

## Влияние перекиси водорода на сократительную активность гладкомышечных клеток: роль цитоскелета

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

## Hydrogen peroxide influence on contractile activity smooth muscle cells: the role of cytoskeleton

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

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Ковалев И.В., Гусакова С.В., Мельник О.С. и др.

Методом механографии изучено влияние перекиси водорода на сократительные реакции гладкомышечных клеток, вызванные гиперкалиевым раствором и фенилэфрином в условиях модуляции калиевой проводимости мембраны и состояния элементов цитоскелета. Установлено разнонаправленное воздействие перекиси водорода на сокращения гладких мышц аорты крысы при деполяризации мембраны гиперкалиевым раствором и действии фенилэфрина: снижение величины фенилэфриновой и увеличение силы гиперкалиевой контрактуры. Показано, что элементы цитоскелета вовлечены в механизмы действия перекиси водорода на сокращения гладких мышц аорты крысы, вызванные фенилэфрином.

**Ключевые слова:** гладкомышечные клетки, цитоскелет, активные формы кислорода, перекись водорода.

The influence of of hydrogen peroxide on the contractile reactions of smooth muscle cells caused by hyperpotassium solution and phenylephrine in modulation a potassium conductance the membrane and the state of cytoskeleton elements has been investigated by the mechanographical method. It has multidirectional influence of hydrogen peroxide in the reduction of smooth muscles of rat aorta with the membrane depolarization hyperpotassium solution and action phenylephrine: phenylephrine decline in value and increase strength hyperpotassium contractures. We show that the cytoskeleton components involved in the mechanisms of action of hydrogen peroxide in the contractile reactions of smooth muscles of rat aorta caused by phenylephrine.

**Key words:** smooth muscle cells, cytoskeleton, reactive oxygen species, hydrogen peroxide.

УДК 612.73:611.018.61:546.215

### Введение

Универсальным механизмом адаптации и повреждения клеточных систем является окислительный стресс. Большинство социально значимых заболеваний, например сердечно-сосудистые и инфекционные патологии, сахарный диабет и другие, характеризуются дисбалансом окислительного метаболизма клеток и, естественно, нарушением оперирования редоксзависимых регуляторных систем клеток.

Одним из важнейших элементов редокс-системы клеток являются активные формы кислорода (АФК), и прежде всего супероксиданион. Многочисленные исследования показали, что

супероксиданион и в большей степени его стабильный продукт — перекись водорода могут регулировать различные сигнальные каскады. Изменения редокс-статуса клеток при различных стрессовых воздействиях влияют на процессы сигнальной трансдукции различных физиологически активных веществ и экспрессии ряда генов как при адаптивной реакции клеток в экстремальных условиях, так и при развитии патологических процессов [5]. Действуя как пара- и (или) аутокринный регулятор, АФК активируют протеинкиназу С, фосфолипазу А<sub>2</sub>,  $\text{NO}$ -синтазу, циклооксигеназу и гуанилатциклазу [8], которые кроме того, что оказывают регулирующее влияние на уровень АФК в клетке,

сами находятся под контролем внутриклеточных сигнальных систем или являются их компонентами. В результате этого происходит изменение ключевых процессов регуляции клеточного гомеостаза, а также нарушение функциональных свойств клетки [6, 7].

Общая феноменология влияния АФК на электрофизиологические и сократительные свойства гладкомышечных клеток (ГМК) достаточно хорошо изучена. Установлены основные молекулярные и мембранные системы, обеспечивающие реализацию эффектов перекиси водорода. Это прежде всего  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Cl^-$  каналы мембраны ГМК [3, 8, 12]. Имеются отдельные указания на то, что актиновые микрофиламенты — обязательный компонент сигнального каскада, индуцируемого ангиотензином II в сосудистых ГМК [9], а микротрубулы опосредуют стимуляцию ангиотензином II продукции перекиси водорода [15]. Не исключено, что сам цитоскелет выступает первичной мишенью окислительного стресса и диссоциация его белков является начальным этапом повреждения клеток [4, 11, 13].

Вместе с тем отсутствуют систематические исследования роли цитоскелета в молекулярных механизмах влияния дисбаланса редокс-состояния клеток на сократительную функцию гладких мышц.

