УДК 612.13+612.73+612.273.2

О.О. Павлова, В.Ф. Сагач, А.І.Соловйов

Вплив блокади протеїнкінази С на зміни кальцієвої чутливості скоротливого апарату судинних гладеньких м'язів при вазоспастичних станах різного генезу

Исследовали роль протеинкиназы С (ПКС) в изменениях кальциевой чувствительности сократительного аппарата сосудистых гладкомышечных клеток (ГМК) в развитии вазоспастических состояний различной этиологии – легочной гипоксической вазоконстрикции, генетически детерминированной (спонтанной) гипертензии и гипертензии, вызванной действием ионизирующей радиации. При всех видах вазоспастических состояний в опытах на химически скинированных ГМК был зафиксирован сдвиг кривой pCa – напряжение влево, что свидетельствует о повышении кальциевой чувствительности сократительного аппарата ГМК. В скинированых препаратах легочных артерий крысы увеличение кальциевой чувствительности сократительного аппарата ГМК при гипоксии полностью устранялось действием блокатора ПКС челеритрина. Блокаторы ПКС, челеритрин и стауроспорин, также устраняли увеличение кальциевой чувствительности сократительного аппарата ГМК в скинированных препаратах аорты крыс с генетически детерминированной гипертензией. В аорте крыс с артериальной гипертензией, вызванной ионизирующим облучением, увеличение кльциевой чувствительности миофибрилл лишь частично уменьшалось под действием челеритрина. Результаты исследований свидетельствуют о том, что опосредованное увеличением активности ПКС повышение кальциевой чувствительности сократительного аппарата сосудистых ГМК является одним из общих механизмов, лежащих в основе развития вазоспастических состояний различной этиологии.

ВСТУП

Добре відомо, що зміни концентрації іонізованого кальцію в міоплазмі ($[Ca^{2+}]_i$) гладеньком'язових клітин (ГМК) є основним механізмом регуляції тонусу кровоносних судин. Цей механізм полягає в утворенні комплексу кальцій – кальмодулін і наступної активації кінази легких ланцюгів міозину, яка їх фосфорилює [16]. Однак, як було встановлено, при досить тривалому підтриманні ізометричного напруження судинних ГМК $[Ca^{2+}]_i$ та рівень фосфорилювання легких ланцюгів міозину знижуються до вихідних значень, тоді як сила скорочення, що розвивають ГМК продовжує залишатися стабільною [14]. Так, останнім часом з'явилося багато даних про те, що тонус судинних ГМК може змінюватися без попередніх зсувів $[Ca^{2+}]_i$ лише внаслідок змін чутливості (спорідненості) скоротливих і/або регуляторних білків до Ca^{2+} [4, 17, 20, 21].

Є відомості про те, що механізми підтримання тонічної фази скорочення ГМК, які не пов'язані зі збільшенням $[Ca^{2+}]_i$, можуть включати як ключовий кальцієвочутливий фермент протеїнкіназу С (ПКС) [12, 14, 19]. Встановлено, що ПКС може

© О.О. Павлова, В.Ф. Сагач, А.І.Соловйов

фосфорилювати кіназу легких ланцюгів міозину за відсутності кальмодуліну, при цьому константа дисоціації згаданої кінази для кальмодуліну збільшується в 10 разів [9]. Крім того показано, що ПКС може фосфорилювати як кіназу легких ланцюгів міозину, так і самі ланцюги, а також цАМФ-залежну протеїнкіназу, яка може включати 2 моля фосфату у кіназі легких ланцюгів міозину [8, 9]. Дослідження ж дії складних форболових ефірів, які є активаторами ПКС [18, 22], показали підвищення тонусу судинних ГМК при незмінній $[Ca^{2+}]_i$ [10] та незначному рівні активації кінази легких ланцюгів міозину [7].

