

Роль оксида азота и элементов цитоскелета в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток

Гусакова С.В., Баскаков М.Б., Ковалев И.В., Мельник О.С.,
Капилевич Л.В., Медведев М.А., Студницкий В.Б., Антонов О.И.

Role of nitric oxide and cytoskeleton in regulation of contractile activity smooth muscle cells

Gusakova S.V., Baskakov M.B., Kovalev I.V., Melnik O.S., Kapilevich L.V.,
Medvedev M.A., Studnitsky V.B., Antonov O.I.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Гусакова С.В., Баскаков М.Б., Ковалев И.В. и др.

Методом механографии изучено влияние модуляции цитоскелета колхицином, нокодазолом и цитохалазином D на сократительные реакции гладкомышечных клеток, вызванные гиперкалиевым раствором, фенилэфрином и донором оксида азота – нитропруссидом натрия. Установлено, что сокращения гладкомышечных клеток аорты крысы, вызванные фенилэфрином, более чувствительны к действию нитропруссидом натрия, чем сокращения, индуцированные гиперкалиевым раствором. Показано, что микротубулы участвуют в расслаблении, опосредованном оксидом азота в гладких мышцах, предсокращенных гиперкалиевым раствором, тогда как эффективность релаксирующего влияния оксида азота в гладкой мышце аорты крысы при действии фенилэфрина зависит от состояния и микрофиламентов, и микротубул.

Ключевые слова: гладкомышечные клетки, цитоскелет, нитропруссид натрия.

The influence of modulation of cytoskeleton by colchicine, nocodazole and cytochalasin D on contractile reactions of smooth muscle cells caused by depolarization, phenylephrine and sodium nitroprusside has been investigated by the mechanographical method. It was found that the reduction in smooth muscle cells of rat aorta caused by fenilefrin more sensitive to sodium nitroprusside than the reduction induced hyperpotassium solution. We show that microtubules involved in relaxation, indirect nitric oxide of smooth muscle in hyperpotassium solution, whereas the efficiency of relaxing influence of nitric oxide in rat aorta smooth muscle in the action depends on phenylephrine and microfilaments and microtubules.

Key words: smooth muscle cells, cytoskeleton, sodium nitroprusside.

УДК 612.015.33:612.73:611.018.61

Введение

Тонус сосудистых гладких мышц поддерживается многими регуляторными факторами, реализующими свой эффект через системы внутриклеточной сигнализации. Передача информации от рецепторов плазматической мембраны к исполнительным системам осуществляется с помощью сигнальных молекул – вторичных посредников, основными из которых в гладкомышечных клетках (ГМК) являются ионы кальция и циклические нуклеотиды (циклический гуанинмонофосфат (цГМФ) и циклический аденозинмонофосфат (цАМФ)) [1]. В процессах взаимоотношения этих сигнальных систем особое значение занимает оксид азота NO [–].

Феноменология влияния оксида азота и нитросоединений-доноров NO на сократительную функцию гладких мышц достаточно хорошо известна. Во всех исследованных типах мышц доноры NO вызывали уменьшение механического напряжения, угнетали спонтанную активность (если таковая имелась) и снижали величину сократительных ответов на действие биологически активных веществ. Расслабляющие эффекты NO и (или) релаксирующего фактора в сосудистых ГМК реализуются через активацию растворимой фракции гуанилатциклазы и увеличение внутриклеточной концентрации цГМФ [1].

Изучение механизмов действия NO на функции нормальных и патологически измененных клеток продолжается и в настоящее время, но вместе с тем практически отсутствуют сведения о роли цитоскелета в механизмах регуляции цГМФ-зависимой сигнальной системы сократительной активности сосудистых гладких мышц.

Цель исследования – изучение влияния дезинтеграции микроэлементов и микротубул цитоскелета на цГМФ-опосредованную регуляцию сократительной активности сосудистых гладкомышечных клеток.