## Материал и методы

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

Амплитуду контрольных (100%) сократительных ответов сосудистых сегментов на гиперкалиевый раствор (замена  $NaCl$  с концентрацией 30 ммоль на  $KCl$ ) регистрировали после 40—

50 мин выдерживания в нормальном растворе Кребса.

Растворы для перфузии препаратов готовили на основе дистиллированной воды с помощью соответствующих реактивов («ХЧ, «Реахим»). Физиологический раствор Кребса содержал (ммоль): 120,4  $NaCl$ , 5,9  $KCl$ , 2,5  $CaCl_2$ , 1,2  $MgCl_2$ , 5,5 глюкозы, 15  $C_4H_{11}O_3N$  [tris(oxymethyl)-aminometan] (316,4 мосМ). В растворах поддерживались значения pH в пределах 7,35—7,40 и температура ( $37,0 \pm 0,1$ ) °С.

Для деполимеризации микрофиламентов и микротубул цитоскелета использовали колхицин. Для дифференцировки участия отдельных элементов цитоскелета в сократительных реакциях гладкомышечных клеток применяли специфические модуляторы микрофиламентов (цитохалазин D) и микротубул (нокодазол).

Тестирующие растворы готовили путем добавления в раствор Кребса соответствующих реактивов: колхицина, цитохалазина D, нокодазола, фенилэфрина (все Sigma, США), перекиси водорода (Россия), тетраэтиламмония хлорида (Serva), аминотриазола (Wako).

Результаты представлены как среднее арифметическое значение  $M$  и среднеквадратичное отклонение  $\sigma$  и обработаны с помощью программного пакета Statistica с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни или  $t$ -критерия для зависимых выборок. Достоверными считали различия при значении  $P < 0,05$ .

## Результаты

После 40 мин инкубации в нормальном растворе Кребса в ответ на гиперкалиевый раствор регистрировались типичные для ГМК аорты крысы сократительные ответы, активируемые потенциалзависимым входом кальция [1, 2].

При добавлении в перфузионный раствор перекиси водорода  $H_2O_2$  в концентрации 1—500 мкмоль, исходное механическое напряжение (МН) гладких мышц не изменялось. Для исследования влияния перекиси водорода (1—500 мкмоль) на сокращения, вызванные деполяризацией мембраны сосудистых ГМК, воздейст

ли гиперкалиевыми растворами. Только в концентрации 500 мкмоль  $H_2O_2$  вызывала дополнительное увеличение МН сегментов, предсокращенных гиперкалиевыми растворами (в концентрации  $KCl$  30, 60 и 120 ммоль) на  $(25,2 \pm 2,9)$ ,  $(25,4 \pm 7,7)$  и  $(26,3 \pm 2,3)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно от контрольной гиперкалиевой контрактуры ( $KCl$  30 ммоль) (рис. 1,а). Полученные результаты показывают, что перекись водорода усиливает сокращающее действие гиперкалиевого раствора на сосудистые гладкие мышцы.

Для изучения роли эндотелия в реализации эффектов  $H_2O_2$  исследовали влияние перекиси водорода на сокращения сосудистых сегментов с сохраненным эндотелием. В этих условиях  $H_2O_2$  вызывала дополнительное увеличение МН сегментов, предсокращенных гиперкалиевым раствором ( $KCl$  30 ммоль), на  $(25,2 \pm 2,1)\%$  ( $n = 5$ ) от контрольных значений, т.е. эффекты перекиси водорода не зависят от наличия эндотелия.