Мета нашої роботи – дослідити роль ПКС у змінах кальцієвої чутливості скоротливого апарату судинних ГМК у розвитку вазоспастичних станів різної етіології – локального гіпоксичного спазму легеневих артерій, генетично детермінованої (спонтанної) гіпертензії та гіпертензії, викликаної дією іонізуючої радіації.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на ізольованих кільцевих сегментах правої та лівої легеневих артерій та грудної аорти шириною близько 1 – 1,5 мм та внутрішнім діаметром 2 – 3 мм. Ізольовані сегменти було виділено з судин 48 дорослих щурах обох статей (лінія Вістар – Кіото та спонтанно гіпертензивна лінія Окамото), масою 250 – 300 г, забитих за допомогою цервікальної дислокації з наступним знекровлюванням.

Для створення фіксованої внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} нами було використано методику хімічного скінування [13]. Хімічне скінування ізольованих судинних препаратів легеневих артерій і грудної аорти здійснювали за допомогою холістеролпреципітуючого детергента β-есцину в концентрації 0,1 –0,5 мг/мл протягом 15 та 20 хв відповідно. Перфузували скіновані судинні препарати при кімнатній температурі (21 – 22 °С) аерованим (16 % O_2, 79 % N_2, 5 % CO_2) релаксуючим розчином наступного складу (ммоль/л): KCl – 130; $MgCl_2$ – 5; тріс-HCl – 20; ЕГТА – 4; Na_2АТФ – 3,3; 1,4-дитіотриетол – 0,5; pH 6,8. Різні внутрішньоклітинні концентрації Ca^{2+} створювали додаванням $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ до активуючого розчину, компоненти якого були аналогічні таким релаксуючого розчину за винятком заміщення ЕГТА на Са-ЕГТА.

Для отримання розчинів зі зниженим вмістом O_2 використовували газову суміш, що містила 5 % CO_2 та 95 % N_2. Буферний розчин барбатували газовою сумішшю в закритій пластиковій посудині об'ємом 300 мл протягом 15 хв. pO_2 буферного розчину при цьому знижувався з 135 – 145 до 30 – 35 мм рт. ст. Водневий показник гіпоксичних розчинів залишався сталим і коливався в межах 7,3 – 7,4. Отриманий гіпоксичний розчин подавали в робочу камеру за перфузійною системою. Парціальний тиск кисню визначали інструментально за допомогою вимірювачів розчинного кисню ISO_2 ("World Precision Instruments Inc", США). Водневий показник вимірювали за допомогою pH-метра MP 220 ("Mettler Toledo", США).

Опромінення тварин (зовнішнє одноразове) здійснювали за допомогою джерела ^{60}Co (ТГТ "Рокус-М", Росія), дозою 6 Гр, потужністю 0,833 Гр/хв.

Скоротливу активність ізольованих судинних препаратів реєстрували в ізометричному режимі за допомогою датчиків напруження. Запис скоротливої активності ізольованих судинних препаратів здійснювали на папері за допомогою двоканального самописця "Cole Parmer" (США).

Артеріальний тиск вимірювали на хвостовій артерії щурів: контрольних, з генетично детермінованою гіпертензією та опромінених. Для цього було використано вимірювальний комплекс "Sphygmomanometer S-2" ("HSE", Німеччина), що дає змо-

гу реєструвати систолічний артеріальний тиск ($АТ_с$, мм рт. ст.) та частоту серцевих скорочень (ЧСС, $хв^{-1}$) у тварин.

У дослідах використовували наступні препарати фірми "Sigma" (США): β-есцин, стауроспорин, челеритрин, норадреналін.

Розрахунки проводили у відносних одиницях як відсоток від значення амплітуди тонічного напруження скінованого судинного сегмента відносно його скорочення при pCa_{max} (3,5). Вірогідність різниці середніх значень досліджуваних показників оцінювали за критерієм t Стьюдента. Зміни вважали статистично вірогідними при $P<0,001$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що в основі легеневої гіпоксичної гіпертензії лежить констрикторна реакція легеневих артерій на гіпоксію, тоді, як стінка системних артерій реагує на зниження оксигенації розслабленням [11]. У першій серії експериментів було досліджено зміни кальцієвої чутливості скоротливого апарату ГМК легеневих артерій та аорти під дією гіпоксії та встановлено роль ПКС у цих процесах.

