

ВПЛИВ БЛОКАДИ ПРОТЕЇНКІНАЗИ С НА ЗМІНИ Ca^{2+} -ЧУТЛИВОСТІ СКОРОТЛИВОГО АПАРАТУ СУДИННИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ПРИ ВАЗОСПАСТИЧНИХ СТАНАХ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ

О.О. Павлова

Інститут фармакології та токсикології АМН України, Київ

Ключові слова: вазоспастичні стани, судинні гладенькі м'язи, скоротливий апарат, Ca^{2+} -чутливість, протеїнкіназа С.

Добре відомо, що зміни концентрації іонізованого Са в міоплазмі ($[Ca^{2+}]_i$) гладеньком'язових клітин (ГМК) є ключовим механізмом у регуляції тону кровеносних судин. Він полягає в утворенні комплексу Са-кальмодулін та подальшої активації кінрази легких ланцюгів міозину (КЛЛМ), яка фосфорилує легкі ланцюги міозину (ЛЛМ) [16]. Однак, як встановлено, за досить тривалого ізометричного напруження судинних ГМК $[Ca^{2+}]_i$ та рівень фосфорилування ЛЛМ знижуються до вихідних значень, тоді як сила скорочення, що його розвивають ГМК, лишається стабільною [14]. Так, останнім часом з'явилося багато даних про те, що тонус судинних ГМК може змінюватися без попередніх зсувів $[Ca^{2+}]_i$ тільки за рахунок змін у чутливості (спорідненості) скоротливих та/або регуляторних білків до іонів Ca^{2+} [4, 17, 20, 21].

Є дані про те, що механізми підтримання тонічної фази скорочення ГМК, які не пов'язані зі збільшенням $[Ca^{2+}]_i$, можуть включати як ключовий Ca^{2+} -чутливий регуляторний білок протеїнкіназу С (ПКС) [12, 14, 19]. Встановлено: ПКС фосфорилує КЛЛМ за відсутності кальмодуліну, при цьому константа дисоціації КЛЛМ для кальмодуліну зростає в 10 разів [9]. Крім того, доведено, що ПКС може фосфорилувати як КЛЛМ, так і безпосередньо ЛЛМ, а також сАМФ-залежну протеїнкіназу (ПКА), яка може включати 2 молі фосфату в КЛЛМ [8, 9]. Дослідження ж дії складних форболових ефірів, що є активаторами протеїнкінази С (ПКС) [18, 22], засвідчили зростання тону судинних ГМК при незмінній $[Ca^{2+}]_i$ [10] та незначному рівні активації КЛЛМ [7].

Мета роботи — дослідити роль ПКС в змінах Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату судинних ГМК у розвитку вазоспастичних станів різної етіології — гіпоксичної легеневої гіпертензії, генетично детермінованої (спонтанної) гіпертензії та гіпертензії, зумовленої дією іонізуючої радіації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на ізольованих кільцевих сегментах правої та лівої легеневої артерії і грудної аорти шириною 1—1,5 мм та внутрішнім діаметром 2—3 мм. Ізольовані судинні сегменти виділено з судин 48 різностатевих дорослих щурів (лінія Wistar—Kyoto та спонтанно гіпертензивна лінія Okamoto) з масою тіла від 250 до 300 г, вбитих шляхом цервікальної дислокації з подальшим знекровленням.

Для створення фіксованої внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} використано методику хімічного скінювання [13]. Хімічне скінювання ізольованих судинних препаратів здійснювали за допомогою холістеролпреципітуючого детергенту β-есцин в концентрації 0,1—0,5 мг/мл протягом 15 та 20 хв для препаратів легеневої артерії та грудної аорти відповідно. Перфузію скінюваних судинних препаратів здійснювали при кімнатній температурі (21—22 °С) аерованим релаксуючим розчином такого складу (в ммоль): KCl 130; MgCl₂ 5; Tris-HCl 20; EGTA 4; Na₂ATФ 3,3; 1,4-дитіотриетол 0,5; рН-6,8. Різні внутрішньоклітинні концентрації Ca^{2+} створювали додаванням CaCl₂ × 6H₂O до активуючого розчину, компоненти якого були аналогічними компонентам релаксуючого розчину за винятком заміщення EGTA на Са-EGTA.