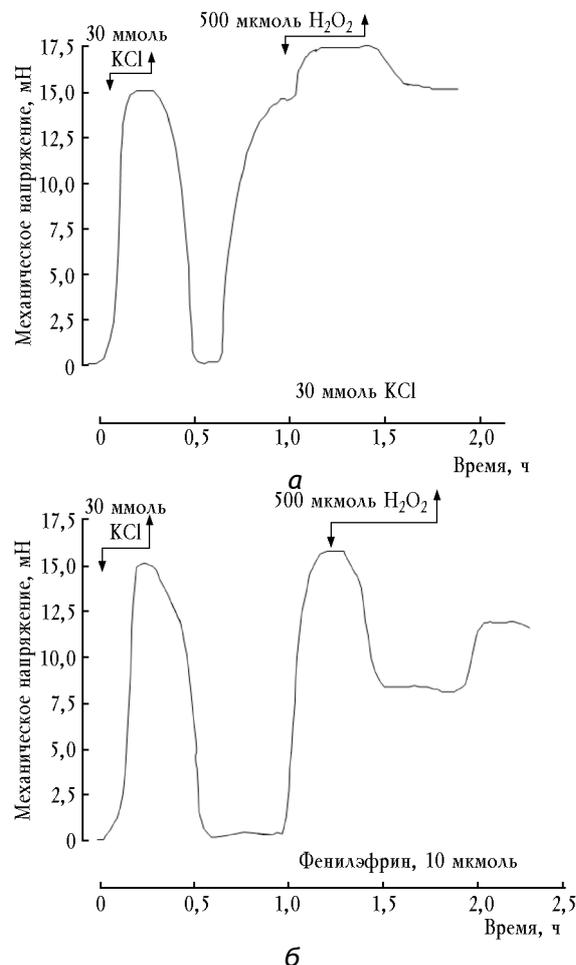


Рис. 1. Влияние перекиси водорода на механическое напряжение гладкой мышцы аорты крысы, предсокращенной гиперкалиевым ( $KCl$ , 30 ммоль) раствором (а) и фенилэфрином (б)

Сократительные ответы сосудистых гладких мышц инициируются многими физиологически и биологически активными веществами, в том числе  $\alpha_1$ -адреномиметиком фенилэфрином (ФЭ) [2].

Амплитуда сокращений в ответ на добавление фенилэфрина в концентрации 10 мкмоль в раствор Кребса была сравнима с действием  $KCl$  (30 ммоль). Перекись водорода (500 мкмоль) достоверно  $((51,7 \pm 2,9)\%$ ;  $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ) уменьшала МН таких сегментов (рис. 1,б).

Для изучения влияния  $H_2O_2$  на рецепторуправляемый вход ионов кальция ФЭ добавляли на фоне действия раствора, содержащего  $KCl$  в концентрации 120 ммоль [2]. Фенилэфрин (10 мк-

моль) в присутствии КСl (120 ммоль) вызывал повышение МН до  $197,0 \pm 19,8$  ( $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ) от контрольных значений. В этих условиях перекись водорода (500 мкмоль) не влияла на величину МН гладкомышечных сегментов. Полученные данные указывают на то, что расслабляющее влияние перекиси водорода на гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином, не связано с угнетением рецепторуправляемого входа ионов кальция в ГМК, а также на то, что расслабляющее действие перекиси водорода на фенилэфрининдуцированное сокращение проявляется только при субмаксимальных концентрациях кальция в клетке. Последнее позволяет допускать угнетение перекисью водорода С-киназой ветви кальциевой сигнальной системы и (или) кальциевой сенситизации сократительного аппарата ГМК.

Внутриклеточная концентрация перекиси водорода зависит от активности супероксиддисмутазы и расщепляющих ее ферментов, в том числе каталазы [10]. Для изучения влияния изменений внутриклеточной концентрации перекиси водорода на сократительную активность гладких мышц использовали ингибитор каталазы аминотриазол. Предобработка аминотриазолом (1 ммоль, 90 мин) не изменяла уровень исходного механического напряжения ГМК и не влияла на сократительные эффекты гиперкалиевых растворов (КСl в концентрации 30 ммоль) и перекиси водорода. Однако фенилэфрининдуцируемое сокращение на фоне ингибитора каталазы резко угнеталось и составляло  $(12,3 \pm 2,1)\%$  ( $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) от контроля.

Полученные данные свидетельствуют в пользу вышеприведенного предположения о том, что АФК, по-видимому, снижают эффективность оперирования С-киназой ветви кальциевой сигнальной системы и (или) снижают чувствительность сократительного аппарата ГМК к кальцию.

Изменения калиевой проводимости мембраны ГМК во многом определяют направленность и величину сократительных реакций гладких мышц на действие биологически активных веществ. Добавление блокатора калиевых каналов тетраэти-

ламмония (ТЭА) в концентрации 10 мкмоль в раствор Кребса не влияло на исходный уровень механического напряжения ГМК, амплитуду гиперкалиевого (КСl 30 ммоль) сокращения, но вызывало увеличение амплитуды фенилэфрининдуцированного сокращения (10 мкмоль) на  $(11,4 \pm 7,2)\%$  ( $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ). ТЭА не влиял на эффекты  $H_2O_2$  в предсокращенных гиперкалиевым раствором или фенилэфрином сегментах. Следовательно, эффекты  $H_2O_2$  как при гиперкалиевом, так и при фенилэфрининдуцированном сокращениях не оказывают влияния на потенциалзависимую и  $Ca^{2+}$ -активируемую калиевую проводимость мембраны ГМК аорты.

