

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК АОРТЫ КРЫСЫ

Баскаков М. Б.^{1, 2}, Желудева А. С.¹, Гусакова С. В.¹, Смаглий Л. В.¹, Ковалев И. В.¹, Бирулина Ю. Г.¹, Алейник А. Н.², Медведев М. А.¹, Орлов С. Н.³

¹ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России», Томск, Россия (634050, Томск, ул. Московский тракт, 2), e-mail: zheludevan@rambler.ru

²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Россия (634050, пр. Ленина, 30)

³Научно-исследовательский центр Университета г. Монреаль (2901 Rachel Street East, room 313, Montreal, Quebec, H1W 4A4 Canada)

Методом механографии изучено действие монооксида углерода (СО) на сократительные реакции гладкомышечных клеток (ГМК), вызванные гиперкалиевой деполяризацией мембраны (30мМ КСl) и фенилэфрином (ФЭ).

Показано, что донор СО - CORM-2 в экспериментах с гиперкалиевой контрактурой в концентрациях 10-1000 мкМ, а в случаях предсокращения ГМК 10 мкМ ФЭ, от 1 мкМ и выше, вызывал дозозависимое расслабление сосудистых сегментов. Ингибирование NO-синтазы и растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) ослабляли СО-индуцированную релаксацию сегментов. В условиях блокирования калиевых каналов тетраэтиламмонием и 4-амнопридином релаксирующее действие CORM-2 на сосудистые сегменты практически устранялось.

Полученные результаты являются свидетельством взаимодействия газотрансмиттеров, СО и NO, в реализации релаксирующего эффекта монооксида углерода на уровне рГЦ и калиевых каналов плазмолеммы ГМК.

Ключевые слова: сосудистые гладкомышечные клетки, газотрансмиттеры, монооксид углерода, оксид азота.

THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE MECHANISM OF ACTION OF CARBON MONOXIDE ON THE CONTRACTILE ACTIVITY OF SMOOTH MUSCLE CELLS FROM THE RAT AORTA

Baskakov M. B.^{1, 2}, Zheludeva A. S.¹, Gusakova S. V.¹, Smagly L. V.¹, Kovalev I. V.¹, Birulina J. G.¹, Aleinik A. N.², Medvedev M. A.¹, Orlov S. N.³

¹Sibirian State Medical University, Tomsk, Russia (634050, Tomsk, street Moskovsky trakt, 2), e-mail: zheludevan@rambler.ru

²National Research Tomsk Polytechnic University (634050, street Lenina prospect 30)

³Research Center, University of Montreal Hospital (CHUM) (2901 Rachel Street East, room 313, Montreal, Quebec, H1W 4A4 Canada)

The effect of carbon monoxide (CO) on contractile reactions of smooth muscle cells (SMC) caused by depolarization (30mM KCl) and phenylephrine (PE) has been investigated by the mechanographical method.

It is shown that the donor CO - CORM-2, in experiments with of high potassium contraction in concentrations of 10-1000 μM, and in cases phenilefrine-induced contractions (10 μM) of SMC, of 1 μM and above, caused a dose-dependent relaxation of vascular segments. Inhibition of NO-synthase and soluble guanylate cyclase (GC) weakened CO - induced relaxation of the segments. With blocking potassium channels tetraethylammonium chloride and 4-aminopyridine relaxing effect CORM-2 on vascular segments virtually eliminated.

These results may be the evidence of cooperation in the implementation of gazotransmitters gasotransmitters relaxing effect of CO on the level of soluble guanylate cyclase and potassium channels plasmalemma of SMC.

Key words: vascular smooth muscle cells, gasotransmitters, carbon monoxide, nitric oxide.

Введение. В конце прошлого века (Furthgott et al.,1987) был открыт первый газовый посредник, оксид азота, и, что много более значимо, принципиально отличный способ трансляции сигналов в клетках, не связанный с лиганд-рецепторным взаимодействием [8]. В

настоящее время семейство газотрансмиттеров включает, помимо оксида азота (NO), монооксид углерода (CO), сероводород (H₂S) и, возможно, сернистый ангидрид (SO₂) [1].

Монооксид углерода в последнее время позиционируется как внутриклеточная сигнальная молекула. Эндогенный CO является продуктом катаболизма гема до монооксида углерода, биливердина, железа и контролируется гемоксигеназами (ГО) [6]. В настоящий момент идентифицированы три изоформы ГО: ГО-1 («индуцибельная изоформа»), ГО-2 и ГО-3 («конститутивные изоформы») [3].

