

**А. І. Соловійов, В. В. Легенький, С. М. Зеленський,
О. О. Мойбенко, О. В. Стефанов**

цГМФ–незалежний вплив оксиду азоту на скоротливу активність і вміст внутрішньоклітинного Ca^{2+} гладеньких м'язів хвостової артерії щура

Исследовано влияние оксида азота (NO , 10^{-6} моль/л) на сократительную активность и содержание внутриклеточного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в гладких мышцах хвостовой артерии крысы в норме и в условиях ингибирования растворимой формы гуанилатциклазы (рГЦ) с помощью 6-анилин-5,8-хинолиндиона (LY83583, 10^{-6} моль/л). NO вызывал расслабление гладких мышц на $61,01\% \pm 5,56\%$ от максимальной амплитуды сокращения гиперкалиевым раствором Кребса, и уменьшал $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на $66,35\% \pm 11,33\%$. В условиях ингибирования рГЦ с помощью LY83583 NO вызвал расслабление гладких мышц на $29,41\% \pm 5,17\%$ от максимальной амплитуды сокращения, и уменьшил $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на $53,68\% \pm 16,93\%$. Таким образом, доказано существование цГМФ-независимого пути расслабления и уменьшения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в гладких мышцах хвостовой артерии крысы.

Вступ

Відомо, що функції кровоносних судин регулюються багатьма судиноактивними речовинами, що синтезуються й вивільнюються ендотелієм [6–9]. Було виявлено, що оксид азоту (NO) є ендотеліальним фактором розслаблення судин [15, 16, 24]. Також було встановлено, що основною мішенню NO в гладеньких м'язах судин є розчинна форма гуанілатциклази (рГЦ) [18, 20]. Активація рГЦ за допомогою NO призводить до підвищення утворення цГМФ – молекули, що опосередковує розслаблення гладеньких м'язів судин (ГМС) [21, 25].

Вважається, що активація цГМФ-залежних протеїнкіназ та фосфорилювання багатьох білків складає каскад фосфорилювання/дефосфорилювання білків, що призводить врешті до дефосфорилювання легкого ланцюга міозину та як наслідок цього – розслаблення ГМС [11]. Як альтернатива, було зроблено припущення, що цГМФ безпосередньо контролює кальцієву чутливість скорочувального апарата ГМС через активацію специфічних протеїнкіназ [17, 22]. Також вважається, що розслаблення, викликане NO через активацію рГЦ та збільшення кількості внутрішньоклітинного цГМФ, опосередковується через зміни у вмісті внутрішньоклітинного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), оскільки останній є ключовим фактором скорочення ГМС [14, 28].

Існує мало відомостей щодо альтернативних цГМФ-незалежних механізмів розслаблення ГМС [1, 23, 30]. Було виявлено цГМФ-незалежний вплив NO на Na^+ , K^+ -АТФазну активність ГМС [13]. Було також показано, що NO зменшує кальцієву-чутливість міофіламентів незалежно від активації

рГЦ [26]. Вплив NO зменшився після обробки ГМС дитіоеритритолом, за властивість якого вважається підтримка SH-груп у відновленому стані, що робить їх нездатними до нітрозилування [27].

Отже, мета даної роботи полягала в дослідженні цГМФ-незалежного механізму розслаблення ГМС хвостової артерії щура, зокрема дослідження змін скоротливої активності та $[Ca^{2+}]_i$ за умов інгібування рГЦ ГМС хвостової артерії щура.

Методика

За об'єкт досліджень обрали сегменти хвостової артерії щурів-самців лінії Вістар масою 200–250 г. Вирізали сегмент довжиною 2–3 см хвостової артерії щура й очищували від сполучної та жирової тканини. Цей сегмент розрізали на кільця завширшки 2–3 мм, які потім вигортали назовні, видаляючи ендотелій. Усі процедури проводили за кімнатної температури в модифікованому розчині Кребса, що мав наступний склад (ммоль/л): NaCl – 122; KCl – 4,7; $NaHCO_3$ – 15,5; KH_2PO_4 – 1,2; $CaCl_2$ – 2,5; $MgCl_2$ – 1,2 та глюкоза – 11,5; рН 7,3–7,4. Гіперкалієвий розчин Кребса з високим вмістом K^+ (70 ммоль/л) готували за допомогою еквімолярного заміщення NaCl на KCl.

