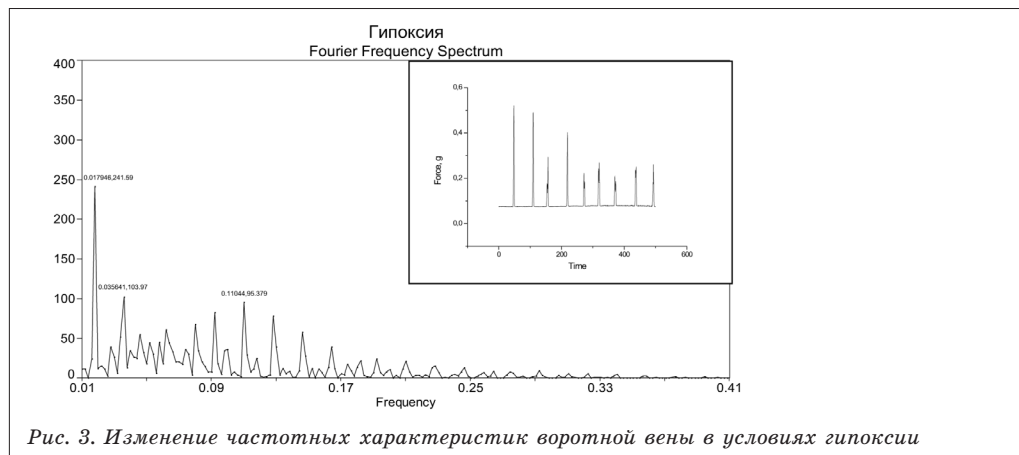
*Рис. 2. Частотные характеристики воротной вены в нормальных условиях*

*Здесь и на рис. 3–7: ось абсцисс – частота в Гц, ось ординат – условные единицы относительной спектральной мощности. Полное анализируемое сокращение – во вставке*

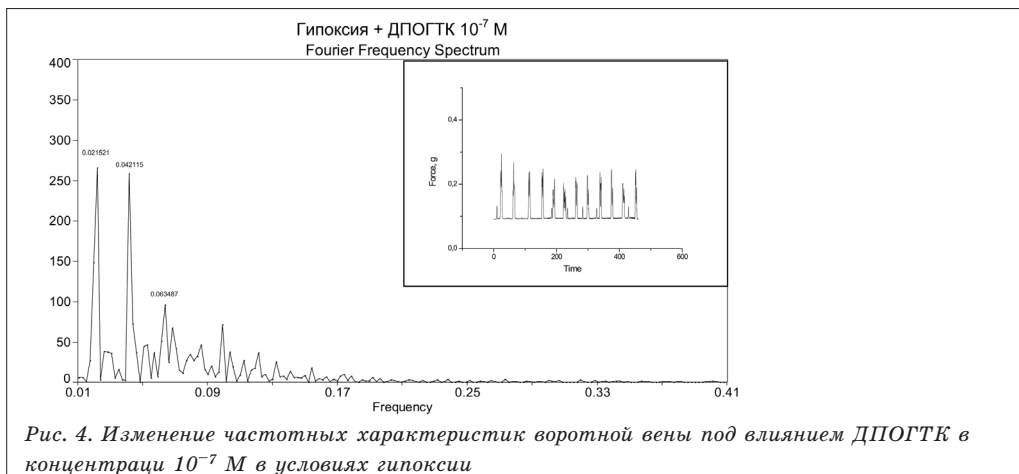
нашем случае – 0.018 Гц) и несколько слабых генераторов с большей частотой, что может свидетельствовать о существовании медленного гипоксического генератора и наличии нестабильных, менее мощных (либо наличии генератора с изменяющейся во времени частотой), рисунок 3.

Применение ДПОГТК в концентрации  $10^{-7}$  моль/л на фоне действия гипоксии вызывает увеличение частот базовых генераторов (0,022 и 0,042 Гц), что проявляется в учащении сокращений воротной вены (рис. 4).

Более выраженным такое проявление действия ДПОГТК стало в концен-



*Рис. 3. Изменение частотных характеристик воротной вены в условиях гипоксии*



*Рис. 4. Изменение частотных характеристик воротной вены под влиянием ДПОГТК в концентрации  $10^{-7}$  М в условиях гипоксии*

трации  $10^{-6}$  моль/л (0,035 и 0,072 Гц), рисунок 5.