Материал и методы

Объектом исследования служили дезэндотелизированные гладкомышечные сегменты аорты беспородных белых крыс. Для исследования сократительной активности после предварительной нагрузки 500 мг сегменты фиксировали в термостатируемой перфузионной камере в условиях постоянной смены раствора Кребса (1 мл/мин). Изменение механического напряжения ГМК передавалось на шток механоэлектрического преобразователя «МХ₂Б» (г. Москва) и регистрировалось после усиления с помощью XY рекодера (Karl Zeiss Jena, Германия).

Амплитуду контрольных (100%) сократительных ответов сосудистых сегментов на гиперкалиевый раствор (замена NaCl в концентрации 30 ммоль на KCl) регистрировали после 40–50 мин выдерживания в нормальном растворе Кребса.

Растворы для перфузии препаратов готовили на основе дистиллированной воды путем добавления соответствующих реактивов (ХЧ, «Реахим», Россия). Физиологический раствор Кребса содержал (в ммоль): 120,4 NaCl, 5,9 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 5,5 глюкозы, 15 C₄H₁₁O₃N [tris(oxymethyl)-aminometan] (316,4 мосМ).

В растворах поддерживались значения pH в пределах 7,35–7,40 и температуры (37,0 ± 0,1) °С.

Для деполимеризации микрофиламентов и микротубул цитоскелета использовали колхицин [1]. Для дифференцировки участия отдельных элементов цитоскелета в сократительных реакциях гладкомышечных клеток применяли специ-

фические модуляторы микрофиламентов – цитохалазин D и микротубул – нокодазол.

Тестирующие растворы готовили путем добавления в раствор Кребса соответствующих реактивов: колхицина, цитохалазина D, нокодазола, фенилэфрина, нитропруссид натрия, метиленового синего и дибутирила-цГМФ (Sigma, США).

Результаты представлены как среднее арифметическое значение \bar{X} и среднеквадратичное отклонение σ и обработаны с помощью программного пакета Statistica 6.0 с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни или t -критерия Стьюдента для зависимых образцов. Достоверными считали различия при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

После 40 мин инкубации в нормальном растворе Кребса в ответ на гиперкалиевый раствор регистрировались типичные для ГМК аорты крысы сократительные ответы, активируемые потенциалзависимым входом кальция [1, 2]. Активатор гуанилатциклазы нитропруссид натрия (0,01–1 мкмоль) не влиял на исходное механическое напряжение (МН), но вызывал снижение величины гиперкалиевого сокращения сегментов аорты. Расслабление, близкое к полумаксимальному, наблюдалось при добавлении нитропруссид натрия (НП) (0,05 мкмоль), составляя (58,4 ± 4,1)% ($n = 9$, $p < 0,05$) от контрольного сокращения (рис. 1,а).

Известно, что основные эффекты доноров NO в гладкомышечных клетках обусловлены активацией растворимой фракции гуанилатциклазы (ГЦ) [1]. Вместе с тем было установлено цГМФ-независимое действие нитропруссид натрия, для выявления которого использовался ингибитор ГЦ – метиленовый синий [1, 2, 3].

Предобработка сегментов метиленовым синим (10 мкмоль, 30 мин) не влияла на исходное МН, но приводила к уменьшению расслабляющего воздействия НП (0,05 мкмоль) на предсокращенный гиперкалиевым раствором сегмент, которое в этих условиях составило (27,2 ± 1,8)%

($n = 6$, $p < 0,05$) относительно контрольных значений (рис. 2,а).

Полученные данные указывают на то, что основной мишенью для НП в исследуемых ГМК является растворимая фракция ГЦ, и расслабляющее действие донора оксида азота на гиперкалиевое сокращение по большей части опосредовано цГМФ.

Для изучения роли цитоскелета в регуляции оксидом азота сократительной активности ГМК использовали дезинтегратор микротубул и микрофиламентов колхицин. Обработка колхицином (10 мкмоль, 90 мин) не влияла на исходное МН и приводила к снижению амплитуды гиперкалиевых сокращений сосудистых гладких мышц до $(74,7 \pm 11,6)\%$ ($n = 8$, $p < 0,05$) от контроля (рис. 3,а).