Одним из хорошо известных эффектов CO является расслабление кровеносных сосудов. Иницируя различные молекулярные события, он вызывает вазодилатацию [5], что, позволяет рассматривать CO как один из факторов, препятствующих локальному вазоспазму и увеличению сосудистого тонуса [2, 8]. Другие авторы отрицают какое-либо влияние монооксида углерода на механическое напряжение (МН) сосудистых гладких мышц, а в некоторых исследованиях описано констрикторное действие этого газотрансмиттера.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что расслабление сосудистых ГМК при действии монооксида углерода опосредовано активацией протеинкиназы G (ПК-G) и открыванием Ca²⁺-зависимых калиевых каналов большой проводимости (BK(Ca)) [9, 10]. В дополнение к G-киназному механизму, имеются свидетельства того, что CO прямо активирует BK(Ca)-каналы [4], и указывают на причастность канала к газовым сенсорам. Допускается, что с BK(Ca)-каналом связан гем, который функционирует как сенсор для CO. Повышение активности канала отражает способность CO устранять ингибирующее влияние гема на его оперирование. Однако и эта гипотеза не получила общего признания. Например, BK(Ca)-каналы, обработанные окислителем – перекисью водорода (H₂O₂), которая, как ожидается, окисляет железо гема и нарушает взаимодействие CO с белком [2], сохраняют чувствительность к CO. Наряду с этой дискуссией, вопросы участия других ионных каналов в реализации релаксирующего действия монооксида углерода, взаимодействия CO с вторичными посредниками, в том числе и газовыми, о соотношении собственно сигнальной функции этой молекулы и модулирующего влияния на оперирование вторичных посредников в функционировании этой ветви внутриклеточной коммуникации не нашли удовлетворительного решения.

В настоящей работе проведено исследование феноменологии и механизмов действия монооксида углерода на сократительные свойства изолированных сосудистых гладких мышц.

Материалы и методы. Объектом исследования явились изолированные сегменты грудного отдела аорты беспородных белых крыс, которые являются традиционной моделью артериального сосуда мышечного типа. После выделения аорту помещали в физиологически

сбалансированный солевой раствор Кребса, с помощью хирургических ножниц отпрепаровывали жировую и соединительную ткань и выделяли сегменты шириной 2–3 мм. Эндотелий удаляли механически, вращением деревянного манипулятора в просвете сегмента в течение 1 минуты непосредственно перед выполнением эксперимента. Для исследования сократительной активности гладких мышц использовался метод механографии. После приготовления сегмент помещался в термостатируемую, аэрируемую камеру объемом 10 мл, заполненную физиологическим раствором Кребса и фиксировался после предварительной нагрузки 500 мг.

Исследование сократительной активности гладкомышечных сегментов проводилось с использованием сертифицированной четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16 (Германия).

Амплитуду контрольных (100 %) сократительных ответов сосудистых сегментов на действие гиперкалиевого раствора (эквимолрное замещение 30 мМ NaCl на KCl) или фенилэфрина (10 мкМ) регистрировали после 40-50 минут выдерживания в нормальном растворе Кребса.

Растворы готовились на основе дистиллированной воды добавлением соответствующих реактивов (ХЧ, «Реахим», Россия). Физиологический раствор Кребса содержал (в мМ): 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 7,35—7,40 и температуры 37,0 ± 0,1°C.

Реактивы и статистика: Tricarbonyldichlororuthenium(II)-dimer (CORM-2) (Sigma); 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4, 3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) (Sigma); N^G-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) (Sigma); Phenylephrine hydrochloride (Sigma); 4-Aminopyridine (4AP) (Sigma); Tetraethylammonium chloride (TEA) (Serva). Анализ данных проводили при помощи программы Statistica 6.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде «среднее ± ошибка среднего» (X±m). Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий нормальности Колмогорова-Смирнова. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Для проверки однородности парных или зависимых, выборок был использован T-критерий Вилкоксона (Wilcoxon mached pairs test).

Результаты и обсуждение. Для изучения влияния монооксида углерода на сократительную активность ГМК аорты крысы использовался донор CO-tricarbonyldichlororuthenium(II)-dimer (CORM-2) [7]. В концентрациях 1 – 1000 мкМ CORM-2 не влиял на исходное механическое напряжение (МН) исследуемых препаратов, но

дозозависимо расслаблял сосудистые сегменты, предсокращенные деполяризацией мембраны в гиперкалиевом растворе (30 мМ КСl) или действием ФЭ (10 мкМ).

Концентрация CORM-2, приводящая к полумаксимальному снижению (EC_{50}) МН сегментов аорты, вызванного действием гиперкалиевого раствора равнялась 100 мкМ ($58.4 \pm 6.7\%$, $n=6$, $p<0.05$), а EC_{50} CORM-2 при предсокращении, индуцированном ФЭ-10 мкМ ($59.7 \pm 4.8\%$ ($n=6$, $p<0.05$)).