При данной концентрации в нашем примере появился еще один дополнительный стабильный генератор (0,08 Гц).

Концентрация ДПОГТК  $10^{-5}$  моль/л (рис. 6) вызывает появление нескольких близких по частоте и мощности водителей ритма, что в результате приводит к уменьшению амплитуды

и снижению средней частоты сокращения.

Самое яркое проявление действия ДПОГТК отмечалось при концентрации  $10^{-4}$  моль/л. На спектральной диаграмме (рис. 7) отмечается один стабильный мощный водитель ритма с частотой 0,118 Гц, чем и объясняется резкое повышение амплитуды и частоты сокращений воротной вены.

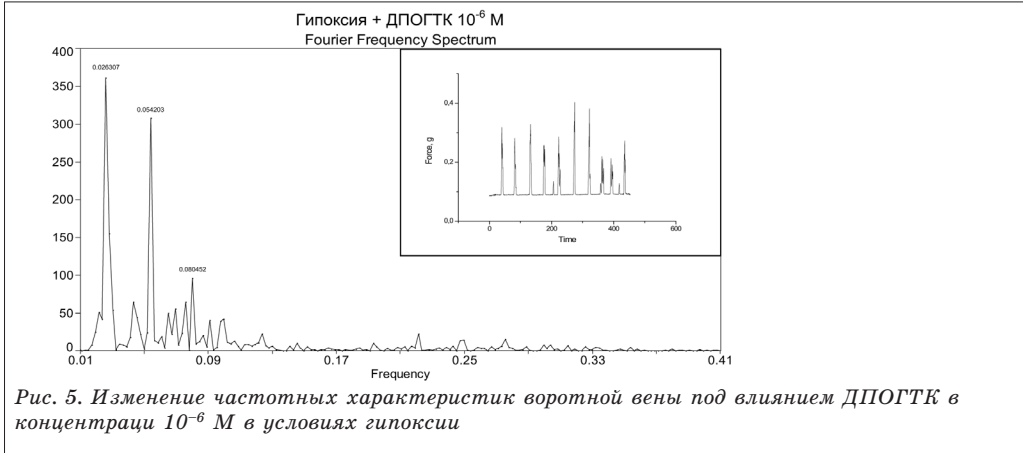


Рис. 5. Изменение частотных характеристик воротной вены под влиянием ДПОГТК в концентрации  $10^{-6}$  М в условиях гипоксии

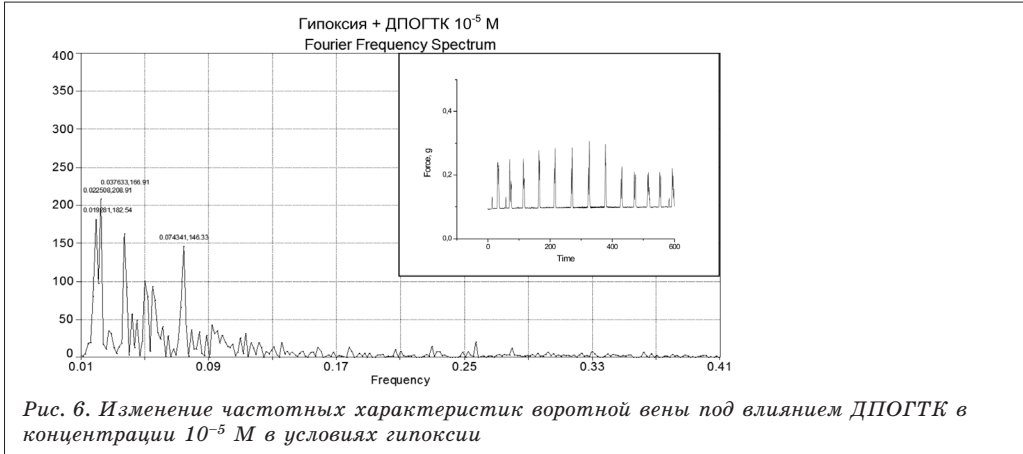


Рис. 6. Изменение частотных характеристик воротной вены под влиянием ДПОГТК в концентрации  $10^{-5}$  М в условиях гипоксии

