

Є. В. Стрелков, О. В. Паршиков, І. В. Кізуб, Н. С. Гула,
Ю. О. Дуняк, Н. В. Добреля, О. С. Хромов

Відеомікроскопічний аналіз скоротливої активності внутрішньолегенових артерій у реальному часі

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

Ключові слова: легеневі артерії, прижиттєва мікроскопія, реактивні форми кисню

Резистивні судини малого кола кровообігу, а саме внутрішньолегенові артерії (тобто, внутрішньолегенові відгалуження головних легенових артерій; ВЛА) та артеріоли мають потужний кільцевий м'язовий шар, що значною мірою визначає їхню провідну роль у регуляції легеневого кровотоку [1]. У той самий час, відмінності в будові магістральних та резистивних судин не є єдиними ознаками, що визначають їхні функціональні особливості. Різниця, зокрема, спостерігається й у реакціях на гуморальні фактори. Так, наприклад, внутрішньолегенові артерії значно менш чутливі до норадреналіну, адреналіну та ацетилхоліну порівняно з головними легеновими артеріями, водночас більш чутливі до гістаміну та брадикініну [2, 3]. Також суттєві відмінності спостерігаються у відповіді на гіпоксію, а саме: магістральні легеневі артерії відповідають на зниження парціального тиску кисню однофазним скороченням, за яким іде розслаблення [4]; а ВЛА відповідають двофазним скороченням, причому друга фаза зберігається протягом усього періоду гіпоксії [5]. Загалом, скорочення ВЛА вважають головним механізмом розвитку легенової гіпертензії внаслідок гіпоксії [6].

Ці, і не тільки, обставини роблять необхідним вивчення фізіологічних властивостей малих внутрішньолегенових артерій для розуміння механізмів регуляції легеневого кровообігу. Проте через відносно малий діаметр досліджуваних судин виникає проблема адекватної оцінки їхньої скоротливої актив-

ності. Тензометрія судин діаметром меншим за 200 мкм є досить проблематичною. У 1996 році Martin зі співавт. запропонував метод відеомікроскопічного аналізу тонких (200–250 мкм) прижиттєвих зрізів легень для оцінки скоротливої активності повітроносних шляхів, який полягав у розрахунку змін площини просвіту окремих бронхів на цифрових знімках, зроблених через рівні проміжки часу [7]. Згодом цей метод був застосований і для реєстрації реакцій ВЛА. Одним з головних недоліків методу була необхідність мануального налаштування програмного забезпечення для визначення площини просвіту (що може впливати на кінцевий результат) та неможливість реєстрації її змін у реальному часі.

Мета дослідження – модифікувати метод для оцінки зміни тонуусу легенових артерій діаметром менше 200 мкм за допомогою відеомікроскопічного аналізу тонких зрізів легень у реальному часі.

Матеріали та методи. Піддослідні тварини. Дослідження було проведено на 10 дорослих білих щурах-самцях лінії Wistar масою 235 ± 15 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію, що складається з сухих брикетованих комбікормів (віварій ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»). Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [8] та Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [9]. Тварин виводили з експерименту шляхом уведення летальної дози урета-

ну (400 мг на 100 г маси тіла; в/в). Експериментальні групи тварин формували методом випадкової вибірки.

Підготовка тонкого зрізу легень. Під внутрішньоочеревинним наркозом сумішшю хлоралою й уретану (1:10 за масою), 0,2 мг/100 г за хлоралою, виконували торакаотомію з наступною екстирпацією серця та легень en bloc. Серце та легені занурювали в розчин Хенкса (1,26 ммоль/л $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 5,33 ммоль/л KCl ; 0,44 ммоль/л KH_2PO_4 ; 0,8 ммоль/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 138 ммоль/л NaCl ; 4,2 ммоль/л NaHCO_3 ; 0,3 ммоль/л Na_2HPO_4 ; 5,6 ммоль/л глюкози), після цього відділяли одну з долей легень і за допомогою двох лез, розташованих паралельно на відстані 200 мкм, робили зріз долі перпендикулярно дистальній частині дольової артерії. Отриманий зріз переносили до термостабілізованої камери з температурою розчину Хенкса 37 °С та притискали за допомогою двох нейлонових ниток, закріплених на платиновому напівкільці. Камеру розміщували на предметному столику інвертованого мікроскопа Біолам П-1 («Ломо», Росія). Дослідження проводили при 100-разовому збільшенні зображення. На зрізі знаходили просвіт наявного сегмента дольової артерії (діаметром 100–250 мкм). Стан судинної стінки після фіксації зрізу в камері стабілізували 30 хв.