Для отримання розчинів зі зниженим вмістом O₂ використовували газову суміш, що містила 5% CO₂ та 95% N₂. Буферний розчин барбатували газовою сумішшю в закритій пластиковій судині об'ємом 300 мл протягом 15 хв. pO₂ буферного розчину при цьому знижувався з 135 — 145 до 30 — 35 мм рт. ст. Водневий показник гіпоксичних розчинів лишився сталим та коливався в межах 7,3 — 7,4. Отриманий гіпоксичний розчин подавали в робочу камеру перфузійною системою. Парціальний тиск кисню визначали інструментальним шляхом вимірювачами розчинного кисню ISO₂, World Precision

Instruments Inc. (США). Водневий показник встановлювали за допомогою рН-метра МР 220, Mettler Toledo (США).

Скоротливу активність ізольованих судинних препаратів реєстрували в ізометричному режимі датчиками напруження і записували на папері за допомогою багатоканального фізіографа Cole Parmer (США).

У дослідах використовували препарати компанії Sigma (США) β -есцин, стауроспорин, челеритрину хлорид.

Числові результати представлено у вигляді середнього арифметичного (М) та стандартної похибки середнього (m) для певної вибірки (n). Усі розрахунки проводились у відносних одиницях як відсоток від значення амплітуди тонічного напруження скінованого судинного сегмента відносно його скорочення при pCa_{max} . Вірогідність різниці середніх значень досліджуваних показників оцінювали за t-критерієм Ст'юдента. Зміни вважали статистично вірогідними при $P < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що в основі легеневої гіпоксичної гіпертензії лежить констрикторна реакція легених артерій на гіпоксію, тоді як стінка системних артерій реагує на зниження рівня оксигенації розслабленням [11]. У першій серії експериментів досліджено зміни Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату ГМК легених артерій та аорти під дією гіпоксії, а також встановлено роль ПКС у цих процесах.

За нормоксичних умов підвищення $[Ca^{2+}]$ у перфузійному розчині (pCa від 8,5 до 4,5) викликало дозозалежне скорочення скінованих препаратів легених артерій (рис. 1, А) та аорти (рис. 2, А). Дія гіпоксії ($pO_2 = 30\text{—}35$ мм рт. ст.) на скіновані препарати легених артерій щура спричинила значний зсув вліво кривої залежності pCa -скорочення на 1,13 одиниць pCa ($n = 7$, $P < 0,001$), порівняно зі значеннями, що їх реєстрували за нормоксичних умов ($n = 9$), що свідчить про зростання Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату (рис. 1, А).

Зниження рівню оксигенації перфузійного розчину в скінованих препаратах аорти призвело до зсуву кривої залежності pCa -скорочення вправо на 0,74 одиниць pCa ($n = 7$, $P < 0,001$), порівняно з нормоксичними реакціями ($n = 11$), демонструючи зменшення чутливості скоротливого апарату ГМК до Ca^{2+} (рис. 2, А).

Таку різницю у реакціях судинних ГМК можна пояснити функціональними відмінностями аорти та легених артерій щодо забезпечення газообміну. Зростання судинного тону легених артерій внаслідок підвищення Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату ГМК у відповідь на гіпоксію спрямоване на забезпечення належного рівня тиску крові у легених капілярах для ефективного газообміну.

Відомо, що під дією гіпоксії в ГМК судин можуть утворюватися реактивні кисневі радикали (O_2^- , H_2O_2 , OH^-), що здатні впливати на активність багатьох регуляторних білків [6]. Внаслідок постійного

перебування ГМК легених артерій в умовах колювання pO_2 реактивні види кисню (РВК) можуть виконувати сигнальну функцію [5], на відміну від ГМК системних судин, які не пристосовані такою мірою до функціонально зумовленого контакту з реактивними видами кисню. При цьому РВК можуть виступати ушкоджувальним чинником, призводячи до зниження реактивності ГМК [11].