Гіпоксія (pO_2=30 – 35 мм рт. ст.) викликала тонічне скорочення стінки інтактних нескінованих препаратів легеневих артерій, амплітуда якого становила 45,65 % ± 4,50 % (n=13) від тонусу, створеного норадреналіном ($3 \cdot 10^{-7}$ моль/л). Проте інтактні нескіновані препарати аорти реагували на зниження оксигенації розслабленням з амплітудою 64,27% ± 6,64 % (n=12).

За умов нормоксії підвищення концентрації Ca^{2+} у перфузуючому розчині (pCa від 8,5 до 4,5) викликало дозозалежне скорочення скінованих препаратів легеневих артерій та аорти (рис. 1, а). Дія гіпоксії на скіновані препарати легеневих артерій щура викликала значний зсув уліво кривої залежності pCa – скорочення на 1,13 одиниць (n=7; $P<0,001$) порівняно зі значеннями, які реєструвалися за умов нормоксії (n=9), що свідчить про підвищення кальцієвої чутливості скоротливого апарату (див. рис. 1,а).

Однак зниження рівня оксигенації перфузуючого розчину в скінованих препаратах аорти призвело до зсуву кривої залежності pCa – скорочення вправо на 0,74 одиниць (n=7; $P<0,001$) порівняно з реакціями нормоксії (n=11) свідчить про зниження чутливості скоротливого апарату ГМК до Ca^{2+} (див.рис. 1, I а).

Таку різницю у реакціях ГМК судин можна пояснити функціональними відмінностями аорти та легеневих артерій відносно забезпечення газообміну. Підвищення судинного тонусу легеневих артерій внаслідок збільшення кальцієвої чутливості скоротливого апарату ГМК у відповідь на гіпоксію спрямовано на забезпечення необхідного рівня тиску крові у легеневих капілярах для ефективного газообміну.

Відомо, що під дією гіпоксії в ГМК судин можуть утворюватися реактивні кисневі радикали ($\cdot O_2^-$, H_2O_2, $\cdot OH^-$), котрі здатні впливати на активність багатьох регуляторних білків [6]. Внаслідок постійного перебування ГМК легеневих артерій за умов коливань pO_2 реактивні види кисню можуть виконувати сигнальну функцію [5], на відміну від ГМК системних судин, які не пристосовані такою мірою до функціонально зумовленого контакту з реактивними видами кисню. При цьому останні можуть виступати регулювальним фактором, призводячи до зниження реактивності ГМК [11].

Одним із важливих регуляторних ферментів, які є потенційною мішенню для реактивних видів кисню, може бути ПКС. З метою визначення ролі останньої у збільшенні кальцієвої чутливості скоротливого апарату ГМК легеневих артерій за умов зниження оксигенації ми застосовували селективний блокатор ПКС челеритрин.

Попередня 10-хвилинна аплікація челеритрину в концентрації 10^{-6} моль/л (див. рис. 1,б) не впливала на чутливість скоротливого апарату ГМК скінованих препаратів легеневих артерій до Ca^{2+} за умов нормоксії (n=6; P>0,001). Однак за умов гіпоксії блокада ПКС челеритрином призводила до зсуву кривої залежності pCa – скорочення вправо на 1,13 одиниць (n=6; P<0,001), практично до рівня, що реєст-