С другой стороны, эффекты  $H_2O_2$  могут быть связаны и с процессами развития ионной проницаемости мембраны, не чувствительными к действию малоселективного блокатора, например с чувствительной к аденозинтрифосфату компонентой калиевой проводимости мембраны ГМК.

Наряду с представлениями о ключевой роли кальцийзависимых механизмов регуляции сократительной функции гладких мышц все большее внимание привлекают к себе другие способы развития сопряжения возбуждения – сокращения ГМК, например обусловленные цитоскелетом и (или) содержанием перекиси водорода.

В присутствии дезинтегратора микротрубочек и микрофиламентов цитоскелета колхицина активирующее влияние  $H_2O_2$  на сокращение, вызванное хлоридом калия, статистически значимо не изменялось: МН увеличивалось на  $(25,6 \pm 5,1)\%$  ( $n = 8$ ) от величины гиперкалиевого сокращения в присутствии колхицина (рис. 2,а). На фоне предобработки колхицином (10 мкмоль, 90 мин) релаксирующее влияние  $H_2O_2$  (500 мкмоль) на сокращения, вызванные фенилэфрином, достоверно усиливалось, составляя  $(83,5 \pm 4,1)\%$  ( $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ) от фенилэфрининдуцированного сокращения в присутствии колхицина (рис. 2,б).

Для оценки вклада отдельных элементов цитоскелета в сократительные реакции гладкой мышцы аорты при действии оксида азота использовались химические агенты, вызывающие

деполимеризацию микротубул и микрофиламентов — нокодазол и цитохалазин D соответственно.

После обработки нокодазолом (10 мкмоль, 60 мин) амплитуда гиперкалиевых (KCl 30 ммоль) и фенилэфрининдуцированных сокращений сосудистых сегментов увеличивалась, составляя  $(121,5 \pm 1,7)$  ( $n = 8$ ;  $p < 0,05$ ) и  $(124,9 \pm 4,3)\%$  ( $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно от контрольных значений. В присутствии нокодазола действие  $H_2O_2$  не изменилось.

После 30-минутной обработки цитохалазином D (0,5 мкмоль) амплитуда гиперкалиевых сокращений (KCl 30 ммоль) сосудистых сегментов статистически значимо уменьшалась: МН составляло  $(34,3 \pm 0,2)\%$  ( $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) от контрольных значений. В присутствии цитохалазина D (0,5 мкмоль) активирующее влияние  $H_2O_2$  (500 мкмоль) на сокращение, вызванное хлоридом калия, не изменялось, составляя  $(23,3 \pm 3,1)\%$  ( $n = 6$ ) от величины гиперкалиевого сокращения в присутствии дестабилизатора микрофиламентов.