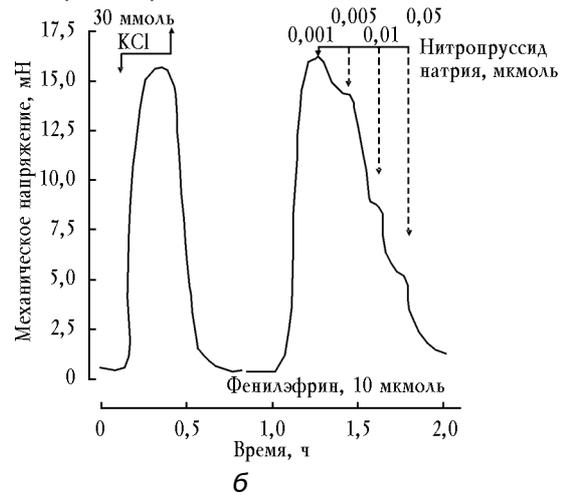
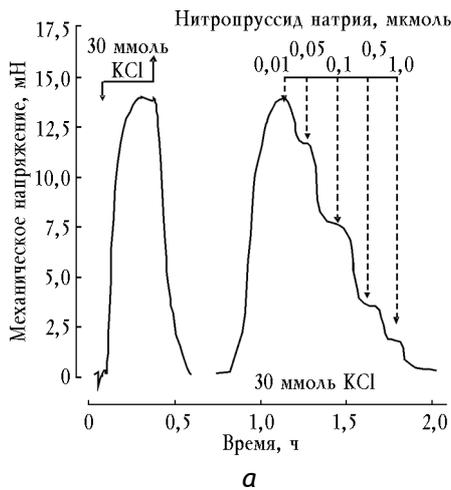


Рис. 1. Влияние нитропруссид натрия на механическое напряжение гладкой мышцы аорты крысы, предсокращенной гиперкалиевым (КСI) раствором (а) и фенилэфрином (б)

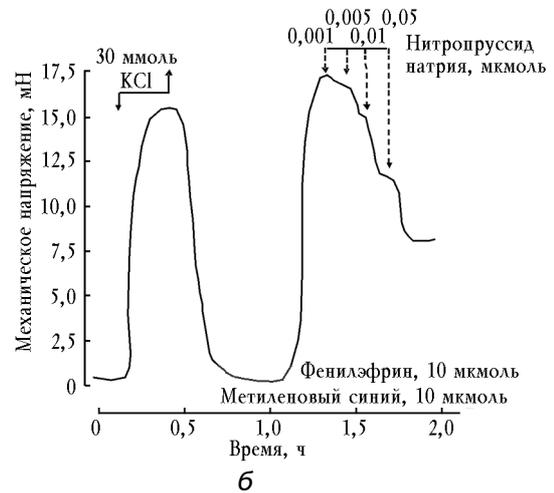
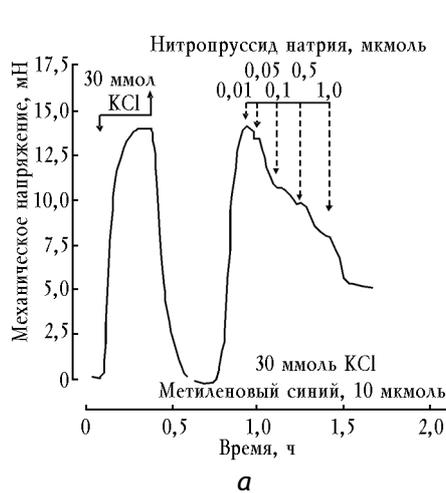


Рис. 2. Влияние метиленового синего на эффекты нитропруссид натрия в гладкой мышце аорты крысы при действии гиперкалиевого (в концентрации 30 ммоль КСИ) раствора (а) и фенилэфрина (б)

