

Роль цитоскелета в формировании сокращения гладких мышц воздухоносных путей в присутствии наноразмерного магнетита

Зайцева Т.Н.¹, Носарев А.В.², Дьякова Е.Ю.³, Капилевич Л.В.², Агеев Б.Г.¹, Огородова Л.М.², Магаева А.А.⁴, Терехова О.Г.⁴, Итин В.И.⁴

Role of cytoskeleton in formation of airway muscle activity in the presence of nanosized magnetite

Zaitseva T.N., Nosarev A.V., Diyakova Ye.Yu., Kapilevich L.V., Ageyev B.G., Ogorodova L.N., Magayeva A.A., Terekhova O.G., Iteen V.I.

¹ Институт оптики атмосферы ТНЦ СО РАН, г. Томск

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

³ Томский государственный университет, г. Томск

⁴ Отдел структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН, г. Томск

© Зайцева Т.Н., Носарев А.В., Дьякова Е.Ю. и др.

Методом механографии исследовали влияние нанопорошка оксида железа на сократительные реакции воздухоносных путей морских свинок. При действии наноматериала на изолированные сегменты повышаются амплитуды холинэргических, гистаминэргических сократительных реакций. Предобработка дезинтеграторами цитоскелета колхицином и нокодазолом ведет к увеличению механического напряжения сегментов при действии карбахолина и гистамина.

Ключевые слова: воздухоносные пути, гладкие мышцы, цитоскелет, наночастицы.

The mechanographic method was used to study the influence of iron oxide nano-powder on airway muscle activity in guinea pigs. Under the action of nanomaterial on isolated segments, amplitudes of cholinergic and histaminergic contractile reactions increased. The pre-processing of cytoskeleton by colchicines and nocodazole disintegrators led to an increase in the mechanical stress of segments under the action of carbacholine and histamine.

Key words:

УДК 616.2-018.61:577.353:549.731.13-022.532

Введение

На современном этапе достигнут определенный прогресс в изучении механизмов регуляции сократительных свойств гладкомышечных клеток (ГМК), однако еще существуют вопросы о механизмах локальной и дистантной регуляции сократительной активности. Все большее внимание исследователей привлекает цитоскелет ГМК. Он является структурой, к которой конвергируют различные сигнальные пути [3]. В то же время механизмы сигнальных каскадов, запускаемых действием биологически активных агентов и опосредованных участием цитоскелета, остаются во многом невыясненными. Вместе с тем отсутствуют систематические исследования влияния цитоскелета на сократительную функцию гладких мышц (ГМ). В этой связи не могут не привлечь внимания

данные об участии цитоскелета в реализации клеточного ответа на воздействие наноразмерных частиц.

Цель работы — изучить особенности сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей морских свинок при воздействии наноразмерных частиц магнетита, исследовать роль белков цитоскелета в регуляции сократительной активности гладких мышц.

Материал и методы

Объектом исследования служили изолированные кольцевые гладкомышечные сегменты воздухоносных путей морских свинок — трахеи и главных бронхов. Эпителий удаляли механически, изолированные сегменты воздухоносных путей обрабатывали раствором нанопорошка магнетита (0,3 мг/мл). Сократительные реакции изучали методом механографии. Величину механи-

ческого напряжения на тестирующие растворы оценивали в процентном отношении от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса.

Анализ данных проводили при помощи программы Statistica 6.0 for Windows (США). Фактические данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, m — ошибка среднего.

Результаты исследования

В первой серии экспериментов изучали сократительные реакции ГМ воздухоносных путей (ВП) при воздействии наночастиц магнетита *in vitro*. При действии карбахолина (от 1 нмоль до 10 мкмоль) сегменты отвечали дозозависимым сокращением. Сегменты контрольной группы развивали ответ, достигающий $(87,7 \pm 4,3)\%$, $EC_{50} = (2,9 \pm 0,7)$ мкмоль. Амплитуда сокращения сегментов, обработанных нанопорошком, превышала контрольную и составила $(118,2 \pm 6,1)\%$, что достоверно выше контрольных значений ($p < 0,05$), величина EC_{50} была ниже контрольной — $(1,3 \pm 0,3)$ мкмоль. При действии на гладкие мышцы животных контрольной группы гистамином (от 1 нмоль до 10 мкмоль) наблюдали сократительный ответ (амплитуда $(41,8 \pm 5,4)\%$, $EC_{50} = (7,7 \pm 2,5)$ мкмоль). Механическое напряжение сегментов воздухоносных путей, обработанных взвесью нанопорошка, было достоверно выше контрольного ($p < 0,05$) и составило $(61,2 \pm 9,9)\%$. Отмечено также снижение величины EC_{50} до $(7,2 \pm 0,9)$ мкмоль.