Известно, что расслабляющее действие СО на ГМК в значительной степени обусловлено активацией рГЦ и увеличением цитоплазматической концентрации циклического 3:5-гуанозинмонофосфата (цГМФ) [5]. Для исследования роли цГМФ в механизмах действия СО на сосудистые сегменты использовали ингибитор рГЦ - 1Н-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) [8]. Тестировалось действие CORM-2 в концентрациях равных EC_{50} для обоих способов предсокращения гладкомышечных сегментов. 1 мкМ ODQ не влиял на исходное МН сосудистых сегментов и амплитуду сокращений, вызванных действием гиперкалиевого раствора и ФЭ, но достоверно снижал расслабляющее действие CORM-2. Амплитуда сокращений гладкомышечных сегментов, вызванных гиперкалиевым раствором, уменьшилась на $20.7 \pm 3.0\%$ ($n=6$, $p<0.05$), а сокращений, индуцированных ФЭ – на $15.4 \pm 4.5\%$ ($n=6$, $p<0.05$) в сравнении с контрольными значениями. Полученные данные свидетельствуют о том, что релаксирующее действие СО на сосудистые сегменты, по крайней мере, частично, опосредовано участием рГЦ. Следовательно, одним из молекулярных событий, инициируемых СО является активация рГЦ, которая считается основной мишенью и для NO.

Мы предприняли попытку исследовать взаимодействие этих двух газотрансмиттеров на уровне рГЦ. С этой целью эндогенный синтез оксида азота выключался ингибитором NO-синтазы - N^G -нитро-L-аргинин метиловым эфиром (L-NAME). В концентрации 100 мкМ L-NAME не влиял на исходное МН гладкомышечных сегментов аорты, а также амплитуду сокращений, вызванных деполяризацией мембраны при действии гиперкалиевого раствора и ФЭ, но достоверно ослаблял расслабляющее действие CORM-2.

После предобработки гладкомышечных сегментов L-NAME, CORM-2 уменьшал МН сегментов, вызванное гиперкалиевым раствором лишь на $11.3 \pm 5.6\%$ ($n=8$, $p<0.05$), а в случаях предсокращения сегментов ФЭ – на $10.2 \pm 4.3\%$ ($n=8$, $p<0.05$).

Таким образом, в условиях угнетения синтеза NO релаксирующий эффект донора СО достоверно ослаблялся. Полученные данные являются указанием на то, что одним из молекулярных каскадов, используемых СО для реализации своего действия на ГМК, является оксид азота.

Хорошо известно, что расслабление ГМК при действии различных факторов, в большинстве случаев связано с активацией калиевой проводимости мембраны [10]. Для выяснения роли изменений калиевой проводимости в механизмах действия монооксида углерода мы использовали блокаторы калиевых каналов тетраэтиламмония хлорид (ТЭА) и 4-аминопиридин (4-АП). Добавление 10 мМ ТЭА в раствор Кребса не влияло на исходное МН гладкомышечных сегментов аорты крысы, предсокращенных гиперкалиевым раствором, но вызывало дополнительный прирост МН на $16.2 \pm 8.6\%$ ($n=6$, $p<0.05$) в случаях предсокращения сосудистых сегментов ФЭ. Блокаторы калиевых каналов снижали расслабляющее действие CORM-2 на сосудистые ГМК, причем степень ослабления эффектов CORM-2 не зависела от характера предсокращения.

Заключение. При исследовании влияния монооксида углерода на сократительную активность ГМК было установлено, что в случае использования в качестве предсокращающего фактора α -адреномиметика ФЭ, концентрация донора СО, обеспечивающая полумаксимальный релаксирующий эффект была на порядок ниже. Это, вероятнее всего, связано с различиями природы сократительных ответов сосудистых сегментов, а точнее сигнальных систем, обеспечивающих сокращение и расслабление. В проведение сигнала при деполяризации мембраны ГМК вовлечена, в сущности, одна, кальций-кальмодулиновая, ветвь кальциевой сигнальной системы. Гораздо сложнее совокупность процессов, индуцируемых возбуждением α_1 -адренорецепторов. Набор и последовательность открывания ионных каналов, участие обеих ветвей кальциевой сигнальной системы, обилие прямых и обратных связей (положительных и отрицательных) и мн. др. делает такое сокращение в целом, или в отдельных звеньях в цепи индукции и поддержания МН более уязвимым к действию СО.

Хорошо известно, что L-NAME, ингибитор NO-синтазы выключает эндогенную продукцию NO. Результатом этого, в соответствии с нашими данными, является значительное ослабление релаксации сосудистых сегментов на действие СО. Полученные результаты являются свидетельством синергизма сигнальных молекул в процессе реализации расслабляющего действия СО на сосудистые сегменты. Учитывая данные о том, что основной мишенью NO является рГЦ, этот феномен может быть обусловлен: а) суммацией активирующего рГЦ действия обоих газотрансмиттеров (СО и NO); б) сенсбилизацией оксидом азота рГЦ к действию СО. Первое предположение представляется менее вероятным, поскольку L-NAME не изменял исходное (базальное) МН исследуемых препаратов, вызванное деполяризацией мембраны ГМК или ФЭ, что следовало ожидать в случае активации эндогенным оксидом азота рГЦ в покоящихся или стимулированных указанными

предсокращающими факторами сосудистых ГМК. Поэтому мы считаем, что эндогенный оксид азота сенсibiliзирует рГЦ к действию СО.