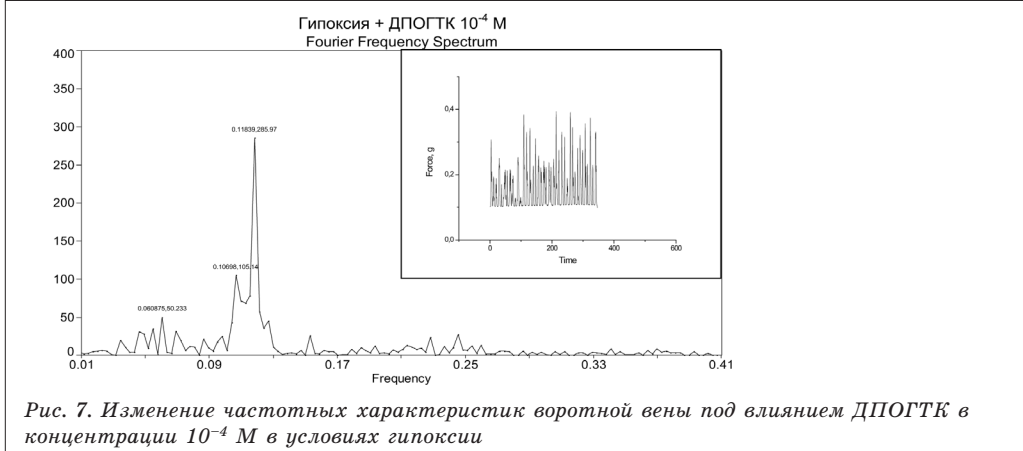


Рис. 7. Изменение частотных характеристик воротной вены под влиянием ДПОГТК в концентрации  $10^{-4}$  М в условиях гипоксии

## Заклучение

Выводы работы можно разделить на три направления:

– фундаментальное: в основе адаптационной перестройки воротной вены при гипоксии может лежать изменение триггерных механизмов, обуславливающих пейсмейкерную активность гладких мышц. Как результат – перенастройка сокращений за счет как модификации цепочки частота-амплитуда-интегральная работа, так и вследствие возникновения новых водителей ритма;

– методологическое: впервые продемонстрирована возможность применения математического аппарата спектрального анализа частот для оценки сокращений

воротной вены крыс в экстремальных условиях. Это открывает новый методологический подход для анализа воздействия фармакологических препаратов и биологически активных веществ на спонтанно активные гладкомышечные объекты, и может способствовать разработке новых лекарственных препаратов;

– прикладное: на фоне гипоксии диизопротилфосфат-олигоэтиленгликоль таурохолевой кислоты (Орион) восстанавливает авторитмическую активность воротной вены крыс за счет влияния на формирование пейсмейкерной активности в сосудистых гладких мышцах, что может свидетельствовать о его противогипоксическом действии в гладких мышцах.