Протягом експерименту за допомогою цифрової камери з роздільною здатністю 5 Мп («Trek», Китай) отримувалися знімки через рівні проміжки часу з частотою 5 хв⁻¹.

Здатність препаратів легневих артерій до скорочення визначали за допомогою 5-хв реакції на розчин Хенкса, що містив 40 ммоль KCl (деполяризуючий розчин). Величину цієї реакції надалі використовували для нормування наступних реакцій відповідного препарату. Зміни тонуусу сегмента ВЛА розраховували у відсотках від амплітуди максимального скорочення у відповідь на деполяризуючий розчин (S_K).

Зміну розчинів у камері здійснювали за допомогою перистальтичного насосу IPS («Ismatec», Швейцарія) зі швидкістю 3,5 мл/хв.

Розрахунок змін площини просвіту ВЛА. Отримані знімки обробляли в реальному часі програмою ImageJ (National Institutes of Health, США) за допомогою створеного нами алгоритму, написаного на мові ImageJ Macro Language: одразу після отримання зображення переводили в 8-бітний формат (шкала сірого), та за допомогою алгоритму детектора меж Канні-Деріха [10] виявляли межі просвіту ВЛА, після чого розраховували площину просвіту ВЛА у пікселях. На основі отриманих значень будували графік, що оновлювали після отримання кожного знімку.

Реєстрація тонуусу ізольованих головних легневих артерій щурів. Легені разом із серцем було видалено та розміщено в розчині Krebsa наступного складу: 118 ммоль/л NaCl , 24 ммоль/л NaHCO_3 , 1 ммоль/л MgSO_4 , 0,435 ммоль/л NaH_2PO_4 , 5,56 ммоль/л глюкози, 1,8 ммоль/л CaCl_2 та 4 ммоль/л KCl . Легеневі артерії було видалено із легень, відділено від сполучної тканини, порізано на кільцеві сегменти та розміщено в камері міографа (Danish Myo Technology, Данія), наповненій фізіологічним сольовим розчином, термостатованим до 37 °С та аерованим газовою сумішшю, яка містила 21% O_2 , 5% CO_2 та 74% N_2 ; (pH 7,3–7,4). До початку експерименту судинні препарати підлягали пасивному розтягненню з силою 0,25 г та періодичній стимуляції розчином Krebsa, що містив 40 ммоль KCl до досягнення стабільних скоротливих відповідей. Реєстрацію судинного тонуусу здійснювали за допомогою датчиків напруження (Danish Myo Technology, Данія) та комп'ютерної програми Datatrac 2 (World Precision Instruments Inc., США). Рівень судинного тонуусу розраховували як відсоток від максимального скорочення препаратів (ТК) у відповідь на 5 хв аплікацію деполяризуючого розчину.

Статистичний аналіз отриманих результатів. Фактичний матеріал було оброблено методами варіаційної статистики. Проводили тест на нормальність розподілу Шапіро-Уїлка, нормально розподілені дані обчислювали за критерієм Стьюдента для

залежних вибірок з урахуванням тесту Левена на гомогенність вибірки. Дані представлено у вигляді середнього \pm похибки середнього ($M \pm m$). Статистично значущими вважали зміни в довірчому інтервалі не менше ніж 95%, або $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Інкубація зрізу легень протягом 5 хв у розчині Хенксу, який містив 40 ммоль KCl (деполяризуючий розчин), призводила до значного скорочення сегментів ВЛА. Площина просвіту при цьому зменшувалася в середньому на $43,1 \pm 5,2\%$ ($P < 0,05$; $n = 5$; рис. 1). Наступна зміна розчину на стандартний викликала поступове розслаблення сегментів артерій та повернення площини просвіту приблизно до початкових величин (рис. 2). Повна нормалізація відбувалася через 25–35 хв.