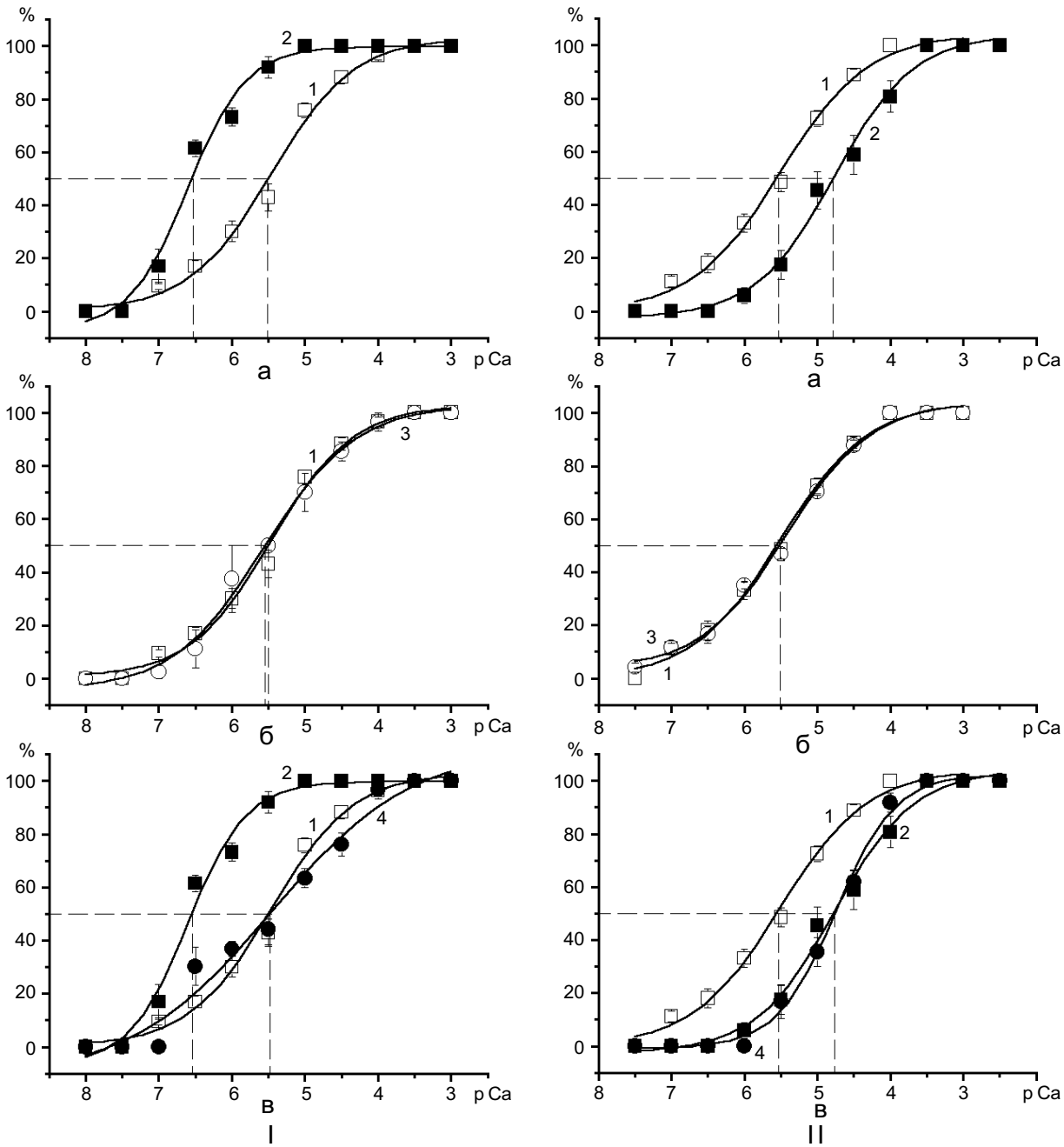

Рис. 1. Зміни залежності pCa – скорочення в скінованих препаратах легеневої артерії (I) та аорти (II) щура під дією гіпоксії (а) та челеритрину за нормоксичних (б) і гіпоксичних (в) умов: 1 – нормоксія, 2 – гіпоксія, 3 – нормоксія та блокада протеїнкінази С, 4 – гіпоксія та блокада протеїнкінази С

рувався при нормоксії (див. рис. 1, І в). Як видно з рис. 2,б та 2,в, на скінованих препаратах аорти блокада ПКС челеритрином (10^{-6} моль/л) не впливала на криву залежності рСа – скорочення ні за умов нормоксії: pCa_{50}=5,42±0,08 (n=8; P>0,05), ні за умов гіпоксії pCa_{50}=4,74±0,04 (n=7; P>0,05).

У другій серії експериментів ми досліджували зміни кальцієвої чутливості скоротливого апарату ГМК і роль ПКС у розвитку генетично детермінованої гіпертензії. У цих щурів було зареєстровано підвищення АТс, порівняно з контрольними тваринами (173,55 мм рт.с. ± 2,05 мм рт. ст., n=12 та 121,27 мм рт.ст. ± 3,85 мм рт. ст., n=11 відповідно; P<0,001). У скінованих препаратах аорти щурів з генетично детермінованою гіпертензією спостерігався зсув уліво на 0,89 одиниць кривої залежності рСа – скорочення (n=12; P<0,001) порівняно з препаратами аорти контрольних тварин (n=11), що свідчить про підвищення кальцієвої чутливості скоротливого апарату ГМК (рис. 2,а).