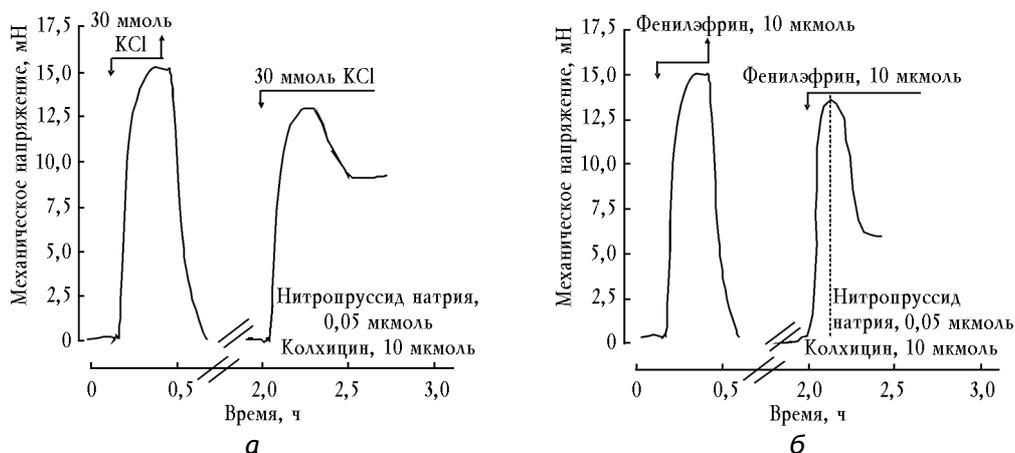


Рис. 3. Влияние колхицина на эффекты нитропруссид натрия в гладкой мышце аорты крысы при действии гиперкалиевого (в концентрации

30 ммоль КСl) раствора (а) и фенилэфрина (б)

Колхицин достоверно снижал расслабляющее влияние НП на сосудистые ГМК: релаксирующий эффект НП в концентрации 0,05 мкмоль составлял $(31,1 \pm 6,5)\%$ ($n = 8, p < 0,05$) (рис. 3,а) от величины гиперкалиевого сокращения в присутствии колхицина.

Подобное действие колхицина свидетельствует об участии цитоскелета в генерации сокращений сосудистых сегментов при деполяризации мембраны и вовлечении элементов цитоскелета в *no*-зависимую регуляцию сократительной активности, вызванной деполяризацией мембраны ГМК.

Для оценки вклада отдельных элементов цитоскелета в сократительные реакции гладкой мышцы аорты при действии оксида азота использовали химические агенты, вызывающие деполимеризацию микротубул или микрофиламентов: нокодазол и цитохалазин D соответственно.

Нокодазол (10 мкмоль) в течение 60–90 мин действия не изменял исходное МН и амплитуду сокращений сегментов ГМК, вызванных гиперкалиевым раствором ($(105,8 \pm 7,8)\%$, $n = 6, p > 0,05$), но достоверно снижал расслабляющее действие НП (0,05 мкмоль), которое составило $(24,5 \pm 1,6)\%$ ($n = 6, p < 0,05$) от величины гиперкалиевого сокращения в присутствии нокодазола.

Приведенные данные указывают на то, что микротубулы являются значимым компонентом

no-зависимого сигнального пути, активация которого ведет к расслаблению ГМК.

Для изучения роли актиновых микрофиламентов в *no*-зависимой регуляции сократительной активности гладких мышц аорты использовался цитохалазин D. Добавление цитохалазина D (0,5 мкмоль) в раствор Кребса приводило к снижению исходного МН сегментов, которое к 40-й мин составило $(11,4 \pm 4,1)\%$ ($n = 6, p < 0,05$) от контрольной гиперкалиевой контрактуры. Амплитуда сокращения, вызванного гиперкалиевым раствором, в этих условиях снизилась до $(42,4 \pm 6,7)\%$ ($n = 6, p < 0,05$) от контрольных значений. Расслабляющее действие НП (0,05 мкмоль) на фоне цитохалазина D достоверно усиливалось, так как сосудистый сегмент под влиянием НП расслаблялся практически полностью.