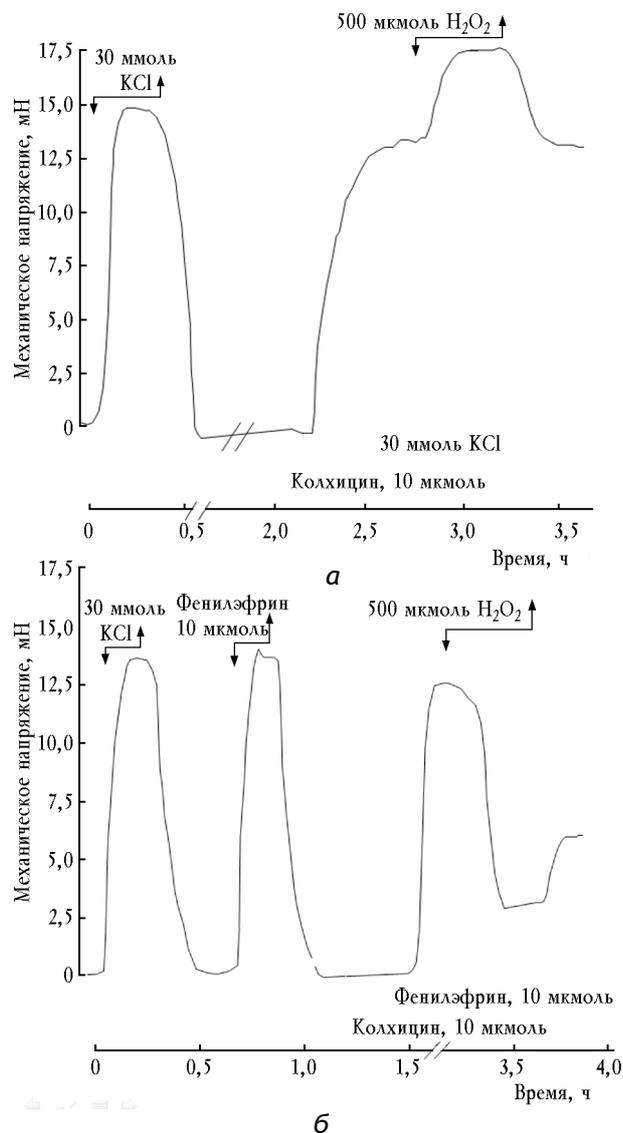


Рис. 2. Влияние колхицина на эффекты перекиси водорода в гладкой мышце аорты крысы, предсокращенной гиперкалиевым (KCl 30 ммоль) раствором (а) и фенилэфрином (б)

Амплитуда фенилэфрининдуцированного сокращения после предобработки гладкомышечных сегментов цитохалазином D снизилась, составляя  $(31,3 \pm 5,1)\%$  ( $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) от контрольных значений. Релаксирующее влияние перекиси водорода (500 мкмоль) на сокращения, вызванные ФЭ, статистически значимо увеличилось: МН составляло  $(11,6 \pm 2,9)\%$  ( $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) от фенилэфрининдуцированного сокращения в присутствии дестабилизатора микрофиламентов.

Потенцирование расслабляющего влияния перекиси водорода на фоне колхицина, цитохалазина D при фенилэфрининдуцированном сокращении гладких мышц аорты крысы свидетельствует о вовлечении элементов цитоскелета в этот процесс. Напротив, сокращения гладких мышц, индуцируемые гиперкалиевым раствором и активируемые перекисью водорода, не зависят от состояния цитоскелета.

## Обсуждение

Знания о патогенезе многих заболеваний в последние годы обогатились новыми сведениями о механизмах повреждения клеточных структур. Одним из основных альтернирующих факторов оказались активные формы кислорода, являющиеся естественными продуктами жизнедеятельности клеток. Разнообразные функции АФК как аутокринных (паракринных) посредников обнаруживаются по их лабильности в организме, демонстрируя, что в зависимости от концентрации они могут оказывать не только повреждающее действие, но и выполнять регуляторную функцию. С другой стороны, все больше появляется сведений о неоднозначной роли элементов цитоскелета в механизмах оперирования внутриклеточных сигнальных систем в гладких мышцах, а дополнительное вмешательство в эти процессы АФК может и, по-видимому, реализуется через наиболее чувствительные к ним эффекторные структуры [9, 11, 14].

Короткий период полураспада супероксида аниона ограничивает роль этой АФК как важного паракринного регулятора в сосудах, тогда как его метаболит – перекись водорода – является наиболее устойчивым продуктом обмена кислорода в организме.

Как показали эксперименты, перекись водорода вызывает дополнительное увеличение механического напряжения сосудистых сегментов, вызванного деполяризацией мембраны ГМК гиперкалиевым раствором, но уменьшает сокращение, индуцированное фенилэфрином. Полученные данные указывают на то, что потенциалзависимые звенья регуляции механического напряжения сосудистых гладких мышц активи-

руются перекисью водорода, тогда как расслабляющее влияние перекиси водорода на гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином, не связано с угнетением рецепторуправляемого входа ионов кальция в ГМК. Расслабляющее действие перекиси водорода на фенилэфрининдуцированное сокращение проявляется только при субмаксимальных концентрациях кальция в клетке. Последнее позволяет допускать угнетение перекисью водорода C-киназной ветви кальциевой сигнальной системы и (или) кальциевой сенситизации сократительного аппарата ГМК. Эффекты перекиси водорода как при гиперкалиевом, так и при фенилэфрининдуцированном сокращении не оказывают влияния на потенциалзависимую и  $Ca^{2+}$ -активируемую калиевую проводимость мембраны ГМК аорты.