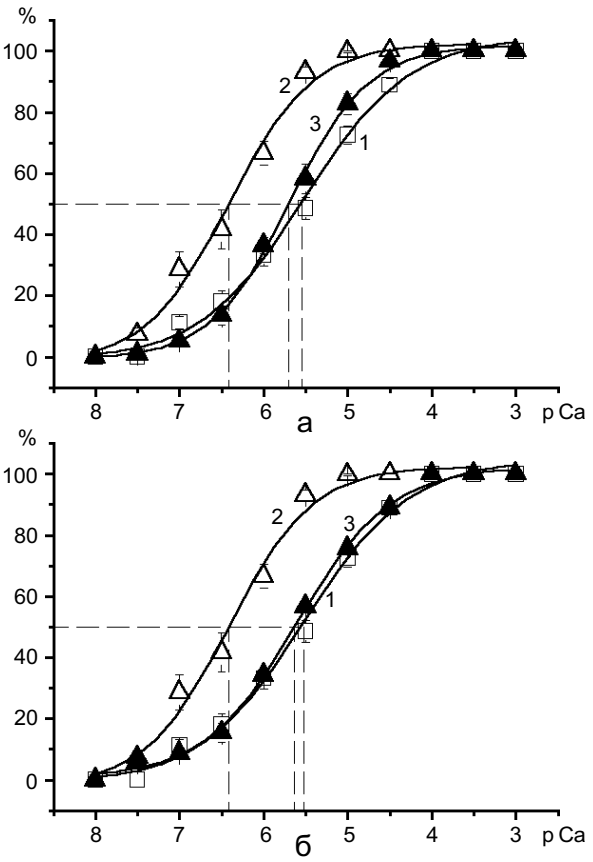

Рис. 2. Вплив челеритрину (а) та стауроспорину (б) на залежність рСа – скорочення в скінованих препаратах аорти щурів з генетично детермінованою гіпертензією: 1 – контроль, 2 – гіпертензія, 3 – гіпертензія та блокада протеїнкінази С

Блокатори ПКС челеритрин (10^{-6} моль/л) і стауроспорин (10^{-7} моль/л) у скінованих препаратах аорти щурів з генетично детермінованою гіпертензією викликали збільшення значення pCa_{50} на 0,72 (n=9; P<0,001) та на 0,81 одиниці (n=6; P<0,001) відповідно порівняно з препаратами контрольних тварин (n=11), тобто зсували криву залежності рСа – скорочення вправо (див. рис. 2, а,б), що свідчить про нормалізацію під їх впливом кальцієвої чутливості скоротливого апарату.

Метою наступної серії експериментів було дослідити участь ПКС у змінах кальцієвої чутливості скоротливого апарату ГМК, які можуть лежати в основі розвитку гіпертензії, що виникає внаслідок дії іонізуючого опромінення [3]. У щурів, яким проводили одразове γ-опромінення (доза 6 Гр, джерело ^{60}Co), на 30-ту добу спостерігалося значне підвищення АТс, яке становило 147,28 мм рт.ст. ± 4,67 мм рт.ст. (n=6; P<0,001). На скінованих препаратах аорти цих тварин спостерігалося підвищення кальцієвої чутливості скоротливого апарату ГМК, що виражалося у зсуві кривої залежності рСа – скорочення вліво на 0,77 одиниці (n=6; P<0,001) порівняно з препаратами аорти контрольних тварин (n=11) (рис. 3). Додавання челеритрину (10^{-6} моль/л) до перфузуючого розчину призводило до зсуву кривої залежності рСа – скорочення вправо на 0,31 одиниці (n=6; P<0,001) (див.рис. 3).