Одним із важливих регуляторних ферментів, що є потенційною мішенню для РВК, може бути ПКС. З метою визначення ролі ПКС в збільшенні Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату ГМК легених артерій за умов зниження оксигенації ми застосували селективний блокатор ПКС челеритрин.

Попередня 10-хвилинна аплікація челеритрину в концентрації 10^{-6} М не впливала на чутливість скоротливого апарату ГМК скінованих препаратів легених артерій до Ca^{2+} за нормоксичних умов ($n = 6$, $P > 0,001$) (рис. 1, Б). Однак за гіпоксичних умов блокада ПКС челеритрином призводила до зсуву кривої залежності pCa -скорочення вправо на 1,13 одиниць pCa ($n = 6$, $P < 0,001$), практично до рівня, зареєстрованого при нормоксії (рис. 1, В). Як видно з рис. 2 Б та 2 В, на скінованих препаратах аорти блокада ПКС челеритрином (10^{-6} М) не позначалася на кривій залежності pCa -скорочення ні за нормоксичних ($n = 8$, $P > 0,05$) $pCa_{50} = 5,42 \pm 0,08$, ні за гіпоксичних умов ($n = 7$, $P > 0,05$).

У другій серії експериментів ми досліджували зміни Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату ГМК та роль ПКС в розвитку генетично детермінованої гіпертензії. В скінованих препаратах аорти спонтанно гіпертензивних щурів спостерігався зсув вліво на 0,89 одиниць pCa кривої залежності pCa -скорочення ($n = 12$, $P < 0,001$) порівняно з препаратами аорти нормотензивних тварин ($n = 11$) (рис. 3, А), що свідчить про зростання Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату ГМК.

Блокатори ПКС челеритрин (10^{-6} М) та стауроспорин (10^{-7} М) в скінованих препаратах аорти спонтанно гіпертензивних щурів спричинювали збільшення значення pCa_{50} відповідно на 0,72 ($n = 9$, $P < 0,001$) та на 0,81 одиниць pCa ($n = 6$, $P < 0,001$) порівняно з препаратами нормотензивних тварин ($n = 11$), тобто зсували криву залежності pCa -скорочення вправо (рис. 3, А, Б), що свідчить про нормалізацію під їхнім впливом Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату.

Мета цієї серії експериментів — дослідити участь ПКС у змінах Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату ГМК, які можуть лежати в основі розвитку гіпертензії, що виникає в наслідок дії іонізуючого опромінення [3]. У пізні терміни після γ -опромінення разово опромінені щури (30-й день після опромінення, доза 6 Гр, джерело опромінення ^{60}Co) демонстрували значне підвищення рівня системного кров'яного тиску. На скінованих препаратах аорти цих тварин спостерігалася зростання Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату ГМК, що виявлялося у зсуві кривої залежності pCa -скорочення вліво на 0,77 одиниць pCa ($n = 6$, $P < 0,001$) порівняно з препаратами аорти контрольних тва-

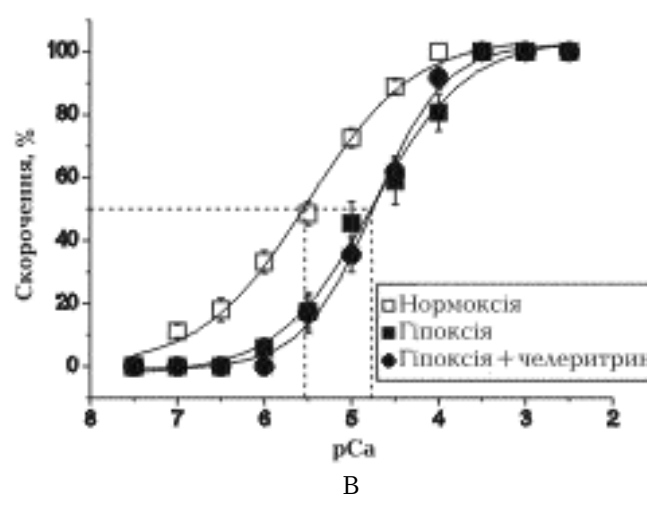
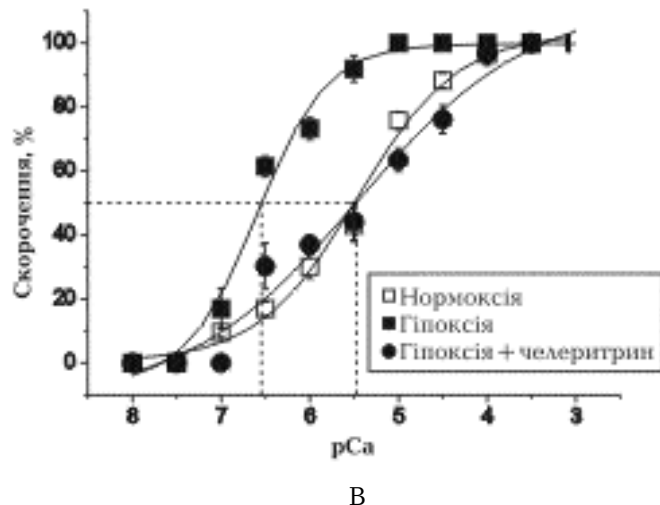
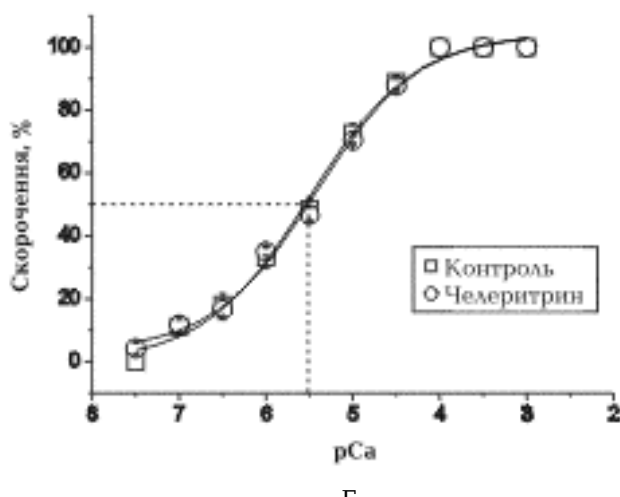
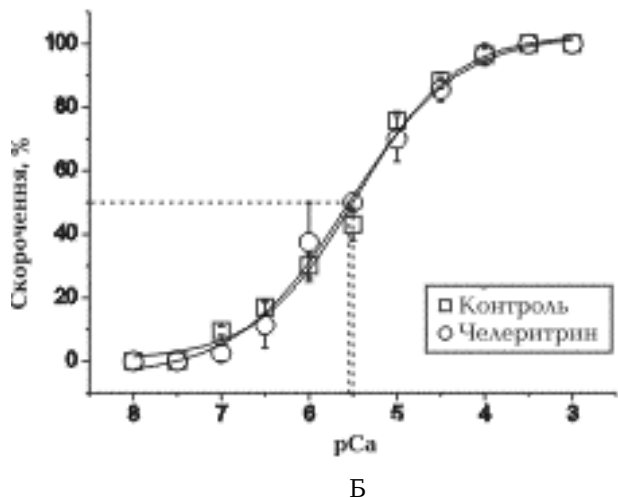
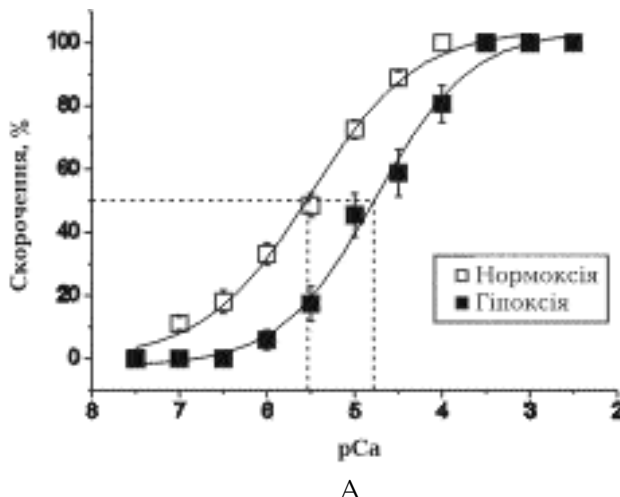
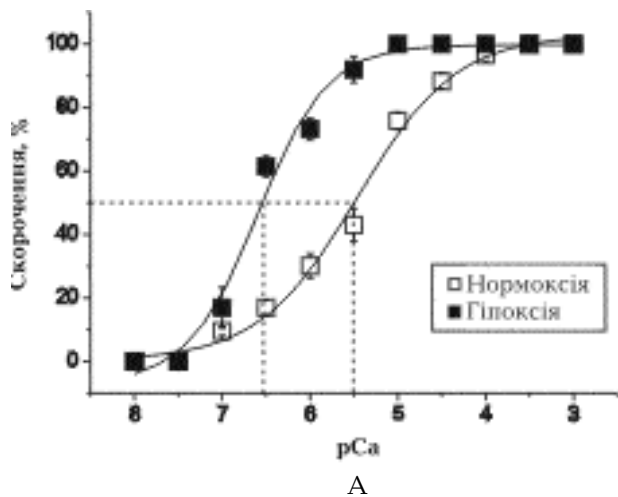
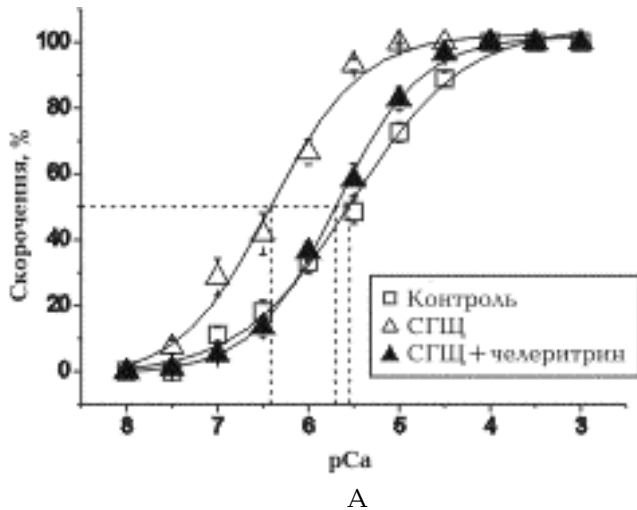
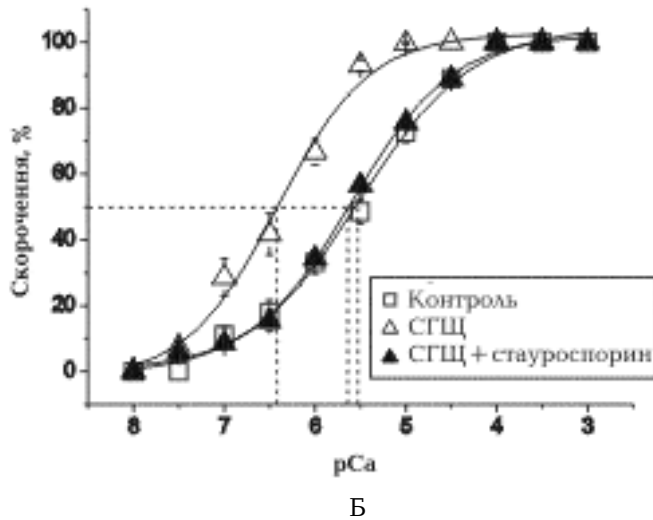


Рис. 1. Зміни залежності рСа-скорочення в скінованих препаратах легеневої артерії щура під дією гіпоксії ($pO_2=30-35$ мм рт. ст.) (А) та блокади протеїнкінази С челеритрином (10^{-6} М) за нормоксичних (Б) та гіпоксичних (В) умов

Рис. 2. Зміни залежності рСа-скорочення в скінованих препаратах аорти щура під дією гіпоксії ($pO_2=30-35$ мм рт. ст.) (А) та блокади протеїнкінази С челеритрином (10^{-6} М) за нормоксичних (Б) та гіпоксичних (В) умов



А



Б

Рис. 3. Вплив блокативних протеїнкінази С челеритрину (10^{-6} М) (А) та стауроспорину (10^{-7} М) (Б) на залежність рСа-скорочення в шкінованих препаратах аорти спонтанно гіпертензивних щурів (СГЩ)

рин ($n=11$) (рис. 4). Додавання челеритрину (10^{-6} М) до перфузійного розчину призводило до зсуву кривої залежності рСа-скорочення вправо на 0,31 одиниць рСа ($n=6$, $P<0,001$) (рис. 4).

Отримані результати свідчать про те, що підвищення чутливості скоротливого апарату до іонів Ca^{2+} є одним з ключових механізмів зростання тону судинних ГМК у патогенезі гіпертензивних станів різної етіології. При цьому, як також підтверджують результати наших досліджень із зас-

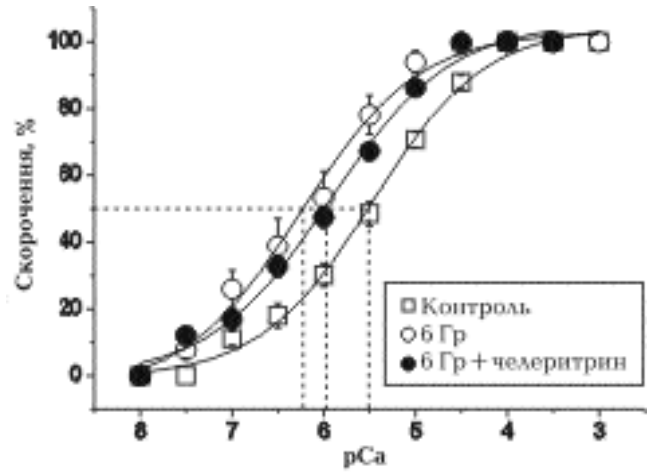


Рис. 4. Вплив блокативної протеїнкінази С челеритрину (10^{-6} М) на відношення рСа-скорочення в шкінованих препаратах аорти щурів, забитих на 30-й день після одноразового іонізуючого опромінення у дозі 6 Гр (джерело опромінення ^{60}Co)

тосуванням селективних блокативних протеїнкінази С, зростання Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату ГМК пов'язане з підвищенням активності ПКС. Тоді як зростання активності ПКС в ГМК легеневої артерії під дією гіпоксії, як уже зазначалося, може бути зумовлене взаємодією ПКС із РВК, що виникають внаслідок гіпоксії [5]. У разі спонтанної та радіаційної гіпертензії такі зміни певно викликають інші, досі не визначені механізми.

Відомо, що під дією радіаційного опромінення продуктами вільнорадикального перекисного окиснення, яке відбувається при цьому, поряд з іншими є РВК, мішенями яких можуть бути як ліпідні клітинні мембрани, так і ДНК та регуляторні ферменти [2]. Зростання активності ПКС при цьому з одного боку, можливо, є наслідком ушкоджувальної дії продуктів перекисного окиснення ліпідів [1], а з іншого, наслідком прямої взаємодії РВК з ПКС. В основі зростання активності ПКС в ГМК системних судин при спонтанній гіпертензії може лежати експресія матричного синтезу ПКС внаслідок ще не встановлених причин [15].

Таким чином, результати наших досліджень свідчать про те, що активність ПКС відіграє ключову роль у зростанні Ca^{2+} -чутливості скоротливого апарату судинних ГМК, при цьому ПКС-опосередковане зростання чутливості скоротливого апарату до Ca^{2+} є одним з загальних механізмів, що лежать в основі розвитку вазоспастичних станів різної етіології.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. Перекисное окисление и радиация. К.: Наукова думка, 1991.— 256 с.
2. Кудряшов Ю.Б. Лучевое поражение. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987.— С. 5—72.
3. Соловйов А.І., Тишкін С.М., Хромов О.С., Стефанов О.В. Скорочувальна функція судин при артеріальній гіпертензії різного генезу та її корекція за допомогою фосфатидихолінових ліпосом // Фізіол. журн.— 2002.— Т. 48, № 6.— С. 11—17.
4. Соловьёв А.И. Изменения Ca^{2+} -чувствительности сократительных белков гладкомышечных клеток воротной вены крыс при растяжении и гипоксии // Физиол. журн. СССР — 1990.— Т. 76.— С. 1048—1054.
5. Archer S.L., Peterson D., Nelson D.P. et al. Oxygen radicals and antioxidant enzymes alter pulmonary vascular reactivity in the rat lung // J. Appl. Physiol.— 1989.— 66.— P. 102—111.
6. Bunn H.F., Poyton R.O. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia // Physiol. Rev.— 1996.— Vol. 76, N 3.— P. 839—877.
7. Chatterjee M., Teajada M. Phorbol ester induced contraction in chemically-skinned vascular smooth muscle // Am. J. Physiol.— 1986.— Vol. 261.— P. 356—361.
8. Hattaway D.R., Adam L.P., Turner R.C. et al. Myosine light chain and heavy chain phosphorylation in smooth muscle: potential regulatory roles for calcium phospholipids and cyclic nucleotides // Biochem. Soc. Trans.— 1988.— Vol. 16, N 4.— P. 449—501.
9. Ikebe M., Inagaki M., Kanamaru K. et al. Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by Ca^{2+} -activated phospholipid-dependent protein kinase // J. Biol. Chem.— 1980.— Vol. 260, N 8.— P. 4547—4550.
10. Jiang M.J., Morgan J.P., Schoen F.J., Morgan K.G. A phorbol ester contracts human coronary artery without increasing Ca^{2+} // Circulation.— 1986.— Vol. 74, N 2.— P. 84.
11. Jin, N., Packer, C.S., and Rhoades, R.A. Reactive oxygen-mediated contraction in pulmonary arterial smooth muscle: cellular mechanisms // Can. J. Physiol. Pharmacol.— 1991.— Vol. 69.— P. 383—388.
12. Lee M.W., Severson D. Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerine second messengers and PKC action // Am. J. Physiol. (Cell Physiol.36).— 1994.— Vol. 267.— P. C659—C678.
13. Meisheri K.D., Ruegg J.C., Paul R.J. Studies on skinned fiber preparations. In Calcium and Contractility (edited by Grover, A.K. and Daniel, E. E.).— P. 191—224. The HUMANA Press, Clifton, New Jersey, U.S.A. (1985).
14. Morgan, J.P., Morgan, K.G. Stimulus-specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein // J. Physiol.— 1984.— Vol. 361.— P. 155—167.
15. Muracada K., Kohno M., Yasunari K. et al. Possible involvement of protein kinase C in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats // J. Hypertens.— 1988.— Vol. 6.— P. 157—159.
16. Murphy R.A., Aksoy M.O., Dillon P.F. et al. The role of myosin light chain phosphorylation in regulation of the cross-bridge cycle // Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.— 1983.— Vol. 42.— P. 51—56.
17. Nashimura J., Moreland S., Moreland R., vanBremen C. Regulation of the Ca^{2+} -force relationship in permeabilized arterial smooth muscle. Regulation of smooth muscle contraction.— New York-London: 1991.— P. 11—127.
18. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion // Nature — 1984.— Vol. 308.— P. 693—698.
19. Rasmussen H., Takuwa Y., Park S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction // FASEB J.— 1987.— Vol. 1.— P. 177—185.
20. Sato K., Jzaki H., Karaki H. Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator Fura-2 // J. Pharmacol. Exp. Ther.— 1988.— Vol. 246.— P. 294—300.
21. Soloviev A.I., Bernshtein S.A. The contractile apparatus in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats possess increased calcium sensitivity: the possible role of protein kinase C // J. Hypertens.— 1992.— Vol. 10. P. 131—136.
22. Yamanishi J., Takai Y., Kaibuchi K. et al. Synergistic functions of phorbol ester and calcium in serotonin release from human platelets // Biochem Biophys. Res. Commun.— 1983.— Vol. 112.— P. 778—786.

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ ПРОТЕИНКИНАЗЫ C НА ИЗМЕНЕНИЯ Ca^{2+} -ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА СОСУДИСТЫХ ГЛАДКИХ МЫШЦ ПРИ ВАЗОСПАСТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ РАЗНОГО ГЕНЕЗА

А.А. Павлова

Исследована роль протеинкиназы C (ПКС) в изменениях Ca^{2+} -чувствительности сократительного аппарата сосудистых гладкомышечных клеток (ГМК) в развитии вазоспастических состояний различной этиологии — гипоксической легочной гипертензии, генетически детерминированной (спонтанной) гипертензии и гипертензии, вызванной действием ионизирующей радиации. При всех видах гипертензии был зафиксирован сдвиг кривой рСа-напряжения вправо, что свидетельствует о повышении Ca^{2+} -чувствительности сократительного аппарата ГМК. В химически скинированных (β -эсцин) препаратах легочных артерий крысы увеличение Ca^{2+} -чувствительности сократительного аппарата ГМК при гипоксии полностью устранялось действием блокатора ПКС, челеритрина. Блокаторы ПКС, челеритрин и стауроспорин, также останавливали увеличение Ca^{2+} -чувствительности сократительного аппарата ГМК в скинированных препаратах аорты спонтанно гипертензивных крыс. В аорте крыс с артериальной гипертензией, вызванной ионизирующим облучением, увеличение Ca^{2+} -чувствительности миофибрилл частично уменьшалось под действием челеритрина. Результаты исследований свидетельствуют о том, что опосредованное увеличение активности ПКС, повышение Ca^{2+} -чувствительности сократительного аппарата сосудистых ГМК является одним из общих механизмов, лежащих в основе развития вазоспастических состояний различной этиологии.

THE INFLUENCE OF PROTEIN KINASE C BLOCKADE
ON Ca^{2+} -SENSITIVE CONTRACTILE APPARATUS OF VASCULAR SMOOTH MUSCLES
IN VASOSPASTIC CONDITIONS OF DIFFERENT GENESIS

A.A. Pavlova

The aim of the present study was to investigate the role of protein kinase C (PKC) in the changes of myofilament Ca^{2+} -sensitivity such as in vascular smooth muscle cells (SMC) at different hypertensive conditions: hypoxic pulmonary hypertension, genetically determined hypertension, and hypertension caused by ionizing radiation. At all kinds of hypertension pCa-tension curve shift to the right was obtained that suggests that myofilaments Ca^{2+} -sensitivity is increase. In chemically (β -escin) skinned rat pulmonary artery hypoxia-induced increasing in myofilaments Ca^{2+} -sensitivity was completely abolished by the action of PKC inhibitor chelerythrine. The similar results were demonstrated on skinned aorta obtained from spontaneously hypertensive rat where increasing in myofilaments Ca^{2+} -sensitivity was also abolished by PKC inhibitors, chelerythrine and staurosporine. The chelerythrine partially inhibits myofilaments Ca^{2+} -sensitivity increased in rat aorta following gamma-radiation. The data suggest the key role of PKC activity in modulation of myofilaments Ca^{2+} -sensitivity in SMC. We conclude that PKC-mediated increase in myofilaments Ca^{2+} -sensitivity is one of the main mechanism which contribute to the vasospasm development of different genesis.