Полученные данные свидетельствуют об участии микрофиламентов цитоскелета в поддержании исходного механического напряжения гладкой мышцы, их вовлечении в генерацию и поддержание сокращений при деполяризации мембраны ГМК, микротубулы в большей мере вовлечены в механизмы расслабляющего действия оксида азота.

Если цитоскелетзависимое расслабляющее действие НП связано с высвобождением оксида азота и активацией растворимой фракции ГЦ, то вторичным посредником этого сигнального пути может являться цГМФ [1].

После обработки гладкомышечных препаратов колхицином (10 мкмоль, 90 мин) на фоне метиленового синего (10 мкмоль) релаксирующий эффект НП (0,05 мкмоль) достоверно уменьшался, составляя $(9,0 \pm 1,6)\%$ ($n = 6$, $p < 0,05$) от величины гиперкалиевого сокращения в присутствии колхицина. В отсутствие метиленового синего этот эффект составлял $(31,1 \pm 6,5)\%$. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о вкладе элементов цитоскелета в реализацию цГМФ-независимого компонента расслабляющего действия НП.

Для выяснения вклада цитоскелета в обеспечение цГМФ-зависимого компонента расслабляющего действия оксида азота были проведены исследования с использованием проникающего аналога цГМФ — дибутирила-цГМФ.

Дибутирил-цГМФ (100 мкмоль) вызывал снижение МН сегментов аорты, предсокращенных гиперкалиевым раствором: релаксирующий эффект составлял $(26,4 \pm 3,1)\%$ ($n = 5$, $p < 0,05$) от контрольного сокращения. После обработки гладкомышечных препаратов колхицином (10 мкмоль) расслабляющее влияние дибутирил-цГМФ резко ослаблялось и составляло $(8,6 \pm 5,3)\%$ ($n = 5$, $p < 0,05$) от величины гиперкалиевого сокращения в присутствии колхицина.

Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении элементов цитоскелета в реализацию цГМФ-зависимого релаксирующего действия оксида азота.

Сократительные ответы сосудистых гладких мышц инициируются многими физиологически активными веществами [1, 2]. Для изучения роли цитоскелета в NO -зависимой регуляции сократительной активности ГМК аорты крысы, вызванной оперированием сигнальной системы, связанной с активностью протеинкиназы С, применяли фенилэфрин (ФЭ). ФЭ использовался в концентрации 10 мкмоль, при которой амплитуда сокращений сосудистых гладких мышц была сравнима с действием KCl в концентрации 30 ммоль (рис. 1,б).

Нитропруссид натрия вызывал снижение МН фенилэфрининдуцированного сокращения сегментов при более низких концентрациях ($0,001$ –

$0,05$ мкмоль), чем на фоне 30 ммоль KCl (рис. 1,а). Уже при добавлении 0,005 мкмоль НП наблюдался близкий к полумаксимальному релаксирующий эффект: $(42,6 \pm 4,1)\%$ ($n = 6$, $p < 0,05$) от контроля.

Таким образом, релаксирующее действие НП на ГМК аорты зависело от предсокращающего фактора. Его более выраженное влияние на индуцированное фенилэфрином сокращение, чем на вызванное хлоридом калия, свидетельствует о том, что участие С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы играет существенную роль в механизмах NO -зависимого расслабления сосудистых ГМК.

В присутствии ингибитора растворимой фракции ГЦ метиленового синего (10 мкмоль) расслабляющее действие НП (0,005 мкмоль) на фенилэфрининдуцированные сократительные реакции значительно снижалось, составляя $(15,7 \pm 2,3)\%$ ($n = 6$, $p < 0,05$) от контрольных значений (рис. 2,б). Следовательно, растворимая фракция ГЦ является основной мишенью для НП и при фенилэфрининдуцированном сокращении ГМК аорты крысы.