Отримані результати свідчать про те, що підвищення чутливості скоротливого апарату до Ca^{2+} є одним із ключових механізмів підвищення тонусу судинних ГМК

у патогенезі гіпертензивних станів різної етіології. При цьому, як також показують результати наших досліджень із застосуванням селективних блокаторів ПКС, збільшення кальцієвої чутливості скоротливого апарату ГМК пов'язано з підвищенням активності ПКС. Тоді як підвищення активності ПКС у ГМК легеневих артерій під дією гіпоксії, як уже зазначалося, може бути зумовлене взаємодією ПКС із реактивними видами кисню, що виникають під дією гіпоксії [5], у випадку спонтанної та радіаційної гіпертензії такі зміни можуть бути викликані іншими, досі не визначеними механізмами.

Відомо, що під дією радіаційного опромінення продуктами вільнорадикального перекисного окиснення є і реактивні види кисню, мішенями яких можуть бути як ліпіди клітинних мембран, так і ДНК та регуляторні ферменти [2]. Підвищення активності ПКС при цьому з одного боку, можливо, є наслідком модулюючої дії продуктів перекисного окиснення ліпідів [1], а з іншого – наслідком прямої взаємодії реактивних видів кисню з ПКС. В основі підвищення активності ПКС у ГМК системних судин при спонтанній гіпертензії може лежати експресія матричного синтезу ПКС внаслідок ще не з'ясованих причин [15].

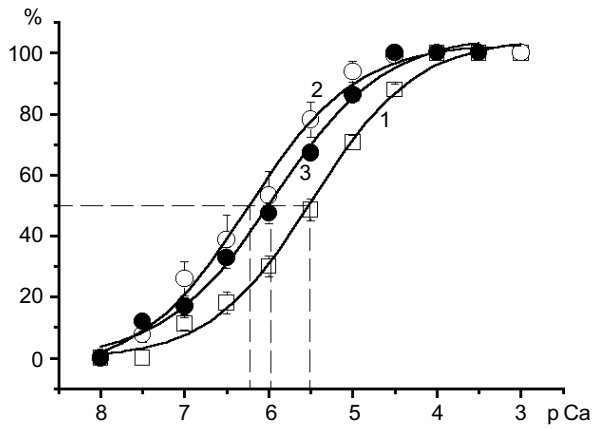

Рис. 3. Вплив челеритрину на залежність pCa – скорочення в скінованих препаратах аорти -опромінених щурів: 1 – контроль, 2 – опромінення, 3 – опромінення та блокада протеїнкінази С

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

A.A. Pavlova, V.F. Sagach, A.I. Soloviev

EFFECTS OF INHIBITING PROTEIN KINASE C ON CA^{2+}-SENSITIVITY OF CONTRACTILE MACHINERY IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE UNDER VASOSPASM OF DIFFERENT GENESIS

The aim of the study was to investigate the role of protein kinase C (PKC) in changes in myofilament Ca^{2+}-sensitivity of vascular smooth muscle cells (SMC) in rats at different vasospastic states: hypoxic pulmonary vasoconstriction, genetically determined hypertension, and hypertension resulted from ionizing radiation. All vasospastic states demonstrated rightward shifts in pCa-tension curves suggesting that myofilament Ca^{2+}-sensitivity had increased. In chemically (β-escin) skinned pulmonary artery, hypoxia-induced increase in myofilament Ca^{2+}-sensitivity was completely abolished by PKC inhibitor chelerythrine. The similar results were demonstrated in skinned aorta SMC of spontaneously hypertensive rats where an increase in myofilament Ca^{2+}-sensitivity was also abolished by PKC inhibitors chelerythrine and staurosporine. The chelerythrine partially inhibited myofilament Ca^{2+}-sensitivity that had increased following γ-radiation. The data suggest the key role of PKC activity in modulation of myofilament Ca^{2+}-sensitivity in SMC. We conclude that PKC-mediated increase in myofilament Ca^{2+}-sensitivity is one of the main mechanisms which contribute to the vasospasm of different genesis.