1. Соловьев А. И. Клеточные механизмы гипоксического коронарораспазма / Соловьев А. И. // Физиологический журнал СССР. – 1988. – №74. – С. 193–201.
2. Aalkjaer C. Effect of hypoxia on force, intracellular pH and  $Ca^{2+}$  concentration in rat cerebral and mesenteric small arteries / Aalkjaer C., Lombard J. H. // J. Physiol. (Lond.). – 1995. – V. 482. – P. 409–419.
3. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia / Archer S. L., Huang J. M., Reeve H. L. [et al.] // Circ. Res. – 1996. – V. 78. – P. 431–442.
4. Bile salts, hypotension and obstructive jaundice / Bomzon A., Finberg J. P., Tovbin D. [et al.] // Clin. Sci. – 1984. – V. 67. – P. 177–183.
5. Bomzon A. & Ljubincic P. Bile acids as endogenous vasodilators? / Bomzon A. & Ljubincic P // Biochem. Pharmacol. – 1995. – V.49. – P.581–589.
6. Dillon P. F. Influence of cellular energy metabolism on contractions of porcine carotid artery smooth muscle / Dillon P. // J. Vasc. Res. – 2000. – V. 37. – P. 532–539.
7. Herrera G. M. Involvement of L-type calcium channels in hypoxic relaxation of vascular smooth muscle / Herrera G. M., Walker B. R. // J. Vasc. Res. – 1998. – V.35. – P.265–273
8. Ishida Y. Underlying mechanisms for hypoxia-induced relaxation of the guinea-pig isolated aorta / Ishida Y., Honda H. // Jpn. J. Pharmacol. – 1992. – V. 58 (Suppl. 2). – P. 307.
9. Ishida Y. Lactate production of mammalian intestinal and vascular smooth muscles under aerobic and hypoxic conditions / Ishida Y., Takagi-Ohta K. // J. Smooth Muscle Res. – 1996. – V. 32. – P. 61–67.
10. Effects of deoxyhologlycine, a conjugated secondary bile acid, on myogenic tone and agonist-induced contraction in rat resistance arteries / Khurama S., Raina H., Pappas V. [et al.] // PLoS. – 2012. – V. 7 (2). – P.e32006.
11. Lee H. K. Bile acid modulation of gastrointestinal smooth muscle contraction and ionic currents / Lee H. K., Lee K. H. // Korean J. Physiol. Pharmacol. – 2000. – Aug; 4. – P. 333–338.
12. On the vitro vasoactivity of bile acids / Ljubincic, P., Said, O., Ehrlich, Y. [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2000. – V. 131. – P. 387–398.
13.  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channel activity and cytosolic  $[Ca^{2+}]$  in oxygen-sensing tissues / Lopez-Barneo J., Pardal R., Montoro R.J. [et al.] // Respir. Physiol. – 1999. – V. 115. – P. 215–227.
14. Bile acids increase intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and nitric oxide production in vascular endothelial cells / Nakajima T., Okuda Y., Chisaki K. [at al.] // Br. J. Pharmacol. – 2000. – V. 130, № 17. – P. 1457–1467.
15. Mechanism of bile salt vasoactivity: Dependence on calcium channels in vascular smooth muscle / Pak J M., Adeagbo A. S. O., Triggie, C. R. [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 1994. – V. 112. – P. 1209–1215.
16. Paul R. Chemical energetics of vascular smooth muscle. In: D. Bohr, A. Somlyo, H. Sparks, S. Geiger (Eds.) / Paul R. // Handbook of Physiology. Vol. Section 2: The Cardiovascular System; Vol. 2: Vascular Smooth Muscle, American Physiological Society, Bethesda. – 1980. – P. 201–235.
17. Role of exchange in relaxant effect of sodium taurcholate on the guinea-pig ileum smooth muscle / Romero F., Frediani-Neto E., Paiva T. B., Paiva A. C. // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. – 1993. – V. 348 (3). – P. 325–31.
18. Effects of hypoxia on isometric force, intracellular  $Ca^{2+}$ , pH, and energetic in porcine coronary artery (in process citation) / Shimizu S., Bowman P. S., Thorne III G., Paul R. J. // Circ. Res. – 2000. – V. 86. – P. 862–870.
19. Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes / Sokol R. J., Devereaux M., Khndwala R., O'Brien K. // Hepatology. – 1993. – V. 17. – P. 869–881.

20. Soloviev A. I. Evidence for decrease in myofilament responsiveness to  $\text{Ca}^{2+}$  during hypoxia in spontaneously active vascular smooth muscle in rats / Soloviev A. I., Basilyuk O. V. // *Exp. Physiol.* – 1993. – V. 78. – P. 395–402.
21. Changes in plasma membrane ionic permeability and related contractile responses in vascular smooth muscle at hypoxia / Soloviev A. I., Stefanov A. V., Bazilyuk O. V. [et al.] // *Pathophysiology.* – 1996. – V. 3. – Issue 1. – P. 11–20.
22. Influence of mitochondrial inhibition on global and local  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in rat tail artery / Sward K., Dreja K., Lindqvist A. [et al.] // *Circ. Res.* – 2002. – V. 90. – P. 792–799.
23. Regulation of vascular smooth muscle mechanotransduction by microRNA and L-type calcium channels / Turczynska K., Hellstrand P., Sward K., Albinsson S. // *Communicative and Integrative Biology.* – 2013. – V. 6–1. – P. e2278–4
24. Wei E. P. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide and peroxynitrite / Wei E. P., Kontos H. A., Beckman J. S. // *Am. J. Physiol.* – 1996. – V. 271. – P. H1262–H1266.
25. Redox signaling in oxygen sensing by vessels / Weir E.K., Hong Z., Porter V. A., Reeve H. L. // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2002. – V. 132. – P. 121–130.
26. FXR-mediated regulation of angiotensin type 2 receptor expression in vascular smooth muscle cells / Zhang Q., He F., Kuruba R. [at al.] // *Cardiovascular Research.* – 2008. – V. 77. – P. 560–569.