После 90-минутной обработки колхицином амплитуда сокращений сосудистых сегментов, вызванных добавлением фенилэфрина в концентрации 10 мкмоль, статистически значимо снижалась, составляя $(87,7 \pm 10,3)\%$ ($n = 6$, $p < 0,05$) от контрольного фенилэфрининдуцированного сокращения.

Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении микротрубочек и актиновых элементов цитоскелета в развитие фенилэфрининдуцированных сокращений сосудистых ГМК.

После обработки гладкомышечных препаратов колхицином (10 мкмоль, 90 мин) релаксирующее действие НП в концентрации 0,005 мкмоль достоверно увеличивалось, составляя $(59,8 \pm 3,2)\%$ ($n = 6$, $p < 0,05$) от фенилэфрининдуцированного сокращения на фоне колхицина (рис. 3,б).

Подобное действие колхицина свидетельствует о вовлечении элементов цитоскелета в NO -зависимую регуляцию МН сосудистых сегментов при действии фенилэфрина.

После 60-минутной обработки нокодазолом (10 мкмоль) амплитуда сокращений сосудистых сегментов, вызванных добавлением фенилэфрина в концентрации 10 мкмоль, статистически значимо увеличивалась, составляя $(114,9 \pm 4,3)$ ($n = 6, p < 0,05$). Релаксирующий эффект НП в концентрации 0,005 мкмоль также достоверно увеличивался, составляя $(66,7 \pm 2,4)\%$ ($n = 6, p < 0,05$) от фенилэфрининдуцированного сокращения в присутствии нокодазола.

После предобработки гладкомышечных препаратов цитохалазином D (0,5 мкмоль, 30 мин) амплитуда фенилэфрининдуцированного сокращения снизилась до $(31,3 \pm 5,1)\%$ ($n = 9, p < 0,05$) от контрольной гиперкалиевой контрактуры. Наблюдалось достоверное усиление расслабляющего действия НП на фоне цитохалазина D: сосудистый сегмент расслаблялся полностью ($n = 6, p < 0,05$).

Как следует из полученных данных, актиновые элементы цитоскелета и микротубулы вовлекаются в развитие фенилэфрининдуцированного сокращения. Эффективность оперирования но-опосредованной сигнальной системы в ГМК аорты крысы при действии фенилэфрина в равной степени зависит от состояния микрофиламентов и микротубул цитоскелета.

Заключение

Оксиду азота присущи как сигнальные, так цитопротекторные и цитотоксические функции [1, 2]. Сочетание деструктивных и защитных эффектов но позволяет считать эту молекулу одной из центральных фигур в поддержании жизнеобеспечения клеток, основанном на существовании баланса между физиологическими и патофизиологическими процессами.

В последнее время появляется все больше данных об участии актинового и тубулинового элементов цитоскелета в процессах сопряжения возбуждения-сокращения гладкомышечных клеток. Показано, что дезинтеграция актиновых микрофиламентов цитохалазинами снижает сократительные ответы гладких мышц на действие биологически активных веществ, нарушает оперирование потенциалзависимых кальциевых ка-

налов сосудистых ГМК [1], микротубулы не оказывают существенного влияния на механические характеристики сосудистых гладкомышечных клеток, но участвуют в модуляции большого числа сигнальных путей [1, 2].

Из полученных результатов следует, что эффективность оперирования сигнальной системы, опосредованной оксидом азота в ГМК аорты крысы, зависит от состояния микрофиламентов и микротубул. При этом степень их влияния на эффективность оперирования но-опосредованного сигнального пути может модулироваться, по-видимому, вовлечением дополнительно С-киназной ветви в кальциевую регуляцию сократительной активности сосудистых сегментов [1]. Действие фенилэфрина и, возможно, других биологически активных веществ, сопряженных с активацией протеинкиназы С [1, 2], может приводить к потенцированию действия но и (или) релаксирующего фактора в сосудистых гладкомышечных клетках, в том числе и за счет совместного участия микрофиламентов и микротубул цитоскелета.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, контракты № 07-04-01184, 08-04-99037 и 09-04-99026.