З метою виявлення особливостей реактивності дільових ВЛА порівняно із головними легеневиими артеріями ми використовували перекис водню (H_2O_2). Відомо, що H_2O_2 здатен викликати скорочення легеневиих артерій на відміну від системних артерій, у яких відбувається розслаблення.

Зміна розчину в інкубаційній камері на такий, що містив 100 мкмоль перекису водню, призводила до розвитку

двофазного скорочення сегментів ВЛА (рис. 2).

Перша фаза скорочення була транзитною тривалістю приблизно 2 хв. Її амплітуда складала в середньому $16,2 \pm 1,4\%$ S_K ($p < 0,05$). Транзитрна фаза змінювалася поступово наростаючою тривалою фазою. Приблизно через 20 хв після аплікації H_2O_2 вона виходила на плато з амплітудою $47,6 \pm 2,4\%$ S_K ($p < 0,05$). Слід відзначити, що реакція була необоротною і площа просвіту ВЛА суттєво не змінювалася після усунення H_2O_2 з інкубаційної камери. Подібну двофазну реакцію ВЛА на перекис водню раніше також продемонстрував Roumahnam та співавт. за допомогою тензометричного методу [11].

Деполяризуючий розчин викликав підвищення тонуусу головних легеневиих артерій в середньому на $56 \pm 2,4\%$ ($p < 0,05$; $n = 5$). Реакція головних легеневиих артерій на перекис водню суттєво відрізнялася за своїм характером від реакції ВЛА. Аплікація H_2O_2 призводила до розвитку однофазного скорочення амплітудою $23,2 \pm 2,1\%$ T_K ($p < 0,05$, $n = 5$), яке поступово переходило в розслаблення до $-42,6 \pm 3,2\%$ T_K ($p < 0,05$) на 20 хв реакції. Подібна реакція на перекис водню

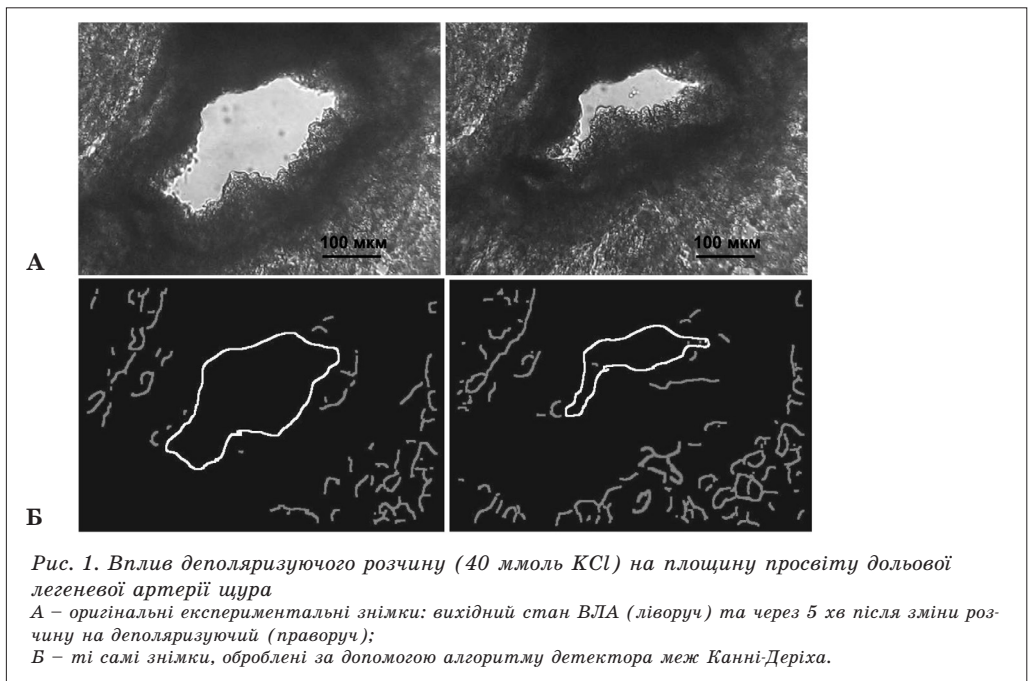


Рис. 1. Вплив деполаризуючого розчину (40 ммоль KCl) на площину просвіту дільової легеневої артерії щура

А – оригінальні експериментальні знімки: вихідний стан ВЛА (ліворуч) та через 5 хв після зміни розчину на деполаризуючий (праворуч);

Б – ті самі знімки, оброблені за допомогою алгоритму детектора меж Канні-Деріха.

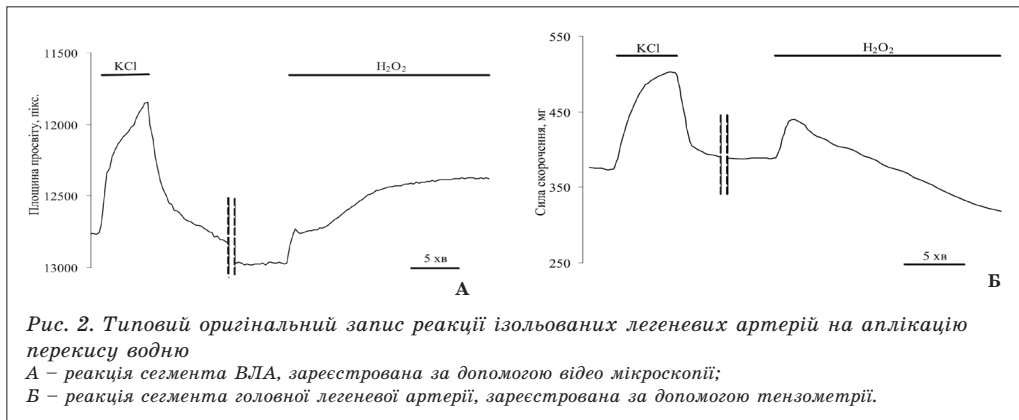


Рис. 2. Типовий оригінальний запис реакції ізольованих легеневих артерій на аплікацію перекису водню
 А – реакція сегмента ВЛА, зареєстрована за допомогою відео мікроскопії;
 Б – реакція сегмента головної легеневої артерії, зареєстрована за допомогою тензометрії.

раніше була продемонстрована і в системних артеріях [12].

Отримані результати підтверджують наявність суттєвих відмінностей скоротливих властивостей ВЛА порівняно з головними легеневими артеріями. На наш погляд, використання методу відео-мікроскопічного аналізу змін тонусу

ВЛА дозволяє проводити докладні дослідження як фізіологічних, так і патофізіологічних механізмів його регуляції. Крім того, цей метод може бути вкрай корисним при дослідженні впливу потенційних лікарських засобів на легеневий кровообіг у межах оцінки загальної фармакологічної безпеки.