**І. Л. Мончак, О. І. Жуковський, В. І. Поляков, В. М. Бондар, А. І. Соловійов**  
**Вплив діізопропілфосфат-олігоетиленгліколя та урохолової кислоти на скоротливу активність ворітної вени щурів за умов гіпоксії *in vitro***

Діізопропілфосфат-олігоетиленгліколь таурохолової кислоти (ДПОГТК) має здібність відновлювати авторитмічну активність ворітної вени щурів за умов гіпоксії *in vitro*, що проявляється в модифікації частотно-амплітудних характеристик біогенної автоматії. Зміни потужності скорочення ворітної вени під впливом ДПОГТК за умов гіпоксії є дозозалежними та двофазними. Дані частотної оцінки скорочень методом аналізу Фур'є свідчать про те, що низькі концентрації ДПОГТК ( $10^{-7}$ – $10^{-5}$  моль/л) викликають підвищення частоти генерації скорочень водіїв ритму ворітної вени (покращання частотних характеристик). У більш високих концентраціях ДПОГТК ( $10^{-4}$  моль/л) потужність скорочень ворітної вени майже сягає величин, що спостерігаються за умов нормальної оксигенації, за рахунок появи «нових» генераторів авторитмічної активності. Отримані дані дозволяють дійти висновку, що ДПОГТК впливає на формування пейсмейкерної активності в судинних препаратах гладеньких м'язів за умов гіпоксії. Таким чином, досліджувана субстанція має протигіпоксичну дію, а результати подальшого вивчення препарату, створеного на її основі, можуть відкрити нові підходи до терапії гіпоксичних станів. Важливо також відмітити можливість застосування аналізу Фур'є для з'ясування внутрішньоклітинних механізмів, пов'язаних із дією гіпоксії на гладенькі м'язи.

*Ключові слова:* гіпоксія, ворітна вена, гладенькі м'язи, таурохолева кислота

**I. L. Monchak, V. I. Polyakov, O. I. Zhukovsky, V. N. Bondar, A. I. Soloviev**  
**The effect of taurocholic acid diisopropylphosphate-oligoethyleneglycol on rat portal vein contractile activity at hypoxia *in vitro***

Now it is well documented that mechanical tension of vascular smooth muscles is very sensitive to environment oxygen tension, but underlying mechanisms remain not fully understood. The aim of this study was to evaluate the effect of laboratory specimen of the pharmaceutical composition Orion (taurocholic acid diisopropylphosphate-oligoethyleneglycol, DPOGTA) on rat portal vein contractile activity under hypoxia *in vitro* condition. Experimental design of the study comprised isolation of rat thoracic aorta rings, contractile recordings and Fourier analysis. It was shown that this derivative of taurocholic acid possess the ability to restore the autorhythmic activity of rat portal vein under hypoxia, and that is manifested in the modification of the frequency- amplitude characteristics of myogenic automaticity. The change of powerfulness of portal vein contractions under the influence DPOGTA at hypoxia was dose-dependent and biphasic. The data of frequency rate using Fourier spectral analysis indicate that low concentrations of DPOGTA ( $10^{-7}$ – $10^{-5}$  M) caused an increase in the frequency of generation rate pacemakers in portal vein (contractile uprating). At higher concentrations, DPOGTA ( $10^{-4}$  M) powerfulness of portal vein contractions was restored at hypoxia almost completely, and it is happened due to the appearance of «new» generators of autorhythmic activity. The data obtained allow us to conclude that DPOGTA affects the pacemaker activity formation in vascular smooth muscle during hypoxia and, hence, possess antihypoxic action. We suggest that this complex compound may be used as a good therapeutic approach under hypoxic condition. It is important to note that the Fourier analysis allows to identify an intrinsic subcellular mechanisms related to hypoxic action on smooth muscle.

*Key words:* hypoxia, portal vein, smooth muscles, taurocholic acid

Поступила: 12.11.2013 г.

**Контактное лицо:** Мончак Игорь Леонидович, младший научный сотрудник, отдел экспериментальной терапии, ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», д. 14, ул. Э. Потье, г. Киев, 03680. Электронная почта: imonchak@bigmir.com