Во второй серии экспериментов исследовали влияние наноматериала на сократительную активность сегментов, вызванную гиперкалиевой (40 ммоль KCl) деполяризацией мембраны. Добавление наночастиц магнетита в рабочий раствор способствовало изменению амплитуды гиперкалиевого сокращения. При этом одна часть сегментов отвечала сокращением, по величине превышающим контрольное на $(26,6 \pm 9,2)\%$ ($p < 0,05$), другая — уменьшением до $(78,1 \pm 5,2)\%$ ($p < 0,05$). Полученные результаты позволяют предполагать возможность наночастиц модулировать величину сократительной реакции, вызванной гиперкалиевым раствором Кребса.

Поскольку сократительные реакции не обходятся без участия цитоскелета, вероятно, и описанные изменения могут быть обусловлены нарушениями структуры либо функционирования его элементов.

При изучении изменения амплитуды гиперкалиевой контрактуры в случае дестабилизации элементов

цитоскелета колхицином (10 мкмоль, 90 мин) наблюдалось изменение величины сокращений. Первая группа сегментов отвечала сокращением, на $(62,46 \pm 11,25)\%$ ($p < 0,05$) превышающим сокращение до предобработки колхицином. Во второй группе воздействие колхицином приводило к снижению амплитуды сокращения до $(54,15 \pm 3,57)\%$ ($p < 0,05$). Подобное действие колхицина свидетельствует о вовлечении цитоскелета в генерацию сокращения ГМ, индуцированного деполяризацией мембраны гладкомышечной клетки. Одинаковая направленность изменения механического напряжения при действии нанопорошков и дестабилизатора цитоскелета колхицина дает основание думать о способности наноразмерных материалов вызывать разрушение элементов цитоскелета и тем самым опосредовать изменения сокращения гладких мышц.

Возможно, колхицин в различной степени дестабилизирует микрофиламенты и микротубулы. Для оценки вклада отдельных элементов цитоскелета в сократительные реакции ГМ использовали нокодазол и цитохалазин D. После обработки гладких мышц нокодазолом (10 мкмоль, 60 мин) амплитуда гиперкалиевого сокращения увеличивалась до $(110,8 \pm 8,5)\%$ по сравнению с контрольным значением. Эти изменения не являлись достоверно значимыми. Предобработка цитохалазином D (1 мкмоль, 30 мин) приводила к снижению амплитуды сокращения, вызванного гиперкалиевым раствором. В этих условиях величина механического напряжения составила $(58,9 \pm 10,2)\%$, что являлось достоверно значимым отличием от контрольных значений ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о незначительной роли микротубул и вовлечении микрофиламентов в генерацию сокращений при деполяризации мембраны клеток.

Для выявления роли цитоскелета в обеспечении сократительных реакций при действии биологически активных веществ изучали механическое напряжение гладкомышечных сегментов ВП, вызванное действием карбахолина и гистамина, после их предварительной обработки колхицином. При добавлении карбахолина в условиях предобработки колхицином наблюдали дозозависимое сокращение сегментов. Максимальная амплитуда сокращения увеличилась до $(109,2 \pm 4,9)\%$ ($p < 0,05$) по сравнению с амплитудой сокращения сегментов, не обработанных колхицином. После предварительной обработки сегментов нокодазолом амплитуда сократительного ответа увеличивается до

(205,5 ± 16,9)% ($p < 0,05$), после обработки цитохалазином D снижается до (63,3 ± 12,4)%.

При действии гистамином на фоне обработки колхицином максимальная амплитуда сокращения увеличилась до (109,9 ± 12,2)% ($p < 0,05$) по сравнению с амплитудой сокращения сегментов, не обработанных колхицином. После предварительной обработки сегментов нокодазолом амплитуда сократительного ответа увеличивается до (92,3 ± 16,3)% ($p < 0,05$), после обработки цитохалазином D снижается до (39,2 ± 19,1)%. Дезинтеграция элементов цитоскелета колхицином приводит к увеличению амплитуды сокращения при действии карбахолина и гистамина, что может свидетельствовать об участии данной структуры в развитии сократительного ответа. При этом увеличение механического напряжения при действии указанных действующих веществ наблюдали и при обработке гладкомышечных сегментов наночастицами, что позволяет предполагать о способности наноматериалов вызывать нарушение структуры элементов цитоскелета.

Снижение величины механического напряжения, вызванного действием карбахолина и гистамина, на фоне обработки цитохалазином свидетельствует о вовлечении микрофиламентов в процесс сокращения. Потенцирование механического напряжения, вызванного действием карбахолина и гистамина, на фоне обработки нокодазолом позволяет предполагать о роли дезинтеграции микротрубочек в развитии повышенной чувствительности к данным биологически активным веществам. Возможно, увеличение амплитуды сокращения гладких мышц при действии наноразмерных частиц опосредовано дезинтеграцией микротрубочек.

Заключение

Введение наночастиц *in vitro* приводит к потенцированию сократительных реакций на гистамин и карбахолин. Изменение сократительных реакций на воз-

действие биологически активных веществ, вероятно, связано с тем, что данный тип сократительной активности реализуется при активации сигнальных путей. Цитоскелет действует как пространственный регулятор внутриклеточной сигнализации, следовательно, его реорганизация может приводить к изменению сократительной активности гладкомышечных клеток ВП. Изменение сокращений, вызванных гиперкалиевой деполяризацией, действием карбахолина и гистамина, на фоне обработки колхицином, цитохалазином и нокодазолом становится доказательством того, что цитоскелет является необходимым звеном в обеспечении сократительных реакций гладких мышц при действии биологически активных веществ и деполяризации мембраны ГМК. Подобные изменения наблюдали и при действии нанопорошков, что дает возможность предполагать о способности наночастиц модулировать целостность микротрубочек и микрофиламентов и тем самым опосредовать изменения сократительных реакций гладких мышц.

Литература

1. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Зайцева Т.Н. и др. Экспериментальные модели в изучении механизмов развития бронхоспастических состояний // Пульмонология. 2005. № 3. С. 112—119.
2. Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. М.: «Мир» 1987. 120 с
3. Anfinogenova Y.J., Kilin A.A., Kovalev I.V. et al. Vascular smooth muscle contraction in hyperosmotic medium: role of Ca²⁺, anion channels and cell volume-sensitive Na⁺, K⁺, Cl⁻ cotransport // J. Hypertens. 2004. P. 101.
4. Klee C.B., Crouch T.H., Richman P.G. Calmodulin // Am. J. Bichem. 1980. V. 49. P. 489—515.
5. Koltsova S.V., Gusakova S.V., Anfinogenova Y.J. et al. Vascular smooth muscle contraction evoked by cell volume modulation: role of the cytoskeleton network // Cell. Physiol. Biochem. 2008. № 21. P. 29—36.

Поступила в редакцию 03.09.2010 г.

Утверждена к печати 28.09.2010 г.

Сведения об авторах

Т.Н. Зайцева — аспирант, Институт оптики атмосферы ТНЦ СО РАН (г. Томск).

А.В. Носарев — д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Е.Ю. Дьякова — канд. мед. наук, доцент ТГУ (г. Томск).

Л.В. Капилевич — д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Б.Г. Агеев — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник Института оптики атмосферы ТНЦ СО РАН (г. Томск).

Зайцева Т.Н., Носарев А.В., Дьякова Е.Ю. и др. Роль цитоскелета в формировании сокращения ГМ воздухоносных путей...

Л.М. Огородова — д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАМН, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ (г. Томск).

А.А. Магаева — канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник Отдела структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН (г. Томск).

О.Г. Терехова — канд. тех. наук, ст. науч. сотрудник, уч. секретарь Отдела структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН (г. Томск).

В.И. Итин — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник Отдела структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН (г. Томск).

Для корреспонденции

Зайцева Татьяна Николаевна, тел. 8 (3822) 42-09-54; e-mail: ZaytcevaTN@yandex.ru