Сеть цитоскелета является начальной мишенью окислительного стресса [4]. Окислительное повреждение, как известно, выборочно влияет на белки цитоскелета. Полученные результаты показывают, что реализация угнетающего действия перекиси водорода на сократительную активность гладких мышц крысы осуществляется с преимущественным участием микротубул. Эти данные согласуются с исследованиями [15], где на культуральных ГМК аорты крысы показана существенная роль микротубул в активации продукции перекиси водорода НАДН-оксидазой при реализации влияния ангиотензина II в гладких мышцах сосудов. Напротив, сокращения гладких мышц, индуцируемые гиперкалиевым раствором и активируемые перекисью водорода, не зависят от состояния цитоскелета.

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

## Литература

1. Баскаков М.Б., Медведев М.А., Ковалёв И.В. и др. Механизмы регуляции функций гладких мышц вторичными посредниками. Томск: Гавань, 1996. 154 с.
2. Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г. Физиология сосудистых гладких мышц. Киев: Наукова думка, 1988. 250 с.
3. Barlow R.S., El Mowafy A.M., White R.E.  $H_2O_2$  opens BKCa channels via the PLA2-arachidonic acid signaling cascade in coron-

## Экспериментальные и клинические исследования

- ary artery smooth muscle // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000. V. 279. P. 475—483.
4. **Dalle-Donne I., Rossi R., Milzani A. et al.** The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself // *Free radical biology & medicine.* 2001. № 31 (12). P. 1624—1632.
  5. **Dröge W.** Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function // *Physiological Reviews.* 2002. V. 82, № 1. P. 47—95.
  6. **Esteve J.M., Momo J., Garcia de Laasuncion J., Sastre J.** Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies *in vivo* and *in vitro* // *The FASEB Journal.* 1999. № 13. P. 1055—1064.
  7. **Rogers A.M.** Rapid vasoregulatory mechanisms in exercising human skeletal muscle: dynamic response to repeated changes in contraction intensity // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. V. 10. P. 355—368.
  8. **Thakali K., Demel S.L., Fink G.D., Watts S.W.** Endothelin-1-induced contraction in veins is independent of hydrogen peroxide // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005. V. 289. P. 1115—1122.
  9. **Touyz R.M., Yao G., Quinn M.T. et al.** p47phox Associates With the Cytoskeleton Through Cortactin in Human Vascular Smooth Muscle Cells Role in NAD(P)H Oxidase Regulation by Angiotensin II // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2005. V. 25. P. 512—518.
  10. **Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohe R. et al.** Diversity of glutathione peroxidases // *Methods Enzymol.* 1995. V. 252. P. 38—53.
  11. **Valen G., Sonden A., Vaage J.** Hydrogen peroxide induces endothelial cell atypia and cytoskeleton depolymerization // *Free Radical Biology and Medicine.* 1999. V. 26, № 11. P. 1480—1488.
  12. **Yang Z., Zheng T., Zhang A. et al.** Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta // *Eur. J. Pharmacol.* 1998. V. 344. P. 169—181.
  13. **Zhao Y., Davis H.W.** Hydrogen peroxide-induced cytoskeletal rearrangement in cultured pulmonary endothelial cells // *J. Cell. Physiol.* 1998. V.174. P.370—379.
  14. **Zhu D., Tan K.S., Zhang X. et al.** Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes // *J. of Cell Sci.* 2005. V. 188. P. 3695—3703.
  15. **Zuo L., Ushio-Fukai M., Hilenski L.L., Wayne Alexander R.** Microtubules Regulate Angiotensin II Type 1 Receptor and Rac1 Localization in Caveolae/Lipid Rafts Role in Redox Signaling // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. V. 24. P. 1223—1228.

Поступила в редакцию 15.06.2009 г.

Утверждена к печати 17.06.2009 г.

### Сведения об авторах

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

**С.В. Гусакова** — канд. мед. наук, доцент кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**О.С. Мельник** — аспирант кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**М.Б. Баскаков** — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

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

**М.А. Медведев** — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).

**В.Б. Студницкий** — канд. биол. наук, доцент кафедры нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).

**О.И. Антонов** — аспирант кафедры нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).

### Для корреспонденции

**Ковалев Игорь Викторович**, тел. (3822) 42-09-54, Kovalew@mail.ru