Institute of Pharmacology and Toxicology Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev;

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. Перекисное окисление и радиация. К.: Наук. думка, 1991. – 256 с.
2. Кудряшов Ю.Б. Лучевое поражение. – М.: Изд-во моск. ун-та, 1987. – С.5 – 72.
3. Соловйов А.І., Тишкін С.М., Хромов О.С., Стефанов О.В. Скорочувальна функція судин при артеріальній гіпертензії різного генезу та її ко-

рекція за допомогою фосфатидилхолінових ліпосом // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, №6. – С.11 – 17.
4. Соловьев А.И. Изменения Ca^{2+}-чувствительности сократительных белков гладкомышечных клеток воротной вены крыс при растяжении и гипоксии // Физиол. журн. СССР – 1990. – **76**. – С.1048 – 1054.
5. Archer S.L., Peterson D., Nelson D.P. et al. Oxygen radicals and antioxidant enzymes alter pulmonary vascular reactivity in the rat lung // J. Appl. Physiol. – 1989. – **66**. – P.102 – 111.
6. Bunn H.F., Poyton R.O. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia // Physiol. Rev. – 1996. – **76**, №3. – P.839 – 877.
7. Chatterjee M., Teajada M. Phorbol ester induced contraction in chemically-skinned vascular smooth muscle // Amer. J. Physiol. – 1986. – **261**. – C356 – 361.
8. Hattaway D.R., Adam L.P., Turner R.C. et al. Myosine light chain and heavy chain phosphorylation in smooth muscle: potential regulatory roles for calcium phopholipids and cyclic nucleotides // Biochem. Soc. Trans. – 1988. – **16**, №4. – P.449 – 501.
9. Ikebe M., Inagaki M., Kanamaru K. et al. Phosphorylation of smooth muscle myosin light cain kinase by Ca^{2+}-activated phospholipid-dependent protein kinase // J. Biol. Chem. – 1980. – **260**, №8. – P.4547 – 4550.
10. Jiang M.J., Morgan J.P., Schoen F.J., Morgan K.G. A phorbol ester contracts human coronary artery without increasing Ca^{2+} // Circulation. – 1986. – **74**, №2. – P.84.
11. Jin, N., Packer, C.S., Rhoades, R.A. Reactive oxygen-mediated contraction in pulmonary arterial smooth muscle: cellular mechanisms // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1991. – **69**. – P.383 – 388.
12. Lee M.W., Severson D. Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerine second messengers and PKC action // Amer. J. Physiol. (Cell Physiol.36). – 1994. – **267**. – P.C659 – C678.
13. Meisheri K.D., Ruegg J.C., Paul R.J. Studies on skinned fiber preparations. – In: Calcium and Contractility (ed. by Grover A.K., Daniel E. E.). Clifton, New Jersey, U.S.A.: The HUMANA Press, 1985. – P.191 – 224.
14. Morgan, J.P., Morgan, K.G. Stimulus-specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein // J. Physiol. – 1984. – **361**. – P.155 – 167.
15. Muracada K., Kohno M., Yasunari K. et al. Possible involvement of protein kinase C in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats // J. Hypertens. – 1988. – **6**. – P.157 – 159.
16. Murphy R.A., Aksoy M.O., Dillon P.F. et al. The role of myosin light chain phosphorylation in regulation of the cross-bridge cycle // Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. – 1983. – **42**. – P.51 – 56.
17. Nashimura J., Moreland S., Moreland R., vanBreemen C. Regulation of the Ca^{2+}-force relationship in permeabilized arterial smooth muscle. Regulation of smooth muscle contraction. – New York – London, 1991. – P.11 – 127.
18. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion // Nature. – 1984. – **308**. – P.693 – 698.
19. Rasmussen H., Takuwa Y., Park S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction // FASEB J. – 1987. – **1**. – P.177 – 185.
20. Sato K., Jzaki H., Karaki H. Changes in citosolic calcium level in vascular smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator Fura-2 // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1988. – **246**. – P.294 – 300.
21. Soloviev A.I., Bernshtein S.A. The contractile apparatus invascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats possess increased calcium sensitivity: the possible role of protein kinase C // J. Hypertens. – 1992. – **10**. – P.131 – 136.
22. Yamanishi J., Takai Y., Kaibuchi K. et al. Synergistic functions of phorbol ester and calcium in serotonin release from human platelets // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1983. – **112**. – P.778 – 786.

Ін-т фармакології та токсикології АМН України, Київ;
Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 25.09.2003