1. Micropuncture measurement of lung microvascular pressure profile during hypoxia in cats / Y. Nagasaka, J. Bhattacharya, S. Nanjo [et al.] // *Circ. Res.* – 1984. – V. 54. – P. 90–95.
2. A comparison of the pharmacological and mechanical properties *in vitro* of large and small pulmonary arteries of the rat / R. M. Leach, C. H. Twort, I. R. Cameron, J. P. Ward // *Clin. Sci. (Lond.)* – 1992. – V. 82. – № 1. – P. 55–62.
3. Different contractile properties between intralobar and extralobar pulmonary arteries of the rabbit / M. K. Park, T. M. Kang, D. Y. Uhm [et al.] // *J. Smooth Muscle Res.* – 1999. – V. 35. – № 1. – P. 1–10.
4. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia / S. L. Archer, J. M. Huang, H. L. Reeve [et al.] // *Circ. Res.* – 1996. – V. 78. – № 3. – P. 431–442.
5. Robertson T. P. Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca^{2+} in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca^{2+} sensitization / T. P. Robertson, P. I. Aaronson, J. P. Ward // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1995. – V. 268. – P. H301–H307.
6. Hypoxic pulmonary vasoconstriction / J. T. Sylvester, L. A. Shimoda, P. I. Aaronson, J. P. Ward // *Physiol. Rev.* – 2012. – V. 92. – № 1. – P. 367–520.
7. Martin C. Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices / C. Martin, S. Uhlig, V. Ullrich // *Eur. Respir. J.* – 1996. – V. 9. – № 12. – P. 2479–2487.
8. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» // *Відомості Верховної Ради України.* – 2006. – № 27. – С. 230.
9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.
10. Deriche R. Using Canny's criteria to derive a recursively implemented optimal edge detector / *Deriche R.* // *Int. J. Computer Vision.* – 1987. – V. 1. – P. 167–187.
11. Constriction of pulmonary artery by peroxide: role of Ca^{2+} release and PKC / G. E. Pourmahram, V. A. Snetkov, Y. Shaifita [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – V. 45, № 10. – P. 1468–1476.
12. H_2O_2 effects on cerebral prostanoids and pial arteriolar diameter in piglets / C. W. Leffler, D. W. Busija, W. M. Armstead, R. Mirro // *Am. J. Physiol.* – 1990. – V. 258. – P. H1382–H1387.

Е. В. Стрелков, А. В. Паршиков, И. В. Кизуб, Н. С. Гула, Ю. О. Дуняк, Н. В. Добреля, А. С. Хромов

Видеомікроскопічний аналіз скоротильної активності внутрілегочних артерій в реальному часі

В статтю пропонується нова модифікація методу прижизненої мікроскопії тонких срезів легких малих лабораторних тварин, що дозволяє оцінювати зміни тонусу внутрілегочних артерій в реальному часі. В результаті порівняння впливу H_2O_2 (100 мкмоль) на головні і внутрілегочні артерії були виявлені суттєві відмінності в їх реактивності. Представлений

метод может быть полезным для изучения физиологических и патофизиологических механизмов регуляции легочного кровообращения, а также при оценке общей фармакологической безопасности лекарственных препаратов.

Ключевые слова: легочные артерии, прижизненная микроскопия, реактивные формы кислорода

**I. V. Strielkov, O. V. Parshikov, I. V. Kizub, N. S. Gula,
Y. O. Duniyuk, N. V. Dobrelya, O. S. Khromov**
**Real-time videomicroscopic analysis of contractile activity
of intrapulmonary arteries**

Main pulmonary arteries and intrapulmonary arteries (IPA) are known to have significant differences in pharmacological and physiological properties. These differences are observed in responses to hypoxia, reactive oxygen species and various mediators. Considering this, studies of IPA reactivity are important for the understanding of the regulation of pulmonary circulation. However, the evaluation of IPA tonus may be complicated due to small diameter of these vessels (less than 200 μm). A new modification of the method of microscopy of living precision-cut lung slices of small laboratory animals has been presented in the article. It allows real-time assessment of vascular tone of intrapulmonary arteries using automatic software analysis of the lumen area of IPA in precision-cut lung slices based on the Canny-Deriche edge detection algorithm. Significant differences between reactive properties of main pulmonary arteries and intrapulmonary arteries have been observed in the reactions induced by hydrogen peroxide (100 μM). Main pulmonary arteries responded to H_2O_2 with transient constriction followed by a slowly developing relaxation. On the other hand, the constriction of IPA was biphasic. It consisted of the rapid transient phase and the sustained phase. The presented method may be advantageous for the study of physiological and pathophysiological mechanisms of pulmonary vascular tone regulation as well as for the safety pharmacology studies.

Key words: pulmonary arteries, real-time microscopy, reactive oxygen species

Надійшла: 01.10.2013 р.

Контактна особа: Стрелков Євген Валентинович, молодший науковий співробітник,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потье, м. Київ, 03680.
Тел.: +38 0 44 456 02 88. Електронна пошта: strielkov@yahoo.com