Результаты, полученные в экспериментах с выключением самой рГЦ, экспонируют интересные феномены. На наш взгляд, приоритетным является то, что, в соответствии с указанным выше, эти данные, прежде всего, являются свидетельством того, что рГЦ далеко не единственный молекулярный субстрат, а вышеуказанный способ взаимодействия не является исключительным для оксидов азота и углерода. Во-первых, потому, что ингибирование рГЦ в целом менее эффективно сказывалось на СО-индуцированной релаксации, чем выключение синтеза NO; во-вторых, в этих случаях наблюдался любопытный феномен: при действии СО в высоких концентрациях, кривая изменения МН сегментов, предсокращенных ФЭ, смещалась в область отрицательных значений тонуса ГМ, что может свидетельствовать о дополнительных молекулярных мишенях для СО, с одной стороны, и указывать на взаимодействие СО и NO на этом сайте, с другой. Является ли это взаимодействие прямым или опосредованным дополнительными молекулярными событиями ответят данные специальных исследований. Но принципиально важным является уже то, что это взаимодействие не является «классическим», опосредованным цГМФ.

Резюмируя данные, полученные в экспериментах с модификацией калиевой проводимости мембраны сосудистых ГМК, можно заключить, что: а) монооксид углерода повышает калиевую проводимость мембраны исследуемых ГМК; б) основным мембранным эффектором СО являются потенциал-зависимые калиевые каналы ГМК.

Было показано, что ТЭА примерно с одинаковой эффективностью блокирует потенциал-зависимые и Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы средней и малой проводимости [3, 4]. 4-АП хорошо известен и широко применяется как селективный блокатор потенциал-зависимых калиевых каналов [7]. Каждый из использованных блокаторов уменьшал расслабляющее действие CORM-2 с близкой эффективностью. Несложно допустить, что если даже какой-то из компонентов Ca^{2+} -зависимой калиевой проводимости (каналы малой и средней проводимости) мембраны активируется монооксидом углерода, его вклад в общее увеличение проводимости мембраны сосудистых ГМК несравненно мал, в сравнении с потенциал-зависимым.

Список литературы

1. Баскаков М. Б. Газовая атака или Осторожно, газы! / М. Б. Баскаков, М. С. Юсубов // Бюллетень Сибирской медицины. – 2010. – Т. 9. – № 6. – С. 160–164.
2. Загоскин П. П. Новые данные о физиологической роли монооксида углерода / П. П. Загоскин // Нижегородский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 103–110.

3. Beech D. J. Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca^{2+} channels and K^+ channels and smooth muscle cells / D. J. Beech // Pharmacol. Ther. – 1997. Vol. 73. – P. 91–119.
4. Benham C. D. The mechanism of action of Ba^{2+} and TEA on single Ca^{2+} -activated K^+ -channels in arterial and intestinal smooth muscle cell membranes / C. D. Benham, T. B. Bolton, P. J. Lang, T. Takewaki // Pflugers Arch. – 1985. – Vol. 403. – P. 120–127.
5. Morita T. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP / T. Morita, M. A. Perrella // Cell Biology. – 1995. – № 92. – P. 1475–1479.
6. Ndisang J. F. Carbon monoxide and hypertension / J. F. Ndisang, H. E.N. Tabien, R. Wang // J. Hypertension. – 2004. – Vol. 22. – P. 1057–1074.
7. Vergara C. Calcium-activated potassium channels / C. Vergara, R. Latorre, N.V. Marrion et al. // Curr Opin Neurobiol. – 1998. – 8 (3). – P. 321–9.
8. Wang R. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms/ R. Wang, Z.Z. Wang, L. Wu // Br. J. Pharmacol. – 1997. – Vol. 121. – P. 927–934.
9. Wu L. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions and pharmacological applications / L. Wu, R.Wang // Pharmac. Rev. – 2005. – № 57. – P. 585.
10. Xi Q. Carbon monoxide activates KCa channels in newborn arteriole smooth muscle cells by increasing apparent Ca^{2+} sensitivity of alpha-subunits / Q. Xi, D. Tcheranova, H. Parfenova et al. // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2004. – 286 (2). – P. H610–8.

Исследование выполнено при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № 14.740.11.0932, № 16.512.11.2282, соглашение № 8487).

Рецензенты:

Носарев Алексей Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России, г. Томск.

Капилевич Леонид Владимирович, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины, ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск.