

*На правах рукописи*

**Гусакова Светлана Валерьевна**

**АФК-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ  
ВТОРИЧНЫМИ ПОСРЕДНИКАМИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ И  
СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛАДКИХ МЫШЦ**

03.03.01 – физиология

03.01.02 – биофизика

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Томск – 2011

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

**Научные консультанты:**

доктор медицинских наук,  
профессор

Баскаков Михаил Борисович

доктор биологических наук,  
профессор

Орлов Сергей Николаевич

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор

Байков Александр Николаевич

доктор медицинских наук,  
профессор, залуженный деятель науки РФ,  
член-корреспондент РАМН

Зефиров Андрей Львович

доктор медицинских наук,  
профессор

Россиев Дмитрий Анатольевич

**Ведущая организация:** НИИ физиологии СО РАМН (г. Новосибирск)

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (634050 г. Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Петрова И.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Универсальным механизмом адаптации и повреждения клеточных систем является окислительный стресс. Одним из важнейших элементов редокс-системы клеток являются активные формы кислорода (АФК), выполняющие функции вторичных посредников и реализующие лиганд-рецепторные взаимодействия. В число таких лигандов входят гормоны, медиаторы и цитокины. Многочисленные исследования продемонстрировали способность сосудистых клеток, включая эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки (ГМК) и фибробласты, генерировать АФК [Touyz R.M. et al., 2002; Clempus R.E., Griending K.K., 2006]. К АФК относят супероксидный анион ( $O_2^-$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ) и другие пероксиды, а также их радикальные формы, гидроксильный радикал, озон, оксид азота и ряд других соединений [Владимиров Ю.А., 2000; Донцов В.И., 2006; Santos C.M. et al., 2010].

Показано, что АФК активируют протеинкиназу С (ПК-С), фосфолипазу  $A_2$ , NO-синтазу, циклооксигеназу и гуанилатциклазу [Rodriguez-Martinez M.A. et al., 1998; Thakali K. Et al., 2005], MAPK- [Lee K. et al., 2002; Blanc A. et al., 2004] и Rho-киназы [Sward K. et al., 2003; Jin L. Et al., 2004; Thakali K. Et al., 2005], которые, кроме того, что находятся под контролем внутриклеточных сигнальных систем или являются их компонентами, сами оказывают регулирующее влияние на уровень АФК в клетке. Получены свидетельства того, что многие эффекты АФК опосредованы изменением ионной проводимости мембраны [Barlow R.S. et al., 2000; Wolin M. et al., 2002; Thakali K. et al., 2006]. Одним из ключевых звеньев в механизмах действия  $H_2O_2$  является модификация калиевой проводимости мембраны ГМК [Barlow R.S., White R.E., 1998; Gao Y.J. et al., 2003; Thengchaisri N., Kuo L., 2003; Rogers P.A. et al., 2006].

Наряду с изучением механизмов влияния АФК на функциональные свойства сосудов, актуальным представляется исследование роли эндогенных протекторов окислительного стресса в клетках. Одним из наиболее обсуждаемых в последнее время является сероводород ( $H_2S$ ), который в небольших количествах синтезируется в клетках, и получил признание как газотрансмиттер с высоким терапевтическим потенциалом при сердечно-сосудистых заболеваниях [Calvert J.W. et al., 2010; Li L. et al., 2011]. Имеются сведения о том, что кардиопротекторное действие  $H_2S$  опосредовано активацией АТФ-чувствительных калиевых каналов [Kimura Y. et al., 2006]. Другим возможным механизмом защиты кардиомиоцитов при окислительном стрессе является связывание сероводородом АФК [Lefter D.J. et al., 2007].

Несмотря на серьезные успехи в изучении механизмов действия АФК, до настоящего времени нет достаточной ясности в молекулярных основах влияния дисбаланса редокс-зависимых сигнальных систем на сократительную функцию клеток, установлении редокс-чувствительности отдельных каскадов внутри этих систем трансдукции сигналов и редкс-зависимости их взаимодействия.

Поддержание формы и обеспечение мышечной и неммышечных форм биологической подвижности, а также электрогенез ГМК во многом определяются цитоскелетом, основными компонентами которого являются актиновые филаменты, микротубулы и промежуточные филаменты [Papakonstanti E.A. et al.,

2000; Anfinogenova Y.J. et al., 2004; Burgstaller G., Gimona M., 2004; Zhang D. et al., 2001, 2006; Svitkina T., 2009]. Транспортная функция цитоскелета является одним из факторов, обеспечивающим реализацию сигнального действия вторичных посредников [Chen N.X. et al., 2010]. Изменения состояния элементов цитоскелета влияют на ионные каналы и мембранные транспортеры. В кардиомиоцитах актин-зависимая модуляция показана для  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника [Li Z. et al., 1993],  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФ-азы, риаудиновых рецепторов [Shibayama T. et al., 1993] и потенциал-зависимых натриевых каналов [Srinivasan Y. et al., 1988]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что микротубулы опосредуют транслокацию протеинкиназ, активация которых в большинстве случаев обеспечивает передачу сигналов в клетке [Chitale K., Webb R.C., 2001; Zhang D. et al., 2001].

Показано, что сеть цитоскелета является первичной мишенью окислительного стресса [Zhao Y., Davis H.W., 1998; Dalle-Donne I. et al., 2001]. Диссоциация белков цитоскелета является начальным этапом альтерации клеток, вызванной окислительным стрессом. Окислительному повреждению подвергаются отдельные белки цитоскелета [Aksenov M.Y. et al., 2001], однако причины неодинаковой чувствительности его различных элементов к действию АФК неясны [Dalle-Donne I. et al., 2001]. Обнаружено, что  $\text{H}_2\text{O}_2$  вызывает реорганизацию актина в эндотелиальных клетках [Huot J. et al., 1998]. В экспериментах на культуре сосудистых ГМК продемонстрировано, что необходимым условием для активации ангиотензином II NAD(P)H-оксидазы и продукции  $\text{O}_2^-$  является интактная сеть актиновых филаментов цитоскелета [Touyz R.M. et al., 2005]. Показана существенная роль микротубул в стимуляции ангиотензином II продукции  $\text{H}_2\text{O}_2$  [Zuo L. et al., 2004].

Таким образом, несмотря на значительный прогресс в изучении механизмов регуляции вторичными посредниками сократительной функции гладких мышц, ряд вопросов не нашел удовлетворительного решения. И это, прежде всего, касается взаимоотношений «классических» вторичных посредников, АФК и цитоскелета. Последний, по мнению ряда авторов [Orlov S.N. et al., 1996; Anfinogenova Y.J. et al., 2004; Zhang D. et al., 2001, 2006], может являться именно тем звеном внутриклеточной коммуникации, к которому конвергируют различные сигнальные системы и отдельные каскады в пределах одной системы трансдукции сигнала в ГМК. Выяснение механизмов, используемых клетками с участием АФК и опосредованных цитоскелетом, является актуальной задачей современной биологии и медицины, решение которой позволит приблизиться к пониманию условий и способов кооперативных взаимодействий внутриклеточных сигнальных путей в обеспечении регуляции клеточного гомеостаза и функциональных свойств клеток, тканей и органов. Все это может стать основой для разработки молекулярных подходов к управлению функциональными свойствами гладких мышц внутренних органов и кровеносных сосудов при физиологических и патологических состояниях, сопряженных с нарушением внутриклеточной коммуникации, и позволит модернизировать современные медицинские технологии патогенетической терапии большого числа социально-значимых заболеваний.

**Цель работы:** изучить роль активных форм кислорода и элементов цитоскелета в механизмах регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток.

**Задачи исследования:**

1. Исследовать участие активных форм кислорода (перекиси водорода и оксида азота) и элементов цитоскелета в сократительных реакциях сосудистых гладкомышечных сегментов при стимуляции  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов и гиперкалиевой деполяризации мембраны.
2. Изучить роль активных форм кислорода в сократительных реакциях гладких мышц при изменении объема клеток.
3. Выявить вклад  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта в цитоскелет-зависимую регуляцию электрических и сократительных свойств гладкомышечных клеток.
4. Исследовать влияние перекиси водорода и оксида азота на цАМФ-зависимые механизмы регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток.
5. Изучить роль цитоскелета в регуляции циклическими АМФ и ГМФ электрических и сократительных ответов гладкомышечных клеток.
6. Исследовать механизмы влияния сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток.

**Научная новизна**

Впервые установлено разнонаправленное влияние перекиси водорода на сокращения сосудистых гладкомышечных клеток при деполяризации мембраны гиперкалиевым раствором и действии фенилэфрина: снижение величины контрактуры, вызванной фенилэфрином и увеличение ее при действии гиперкалиевого раствора. Генерация потенциалов действия и сокращений гладкомышечных клеток мочеточника при действии деполяризующего тока дозозависимо угнетается перекисью водорода.

Впервые установлено стимулирующее влияние оксида азота на сократительную активность гладких мышц мочеточника. Активация сокращений гладкомышечных клеток мочеточника при действии оксида азота обусловлена увеличением длительности вызванных деполяризующим током потенциалов действия вследствие стимуляции  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспортера.

Впервые исследована роль активных форм кислорода в сократительных реакциях сосудистых гладких мышц, вызванных изменением объема клеток. Выявлено, что перекись водорода не влияет на сокращения, вызванные гиперосмотической и изоосмотической стрижкой, однако увеличивает сократительные реакции, вызванные гипоосмотическим набуханием гладкомышечных клеток. Оксид азота, в отличие от перекиси водорода, вызывает снижение величины механического напряжения сосудистых гладких мышц, индуцированного гиперосмотической и изоосмотической стрижкой, и не влияет на сокращения, вызванные гипоосмотическим набуханием клеток.

Впервые исследована роль цитоскелета в сократительных реакциях сосудистых гладких мышц, индуцированных изменениями объема клеток. Установлено, что сокращения, вызванные гиперосмотическим сжатием клеток,

зависят от состояния микротубул и микрофиламентов. В отличие от этого сократительные ответы, индуцированные изоосмотической стрижкой клеток, подавляются при разрушении только микрофиламентов. Сокращения, вызванные гипоосмотическим набуханием клеток, не зависят от состояния элементов цитоскелета.

Впервые показано, что микрофиламенты цитоскелета участвуют в сокращениях сосудистых гладких мышц, индуцированных деполяризацией мембраны клеток гиперкалиевым раствором, а также в генерации потенциалов действия и сокращений гладкомышечных клеток мочеточника при действии деполяризующего тока. Показано, что микрофиламенты цитоскелета вовлечены в механизмы действия перекиси водорода на сокращения сосудистых гладких мышц, вызванные фенилэфрином, но не гиперкалиевым раствором. Установлено, что в расслабление оксидом азота гладких мышц сосудов, предсокращенных гиперкалиевым раствором вовлечены микротубулы. Впервые показано, что релаксирующее действие оксида азота в сосудистых гладких мышцах при активации  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов фенилэфрином зависит от состояния микрофиламентов и микротубул.

Впервые установлено, что вклад отдельных элементов цитоскелета в регуляцию циклическим АМФ электрогенеза и сокращений неодинаков в различных типах гладких мышц. В реализацию угнетающего действия циклического АМФ на сократительную активность сосудистых гладкомышечных клеток вовлечены микрофиламенты. В гладкомышечных клетках мочеточника подавление цАМФ потенциалов действия и сокращений опосредовано преимущественно микротубулами.

Впервые установлено разнонаправленное влияние сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц. Показано констрикторное действие низких концентраций сероводорода на гладкомышечные клетки, деполяризованные гиперкалиевым раствором и расслабляющее влияние высоких.

### ***Теоретическая и практическая значимость работы***

Результаты исследования являются вкладом в развитие фундаментальных знаний о роли активных форм кислорода и цитоскелета в механизмах регуляции вторичными посредниками сократительной функции гладких мышц. Полученные данные дополняют представления о механизмах сосудистых реакций при гипертонической болезни и патологических состояниях, сопровождающихся нарушениями редокс-состояния организма. Установленные в исследовании взаимодействия активных форм кислорода и элементов цитоскелета создают перспективы для разработки молекулярных технологий управления функциями клеток в норме и при патологии, базирующихся на модификации критических молекулярных мишеней внутриклеточной коммуникации, которые могут быть использованы для модернизации лечебных вмешательств, профилактики, прогнозирования течения и исходов социально-значимых заболеваний. Основные положения работы используются в курсах лекций и практических занятиях, проводимых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии Сибирского

государственного медицинского университета, на кафедре физиологии человека и животных Томского государственного университета. Методические приемы и полученные данные используются в научных исследованиях, выполняемых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета и в отделе сердечно-сосудистой хирургии НИИ кардиологии СО РАМН. Области применения полученных данных являются физиология, биофизика, фармакология.

### ***Положения, выносимые на защиту***

1. Перекись водорода угнетает фенилэфрин-индуцированные сокращения гладких мышц, но потенцирует сокращения сосудистых сегментов, вызванные гиперкалиевым раствором. Эффекты перекиси водорода не зависят от эндотелия и сохраняются в условиях снижения калиевой проводимости мембраны гладкомышечных клеток тетраэтиламмонием. Перекись водорода дозозависимо подавляет электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника и это действие обусловлено повышением калиевой проводимости мембраны.
2. Микрофиламенты цитоскелета в большей степени, чем микротубулы, вовлекаются в регуляцию сокращений, вызванных гиперкалиевой деполяризацией сосудистых гладких мышц, а также в генерацию потенциалов действия и сокращений гладкомышечных клеток мочеточника.
3. Релаксирующее действие оксида азота в гладкой мышце аорты при стимуляции фенилэфрином  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов зависит от состояния микрофиламентов и микротубул, тогда как в деполяризованной гиперкалиевым раствором гладкой мышце расслабление опосредовано преимущественно тубулиновыми элементами цитоскелета. В механизмы действия перекиси водорода на сокращения сосудистых гладких мышц, вызванные фенилэфрином вовлечены микрофиламенты.
4. Сокращения сосудистых сегментов, вызванные гиперосмотическим раствором, зависят от состояния микрофиламентов и микротубул. В генерации сокращений при изоосмотической стрижки клеток основную роль играют микрофиламенты цитоскелета.
5. Опосредованное циклическим АМФ угнетение сократительной активности сосудистых сегментов при действии гиперкалиевого раствора, зависит от состояния микрофиламентов цитоскелета, а потенциалов действия и сокращений гладкомышечных клеток мочеточника – от состояния микротубул.
6. Направленность и величина эффектов сероводорода в сосудистой гладкой мышце зависит от активности цАМФ-опосредованной внутриклеточной сигнальной системы.

***Апробация и реализация работы.*** Основные результаты диссертации обсуждены на всероссийских и международных конгрессах: ● Международный конгресс молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», 2005, 2006, 2007 (Томск). ● XV European Meeting on Hypertension, 2005 (Milan, Italy). ● Пятый Сибирский физиологический съезд, 2005 (Томск). ● 10-ая Пущинская школа – конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», 2006

(Москва). • XVI European Meeting on Hypertension, 2006 (Madrid, Spain). • IX Конгресс молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», 2008 (Томск). • VI Сибирский физиологический съезд, 2008 (Барнаул). • IV Международная научная конференция «Психофизиологические и висцеральные функции в норме и патологии», посвященная 90-летию со дня рождения П.Г. Богача, 2008 (Украина, Киев). • XVIII European Meeting on Hypertension, 2008, (Berlin, Germany). • «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии», 2009 (Судак, Украина) • X международный конгресс «Здоровье и образование в XXI веке» «Инновационные технологии в биологии и медицине», 2009 (Москва). • XX European Meeting on Hypertension, 2010 (Oslo, Norway). • XXI Съезд физиологического общества им. И.П.Павлова, 2010 (Калуга). • 6th International Congress of Pathophysiology and the 14th International SHR Symposium, 2010 (Montréal, Canada). • 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2010 (Vancouver, Canada). • V Международная научная конференция «Психофизиол. и висцер. функции в норме и патологии» посвященная 100-летию со дня рождения проф. Харченко П.Д. и 65-летию НИИ физиологии им. академика Петра Богача, 2010 (Киев, Украина).

Исследование выполнено при поддержке Федеральной целевой программы («Разработка технологии селективного управления внутриклеточной газовой сигнализацией» ГК № 02.740.11.5031, «Разработка технологических основ управления функциональным состоянием клеток на основе идентификации ключевых звеньев трансляции сигналов с участием активных форм кислорода и элементов цитоскелета» ГК № П445, «Селективная модуляция внутриклеточной коммуникации как основа молекулярных технологий управления функциями клеток» ГК № 14.740.11.0932) и Российского фонда фундаментальных исследований («Исследование механизмов регуляции цитоскелетом сократительной активности гладких мышц» ГК № 07-04-01184, «Исследование мембранных и молекулярных механизмов регуляции сократительной активности гладких мышц» ГК № 08-04099037, «Разработка технологии селективного управления внутриклеточными редокс-зависимыми сигнальными системами» ГК № 09-04-99026).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 28 научных работ, в том числе 10 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 247 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы собственных результатов и их обсуждения и заключения. Библиография включает 388 ссылок, в том числе 132 – на работы отечественных авторов и 256 – зарубежных. Работа иллюстрирована 45 рисунками и включает 9 таблиц.

**Личное участие автора.** Основные результаты исследования, вошедшие в диссертацию, получены лично автором. Анализ литературных данных по теме диссертации, статистическая обработка полученных результатов, их научный анализ, обсуждение и написание диссертации выполнены самостоятельно автором.



## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования:** изолированные сегменты грудного отдела аорты 360 беспородных белых крыс весом 200-250 г, которые являются традиционной моделью артериальных сосудов мышечного типа и изолированные гладкомышечные препараты мочеточника 156 морских свинок весом 180-230 г.

**Подготовка гладкомышечных препаратов:** после удаления адвентиции и эндотелия механическим путем из грудного отдела аорты нарезались сегменты шириной 2-3 мм [Sakici J. et al, 1993].

Сегменты мочеточника длиной 10-12 мм вырезались после удаления с их поверхности соединительнотканых оболочек.

Все манипуляции выполнялись в препаровальных ванночках с раствором Кребса при комнатной температуре.

**Исследование сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты.** Для исследования сократительной активности сосудистые гладкомышечные сегменты после предварительной нагрузки 500 мг фиксировались в термостатируемой перфузионной камере объемом 10 мл.

Измерение механического напряжения ГМК проводили с помощью четырехканальной системы для проведения электрофизиологических исследований Muobath II (Германия).

Амплитуду контрольных (100 %) сократительных ответов сегментов на действие гиперкалиевого раствора (замещение 30 мМ NaCl на KCl) регистрировали после 40-50 минут перфузии нормальным раствором Кребса. В ряде экспериментов амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды контрольного фенилэфрин-индуцированного (10 мкМ) сокращения.

**Исследование электрической и сократительной активности ГМК мочеточника.** Для одновременной регистрации электрической и сократительной активности ГМК мочеточника использовалась методика двойного сахарозного моста [Артеменко Д.П. с соавт., 1982]. Раствор сахарозы в концентрации 0.3 М приготавливался на основе деионизированной воды с удельным сопротивлением не ниже 15 МОм·см. Отведение электрических потенциалов производили с помощью неполяризуемых хлор-серебряных электродов. Механическое напряжение (МН) гладкомышечных препаратов регистрировали изометрическим датчиком силы FT10G, который был соединен с 16-битным АЦП L-791. Далее сигнал регистрировался и обрабатывался с помощью ПК и соответствующего программного обеспечения AC Test.

В качестве контрольных (100 %) значений служили параметры потенциалов действия (амплитуда пикового компонента, амплитуда и длительность плато) и величина сокращений ГМК в нормальном растворе Кребса, вызванных деполяризующим током. Сопротивление мембраны ГМК оценивалось по величине анэлектротонических потенциалов.

**Исследование соотношения F- и G-актина в ГМК методом флуоресцентной микроскопии.** После стимуляции сократительной активности (фенилэфрином, гиперкалиевым раствором, гиперосмотической стрикцией, гипоосмотическим набуханием) гладкомышечные сегменты аорты помещали в

среду для фиксирования (tissue-embedding medium Neg 52) и замораживали, используя сухой лед ( $-78\pm 0.1$  °C).

Полученные с использованием криостата (Cryostats, Richard-Allen Scientific) поперечные срезы аорты толщиной 8 мкм помещали на стекло и высушивали на воздухе, затем фиксировали 4 % формальдегидом в фосфатном буфере (0.05M Tris Base, 0.9 % NaCl, pH 7.6) при комнатной температуре в течение 30 мин. После 5 минутного трехкратного отмывания в фосфатном буфере срезы обрабатывали 0.2 % раствором Triton X100 в течение 5 минут с последующим повторным отмыванием. Неспецифический сигнал блокировали 2 % раствором альбумина бычьей сыворотки (АБС) в фосфатном буфере в течение 30 мин. при 37 °C и полном насыщении водяными парами.

Для окрашивания F-актина, срезы инкубировали с меченым фаллоидином в разведении 1:100 в 2 % растворе АБС в течение 1 часа при  $37\pm 0.1$  °C и полном насыщении водяными парами.

После отмывания (фосфатный буфер, 3 x 5 мин.), срезы инкубировали с флуоресцентным красителем D12371, специфичным к G-актину, в разведении 1:100 в 2 % растворе АБС в течение 1 часа при  $37\pm 0.1$  °C при полном насыщении водяными парами.

После инкубации и отмывания, срезы высушивали на воздухе при комнатной температуре и накрывали покровными стеклами, предварительно нанося реагент Fluoromount-G. Сигнал визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM/RB и обрабатывали с помощью программы Multi Gauge V3.0.

**Используемые растворы.** Растворы готовились на основе дистиллированной воды добавлением соответствующих реактивов (ХЧ, «Реахим», РФ). Физиологический раствор Кребса содержал (мМ): 120.4 NaCl, 5.9 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 5.5 глюкозы, 15 C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N [tris(oxymethyl)-aminometan] ( $\pi=316.4$  мосм). Гиперосмолярный раствор ( $\pi=466.4$  мосм) приготавливали добавлением к раствору Кребса 150 мМ сахарозы, а гипосмолярный ( $\pi=56.4$  мосм) – снижением концентрации NaCl до 40.4 мМ вместо исходных 120.4 мМ. В растворах поддерживались значения pH в пределах 7.35-7.40 и температуры  $37\pm 0.1$  °C.

**Используемые реактивы:** колхицин, цитохалазин В или D, винбластин, нокодазол, фенилэфрин, нитропруссид натрия, дибутирил-цГМФ, метиленовый синий, форсколин, буметанид (все Sigma); тетраэтиламмония хлорид (Serva); перекись водорода (Россия).

**Статистическая обработка.** Анализ данных проводили при помощи программы Statistica 6.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде «среднее  $\pm$  ошибка среднего» ( $X\pm m$ ). Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий нормальности Колмогорова-Смирнова. Сформированные выборки не подчинялись закону нормального распределения, поэтому для проверки статистических гипотез были использованы непараметрические критерии [Гланц С., 1999]. 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 Т-критерий Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Статистически значимыми считали различия при значении  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одними из важнейших элементов редокс-системы клеток являются супероксид анион и оксид азота (NO). Несмотря на высокую реакционную активность, физиологическая и патофизиологическая значимость супероксид аниона невелика ввиду короткого времени «жизни». Поэтому основную роль играет метаболит супероксид аниона – перекись водорода [Wolin M., 2000]. Перекись водорода, как и оксид азота, является важным ауто- и паракринным регулятором в гладких мышцах висцеральных органов и сосудов.

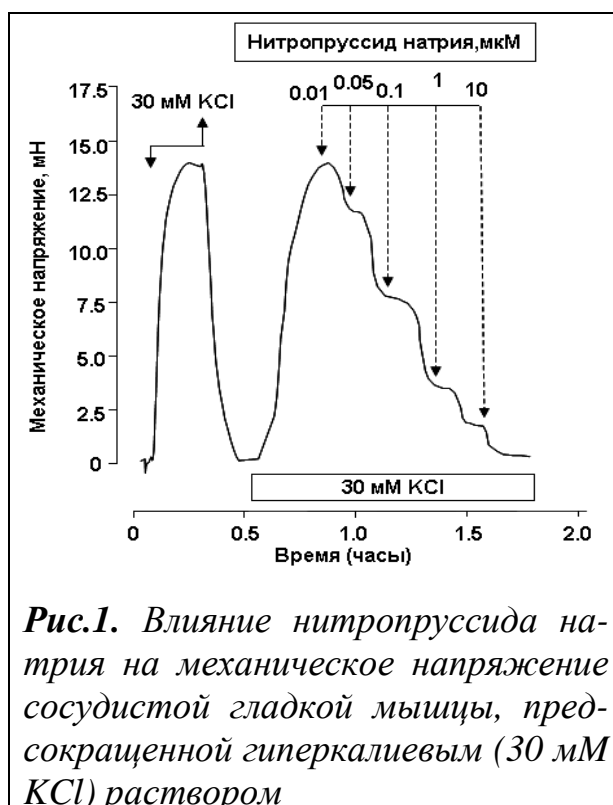
### *1. Влияние активных форм кислорода на сократительную активность гладкомышечных клеток при гиперкалиевой деполяризации мембраны и действии фенилэфрина*

Для изучения влияния оксида азота в экспериментальной практике широко используются нитросоединения – доноры NO. В своих экспериментах мы использовали нитропруссид натрия (НП) [Ignarro L., 1987; Ertemi H. et al., 2011].

*1.1. Влияние нитропруссид натрия на сокращения сосудистых гладких мышц, вызванные гиперкалиевым раствором.* При добавлении в перфузионный раствор нитропруссид натрия в концентрации 0.01-1 мкМ, исходное механическое напряжение (МН) гладких мышц сосудов не изменялось. Перфузия препаратов раствором, содержащим 30 мМ хлорида калия (30 мМ) приводила к развитию поддерживаемого сокращения, величина которого принималась за 100 %.

Нитропруссид натрия (0.01-1 мкМ) вызывал снижение величины сокращений гладкомышечных сегментов, вызванных гиперкалиевым раствором. Расслабление близкое к полумаксимальному наблюдалось при добавлении 0.05 мкМ НП: механическое напряжение снижалось до  $41.6 \pm 3.7\%$  ( $n=9$ ,  $p < 0.05$ ) от контрольного гиперкалиевого сокращения (рис.1). EC50 для нитропруссид натрия составила 0.04 мкМ.

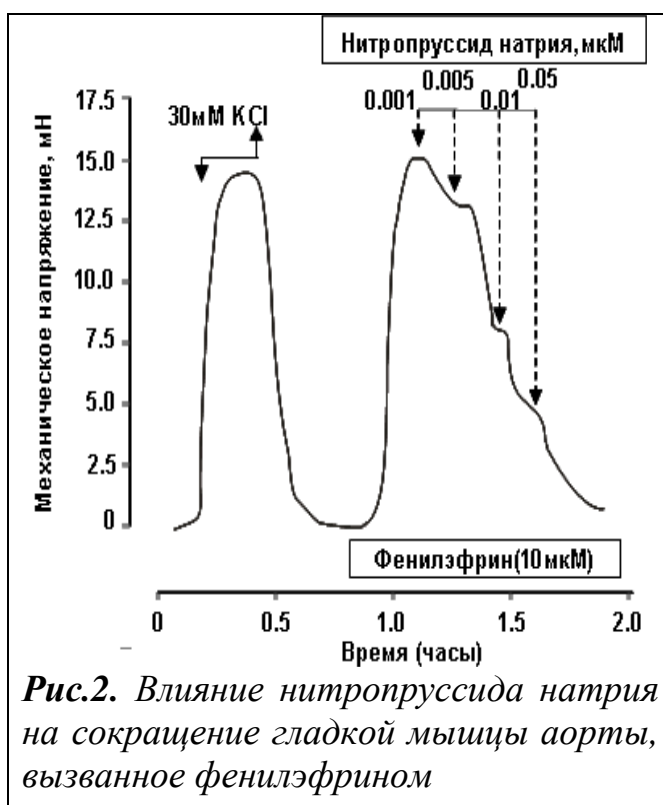
Известно, что основные эффекты оксида азота в ГМК обусловлены активацией растворимой гуанилатциклазы (ГЦ) [Северина И.С., 2002]. Вместе с тем, ранее было установлено и цГМФ-независимое действие НП [Ковалев И.В. с соавт., 1997]. Для выявления цГМФ – независимого компонента действия НП использовали ингибитор ГЦ – метиленовый синий [Реутов В.П. с соавт., 1994;



*Рис.1. Влияние нитропруссид натрия на механическое напряжение сосудистой гладкой мышцы, предсокращенной гиперкалиевым (30 мМ KCl) раствором*

Drewett J., Garbers D., 1994; Huang W.F. et al., 2009].

Добавление 10 мкМ метиленового синего в раствор Кребса течение 30 минут не изменяло исходное МН гладких мышц, но статистически значимо снижало расслабляющее влияние НП



нит не изменяло исходное МН гладких мышц, но статистически значимо снижало расслабляющее влияние НП (0.01-1 мкМ) на предсокращенную гиперкалиевым раствором (30 мМ КСl) гладкую мышцу. При действии 0.05 мкМ НП в этих условиях МН сегментов снижалось до  $83.2 \pm 5.7$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ), тогда как в отсутствии метиленового синего – до  $41.6 \pm 3.7$  %. Полученные данные указывают на то, что основной мишенью для НП в исследуемых ГМК является растворимая ГЦ и расслабляющее действие оксида азота на гладкую мышцу (ГМ), сокращенную в гиперкалиевом растворе, в своей большей части, опосредовано цГМФ.

Сократительные ответы сосудистых гладких мышц инициируются многими физиологически активными веществами.

Для изучения роли оксида азота и перекиси водорода в регуляции сократительной активности сосудистых ГМ, вызванной стимуляцией  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов, применяли фенилэфрин.

1.2. Влияние нитропруссид натрия на фенилэфрин-индуцированные сокращения сосудистых гладкомышечных клеток. Амплитуда сокращений в ответ на добавление 10 мкМ фенилэфрина (ФЭ) в раствор Кребса была сравнима с ответной реакцией ГМ на действие 30 мМ КСl

Нитропруссид натрия (0.001-0.05 мкМ) вызывал снижение силы ФЭ-индуцированных сокращений сосудистых сегментов. При этом близкое к полумаксимальному расслабление наблюдалось при добавлении 0.005 мкМ НП: МН снижалось до  $57.4 \pm 6.3$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) относительно контрольных значений (рис.2). ЕС50 для нитропруссид натрия составила 0.007 мкМ. В присутствии метиленового синего расслабляющее действие НП (0.005 мкМ) на предсокращенную ФЭ гладкую мышцу статистически значимо уменьшалось: механическое напряжение ГМК снижалось до  $84.3 \pm 9.1$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ), против  $57.4 \pm 6.3$  % – в отсутствие метиленового синего. Полученные данные указывают на то, что при фенилэфрин-индуцированном сокращении сосудистой гладкой мышц, как и в случае с ГМ, предсокращенной гиперкалиевым раствором, растворимая ГЦ является основной мишенью для НП. Следовательно, релаксирующее влияние НП на гладкую мышцу сосудов проявлялось независимо от природы предсокращающего фактора. Вместе с тем, НП оказывал более сильное действие на сокращения гладкомышечных сегментов, вызванные ФЭ, чем деполяризацией мембраны ГМК.

Активация  $\alpha_1$ -адренорецепторов вовлекает многочисленные сигнальные пути, контролирующие взаимодействие актина и миозина. Известно, что в обеспечение сокращений сосудистых гладких мышц в ответ на стимуляцию  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов, кроме хорошо изученных рецептор-управляемых и потенциал-зависимых ионных каналов вовлечены Ca-KM, ROCK и ПК-С [Guimarães S., Moura D., 2001; Wier W.G., Morgan K.G., 2003; Docherty J.R., 2010]. EC50 при ФЭ-индуцированном сокращении для нитропруссид натрия составила 0.007 мкМ, тогда как при гиперкалиевом сокращении – 0.04 мкМ. Возможно, более выраженное расслабляющее действие NO на сокращения, вызванные фенилэфрином, обусловлено большей чувствительностью к действию оксида азота С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы ГМК. Ингибирование оксидом азота ПК-С продемонстрировано в ряде исследований [Ковалев И.В. с соавт., 2002, 2003; Muniyappa R. et al., 1998; Vouyouka A.G. et al., 2006].

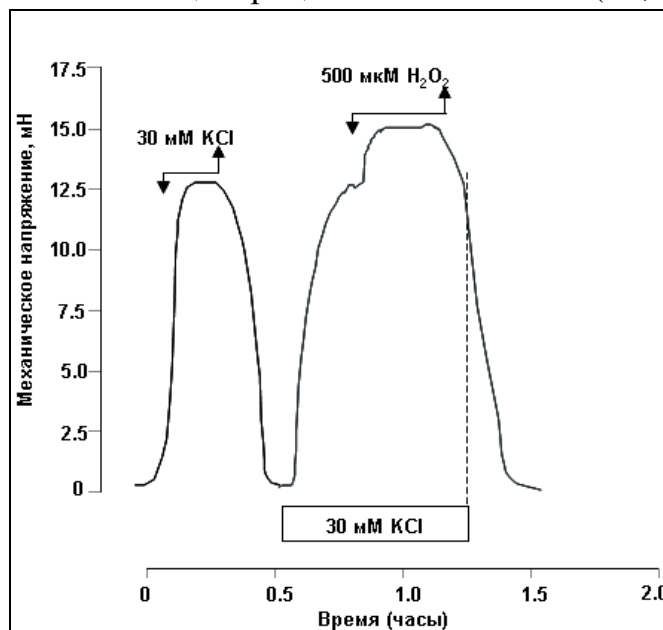
*1.3. Влияние перекиси водорода на сокращения сосудистых гладких мышц, вызванные деполяризацией мембраны гиперкалиевыми растворами.* При добавлении в перфузионный раствор  $H_2O_2$  в концентрации 1-500 мкМ исходное МН сегментов аорты не изменялось.

Для исследования влияния перекиси водорода (1-500 мкМ) на сокращения сегментов, вызванные деполяризацией мембраны клеток, воздействовали гиперкалиевыми растворами, содержащими 30, 60 и 120 мМ KCl. В этих условиях механическое напряжение гладкой мышцы увеличивалось до  $129.1 \pm 6.8$  % (60 мМ KCl) и  $145.5 \pm 13.6$  % при действии 120 мМ KCl ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) от контрольного гиперкалиевого сокращения (30 мМ KCl).

Перекись водорода (500 мкМ) увеличивала МН сосудистых гладких мышц, предсокращенных растворами с повышенной концентрацией ионов калия (30, 60 и 120 мМ KCl) до  $125.2 \pm 2.9$  %,  $125.4 \pm 7.7$  % и  $126.3 \pm 2.3$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) от гиперкалиевой (30, 60 и 120 мМ KCl) контрактуры, соответственно (рис. 3).

Амплитуда сокращений при действии хлорида калия (30, 60 и 120 мМ KCl) и активирующее влияние  $H_2O_2$  в интактных сегментах статистически значимо не отличались от значений, полученных на сегментах с сохраненным эндотелием ( $n=6$ ).

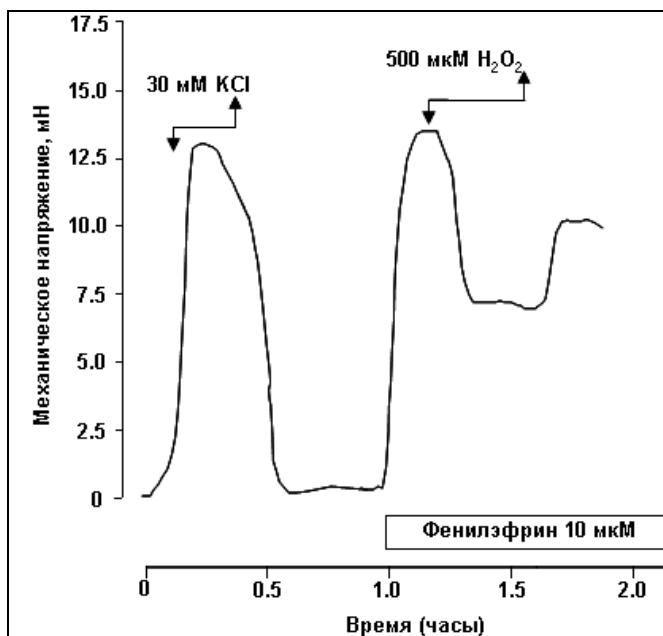
Полученные данные свидетельствуют о том, что  $H_2O_2$  оказывает возбуждающее действие на деэндотелизированные сегменты аорты, предсокращенные гиперкалиевым раствором. При этом величина прироста сокращения на действие перекиси водо-



**Рис.3.** Влияние перекиси водорода на механическое напряжение сосудистой гладкой мышцы, предсокращенной гиперкалиевым (30 мМ KCl) раствором

рода не зависела от величины мембранного потенциала сосудистых гладкомышечных клеток.

1.4. Влияние перекиси водорода на фенилэфрин-индуцированные сокращения сосудистых гладких мышц. Перекись водорода в концентрации 500 мкМ уменьшала МН сосудистых сегментов, предсокращенных ФЭ, до  $48.3 \pm 3.5$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ) (рис.4).



**Рис.4.** Влияние перекиси водорода на сокращение гладкой мышцы аорты, вызванное фенилэфрином

Для изучения влияния  $H_2O_2$  на рецептор-управляемый вход ионов кальция ФЭ добавляли в условиях инактивационного выключения потенциал-зависимых кальциевых каналов. Для этого использовали ГМК, деполяризованные в присутствии 120 мМ КСl. Фенилэфрин (10 мкМ) вызывал повышение МН таких гладкомышечных препаратов на  $51.5 \pm 4.7$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) от контрольного гиперкалиевого сокращения. В этих условиях перекись водорода (500 мкМ) не влияла на величину механического напряжения гладкомышечных сегментов.

Полученные данные указывают, во-первых, на то, что расслабляющее влияние  $H_2O_2$  на гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином, не связано с угнетением рецептор-управляемого входа ионов кальция в ГМК, и ее расслабляющее действие проявляется только при субмаксимальных концентрациях кальция в клетке, во-вторых. Последнее также может служить косвенным подтверждением того, что расслабление ГМ, предсокращенной ФЭ, по крайней мере, частично связано с угнетением перекисью водорода С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы.

1.5. Исследование роли калиевой проводимости мембраны в реализации влияния перекиси водорода на сокращения сосудистых гладкомышечных сегментов, индуцированные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином. Изменения калиевой проводимости мембраны ГМК во многом определяют направленность и величину сократительных реакций гладких мышц на действие биологически активных веществ. Добавление в раствор Кребса 10 мкМ блокатора кальций-активируемых, потенциал-зависимых и АТФ-чувствительных калиевых каналов тетраэтиламмония [Zhao Y., 1998] не влияло на исходное механическое напряжение ГМ и амплитуду сокращений, вызванных гиперкалиевым раствором (30 мМ КСl), но вызывало увеличение амплитуды фенилэфрин-индуцированных сокращений до  $111.4 \pm 7.2$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) от контрольных значений.

Тетраэтиламмоний не оказывал влияния на эффекты перекиси водорода в предсокращенных гиперкалиевым раствором или фенилэфрином гладкомышечных сегментах. Эти данные указывают на то, что действие перекиси водорода на величину сокращений, вызванных гиперкалиевым раствором или фенилэфрином не связано с модуляцией потенциал-зависимой и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой калиевой проводимости мембраны сосудистых ГМК.

## **2. Исследование влияния активных форм кислорода на сократительные реакции гладких мышц в моделях изменения объема клеток**

Известно, что поддержание относительно постоянного объема большинства клеток, в том числе ГМК обеспечивается работой специфических метаболических и транспортных систем.

*2.1. Сократительные реакции гладкомышечных сегментов аорты в моделях изменения объема клеток.* Изменение осмолярности среды инкубации является хорошо апробированным методическим подходом для активации объем-чувствительного ионного транспорта и выяснения роли систем поддержания клеточного объема в регуляции клеточных функций [Anfinogenova Y.D. et al., 2004]. Этот прием позволяет модулировать объем-чувствительные ионотранспортирующие системы клетки без воздействия какими-либо биологически активными соединениями.

Участие объем-чувствительных механизмов в регуляции сократительной активности изолированных сегментов аорты было изучено при моделировании гиперосмотического и изоосмотического сжатия, а также гипоосмотического набухания гладкомышечных клеток.

Для гиперосмотически-индуцированного снижения объема клеток использовался модифицированный физиологический раствор, содержащий 150 мМ сахарозы (466.4 мосм) в качестве непроникающего осмолита. Повышение осмолярности раствора приводило к развитию воспроизводимого, поддерживаемого в течение 45 мин. сокращения. Амплитудные параметры этих сократительных ответов оставались стабильными при трехкратном повторении аппликации 150 мМ сахарозы с последующим отмыванием в течение 30 мин. между ними. Амплитуда сокращений гладкомышечных сегментов на 20-ой минуте действия 150 мМ сахарозы составляла  $51.8 \pm 9.0$  % ( $n=9$ ) в сравнении с величиной контрольного гиперкалиевого сокращения.

Перфузия гладкомышечных препаратов гипоосмотическим раствором (40.4 мМ NaCl) приводила к быстрому транзиторному сокращению сегментов аорты, амплитуда которых составила  $75.7 \pm 8.9$  % ( $n=8$ ) по сравнению с величиной контрольного гиперкалиевого сокращения, а длительность –  $40 \pm 4.8$  мин.

Ключевую роль в обеспечении сокращений сосудистых гладких мышц при гипоосмотическом набухании играют неравновесное распределение ионов  $\text{Cl}^-$  и входящий хлорный ток, который деполяризует мембрану [Анфиногенова Я.Д., 2005]. Для получения изоосмотической стрикции сегменты аорты экспонировали в гипоосмотической среде (40.4 мМ NaCl) в течение 60 мин., затем возвращали их в нормоосмотический раствор. Восстановление осмолярности раствора во всех случаях приводило к развитию транзитных сокращений, амплитуда

которых составляла  $21.6 \pm 6.1$  % по сравнению с величиной контрольной гиперкалиевой контрактуры, а длительность –  $38.8 \pm 1.6$  мин. ( $n=10$ ).

Согласно литературным данным, одним из ключевых механизмов стабилизации объема клеток при стрикции, вызванной абсолютным или относительным увеличением осмотического давления среды, является активация  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта (NKCC) [Mongin A., Orlov S., 2001; Lang F. et al., 2000; Russel J.M., 2000], однако при гиперосмотическом воздействии активация NKCC носит постоянный характер, а в случае изоосмотической стрикции – транзиторный. Показано фосфорилирование легких цепей миозина и Rho-зависимая транслокация миозина II при гиперосмотической стрикции клеток [Klein J.D., O'Neill W.C., 1995; Pedersen P.A. et al., 2002]. Сокращение сегментов аорты, индуцированное гипоосмотическим воздействием обусловлено наличием неравновесного электрохимического хлорного потенциала, открыванием объем-чувствительных и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{Cl}^-$  каналов, входом  $\text{Ca}^{2+}$  по потенциал-зависимым кальциевым каналам и угнетением  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена [Anfinogenova Y.D. et al., 2004]. Кроме того, сокращение, вызванное изоосмотической стрикцией, в отличие от сокращения в гиперосмотическом растворе, сопровождается регуляторным увеличением объема клеток [Mongin A., Orlov S., 2001], что представляет значительный интерес для сравнения результатов, полученных в этих двух моделях.

*2.2. Влияние активных форм кислорода на сокращения гладкомышечных сегментов аорты в моделях изменения объема клеток.* При добавлении  $0.05$  мкМ нитропрусида натрия на плато сокращений, вызванных гиперосмотической стрикцией амплитуда последних статистически значимо снижалась и составляла  $26.3 \pm 4.7$  % ( $n=4$ ,  $p<0.05$ ) от контрольного гиперкалиевого сокращения. Добавление  $0.05$  мкМ НП на фоне действия гипоосмотического раствора не изменяло амплитуду сокращений гладкомышечных сегментов.

Аппликация  $0.05$  мкМ НП снижала амплитуду сокращений при изоосмотической стрикции до  $8.9 \pm 3.1$  % ( $n=4$ ,  $p<0.05$ ) в сравнении с величиной контрольной гиперкалиевой контрактуры.

Перекись водорода ( $500$  мкМ) не влияла на сокращение, вызванное гиперосмотической ( $150$  мМ сахарозы) и изоосмотической стрикцией. Амплитуда сокращений сосудистых сегментов составила  $54.6 \pm 3.3$  % ( $n=6$ ) и  $19.9 \pm 5.8$  % ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ) от контрольного гиперкалиевого сокращения. В отличие от этого, добавление  $500$  мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в гипоосмотический раствор статистически значимо увеличивало амплитуду сокращений до  $98.2 \pm 4.1$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ) от величины контрольного гиперкалиевого сокращения. В отсутствие  $\text{H}_2\text{O}_2$  амплитуда сократительных ответов ГМ аорты при действии гипоосмотического раствора составила  $75.7 \pm 8.9$  %.

### **3. Изучение роли цитоскелета в регуляции сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты**

Для изучения участия цитоскелета в сократительных ответах на действие гиперкалиевого раствора и фенилэфрина, а также при моделировании набухания и стрикции сосудистых ГМК было исследовано влияние



дезинтегратора микротубул и микрофиламентов цитоскелета колхицина [Nakamura M. et al., 2000].

Для дифференцировки участия отдельных элементов цитоскелета в сократительных реакциях гладкомышечных клеток аорты использовались селективные модификаторы микрофиламентов и микротубул цитохалазин В (или D) и винбластин (или нокодазол), соответственно.

*3.1. Влияние колхицина на сокращения сегментов аорты, вызванные деполяризацией мембраны ГМК гиперкалиевым раствором.* Добавление 10 мкМ колхицина в раствор Кребса не изменяло исходное механическое напряжение гладкомышечных сегментов аорты.

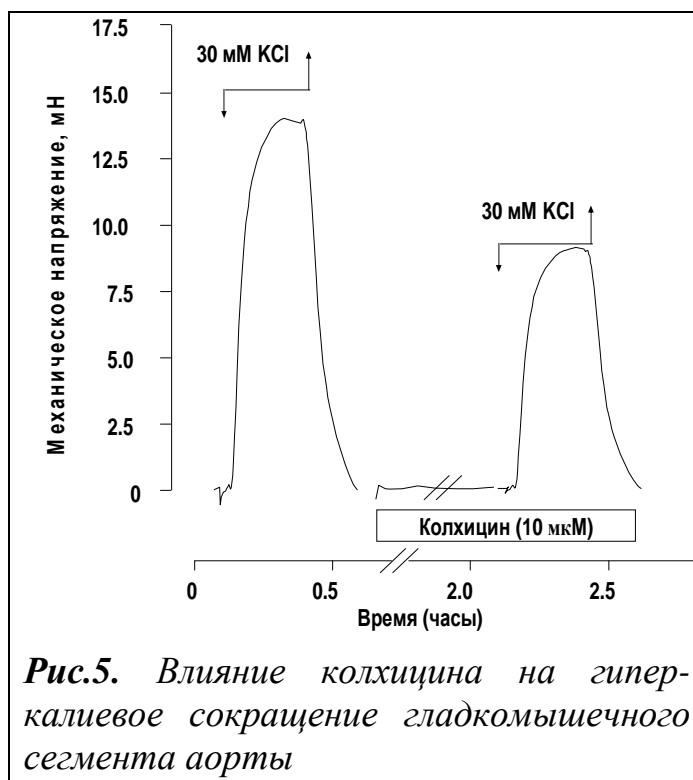
После 90-минутной обработки колхицином амплитуда сокращений сосудистых сегментов, вызванных гиперкалиевым раствором (30 мМ) снизилась до  $62.9 \pm 12.6\%$  ( $n=9$ ,  $p < 0.05$ ) от контрольной гиперкалиевой контрактуры (рис. 5), что свидетельствует о вовлечении элементов цитоскелета в генерацию сокращений гладкомышечных клеток, индуцированных деполяризацией мембраны.

Увеличение концентрации колхицина до 100 мкМ не привело к дополнительному снижению амплитуды гиперкалиевой контрактуры гладкомышечных сегментов. Поэтому в последующих экспериментах использовался колхицин в концентрации 10 мкМ.

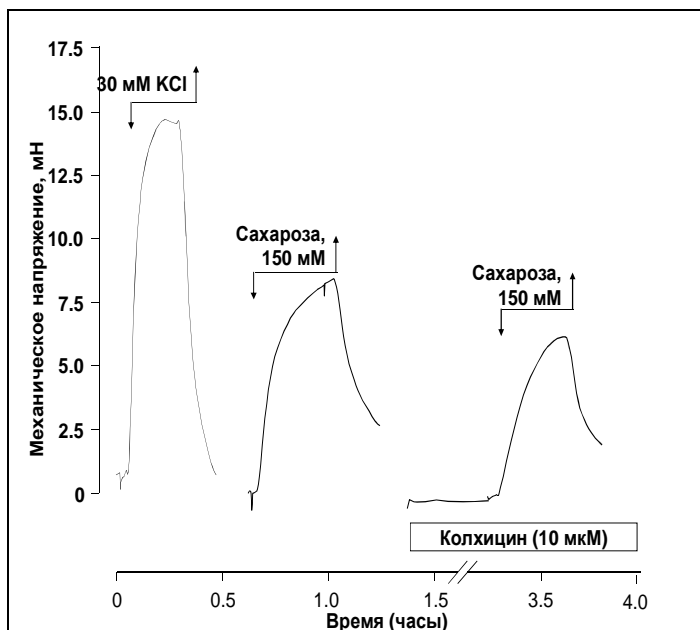
*3.2. Влияние колхицина на сокращения гладкомышечных сегментов аорты, вызванные стрижией клеток в гиперосмотическом растворе.* Амплитуда сокращений гладкомышечных сегментов при действии раствора Кребса, содержащего 150 мМ сахарозы, составляла  $51.8 \pm 9.0\%$  ( $n=9$ ) в сравнении с величиной контрольного гиперкалиевого сокращения.

После 90-минутной предобработки гладкомышечных сегментов аорты колхицином (10 мкМ) амплитуда сокращения ГМ в гиперосмотическом растворе снизилась и составила  $35.9 \pm 9.6\%$  ( $n=8$ ,  $p < 0.05$ ) от контрольного гиперкалиевого сокращения (рис. 6). Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении элементов цитоскелета в развитие сокращений, индуцированных гиперосмотической стрижией клеток.

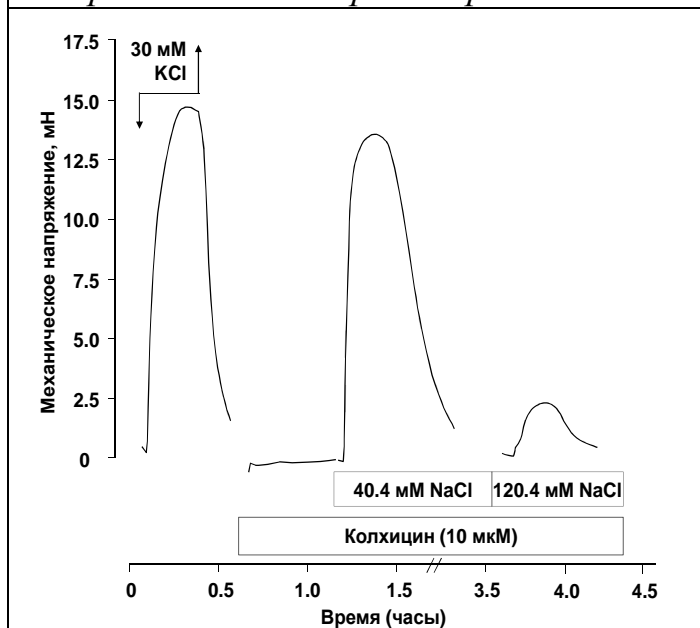
*3.3. Влияние колхицина на сокращения гладкомышечных сегментов аорты, вызванные набуханием клеток в гипоосмотическом растворе.* После инкубации сегментов в растворе Кребса, содержащем 10 мкМ колхицина, амплитуда и длительность сокращений, вызванных гипоосмотическим раствором, достоверно не изменялись.



**Рис.5.** Влияние колхицина на гиперкалиевое сокращение гладкомышечного сегмента аорты



**Рис.6.** Влияние колхицина на амплитуду сокращения гладкомышечного сегмента аорты, вызванного стрижкой клеток в гиперосмотическом растворе



**Рис.7.** Влияние колхицина на амплитуду сокращения, вызванного изоосмотической стрижкой гладкомышечных клеток аорты

Эти данные свидетельствуют о том, что дезинтеграция колхицином цитоскелета не влияет на транзиторное сокращение сегментов аорты при гипоосмотическом набухании клеток, а следовательно, можно предполагать, что хлорные токи, ответственные за деполяризацию мембраны ГМК в этих условиях [Anfinogenova Y.D. et al., 2004], не зависят от состояния цитоскелета.

**3.4. Влияние колхицина на сократительные реакции сегментов аорты в модели изоосмотической стрижки клеток.** После 90-минутной предобработки колхицином (10 мкМ) амплитуда сокращений при изоосмотической стрижки достоверно уменьшилась и составила  $15.8 \pm 5.2\%$  ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) по сравнению с величиной контрольной гиперкалиевой контрактуры (рис.7). Длительность сократительного ответа не изменилась.

Следовательно, цитоскелет принимает участие в обеспечении сокращений гладкой мышцы в условиях изоосмотической стрижки.

Результаты, полученные с использованием дезинтегратора актинового и тубулинового элементов цитоскелета колхицина, свидетельствуют о вовлечении элементов цитоскелета в сократительные ответы при гиперкалиевой деполяризации, гипер- и изоосмотической стрижки клеток.

Для изучения роли микротубул в сократительных реакциях гладкомышечных сегментов аорты мы использовали алкалоид винбластин, который деполимеризует микротубулы.

**3.5. Влияние винбластина на сокращения сосудистых гладких мышц, вызванные гиперкалиевым раствором.** Добавление 10 мкМ винбластина в раствор Кребса не изменяло исходное МН гладкомышечных сегментов аорты. После предобработки гладкомышечных препаратов в течение 60 мин. винбластином

(10 мкМ) амплитуда сокращений сосудистых сегментов, вызванных гиперкалиевым раствором Кребса достоверно не изменилась и составила  $103.9 \pm 6.5$  % от контрольного гиперкалиевого сокращения ( $n=6$ ,  $p>0.05$ ).

Эти данные указывают на то, что микротубулы не участвуют в генерации сокращений при деполяризации мембраны ГМК гиперкалиевым раствором.

*3.6. Влияние винбластина на сокращения сосудистых гладких мышц, вызванные гиперосмотической и изоосмотической стрижией.* Предобработка гладкомышечных препаратов аорты винбластином (10 мкМ, 60 мин.) приводила к снижению амплитуды сокращения, вызванного гиперосмотическим раствором до  $35.13 \pm 3.4$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) от контрольного гиперкалиевого сокращения.

Амплитуда сокращений, индуцированных изоосмотической стрижией, после предобработки винбластином не изменилась.

Таким образом, по данным экспериментов с винбластином, микротубулы не играют существенной роли в обеспечении сократительных ответов, вызванных деполяризацией мембраны ГМК, а также изоосмотической стрижией. Вместе с тем, ингибирование полимеризации микротубул достоверно уменьшает величину сокращений сегментов аорты в ответ на стрижью в гиперосмотическом растворе.

Известно, что фибриллярный актин, образованный мономерами G-актина, является структурным элементом цитоскелета. В клетке G-актин находится в равновесии с F-актином; их соотношение позволяет судить о целостности цитоскелета [Okamoto K.I., 2004; Connelly J.T. et al. 2010].

*3.7. Изучение соотношения F- и G-актина в ГМК аорты при действии гиперкалиевого, гипо- и гиперосмотического растворов.* Для определения соотношения F- и G- актина использовали метод флуоресцентной микроскопии.

При деполяризации мембраны гиперкалиевым раствором, при сокращениях, вызванных гипер- и гипоосмотическими растворами, отношение F/G актина смещалось в сторону F-актина. При действии гиперосмотического раствора это отношение более чем в 2 раза превышало исходные значения (табл.1).

Таблица 1

**Соотношение F- и G-актина в гладкомышечных клетках аорты при действии гиперкалиевого, гипо- и гиперосмотического растворов**

Контроль (F/G)	Гиперкалиевое сокращение (30 мМ KCl)	Сокращение, вызванное гипоосмотическим раствором (40.4 мМ NaCl)	Сокращение, вызванное гиперосмотическим раствором (150 мМ сахарозы)
$1.05 \pm 0.44$	$1.56 \pm 0.25$ *	$1.78 \pm 0.58$ *	$2.40 \pm 0.31$ #

\* – статистическая значимость различий по сравнению с контролем ( $p<0.05$ )

# – статистическая значимость различий по сравнению с контролем ( $p<0.01$ )

3.8. *Влияние цитохалазина В на сокращения сосудистых гладких мышц, вызванные гиперкалиевым раствором.* Для определения участия актиновых микрофиламентов цитоскелета в сократительных ответах сегментов аорты использовали цитохалазин В.

Добавление 10 мкМ цитохалазина В в раствор Кребса приводило к снижению исходного МН сегментов аорты, которое к 40-ой минуте составило  $9.7 \pm 3.5$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) от контрольной гиперкалиевой контрактуры.

После предобработки гладкомышечных сегментов цитохалазином В (10 мкМ, 40 мин.) амплитуда сокращений, вызванных гиперкалиевым раствором, снизилась до  $40.1 \pm 4.9$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) от контрольных значений.

Полученные данные свидетельствуют о том, что микрофиламенты цитоскелета вовлечены в механизмы, обеспечивающие поддержание исходного МН и генерацию сокращений сосудистых гладких мышц, индуцированных деполяризацией мембраны ГМК гиперкалиевым раствором.

3.9. *Влияние цитохалазина В на сокращения, вызванные гиперосмотической и изоосмотической стрикцией сосудистых гладкомышечных клеток.* После инкубации сегментов в течение 40 мин. в растворе, содержащем 10 мкМ цитохалазина В амплитуда сокращений ГМК аорты, вызванных гиперосмотическим раствором, уменьшилась до  $17.2 \pm 3.8$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) от контрольного гиперкалиевого сокращения. Величина сокращений, индуцированных изоосмотической стрикцией, после предобработки препарата цитохалазином В снизилась до  $6.5 \pm 1.5$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) от контрольного гиперкалиевого сокращения. Эти данные свидетельствуют об участии актиновых филаментов цитоскелета в развитии сокращений сосудистых ГМК, вызванных гипер- и изоосмотической стрикцией.

Угнетение цитохалазином В сокращений гладкой мышцы аорты в ответ на деполяризацию мембраны может быть обусловлено нарушением оперирования потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов, открывание которых в этом случае является основным механизмом увеличения концентрации ионов кальция в цитозоле и активации сокращения. По мнению N.Sperelacis (2000), такой эффект цитохалазина В может быть связан с освобождением нерецепторной формы тирозиновой протеинкиназы (c-Src) от цитоплазматической поверхности плазмалеммы в цитозоль. Как следствие, будет нарушаться Tgr-РК-зависимое фосфорилирование потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов и их способность активироваться при деполяризационных смещениях мембранного потенциала в гиперкалиевом растворе.

Снижение цитохалазином В амплитуды сокращений, вызванных гипер- и изоосмотической стрикцией клеток указывает на участие микрофиламентов цитоскелета в объем-зависимой регуляции механического напряжения сосудистых ГМ.

3.10. *Изучение роли цитоскелета в регуляции сократительной активности сосудистых гладких мышц при действии фенилэфрина.* Для определения участия цитоскелета в генерации сокращений сегментов аорты при стимуляции  $\alpha_1$ -адренорецепторов изучалось влияние колхицина, винбластина и цитохалазина В на эффекты фенилэфрина.

Фенилэфрин (0.01, 0.1, 1 и 10 мкМ) в растворе Кребса вызывал дозозависимое увеличение МН гладкомышечных сегментов аорты (табл.2).

После предобработки гладких мышц колхицином амплитуда сокращений сосудистых сегментов, вызванных добавлением фенилэфрина в тех же концентрациях, статистически значимо снижалась (табл.2).

Таблица 2

**Влияние колхицина на фенилэфрин-индуцированные сокращения гладкомышечных сегментов аорты**

	Амплитуда сокращения, вызванного фенилэфрином			
	0.01 мкМ	0.1 мкМ	1 мкМ	10 мкМ
Контроль, %	10.8±7.4	74.1±9.2	103.1±4.9	107.8±6.9
+Колхицин (10 мкМ), %	3.7±1.5 *	31.1±2.8 *	81.8±2.9 *	87.7±10.3 *

\* – статистически значимые различия по сравнению с амплитудой фенилэфрин-индуцированных сокращений в отсутствие колхицина ( $p < 0.05$ )

На фоне цитохалазина В (10 мкМ, 40 мин.) амплитуда сокращений, вызванных 1 мкМ фенилэфрина уменьшилась до 20.6±3.7 % ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ) от величины контрольного фенилэфрин-индуцированного (1 мкМ) сокращения.

Предобработка гладкомышечных препаратов аорты винбластином (10 мкМ, 60 мин.) приводила к увеличению амплитуды сокращений, вызванных 1 мкМ фенилэфрина, до 121.0±12.1 % ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ) от контрольного фенилэфрин-индуцированного сокращения.

Методом флуоресцентной микроскопии было показано, что при действии фенилэфрина в той же концентрации соотношение F и G-актина сместилось в сторону F-актина (2.27±0.31 % по сравнению с 1.05±0.44 % в контроле,  $n=7$ ,  $p < 0.01$ ).

Как следует из полученных данных, актиновые элементы цитоскелета и микротубулы вовлекаются в развитие фенилэфрин-индуцированного сокращения. Это дает основание предполагать участие цитоскелета в оперировании сигнальных путей, включаемых стимуляцией  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов. Угнетение цитохалазином В сокращений гладкомышечных сегментов аорты при действии ФЭ, также как и в случае деполяризации мембраны ГМК в гиперкалиевом растворе, может быть связано с нарушением оперирования потенциал-зависимых Са-каналов L-типа [Nakamura M. et al., 2000], открывание которых является одним из ключевых этапов генерации фазного компонента сокращения в ответ на стимуляцию  $\alpha_1$ -адренорецепторов. Деполимеризация микротубул в присутствии винбластина, напротив, вела к повышению сократительной активности исследуемых ГМК. K. Chitale (2001) показал участие микротубул в регуляции Rho-киназы. Активация этой киназы угнетает фосфатазу легких цепей миозина и, таким образом, увеличивает степень фосфорилирования легких цепей миозина. Ослабление негативного контроля активности Rho-киназы со стороны микротубул при их деполимеризации может быть причиной

усиления сокращений ГМК в ответ на фенилэфрин в присутствии винбластина.

3.11. *Исследование участия  $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспортера в регуляции сократительной активности сосудистых гладкомышечных клеток.* Согласно данным С.Н.Орлова [1992], гиперосмотическое воздействие ведет к стрикции клеток, сопровождающейся поддерживаемой активацией НКСС. Предобработка сегментов в течение 15 мин. ингибитором НКСС буметанидом (100 мкМ) не изменяла величины базального тонуса, но вызывала снижение величины сокращений при действии гиперкалиевого раствора до  $76.6 \pm 3.5\%$  ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ) от контрольного сокращения (30 мМ КСl). При фенилэфрин-индуцированном сокращении предобработка гладкомышечного препарата буметанидом (100 мкМ) снижала амплитуду сокращений до  $53.7 \pm 3.2\%$  ( $n=8$ ,  $p<0.05$ ) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. Полученные данные свидетельствуют о том, что НКСС участвует в сократительных реакциях ГМ, индуцированных деполяризацией мембраны и стимуляцией  $\alpha$ -адренергических рецепторов. На кардиомиоцитах крысы показано, что НКСС регулируется  $\alpha_1$ -адренергической стимуляцией путем фосфорилирования этого белка с участием ERK-пути [Andersen G. et al., 2004]. Вероятнее всего в сосудистых гладких мышцах  $\alpha_1$ -адреномиметики активируют НКСС. Следствием активации котранспорта будет повышение электрохимического потенциала ионов хлора, усиление  $Cl^-$  токов и более выраженная деполяризация мембраны ГМК. Выключение буметанидом этого звена в механизмах формирования сократительной реакции сосудистых ГМК при действии фенилэфрина ведет к снижению эффективности их действия.

Активность НКСС модулируется изменениями клеточного объема [Lang F. et al., 1998; Mongin A.A., Orlov S.N., 2001; Anfinogenova Y.D. et al., 2004], зависит от состояния цитоскелета и при разрушении актиновых филаментов цитохалазинами в большинстве типов клеток происходит ингибирование этого переносчика [Orlov S.N. et al., 1996; Haas M., Forbush B., 1998; Russell J.M., 2000]. В частности, в культуральных ГМК из аорты крысы цитохалазин или не оказывал влияния на активность НКСС [Smith J., Smith L., 1987], или ингибировал его на  $\sim 70\%$  [Orlov S.N. et al., 1995]. Однако имеются также сообщения о том, что деполимеризация актинового цитоскелета ассоциирована с активацией НКСС в клетках Ehrlich ascites tumor cells [Jessen B.S., Hoffmann E.K., 1992] и клетках T84 [Mathews J. et al., 1997].

На фоне действия колхицина (10 мкМ) добавление буметанида (100 мкМ) приводило к снижению величины сократительных ответов как на деполяризацию мембраны в гиперкалиевом растворе ГМК до  $35.8 \pm 7.5\%$  от контрольного гиперкалиевого сокращения, так и ФЭ-индуцированных сокращений, величина которых составила  $7.5 \pm 1.8\%$  от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения ( $n=4$ ,  $p<0.05$ ).

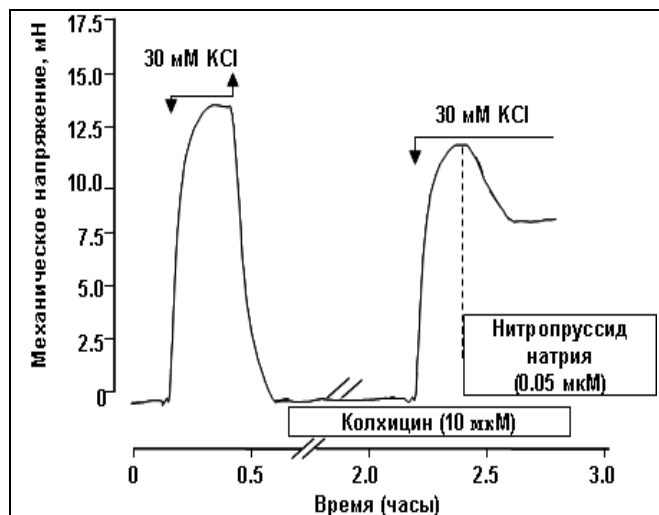
На фоне действия нокодазола (10 мкМ) добавление буметанида (100 мкМ) не вызывало значимых изменений величины гиперкалиевого сокращения, а амплитуда ФЭ-индуцированных сокращений в таких условиях снижалась до  $64.3 \pm 8.7\%$  ( $n=4$ ,  $p>0.05$ ).

Добавление буметанида (100 мкМ) на фоне действия цитохалазина D (0.05 мкМ) приводило к снижению как гиперкалиевых, так и ФЭ-индуцированных сокращений до  $2.2 \pm 0.8$  % и  $4.1 \pm 3.2$  % от величины контрольных сокращений ( $n=4$ ,  $p < 0.05$ ), соответственно.

Таким образом, усиление релаксирующего влияния буметанида на ГМ после предобработки колхицином или цитохалазином D свидетельствует о вовлечении микрофиламентов цитоскелета в процессы объем-зависимой регуляции.

#### 4. Изучение роли цитоскелета в механизмах действия АФК на сократительные реакции гладкомышечных сегментов аорты

4.1. Влияние дестабилизации элементов цитоскелета на эффекты оксида азота. Нитропруссид натрия в концентрации 0.05 мкМ вызывал расслабление близкое к полумаксимальному. 90-минутная предобработка гладкомышечных сегментов колхицином статистически значимо снижала влияние 0.05 мкМ НП на исследуемую ГМ (рис.8), что свидетельствует о вовлечении элементов цитоскелета в реализацию расслабляющего действия оксида азота на сокращения сосудистых ГМ, вызванных деполяризацией мембраны в гиперкалиевом растворе.



**Рис.8.** Влияние нитропруссида натрия на механическое напряжение гладкой мышцы аорты, предсокращенной гиперкалиевым (30 мМ KCl) раствором после предобработки колхицином

В присутствии нокодазола расслабляющее влияние НП на предсокращенную гиперкалиевым раствором (30 мМ KCl) гладкую мышцу статистически значимо снижалось. На фоне действия нокодазола амплитуда сокращений при добавлении 0.05 мкМ НП уменьшалась до  $75.5 \pm 8.1$  % ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ), против  $41.6 \pm 3.7$  % в его отсутствии. Расслабляющее действие НП (0.05 мкМ) на фоне цитохалазина D статистически значимо усиливалось: сосудистый сегмент расслаблялся полностью ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ).

Эти данные указывают на то, что микротубулы вовлечены в механизмы расслабляющего действия оксида азота на ГМК аорты.

Метиленовый синий (10 мкМ), добавленный после обработки гладкомышечных препаратов колхицином (10 мкМ, 90 мин.), значимо уменьшал расслабляющее влияние НП (табл.3).

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 – дибутирил-цГМФ.

**Влияние колхицина на эффекты НП и дибутирил-цГМФ в гладкой мышце аорты, предсокращенной гиперкалиевым (30мМ КСl) раствором**

	Амплитуда сокращений, %		
	30 мМ КСl +НП(0.05 мкМ)	30 мМ КСl+метиленовый синий (10 мкМ) +НП(0.05 мкМ)	30 мМ КСl +Дибутирил-цГМФ (100 мкМ)
Контроль	41.6±3.7	83.2 ±5.7	78.5±6.4
+Колхицин (10 мкМ)	68.9±7.2 *	91±1.2 *	91.4±7.3 *

\* – статистически значимые различия по сравнению с эффектами НП или дибутирил цГМФ в отсутствии колхицина ( $p < 0.05$ )

Дибутирил-цГМФ (100 мкМ) вызывал снижение МН гладкомышечных сегментов аорты, предсокращенных гиперкалиевым раствором до  $78.5 \pm 6.4$  % ( $n=5$ ,  $p < 0.05$ ) от контрольного сокращения (30 мМ КСl). После обработки гладкомышечных препаратов колхицином (10 мкМ) действие дибутирил-цГМФ статистически значимо снижалось (табл.3).

Полученные данные свидетельствуют о вовлечении цитоскелета в реализацию цГМФ-зависимого и независимого от этого циклического нуклеотида действия оксида азота на механическое напряжение гладкой мышцы аорты.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что эффективность расслабляющего действия оксида азота в гладкомышечных клетках аорты зависит от состояния микротубул и микрофиламентов. При этом они вовлечены в различные процессы, которые являются мишенями для NO. По-видимому, микрофиламенты контролируют внутриклеточные системы или процессы, поддерживающие сокращение, напротив, микротубулы прямо или опосредованно участвуют в реализации расслабляющего действия NO.

*4.2. Исследование роли цитоскелета в регуляции оксидом азота сокращений гладкой мышцы аорты при действии фенилэфрина.* После 90-минутной обработки колхицином расслабляющее влияние 0.005 мкМ НП на ФЭ-индуцированные сокращения ГМК статистически значимо усиливалось ( $40.2 \pm 3.6$  %,  $n=6$ ,  $p < 0.05$  от величины ФЭ-индуцированного сокращения в присутствии только колхицина. Полученные результаты свидетельствуют об участии цитоскелета в механизмах действия оксида азота на сокращения гладкой мышцы аорты, вызванные стимуляцией  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов.

После предобработки гладкомышечных сегментов нокодазолом или цитохалазином D наблюдалось статистически значимое усиление расслабляющего действия НП: сосудистые сегменты под влиянием НП (0.005 мкМ) в первом случае расслаблялись до  $33.3 \pm 2.1$  % ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ), в сравнении с  $57.4 \pm 6.3$  % без нокодазола, во втором – расслаблялись полностью ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ).



Как следует из полученных данных, эффективность действия оксида азота на сокращения ГМК, вызванные фенилэфрином, зависит от состояния микрофиламентов и микротубул. При этом, по-видимому, микротубулы в большей степени, чем микрофиламенты участвуют в реализации расслабляющего действия оксида азота на гладкую мышцу аорты.

*4.3. Исследование роли цитоскелета в механизмах регуляции перекисью водорода сокращений гладкой мышцы аорты.* Как показано в ряде исследований [Valen G. et al., 1999; Aksenov M.Y et al., 2001; Dalle-Donne I. et al., 2001] цитоскелет может быть одной из мишеней для АФК. После предобработки сосудистых сегментов колхицином (10 мкМ, 90 мин.) активирующее влияние  $H_2O_2$  на сокращения, вызванные хлоридом калия, статистически значимо не изменялось. МН при действии  $H_2O_2$  (500 мкМ) увеличивалось до  $125.6 \pm 5.1$  % (n=8) от величины гиперкалиевого сокращения в присутствии колхицина.

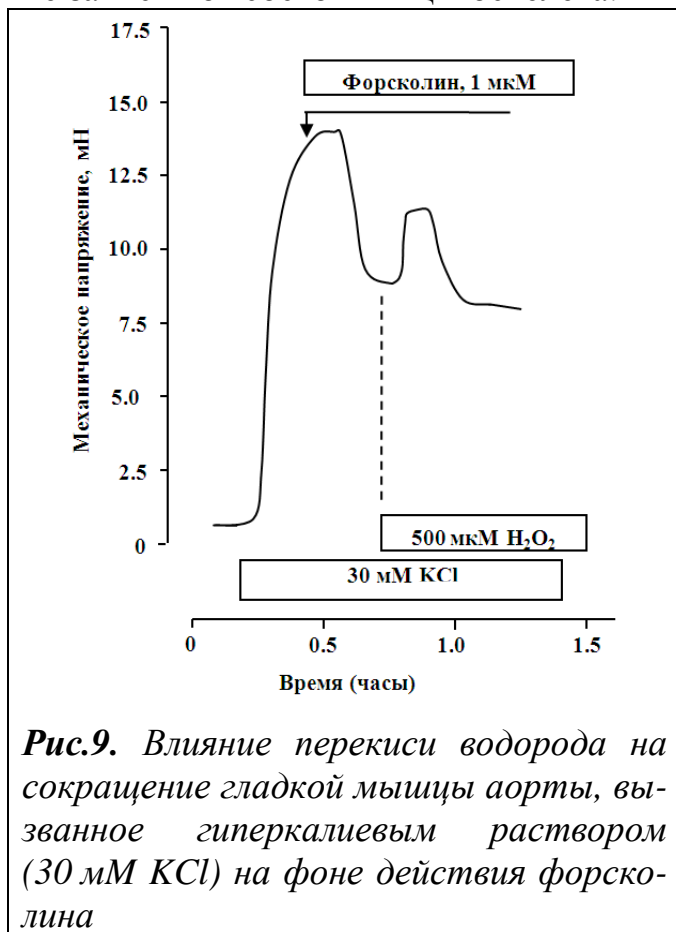
Предобработка сосудистых гладкомышечных препаратов колхицином статистически значимо усиливала расслабляющее действие  $H_2O_2$  на сокращения, вызванные фенилэфрином. Перекись водорода на фоне действия колхицина снижала амплитуду фенилэфрин-индуцированных сокращений до  $16.5 \pm 2.1$  %, против  $48.3 \pm 3.5$  % (n=8,  $p < 0.05$ ) в его отсутствии.

После 60-ти минутной обработки сосудистых сегментов нокодазолом (10 мкМ) активирующее влияние перекиси водорода (500 мкМ) на сокращения гладких мышц, вызванные хлоридом калия, статистически значимо не изменялось: МН составляло  $118.6 \pm 2.9$  % (n=8) от величины гиперкалиевого сокращения в присутствии нокодазола. Расслабляющее влияние перекиси водорода (500 мкМ) на сокращения, вызванные ФЭ, после предобработки сосудистого сегмента нокодазолом (10 мкМ), также не изменялось: МН составляло  $57.2 \pm 3.7$  % (n=6) от амплитуды ФЭ-индуцированного сокращения в присутствии нокодазола.

Обработка сосудистых сегментов цитохалазином D (0.5 мкМ, 30 мин.) не влияла на активацию перекисью водорода (500 мкМ) сокращений, вызванных гиперкалиевым раствором. Механическое напряжение при действии  $H_2O_2$  увеличивалось до  $123.3 \pm 3.5$  % (n=6) от величины гиперкалиевого сокращения в присутствии цитохалазина D. После предобработки гладкомышечных сегментов цитохалазином D (0.5 мкМ, 30 мин.) релаксирующее влияние  $H_2O_2$  (500 мкМ) на сокращения, вызванные ФЭ, статистически значимо увеличивалось. Перекись водорода на фоне действия цитохалазина D снижала амплитуду ФЭ-индуцированных сокращений до  $11.6 \pm 0.8$  %, против  $48.3 \pm 3.5$  % (n=8,  $p < 0.05$ ) в отсутствии только цитохалазина D.

Потенцирование эффектов перекиси водорода на фоне колхицина при фенилэфрин-индуцированном сокращении гладких мышц аорты свидетельствует о вовлечении цитоскелета в механизмы расслабляющего действия  $H_2O_2$ . Данные, полученные в экспериментах с нокодазолом и цитохалазином D, указывают на то, что микрофиламенты, но не микротубулы, участвуют в реализации расслабляющего влияния перекиси водорода на сосудистые ГМ, предсокращенные фенилэфрином. Активирующее влияние

перекиси водорода на сокращения, индуцированные гиперкалиевым раствором, не зависит от состояния цитоскелета.



## 5. Исследование роли перекиси водорода и цитоскелета в регуляции циклическим АМФ сократительной активности сосудистых гладкомышечных клеток

Известно, что цАМФ играет ключевую роль в расслаблении гладких мышц в ответ на стимуляцию  $\beta$ -адренорецепторов и этот процесс обусловлен активацией калиевой проводимости мембраны [Silva A.S., Zanesco A., 2010].

Для увеличения внутриклеточной концентрации цАМФ использовали активатор аденилатциклазы ди-терпен форсколин, который в концентрации 1 мкМ вызывал близкое к полумаксимальному ( $49.7 \pm 7.8$  % от контрольного гиперкалиевого сокращения,  $n=7$ ,  $p<0.05$ ) снижение механического напряжения гладкомышечного препарата, предсокращенного гиперкалиевым раствором.

Перекись водорода (500 мкМ) на фоне действия форсколина (1 мкМ) увеличивала механическое напряжение гладкомышечного препарата, предсокращенного гиперкалиевым раствором на  $24 \pm 4.5$  % ( $n=4$ ,  $p<0.05$ , рис.9), что не отличалось от действия  $H_2O_2$  в отсутствие форсколина ( $25.2 \pm 2.1$  %). Полученные данные указывают на то, что возбуждающее действие  $H_2O_2$  на гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором, не связано с оперированием цАМФ-опосредованной сигнальной системы сосудистых ГМК.

Расслабляющее влияние форсколина на предсокращенные гиперкалиевым раствором гладкомышечные сегменты достоверно не изменялось как после предобработки 10 мкМ колхицина ( $63.9 \pm 9.5$  %,  $n=5$ ,  $p>0.05$ ), так и 10 мкМ винбластина ( $70.1 \pm 13.5$  %,  $n=5$ ,  $p>0.05$ ). На фоне действия 10 мкМ цитохалазина В наблюдалось достоверное усиление релаксирующего действия форсколина. Сосудистый сегмент под влиянием форсколина в этих условиях расслаблялся до  $15.8 \pm 1.34$  % ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ) от величины гиперкалиевого сокращения в присутствии цитохалазина.

Из полученных результатов следует, что эффективность функционирования цАМФ-опосредованной сигнальной системы в ГМК аорты в большей мере зависит от состояния актинового, но не тубулинового элементов цитоскелета. Усиление расслабляющего действия форсколина после обработки гладкой мышцы цитохалазином В может быть свидетельством взаимодействия актино-

вых филаментов и цАМФ-зависимой протеинкиназы в регуляции оперирования потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа.

## 6. Влияние сероводорода на сократительную активность гладкой мышцы аорты

Для изучения влияния и механизмов действия сероводорода в экспериментальной практике широко используется его донор – гидросульфид натрия (NaHS) [Wang R., 2003].

NaHS в концентрациях 5-1000 мкМ не влиял на исходное МН сосудистых сегментов. На фоне гиперкалиевого предсокращения NaHS (5, 10, 50 мкМ) вызывал прирост МН, а в концентрациях 500 и 1000 мкМ сероводород снижал МН гладкомышечных препаратов (табл.4).

При действии 100 мкМ NaHS наблюдалась двухфазная реакция гладкомышечного сегмента: транзиторное увеличение МН до  $127.5 \pm 5.7$  % с последующим снижением констрикции до  $112.2 \pm 2.4$  % ( $n=9$ ,  $p<0.05$ ) от контрольного гиперкалиевого предсокращения.

Таблица 4

### Влияние NaHS на механическое напряжение гладкомышечных сегментов аорты, предсокращенных гиперкалиевым раствором

	Амплитуда сокращений, вызванных гиперкалиевым (30мМ KCl) раствором, %						
	1 мкМ NaHS	5 мкМ NaHS	10 мкМ NaHS	50 мкМ NaHS	100 мкМ NaHS	500 мкМ NaHS	1000 мкМ NaHS
Контроль, $n=9$	$103.9 \pm 1.9$	$109.1 \pm 2.5$ *	$115.9 \pm 3.4$ *	$118.5 \pm 3.5$ *	$112.2 \pm 2.4$ *	$64.9 \pm 7.5$ *	$48.3 \pm 5.0$ *
+Тетраэтил-аммоний (10 мМ), $n=6$	$100.9 \pm 0.6$	$103.8 \pm 0.9$	$104.9 \pm 1.7$ *	$108.5 \pm 2.3$ *	$116.7 \pm 3.7$ *	$106.4 \pm 7.8$ *	$95.4 \pm 7$

\* – статистически значимые различия по сравнению с контрольным гиперкалиевым сокращением ( $p<0.05$ )

На фоне действия тетраэтиламмония (10 мМ) наблюдалось снижение величины констрикторного влияния низких (10 и 50 мкМ) концентраций NaHS и обращение эффекта высоких: МН при действии 500 мкМ NaHS увеличивалось до  $106.4 \pm 7.8$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ), а расслабление ГМ, вызываемое добавлением 1000 мкМ NaHS значимо уменьшалось (табл. 4).

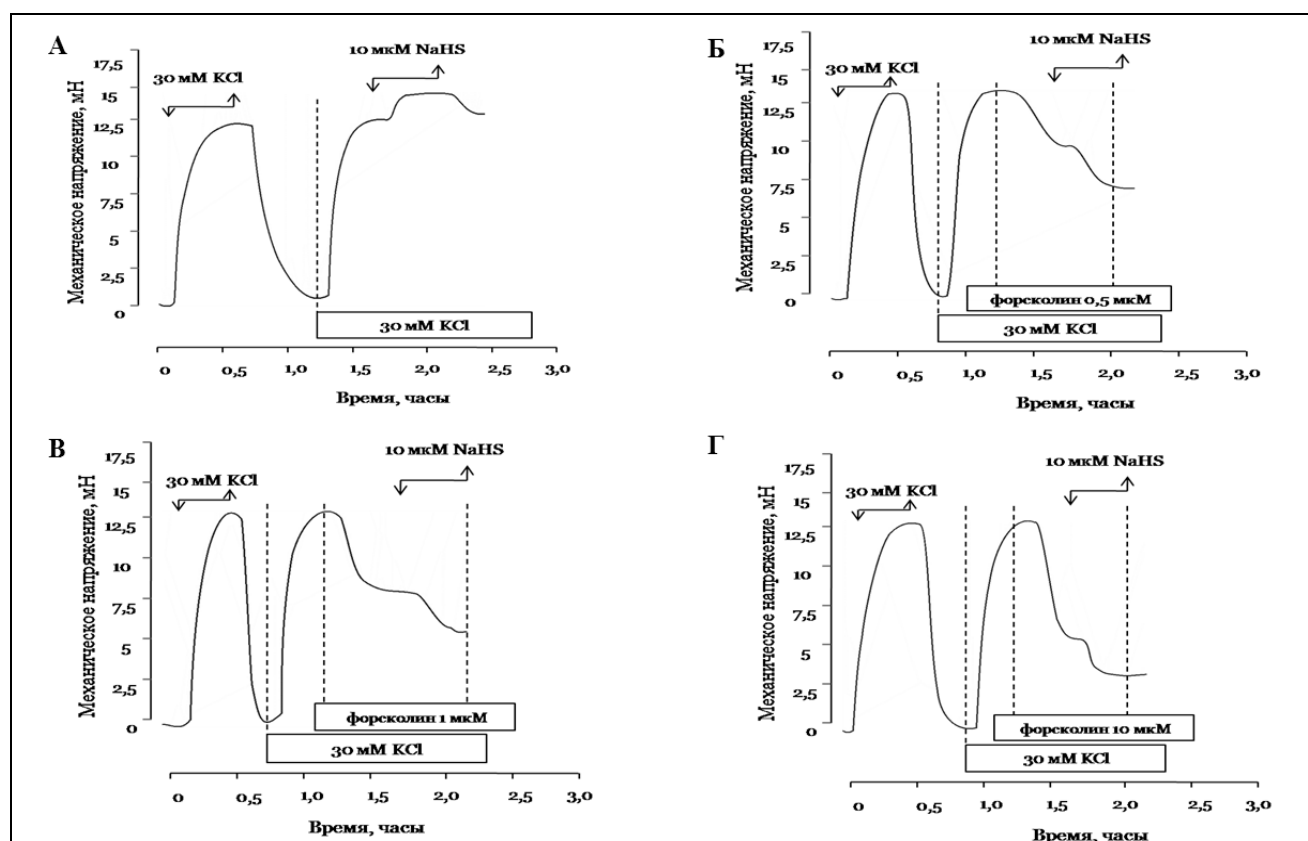
NaHS во всем диапазоне концентраций (5-1000 мкМ) приводил к снижению МН гладкомышечных сегментов, предсокращенных ФЭ (10 мкМ) (табл.5). На фоне действия тетраэтиламмония релаксирующее действие NaHS на ФЭ-индуцированное сокращение уменьшалось (табл. 5).

### Влияние NaHS на механическое напряжение гладкомышечных сегментов аорты, предсокращенных раствором фенилэфрина

	Амплитуда сокращения, вызванного фенилэфрином (10 мкМ), %						
	1 мкМ NaHS	5 мкМ NaHS	10 мкМ NaHS	50 мкМ NaHS	100 мкМ NaHS	500 мкМ NaHS	1000 мкМ NaHS
Контроль, n=6	98.8±1.4	89.8±4.1 *	83.0±6.2 *	62.1±7.3 *	44.2±7.2 *	33.8±7.5 *	17.8±8.1 *
+Тетраэтиламмоний (10 мМ), n=9	108.04±3.4 *	111.9±5.34 *	109.4±4.7 *	113.7±9.0 *	77.6±9.7 *	61.6±6.2 *	54.9±3.6 *

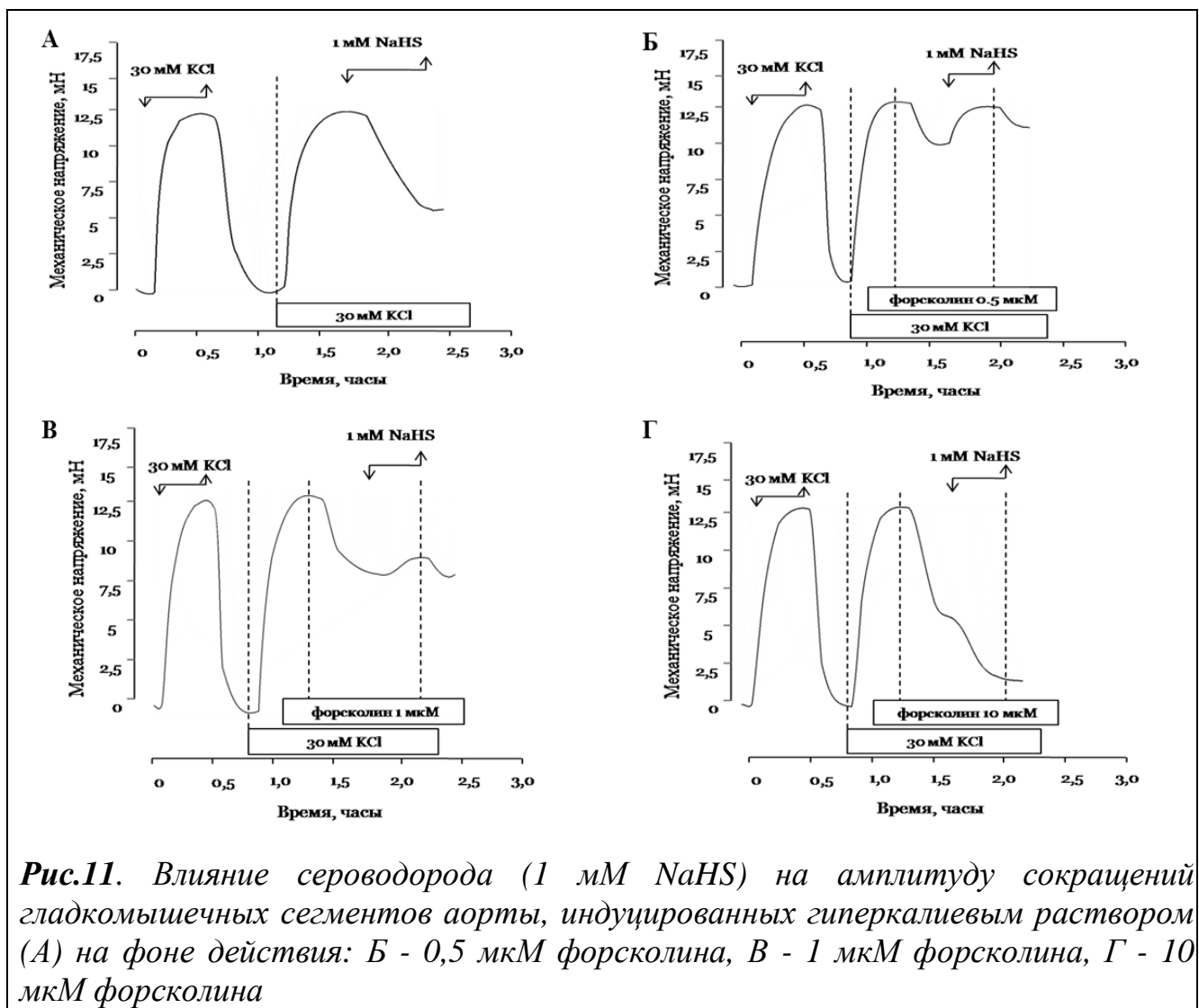
\* – статистически значимые различия по сравнению с фенилэфрин-индуцированным сокращением ( $p < 0.05$ )

На фоне действия форсколина (0,5, 1 и 10 мкМ) NaHS в концентрации 10 мкМ оказывал расслабляющее действие, величина которого составила 25.1±3.4 % ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ), 19.4±2.3 % и 16.6±2.7 % ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ) от величины контрольного гиперкалиевого сокращения, соответственно (рис.10).



**Рис.10** Влияние сероводорода (10 мкМ NaHS) на амплитуду сокращений гладкомышечных сегментов аорты, индуцированных гиперкалиевым раствором (А) и на фоне действия: Б - 0,5 мкМ форсколина, В – 1 мкМ форсколина, Г - 10 мкМ форсколина

Релаксирующее действие NaHS в концентрации 1000 мкМ в присутствии 0.5 и 1 мкМ форсколина обращалось на констрикторное: механическое напряжение гладкомышечного сегмента, предсокращенного гиперкалиевым раствором, повышалось на  $21.0 \pm 4.1$  % и  $9.3 \pm 2.6$  % от величины контрольного гиперкалиевого сокращения ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ), соответственно (рис. 11). На фоне 10 мкМ форсколина NaHS (1000 мкМ) вызывал расслабление гладкой мышцы, величина которого составила  $38.0 \pm 6.4$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) от величины контрольного гиперкалиевого сокращения.



**Рис.11.** Влияние сероводорода (1 мМ NaHS) на амплитуду сокращений гладкомышечных сегментов аорты, индуцированных гиперкалиевым раствором (А) на фоне действия: Б - 0,5 мкМ форсколина, В - 1 мкМ форсколина, Г - 10 мкМ форсколина

Полученные данные свидетельствуют о взаимодействии  $H_2S$  и цАМФ-опосредованной внутриклеточной сигнальной системы в сосудистых ГМК. Величина и направленность сократительных реакций сосудистых сегментов зависела от внутриклеточной концентрации циклического АМФ. Увеличение форсколином внутриклеточной концентрации цАМФ приводило к устранению активирующего ГМ действия низких (10 мкМ) концентраций сероводорода и инверсии влияния высоких (1000 мкМ) при концентрациях форсколина 0.5 и 1 мкМ.

## 7. Влияние активных форм кислорода на механизмы сопряжения возбуждение-сокращение гладкомышечных клеток мочеточника

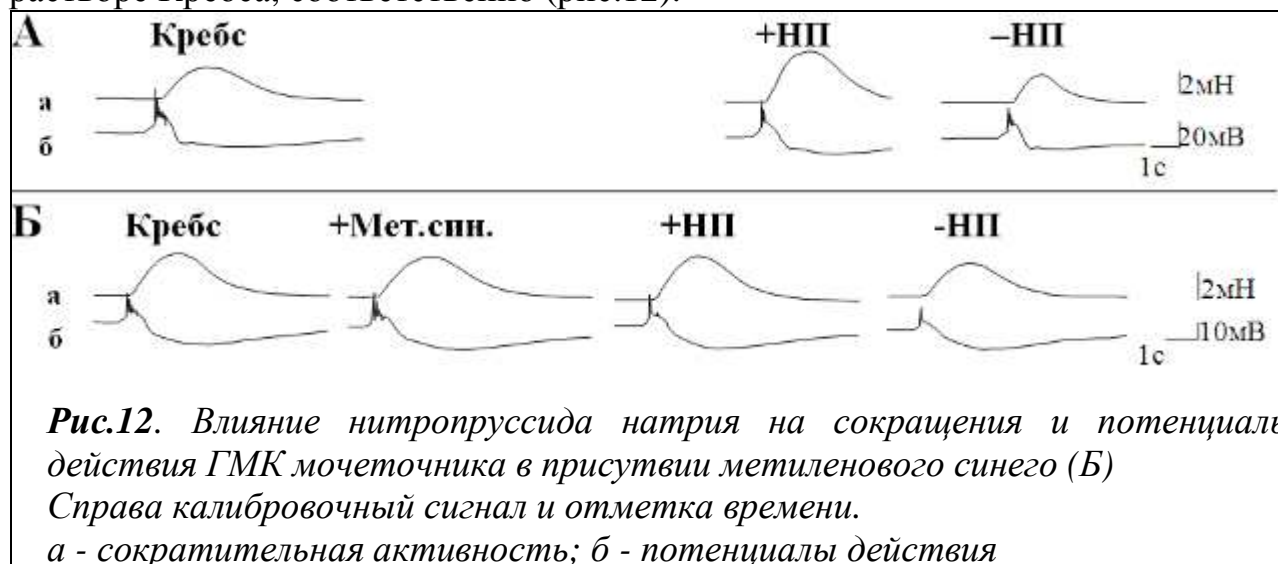
7.1. Исследование влияния нитропруссид натрия на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника. Одновременная регистрация электрической и сократительной активности ГМК препаратов аорты в условиях двойного сахарозного моста затруднена из-за большого содержания в ее стенке соединительной ткани. Поэтому для выяснения участия АФК в сопряжении возбуждения-сокращения в ГМК, исследования проводились на изолированных препаратах мочеточника морской свинки, который является классическим для подобного рода исследований и наиболее изученным объектом.

После 40 минут отмывания препаратов нормальным раствором Кребса в ответ на пороговые и сверхпороговые деполяризующие электрические стимулы регистрировались типичные для ГМК мочеточника потенциалы действия (ПД) и сокращения.

При добавлении в перфузионный раствор нитропруссид натрия в концентрациях 0.1-1000 мкМ исходное МН и мембранный потенциал покоя (МП) ГМК мочеточника не изменялись.

Присутствие НП не влияло на вольт-амперные характеристики мембраны ГМК мочеточника. Эти данные свидетельствуют о том, что НП не изменяет потенциал-зависимую калиевую проводимость мембраны гладкомышечных клеток мочеточника.

Нитропруссид натрия в концентрациях 0.01-50 мкМ не влиял на вызванную деполяризующим током электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника. При добавлении 100 мкМ НП плато потенциалов действия и амплитуда сокращений увеличивались до  $113.2 \pm 6.1\%$  и  $130.4 \pm 7.2\%$  ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ) относительно исходных значений в нормальном растворе Кребса, соответственно (рис.12).



Для изучения роли растворимой гуанилатциклазы в реализации эффектов НП использовался ингибитор ГЦ метиленовый синий.

Метиленовый синий в концентрации 10 мкМ не влиял на исходный уровень МП и МН, а также на вызванные ПД и сокращения, но полностью

устранял влияние нитропруссид натрия на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника (рис.12).

Полученные данные указывают на то, что основной мишенью для нитропруссид натрия в ГМК мочеточника, как и в сосудах, является растворимая ГЦ.

Блокирование калиевых каналов тетраэтиламмонием (5 мМ) вызывало увеличение амплитуды, длительности плато ПД и силы сокращений ГМК мочеточника до  $121.2 \pm 9.1$  %,  $216.3 \pm 23.3$  % и  $157.3 \pm 18.1$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ) относительно контрольных значений в нормальном растворе Кребса, соответственно. На фоне действия тетраэтиламмония нитропруссид натрия в концентрации 100 мкМ увеличивал амплитуду пикового компонента, длительность плато ПД и амплитуду сокращений ГМК мочеточника на  $11.4 \pm 6.1$  %,  $21.4 \pm 9.2$  % и  $27.1 \pm 6.0$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ) относительно исходных значений в присутствии тетраэтиламмония, соответственно. В отсутствие тетраэтиламмония эти параметры составляли  $12.2 \pm 5.1$  %,  $13.4 \pm 4.1$  % и  $30.6 \pm 6.1$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ) относительно контрольных значений в нормальном растворе Кребса.

Таким образом, активирующее действие НП на ПД и сокращения ГМК мочеточника в нормальном растворе Кребса не связано с изменением потенциал-зависимого и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого компонентов калиевой проводимости мембраны ГМК.

*7.2. Влияние модуляторов состояния цитоскелета на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника.* После обработки гладкомышечных препаратов колхицином (10 мкМ, 90 мин.), происходило уменьшение амплитуды пикового компонента до  $86.5 \pm 3.6$  % без изменения длительности плато ПД и снижение силы сокращений до  $84.3 \pm 2.6$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ) относительно контрольных значений в нормальном растворе Кребса.

В отличие от этого, винбластин (10 мкМ, 60 мин.) не влиял на амплитуду пикового компонента, но вызывал увеличение длительности плато ПД и амплитуды сокращений до  $136.0 \pm 16.3$  % и  $127.0 \pm 13.3$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ) в сравнении с контрольными значениями в нормальном растворе Кребса, соответственно.

Цитохалазин В (10 мкМ, 40 мин.) снижал амплитуду пикового компонента ПД и сокращений ГМК до  $34.2 \pm 7.1$  % и  $21.7 \pm 1.4$  % ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ) относительно контрольных значений в нормальном растворе Кребса, соответственно. Длительность плато ПД при действии цитохалазина В не изменялась.

Эти данные свидетельствуют о том, что разрушение микрофиламентов цитохалазином В и микротубул винбластином оказывает разнонаправленное влияние на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника. Угнетение ПД и сокращений цитохалазином В может быть обусловлено снижением потенциал-зависимой кальциевой проводимости мембраны ГМК, которая контролируется микрофиламентами [Nakamura M. et al., 2000].

Известно, что в формировании плато ПД ГМК мочеточника участвуют медленные потенциал-зависимые натриевые и кальциевые токи мембраны.

Можно предположить, что дезинтеграция микротубул винбластином приводит к увеличению натриевого и (или) снижению медленного кальциевого тока. В последнем случае увеличение длительности плато связано с ослаблением лимитирующего его длительность выходящего кальций-активируемого калиевого тока [Баскаков М.Б. с соавт., 1994]. Активирующее сокращение влияние винбластина отсутствовало в сосудистых гладких мышцах, что может служить указанием на особенности участия микротубул в сопряжении возбуждения-сокращения различных типов ГМК.

Форсколин в концентрации 1 мкМ вызывал снижение амплитуды пикового компонента ПД до  $85.6 \pm 3.0$  %, длительности плато до  $35.7 \pm 4.5$  % и силы сократительного ответа до  $20.1 \pm 5.0$  % в сравнении с контрольными значениями в нормальном растворе Кребса ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ).

Угнетающее действие форсколина на ПД в большей степени связано с активацией калиевой проводимости мембраны гладкомышечных клеток, что подтверждают эксперименты с блокатором калиевых каналов тетраэтиламмонием. На его фоне амплитуда, длительность плато ПД и сила сокращений после добавления форсколина составляли  $105.7 \pm 15.1$  %,  $135.4 \pm 12.0$  %,  $155.1 \pm 14.4$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ), соответственно, относительно контроля в растворе Кребса.

После предобработки препаратов колхицином (10 мкМ) форсколин вызывал снижение амплитуды пикового компонента ПД, длительности плато и силы сократительного ответа до  $83.9 \pm 5.1$  %,  $38.3 \pm 7.1$  % и  $23.0 \pm 6$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) в сравнении с контрольными значениями в нормальном растворе Кребса, соответственно, что достоверно не отличалось от действия форсколина в отсутствие колхицина.

Предобработка цитохалазином В не влияла на угнетающий эффект форсколина в ГМК мочеточника. Амплитуда, длительность плато ПД и величина сократительных ответов ГМК при действии форсколина снижались до  $87.9 \pm 3.0$  %,  $35.8 \pm 6.2$  %,  $21.4 \pm 7.1$  % ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ) относительно значений в нормальном растворе Кребса, соответственно. Эти величины близки к контрольным без предобработки цитохалазином.

На фоне винбластина длительность плато ПД и амплитуда сокращений под влиянием форсколина снизились лишь до  $85.8 \pm 9.1$  % и  $58 \pm 6$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) относительно контрольных значений в отсутствие винбластина, соответственно.

Таким образом, угнетающее действие форсколина на ПД и сокращения ослаблялось винбластином, но не колхицином или цитохалазином В. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что в ГМК мочеточника цАМФ-опосредованная сигнальная система оперирует с участием микротубул.

Стимулирующее влияние нитропруссид натрия на фоне действия колхицина усиливалось: при добавлении 100 мкМ НП длительность плато ПД и амплитуда сокращений увеличивались до  $133.6 \pm 3.4$  % и  $149.5 \pm 5.3$  % ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ), в сравнении с контрольными значениями в нормальном растворе Кребса в присутствии колхицина, тогда как в отсутствие колхицина эти



параметры составляли  $113.6 \pm 6.3$  % и  $130.7 \pm 7.2$  % ( $n=7$ ,  $p < 0.05$ ) относительно контрольных значений в нормальном растворе Кребса.

На фоне действия цитохалазина В нитропруссид натрия, также как и в нормальном растворе Кребса, повышал длительность плато ПД и амплитуду сокращений ГМ мочеточника на  $9.1 \pm 6.2$  % и  $28.5 \pm 4.2$  % ( $n=7$ ,  $p < 0.05$ ) относительно исходных значений в присутствии цитохалазина В.

После предобработки гладкомышечного препарата винбластином НП не влиял на амплитуду пикового компонента и длительность плато ПД, амплитуда сокращений ГМК мочеточника при этом увеличивалась до  $111.7 \pm 6.3$  % ( $n=5$ ,  $p < 0.05$ ) относительно исходных значений в присутствии винбластина, тогда как в отсутствие дезинтегратора микротубул этот параметр составлял  $130.5 \pm 7.4$  % ( $n=7$ ,  $p < 0.05$ ) относительно контрольных значений в нормальном растворе Кребса.

Из полученных результатов следует, что эффективность оперирования цГМФ-опосредованной сигнальной системы в ГМК мочеточника в большей мере зависит от состояния тубулинового, но не актинового элементов цитоскелета.

*7.3. Исследование влияния перекиси водорода на потенциалы действия и сокращения ГМК мочеточника.*  $H_2O_2$  в концентрации 1 мкМ не оказывала влияния на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника, тогда как в концентрациях 10, 100 и 500 мкМ вызывала снижение амплитуды пикового компонента ПД до  $79.4 \pm 14.1$  %,  $52.7 \pm 9.2$  %,  $18.5 \pm 8.3$  % ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ) и амплитуды сокращений до  $84.3 \pm 7.3$  %,  $61.5 \pm 7.2$  % и  $12.4 \pm 9.1$  % ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ) относительно исходных значений в нормальном растворе Кребса, соответственно. В последующих экспериментах использовали перекись водорода в концентрации 100 мкМ, при действии которой наблюдались близкие к полумаксимальным изменения исследуемых параметров.

В присутствии тетраэтиламмония (5 мМ) перекись водорода в концентрации 100 мкМ не оказывала статистически значимого влияния на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что угнетающее ПД и сокращения ГМК мочеточника влияние перекиси водорода в нормальном растворе Кребса связано с повышением калиевой проводимости мембраны исследуемых клеток.

*7.4. Влияние нитропрусида натрия на объем-зависимую регуляцию электрической и сократительной активности ГМК мочеточника.* Как уже указывалось выше, НКСС вовлечен в объем-зависимую регуляцию сократительной активности сосудистых ГМК [Lang F. et al., 1998; Mongin A.A., Orlov S.N., 2001; Anfinogenova Y.D. et al., 2004]. Ингибитор НКСС буметанид в концентрации 10 мкМ на 8-10 минуте действия вызывал гиперполяризацию мембраны и снижение силы сокращений ГМК мочеточника до  $83 \pm 12$  % ( $n=9$ ,  $p < 0.05$ ) относительно контрольных значений в нормальном растворе Кребса. Амплитуда и длительность плато потенциала действия не изменялись. В более высоких концентрациях (50–100 мкМ) буметанид не влиял на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника.

На фоне блокирования калиевых каналов тетраэтиламмонием (5 мМ) добавление 10 мкМ буметанида приводило к уменьшению длительности плато ПД и амплитуды сокращений ГМК мочеточника до  $80.6 \pm 16.2$  % и  $76.4 \pm 18.3$  % ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ) от контрольных значений в нормальном растворе Кребса, соответственно.

В присутствии 100 мкМ нитропруссид натрия добавление 10 мкМ буметанида вызывало снижение электрической и сократительной активности ГМК мочеточника. Амплитуда пикового компонента ПД и сокращений составляли  $78.5 \pm 15.2$  % и  $79.7 \pm 13.5$  % ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ) относительно контрольных значений в присутствии НП, соответственно. Величина анэлектротонических потенциалов и длительность плато ПД не изменялись.

Увеличение концентрации буметанида в растворе до 100 мкМ на фоне нитропруссид натрия приводило к еще большему угнетению сокращений ГМК мочеточника: амплитуда сокращений составляла  $71.5 \pm 4.2$  % ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ) относительно контрольных значений в присутствии НП. Предобработка гладкомышечных препаратов буметанидом ослабляла активацию сокращений ГМК мочеточника нитропруссидом натрия. Так, при добавлении 100 мкМ НП на фоне действия 10 мкМ буметанида амплитуда сокращений составляла  $80.7 \pm 12.5$  % ( $n=11$ ,  $p < 0.05$ ) от контрольных значений в присутствии НП. Достоверных изменений электрической активности ГМК не наблюдалось ( $p > 0.05$ ).

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что активация оксидом азота сокращений ГМК мочеточника, по крайней мере, частично, связана со стимуляцией НКСС.

### Заключение

На протяжении многих десятилетий в центре внимания исследователей находятся ключевые механизмы внутриклеточной трансдукции сигналов, в том числе обусловленные активными формами кислорода (АФК). АФК вовлечены во внутри- и межклеточную коммуникацию во всех клетках, тканях и органах. Несмотря на то, что их функция аналогична таковой для классических посредников (органические молекулы и  $Ca^{2+}$ ), АФК имеют отличительные признаки. Так как они – растворимые в липидах молекулы, их деятельности не препятствуют клеточные мембраны, хранение этих транзиттеров в везикулах или органеллах для более позднего освобождения также невозможно. Однако, допускается, что NO может быть связан с гемсодержащими белками и при определенных условиях освобождаться от них, и тогда, очевидно, преобладает другой механизм генерации и регуляции величины внутриклеточного сигнала – это *de novo* синтез посредника [Ding Y. et al., 1999].

Сочетание деструктивных и защитных эффектов активных форм кислорода (NO,  $H_2O_2$  и др.) позволяют считать их одними из центральных фигур в поддержании жизнеобеспечения клеток, основанном на балансе между физиологическими и патофизиологическими процессами. Исследование редокс-модуляции функций клеток представляет определенные трудности, во-первых потому, что АФК могут не только изменять эффекты вторичных мессенджеров, но и сами выполнять их функции и, во-вторых, нет надежных

специфичных инструментов для управления уровнем таких молекул и они способны легко и быстро модифицировать многие аминокислотные остатки, в том числе цистеина, метионина, гистидина, триптофана и тирозина.

В проведенном исследовании показано, что NO расслабляет сосудистые гладкие мышцы предсокращенные всеми исследуемыми факторами: деполяризацией мембраны, активацией  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов, набуханием и стрижкой клеток. Наиболее чувствительными к действию NO являются сосудистые ГМК, стимулированные фенилэфрином.

К настоящему времени накоплено большое количество данных о механизмах действия NO. Оксид азота индуцирует NO-зависимые внутриклеточные процессы посредством активации цитозольного фермента – растворимой гуанилатциклазы [Реутов В.П., Орлов С.Н., 1993; Drewett J.G., Garbers D.L., 1994; Северина И.С., 2002]. Установлены молекулярные мишени, которые могут регулироваться PKG, в том числе  $Ca^{2+}$ -активируемые  $K^+$ -каналы [Robertson B.E. et al., 1993; Stockand J.D., Sansom S.C., 1996; Yang J. et al., 2005],  $Ca^{2+}$  каналы L-типа [Tewari K., Simard J.M., 1997],  $Ca^{2+}$ -депонирующие и механизмы, выводящие  $Ca^{2+}$  из ГМК ( $Ca^{2+}$ -насосы саркоплазматического ретикулума и плазмалеммы) [Yoshida Y. et al., 1991], киназа и фосфатаза легких цепей миозина [Lee M.R. et al., 1997]. Есть сведения о существовании цГМФ-независимого механизма регуляции NO [Sobey C.G., Faraci F.M., 1997; Alonso-Galicia M. et al., 1999]. Показано, что TRPC6-каналы вовлечены в регуляцию NO-цГМФ-PKG пути [Takahashi S. et al., 2008]. Действие доноров NO – нитросоединений на электрические и сократительные свойства ГМК достаточно полно исследовано [Капилевич Л.В. с соавт., 1995-2005; Ковалев И.В. с соавт., 1997-2004]. Было показано, что потенциал-зависимые эффекты доноров оксида азота связаны с угнетением кальциевой и/или натриевой проводимостей и повышением калиевой проводимости мембраны ГМК за счет ее кальций-зависимого и АТФ-чувствительного компонентов. Потенциал-нечувствительные механизмы расслабляющего действия оксида азота на ГМК связаны с угнетением С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы этих клеток.

Наряду с вышеперечисленными путями реализации эффектов NO, проведенное исследование позволяет заключить, что сигнальные каскады, индуцируемые оксидом азота, оперируют с участием микрофиламентов и микротубул. Элементы цитоскелета вовлечены в реализацию цГМФ-зависимого и независимого от этого циклического нуклеотида действия NO на механическое напряжение гладкой мышцы аорты. Эффективность расслабляющего действия NO в гладкомышечных клетках аорты зависит от состояния микротубул и микрофиламентов. При этом они вовлечены в различные процессы, которые являются мишенями для NO. По-видимому, микрофиламенты контролируют внутриклеточные системы или процессы поддерживающие сокращение, напротив, микротубулы прямо или опосредованно участвуют в реализации расслабляющего действия оксида азота.

Оксид азота выступает не только в роли регуляторной молекулы с характерными для первичного и/или вторичного посредника свойствами, но и является по своей химической структуре газом и активной формой кислорода.

Функциональным антагонистом оксида азота является нейтрализующий его супероксид анион, продуцируемый эндотелиоцитами и гладкомышечными клетками. Однако короткий период жизни супероксид аниона ограничивает роль этой АФК как аутокринного, а тем более паракринного регулятора в сосудах. Его метаболит, перекись водорода, является устойчивой молекулой, и основные эффекты супероксид аниона связывают с действием  $H_2O_2$ .

В проведенном исследовании показано, что аппликация  $H_2O_2$  приводит к дополнительному увеличению механического напряжения сосудистых сегментов, вызванного деполяризацией мембраны гиперкалиевым раствором и гипоосмотическим набуханием ГМК. В последнем случае сокращение обусловлено деполяризацией мембраны входящим хлорным током вследствие увеличения электрохимического потенциала этих анионов в гипохлорном гипотоническом растворе и открыванием объем-зависимых и  $Ca^{2+}$ -активируемых  $Cl^-$ -каналов [Anfinogenova Y.D. et al., 2004]. Констрикторное действие  $H_2O_2$  документировано и в условиях активации форсколином цАМФ-опосредованной сигнальной системы сосудистых ГМК.

Как указывалось выше (гл.5) активатор аденилатциклазы форсколин вызывает расслабление деполяризованных гиперкалиевым раствором сосудистых сегментов. В литературе имеется много сведений о влиянии активации цАМФ-опосредованного сигнального пути на сокращения гладких мышц, индуцированные деполяризацией мембраны ГМК [Komalavilas P. et al., 2001; Pulver-Kaste R.A. et al., 2006; Luykenaar K.D., Welsh D.G., 2007], действием агонистов [Kornfeld M., 2001] раздражением механорецепторов [Mills I. et al., 1990; Iba T. et al., 1992; Cohen .CR. et al., 1997], а также изменением объема клеток [Sandau K.B. et al., 2001; Orlov S.N. et al., 2004]. Феноменология действия агентов, индуцирующих увеличение активности цАМФ однообразна: во всех исследованных типах гладких мышц увеличение внутриклеточной концентрации аденилатциклазы.

Несмотря на многочисленные исследования, вопрос о роли  $H_2O_2$  в регуляции сосудистого тонуса и сократительных ответов ГМК на действие различных возбуждающих и релаксирующих агентов не нашел удовлетворительного решения. Убедительно продемонстрированы как констрикторное, так и расслабляющее влияние  $H_2O_2$ , зависящие от вида, принадлежности сосуда к определенному руслу и его состояния [Yang Z. et al., 1998; Taddei S. et al., 1998; Yang Z.W. et al., 1999; Gao Y.J., Lee R.M., 2001; Blumenstein A., 2004].

Вероятно, в механизмы констрикторного действия  $H_2O_2$  вовлечены потенциал-зависимые  $Ca^{2+}$ -каналы [Sotnikova R., 1998; Yang Z.W. et al., 1999], так же как и кальций-освобождающие молекулярные структуры саркоплазматического ретикулума [Favero T.G. et al., 1995; Yang Z. et al., 1998], ингибирование  $Ca^{2+}$ -АТФазы [Grover A.K. et al., 1992]. Допускается выход  $Ca^{2+}$  из митохондрий через образование гидроксильного радикала [Redondo P.C. et al., 2004]. Все эти процессы объединяет общий конечный результат – увеличение внутриклеточной концентрации и принадлежность к кальмодулиновой ветви кальциевой сигнальной системы. Таким образом,  $H_2O_2$

является важным модулятором оперирования этого пути внутриклеточной сигнализации, и ее констрикторное действие на предсокращенную гиперкалиевым раствором гладкую мышцу аорты может быть реализовано через многочисленные молекулярные мишени.

Наряду с этим,  $H_2O_2$  индуцирует сокращение сосудистых ГМК, предобработанных форсколином. т.е. в условиях активации цАМФ-опосредованной сигнальной системы. Имеются данные о том  $H_2O_2$  не влияет на прирост внутриклеточной концентрации цАМФ [Jackson T.C. et al., 2004; Kim S.H. et al., 2007]. Следовательно, сокращение, вызываемое перекисью водорода в условиях действия форсколина на предсокращенные гиперкалиевым раствором ГМ, по всей вероятности, обусловлено влиянием на молекулярные мишени, реализующие эффекты цАМФ и  $Ca^{2+}$ .

Вторая группа механизмов, индуцирующих констрикцию сосудистых ГМК и подверженных влиянию перекиси водорода, прямо не связана с увеличением внутриклеточного кальция. Это активация тирозин-киназы [Yang Z. et al., 1998, 1999; Oeckler R.A. et al., 2003], циклооксигеназы [Gao Y.J., Lee R.M. 2001], ПК-С [Yang Z. et al., 1998, 1999], митоген-активируемой протеинкиназы [Yang Z. et al., 1998; Oeckler R.A. et al., 2003, 2005], Rho-киназы [Thakali K. et al., 2005] и фосфорилирование ЛЦМ [Jin N., Rhoades R.A., 1997]. Некоторые из этих путей могут быть определены как кальций-сенситизирующие, т.е. повышающие генерацию мышцей силы без увеличения внутриклеточного кальция [Somlyo A.P., Somlyo A.V., 2003]. Это приводит к увеличению фосфорилирования ЛЦМ главным образом через ингибирование фосфатазы ЛЦМ, но могут влиять и на активность киназы ЛЦМ, действовать через белки теплового шока, через механизмы, вовлекающие актиновую регуляцию сократительного аппарата ГМК (кальдесмон и кальпонин). Фосфатаза ЛЦМ ингибируется при фосфорилировании интегрин-связанной киназой [Deng J.T. et al., 2001; Muranyi A. et al., 2002], ПК-С [Li L. et al., 1998] и Rho-киназой [Kimura K. et al., 1996; Koyama M. et al., 2000; Jin L. et al., 2004]. Последнее следует особо подчеркнуть в связи с полученными данными о роли цитоскелета в реализации модулирующего действия АФК. Rho-киназа ассоциирована с микротубулами, активируется АФК [Jin L. et al., 2004] и может быть прямо вовлечена в констрикторное действие  $H_2O_2$  [Thakali K. et al., 2005].

Учитывая потенциалозависимость констрикторного действия  $H_2O_2$  на сосудистые сегменты, предсокращенные гиперкалиевым раствором, наиболее вероятным представляется вовлечение группы молекулярных мишеней, воздействие на которые не влечет за собой повышения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ . Вместе с тем, нельзя исключить и влияние  $H_2O_2$  на кальциевые пулы и кальциевый насос саркоплазматического ретикулума. Наконец,  $H_2O_2$  может приводить к вазоконстрикции через MAPK [Klemke R.L. et al., 1997; D'Angelo G., Adam L.P., 2002]. Показано участие MAPK в сокращении брыжеечной артерии, деполяризованной гиперкалиевым раствором [Lucchesi P.A. et al., 2005]. Активация перекисью водорода сокращений при гипоосмотическом набухании клеток, вероятно, имеет ту же природу, что и усиление сокращений, вызванных гиперкалиевым раствором.

В проведенном исследовании показано, что  $H_2O_2$  расслабляет изолированные сегменты аорты, предсокращенные фенилэфрином. Эти данные согласуются с литературными [Yang Z. et al., 1999; Ellis A. et al., 2003] и подтверждаются наблюдениями, сделанными на других сосудах [Fujimoto S. et al., 2001; Matoba T. et al., 2002; Lucchesi P.A. et al., 2005]. Некоторые авторы отмечают эндотелий-зависимый характер этой релаксации сосудов [Bharadwaj L. et al., 1995; Yang Z. et al., 1998, 1999; Hirai T. et al., 2000]. Однако, в проведенных экспериментах установлен эндотелий независимый путь, используемый перекисью водорода для расслабления сосудов при агонист-стимулированном предсокращении. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями [Burke-Wolin T.M. et al., 1991; Barlow R.S. et al., 1998; Fujimoto S. et al., 2001; Lucchesi P.A. et al., 2005]. Для объяснения полученных результатов предлагаются различные механизмы. Так допускается, что  $H_2O_2$ -индуцированная эндотелий-независимая релаксация обусловлена активацией гуанилатциклазы и аккумуляцией цГМФ [Burke-Wolin T.M. et al., 1991; Fujimoto S. et al., 2001, 2003]. Принципиально иной подход состоит в том, что  $H_2O_2$ -индуцированная релаксация агонист-предсокращенных сосудов обусловлена активацией  $Ca^{2+}$ -зависимых [Thengchaisri N., Kuo L., 2003; Barlow R.S. et al., 2000], АТФ-чувствительных [Wei E.P. et al., 1996; Gao Y-J. et al., 2003] и потенциал-зависимых  $K^+$ -каналов [Gao Y-J. et al., 2003]. В проведенных экспериментах тетраэтиламмоний не оказывал влияния на расслабляющее действие  $H_2O_2$  в предсокращенных фенилэфрином гладкомышечных сегментах аорты. Эти данные указывают на то, что действие  $H_2O_2$  в этих случаях не связано с модуляцией потенциал-зависимой и  $Ca^{2+}$ -активируемой калиевой проводимости мембраны сосудистых ГМК. В этой связи более предпочтительным представляется цГМФ-опосредованный механизм  $H_2O_2$ -индуцированного расслабления ГМК аорты, молекулярные мишени которого обсуждались выше.

Представленные данные о том, что  $H_2O_2$  на фоне колхицина при фенилэфрин-индуцированном сокращении гладких мышц аорты вызывает достоверно большее расслабление, чем в контроле, свидетельствуют о вовлечении цитоскелета в механизмы расслабляющего действия  $H_2O_2$ . Данные, полученные в экспериментах с избирательной дезинтеграцией элементов цитоскелета нокодазолом и цитохалазином D, указывают на то, что микрофиламенты, но не микротрубулы, опосредуют расслабляющее влияние перекиси водорода в гладкой мышце предсокращенной фенилэфрином.

В отличие от сокращений гладкой мышцы, вызванных фенилэфрином, величина которых цитоскелет-зависимо модулируется перекисью водорода, активирующее действие  $H_2O_2$  на сократительные ответы ГМК при деполяризации мембраны гиперкалиевым раствором не зависит от состояния цитоскелета.

В регуляцию разнообразных функций клеток, включая сокращение гладких мышц, пролиферацию, рост, программируемую гибель и некроз, вовлечен клеточный объем. Механизмы связи объема клеток и регуляции их сократительной активности остаются мало изученными. Вместе с тем, показано, что модуляция объема клеток влияет на оперирование основных

сигнальных систем клеток, равно как и аппликация биологически важных веществ, активирующих сигнальные системы, во многих случаях ведет к изменению объема клеток.

Проведенное исследование убедительно показывает, что разрушение микрофиламентов, а следовательно, и изменение уровня соотношения F/G-актина, играет ключевую роль в сокращениях ГМК сосудов, индуцированных модуляцией клеточного объема.

В отличие от гипер- и изоосмотического сокращений гладких мышц, при гипоосмотическом набухании ГМК активируется потенциал-зависимый вход ионов кальция. В этом смысле механизмы индукции сокращений при гиперкалиевой деполяризации мембраны и набухании ГМК сходны. Действительно, проведенные исследования на гладкомышечных сегментах аорты показали, что перекись водорода вызывает однонаправленную сократительную реакцию на гиперкалиевый и гипоосмотический растворы.

Донор NO нитропруссид натрия в отличие от  $H_2O_2$  вызывал снижение механического напряжения при действии гиперосмотического раствора и изоосмотической стрикции, и не влиял на гипоосмотическое сокращение.

Таким образом, представленные экспериментальные данные, полученные с цитоскелет-модифицирующими агентами, убедительно свидетельствуют о том, что совместно с регуляцией процессов сопряжения возбуждения-сокращения в ГМК уникальными механизмами внутриклеточной сигнализации, эффективно оперируют процессы, связанные с реорганизацией цитоскелета. Ремоделирование цитоскелета регулируется внешними и внутренними сигналами в пространстве и времени и участвует в обеспечении адаптации клеток к окружающей среде, равно как и в регуляции биологической подвижности.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании особой ветви регуляции сократительной активности сосудистых ГМК, включающей специфический объем-зависимый ионный транспорт. Изменение объема клеток является своеобразным сигнальным механизмом, который может запускать сокращение гладкомышечных клеток и модулировать возбуждающее действие физиологически активных соединений и деполяризации мембраны ГМК.

Известно, что  $H_2S$  обладает выраженным защитным действием против повреждения при ишемии/реперфузии миокарда. Один из предполагаемых механизмов реперфузионных повреждений включает генерацию, аккумуляцию и освобождение различных АФК с одновременным расходом эндогенных антиоксидантов [Hu F.L. et al., 1993; Zhao W. et al., 2001; Yang G. et al., 2004]. Предобработка  $H_2S$  уменьшала аритмию изолированного сердца при глобальной ишемии/реперфузии и улучшала выживание миоцитов [Moore P.K. et al., 2003].

Проведенные исследования показали, что сероводород, не являясь по сути АФК, имеет много сходного с ними по механизмам влияния на сократительную активность ГМК. Полученные данные в экспериментах с неселективным блокатором калиевых каналов тетраэтиламмонием позволяют предположить участие калиевой проводимости мембраны в механизмах расслабляющего действия сероводорода на сосудистые ГМК, предсокращенные гиперкалиевым раствором, и этот процесс модулируется активностью аденилатциклазы.

## **ВЫВОДЫ**

1. Перекись водорода независимо от эндотелия модулирует сократительные реакции гладких мышц: снижает величину сократительного ответа при действии фенилэфрина, но потенцирует сокращения гладких мышц аорты, вызванные гиперкалиевым раствором. Усиление сокращений деполяризованных гладкомышечных клеток обусловлено влиянием перекиси водорода на потенциал-независимые механизмы активации и поддержания сокращений гладкой мышцы аорты.
2. Микрофиламенты цитоскелета участвуют в формировании исходного механического напряжения гладкой мышцы аорты, вовлечены в генерацию и поддержание сокращений, индуцированных гиперкалиевым раствором, изоосмотической стрикцией и фенилэфрином. Сокращение, индуцированное гиперосмотическим раствором, зависит от состояния микрофиламентов и микротубул.
3. Расслабляющее действие оксида азота на гладкомышечные клетки аорты при действии фенилэфрина зависит от состояния микротубул и микрофиламентов цитоскелета, тогда как при деполяризации мембраны ГМК гиперкалиевым раствором – только микротубул.
4. Снижение перекисью водорода сократительных ответов гладких мышц аорты при действии фенилэфрина осуществляется с преимущественным участием микрофиламентов, тогда как активирующее влияние перекиси водорода на сокращения, индуцированные гиперкалиевым раствором, не зависит от состояния цитоскелета.
5. Перекись водорода потенцирует сокращение, индуцированное гипоосмотическим набуханием. Оксид азота оказывает релаксирующее влияние на сокращения, индуцированный гиперосмотическим раствором и изоосмотической стрикцией.
6. Опосредованное циклическим АМФ угнетение сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты зависит от состояния микрофиламентов цитоскелета, а потенциалов действия и сокращений гладкомышечных клеток мочеочника – от состояния микротубул.
7. Расслабляющее действие сероводорода в присутствии низких концентраций активатора аденилатциклазы форсколина сменяется сократительным эффектом. Активирующее гладкую мышцу влияние сероводорода снижается при увеличении концентрации форсколина.

## ***СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ***

1. Гусакова, С.В. Влияние блокатора микротрубочек колхицина на развитие сократительных реакций сосудистых гладкомышечных клеток / С.В. Гусакова, А.А. Килин, Я.Д. Анфиногенова // «Науки о человеке»: Материалы VI конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск. – 2005. – С. 72.
2. Механизмы действия мезатона и гистамина на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеочника морской свинки: роль  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -котранспорта и хлорной проводимости мембраны / И.Л. Миноченко,



- А.А. Килин, С.В. Гусакова, Я.Д. Анфиногенова // «Науки о человеке»: Материалы VI конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск. – 2005. – С. 78-79.
3. Cell shrinkage-induced smooth muscle contraction: evidence for microfilament mediated signaling / S.V. Gusakova, Y.D. Anfinogenova, A.A. Kilin et al. // J. Of Hypertension: The 15th European Meeting on Hypertension. – Milan. – 2005. – V. 23, suppl. 2. – P. S359.
4. Роль  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -котранспорт и хлорной проводимости мембраны в регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки биологически активными веществами: мезатоном и гистамином / И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков, И.Л. Миноченко, Я.Д. Анфиногенова, Ю.Л. Бородин, А.В. Васюков, С.В. Гусакова и др. // Научные труды I съезда физиологов СНГ, Сочи. – 2005. – Том 2. – С. 94-95.
5. Роль циклических нуклеотидов в объем-зависимой регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток / С.В. Гусакова, С.В. Кольцова, А.В. Васюков и др. // «Науки о человеке»: Материалы VII конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск. – 2006. – С. 100-102.
6. The role cytoskeleton in smooth muscle cell contractile responses evoked by depolarization, Phenylephrine, end Forskolin / S.V. Gusakova, I.V. Kovalev, M.B. Baskakov et al. // J. Of Hypertension: The 16th European Meeting on Hypertension. – Madrid. – 2006. – V. 24, suppl. 4. – P. S390.
7. Исследование роли цитоскелета в регуляции циклическими нуклеотидами электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток / И.В. Ковалев, С.В. Гусакова, М.Б. Баскаков и др. // Вестник Томского государственного университета: Сборник материалов Всероссийской научной конференции «Механизмы индивидуальной адаптации», посвященной памяти и 100-летию со дня рождения профессора В.А. Пегеля. – Томск. – 2006. – № 23. – С. 63-65.
8. Изучение роли  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -котранспорта и хлорной проводимости мембраны в регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки мезатоном и гистамином / И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков, М.А. Медведев, И.Л. Миноченко, А.А. Килин, Я.Д. Анфиногенова, Ю.Д. Бородин, С.В. Гусакова и др. // **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.** – 2007. – 93 №3. – С. 306-317.
9. Гусакова, С.В. Исследование роли цитоскелета в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток аорты крысы / С.В. Гусакова // **Бюллетень Сибирской медицины.** – 2007. – Т. 6. – №1. – С. 78-82.
10. Цитоскелет-зависимая регуляция цГМФ сократительной активности гладких мышц аорты крысы / О.С. Мельник, С.В. Гусакова, В.В. Дряпочка В.В. Попов // «Науки о человеке»: материалы VIII конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск: СибГМУ, 2007. – С. 189-190.
11. Влияние состояния цитоскелета на цАМФ и цГМФ-зависимую регуляцию сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты крысы / С.В. Гусакова, И.В.Ковалев, М.Б. Баскаков и др. // «Актуальные проблемы медицины»: материалы межрегиональной научно-практической конференции. – Абакан, 2007. – С. 55-56.
12. Объем-зависимая регуляция сократительной активности гладкомышечных клеток: роль микрофиламентов / С.В. Гусакова, И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков и др.

- // «Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии»: материалы международной научной конференции. – Томск: СибГМУ, 2007. – С. 62-65.
13. Влияние перекиси водорода на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток / И.В. Ковалев, С.В. Гусакова, О.С. Мельник и др. // «Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии»: Материалы международной научной конференции. – Томск: СибГМУ, 2007. – С. 65-68.
14. Мельник, О.С. Влияние перекиси водорода на сократительную активность гладкомышечных клеток: роль цитоскелета / О.С. Мельник, С.В. Гусакова, О. В.Шутова // «Науки о человеке»: Материалы IX конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск: СибГМУ, 2008. – С. 95-97.
15. Cytoskeleton-dependent mechanisms of smooth muscle contraction / S. Gusakova, I. Kovalev, M. Baskakov et al. // Hypertension: The 18th Scientific Meeting European Society on Hypertension. – Berlin, 2008. – P. 323.
16. Regulation contractile activity in smooth muscle cell: The role of cytoskeleton and cyclic nucleotides / O. Melnik, S. Gusakova, I. Kovalev et al. // Hypertension: The 18th Scientific Meeting European Society on Hypertension. – Berlin, 2008. – P. 324.
17. Механизмы регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток: роль цитоскелета / М.А. Медведев, М.Б. Баскаков, С.В. Гусакова и др. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2008. – Т. 7. – № 4. – С. 31-36.
18. Влияние перекиси водорода на фенилэфрин-индуцированное сокращение гладких мышц аорты крысы: роль цитоскелета / Л.В. Капилевич, О.С. Мельник, С.В. Гусакова и др. // **Вестник российского университета дружбы народов.** – 2008. – №7. – С. 658-660.
19. Vascular Smooth Muscle Contraction Evoked by Cell Volume Modulation: Role of the Cytoskeleton Network / S.V. Koltsova, S.V. Gusakova, Y.D. Anfinogenova et al. // **Cell Physiol Biochem.** – 2008. –21 (1-3). – P. 29-36.
20. Цитоскелет и активные формы кислорода в механизмах регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток / С.В. Гусакова, М.Б. Баскаков, И.В. Ковалев и др. // Научные труды X международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке». – М.: РУДН, 2009. – С. 1191-1192.
21. Роль оксида азота и элементов цитоскелета в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток / С.В. Гусакова, М.Б. Баскаков, И.В. Ковалев и др. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2009. – Т.8. – № 3. – С.17-23.
22. Влияние перекиси водорода на сократительную активность гладкомышечных клеток: роль цитоскелета / И.В. Ковалев, С.В. Гусакова, О.С. Мельник и др. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2009. – Т.8. – № 4. –С. 41-47.
23. Исследование цитоскелет-зависимых механизмов регуляции сократительной активности гладких мышц / С.В. Гусакова, И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков и др. // **Российский физиологический журнал им. И.А. Сеченова.** – 2009. – Т. 95. – № 6. – С. 583-593.
24. Гусакова, С.В. Роль цитоскелета и оксида азота в регуляции фенилэфрин – индуцированных сокращений сосудистых гладких мышц / С.В. Гусакова, Л.В. Смаглий, О.С. Мельник // Науки о человеке: материалы X конгресса молодых ученых и специалистов – Томск: СибГМУ. – 2009. – С. 77 – 79.

25. Regulation of contractile activity of smooth muscle cells by reactive oxygen species: evidence for cytoskeleton-mediated signaling / S. Gusakova, M. Baskakov, I. Kovalev et al. // 20th European Meeting on Hypertension Oslo, Norway, June 18-21. – 2010. – №28. – P. 350
26. Влияние сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы / М.Б. Баскаков, С.В. Гусакова, А.С. Желудева и др. // **Бюллетень Сибирской медицины.** – 2010. – Т.9. – № 6. – С. 12-17.
27. Гусакова, С.В. Активные формы кислорода в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток / С.В. Гусакова, Л.В. Смаглий, А.С. Желудева // «Науки о человеке»: Сборник статей по материалам XII Российского конгресса молодых ученых с международным участием (Томск, 26-27 мая 2011 г.) – Томск: СибГМУ. – 2011. – С. 72-74.
28. Механизмы регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток: роль активных форм кислорода / С.В. Гусакова, М.Б. Баскаков, И.В.Ковалев и др. // **Бюллетень Сибирской медицины.** – 2011. – Т. 10. – №.3. – С. 30-36.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода  
АБС – альбумин бычьей сыворотки  
ГМК – гладкомышечная клетка  
ГЦ – гуанилатциклаза  
МН – механическое напряжение  
МП – мембранный потенциал  
НП – нитропруссид натрия  
ПД – потенциал действия

ПК С – протеинкиназа С  
ФЭ – фенилэфрин  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – перекись водорода  
NaHS – гидросульфид натрия  
NKCC – Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup>-котранспорт  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> – супероксидный анион  
H<sub>2</sub>S – сероводород  
NO – оксид азота