Литература

1. Баскаков М.Б., Медведев М.А., Ковалев И.В. и др. Механизмы регуляции функций гладких мышц вторичными посредниками. Томск: Гавань, 1996. 154 с.
2. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Панов А.А. и др. Влияние нитропруссид натрия на мембранный потенциал и механическое напряжение гладкомышечных клеток аорты крысы // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1997. Т. 83, № 7. С. 70–76.
3. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А. и др. Миогенные эффекты циклического гуанозинмонофосфата в гладкомышечных клетках. Роль протеинкиназы С // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 89, № 4. С. 436–446.
4. Реутов В.П., Каюшин Л.П., Сорокина Е.Г. Физиологическая роль цикла окиси азота в организме человека и животных // Физиология человека. 1994. Т. 20, № 3. С. 165–174.
5. Северина И.С. Роль растворимой гуанилатциклазы в механизмах ее физиологических эффектов // Вопр. мед. химии. 2002. Т. 48, вып. 1. С. 4–30.
6. Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г. Физиология сосудистых гладких мышц. Киев: Наукова думка, 1988. 250 с.

Экспериментальные и клинические исследования

7. *Capaldo B., Guardasole V., Pardo F.* Abnormal Vascular Reactivity in Growth Hormone Deficiency // *Circulation*. 2001. V. 103. P. 520—524.
8. *Drewett J., Garbers D.* The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands // *Endoc. Rev.* 1994. V. 15, № 2. P. 135—162.
9. *Furchgott R., Vanhoutte P.* Endothelium-derived relaxing and contracting factor // *FASEB J.* 1989. V. 3. P. 2007—2018.
10. *Luscher T.* Endothelium-derived relaxing and contracting factors // *Eur. Heart. J.* 1989. № 9. P. 847—857.
11. *Moncada S.* The L-arginin: nitric oxide pathway // *Acta Physiol. Scand.* 1992. V. 145. P. 201—227.
12. *Nakamura M., Sunagawa M., Kosugi T., Sperelakis N.* Actin filament disruption inhibits L-type Ca^{2+} channel current in cultured vascular smooth muscle cells // *Am. J. Physiol. Cell.* 2000. V. 279. P. C480—C487.
13. *Ouchi N., Kihara S., Arita Y.* Novel modulator for endothelial adhesion molecules: Adipocyte-derived plasma protein adiponectin // *Circulation*. 2001. V. 103. P. 1057—1063.
14. *Platts S.H., Martinez-Lemus L.A., Meininger G.A.* Microtubule-dependent regulation of vasomotor tone requires Rho-kinase // *J. Vasc. Res.* 2002. V. 9 (2). P. 173—182.
15. *Shaw L., Ahmed S., Austin C., Taggart M.J.* Inhibitors of actin filament polymerisation attenuate force but not global intracellular calcium in isolated pressurised resistance arteries // *J. Vasc. Res.* 2003. V. 40 (1). P. 1—10.
16. *Zhang D., Wang Z., Jin N. et al.* Microtubule disruption modulates the Rho-kinase pathway in vascular smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2001. V. 22 (2). P. 193—200.

Поступила в редакцию 10.06.2009 г.

Утверждена к печати 17.06.2009 г.

Сведения об авторах

- С.В. Гусакова* — канд. мед. наук, доцент кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).
- М.Б. Баскаков* — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).
- И.В. Ковалев* — д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).
- О.С. Мельник* — аспирант кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).
- Л.В. Капилевич* — д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).
- М.А. Медведев* — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).
- В.Б. Студницкий* — канд. биол. наук, доцент кафедры нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).
- О.И. Антонов* — аспирант кафедры нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Гусакова Светлана Валерьевна, тел. 8 (3822) 42-09-54, e-mail: gusacova@yandex.ru