Досліди виконували в камері об'ємом 300 мкл, установленій на предметний стіл флуоресцентного мікроскопа “ЛЮМАМ-И2” (С.-Петербург, Росія). Скоротливу активність кілець хвостової артерії щура вимірювали в режимі, близькому до ізометричного, використовуючи датчик скорочень (AE 801, SensoNor A/S, Horten, Норвегія). Скорочувальну активність та $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ГМС хвостової артерії щура реєстрували, використовуючи електронну інтеграцію активного натягу та флуоресцентного сигналу від фотоелектричного множника стосовно часу. За винятком процедури завантаження, кільця безперервно піддавали перфузії попередньо нагрітим розчином Кребса за температури 35⁰С та швидкості 2,0 мл за хвилину.

Вміст $[Ca^{2+}]_i$ вимірювали з використанням флуоресцентного кальцієвого індикатора Fura-2, використовуючи ацетоксиметильний ефір Fura-2, здатний до проникнення крізь клітинну мембрану (Fura-2 AM) [12]. ГМС хвостової артерії щура завантажували 10 мкмоль/л Fura 2-AM у розчині з наступним складом (ммоль/л): NaCl – 122; KCl – 4,7; $CaCl_2$ – 2,5; $MgCl_2$ – 1,2; Pluronic F-127 – 5 мг/мл, NERES (N-2(гідроксиетилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота) – 11,6 та глюкоза – 11,5, рН 7,3–7,4 протягом 2 год за кімнатної температури. Після завантаження ГМС камеру піддавали перфузії вищезгаданим модифікованим розчином Кребса протягом щонайменше 30-ти хвилин перед тим, як проводити дослідження.

Результати вимірювань $\Delta[Ca^{2+}]_i$ представлені як співвідношення флуоресцентних сигналів (F) при 340 та 380 нм, $R = F_{340nm}/F_{380nm}$. Абсолютні значення $[Ca^{2+}]_i$ залежать від константи дисоціації Fura-2 [12], його розподілення в середині клітини, зв'язування та компартменталізації [3]. Таким чином, ми спостерігали ΔF сигналу, що кількісно відображає $\Delta[Ca^{2+}]_i$, а, отже, вважається придатним для досліджень процесів в середині клітин [2].

Усі неорганічні сполуки одержували від Sigma Chemical Co. (St. Louis, штат Міссурі, США). LY83583 одержали від Calbiochem-Novabiochem Co. (San Diego, штат Каліфорнія, США). Fura-2 AM одержували від Molecular

Probes, Inc. (Eugene, штат Орегон, США). Вихідний розчин NO (3 ммоль/л) одержували, додаючи 5 мл газу NO до 20 мл дезоксигенованої води.

Результати досліджень піддавали статистичній обробці з використанням критерію *t* Стьюдента.

Результати та їх обговорення

У наших дослідженнях ми спостерігали за одночасною зміною двох важливих взаємопов'язаних параметрів, що є своєрідними індикаторами тону судин. Вважається, що кількість $[Ca^{2+}]_i$ має корелювати зі скоротливою активністю ГМС, тобто рівень $[Ca^{2+}]_i$ має відповідати рівню сили скорочення/розслаблення. За певних умов, наприклад дії судиноактивних речовин, ця пряма кореляція може змінюватись, про що в таких випадках кажуть про зміну Ca^{2+} -чутливості клітинних білків, зокрема скорочувального апарату [22].

Ендогенне утворення NO та послідовне стимулювання рГЦ є важливим та розповсюдженим шляхом функціонування клітин та засобів зв'язку між ними, зокрема шляхом регуляції тону судин. цГМФ-залежна протеїнкіназа, активована своїм вторинним посередником — цГМФ, модулює функцію клітин через фосфорилювання білків-субстратів та також зміну Ca^{2+} -чутливості ГМС [17].

Наші дослідження показали прояви зміни Ca^{2+} -чутливості ГМС хвостової артерії щура за умов дії NO. На рис. 1 зображено вплив NO на скоротливу активність та вміст $[Ca^{2+}]_i$ в ГМС хвостової артерії щура. Сила скорочення виражена в мН, а значення $\Delta[Ca^{2+}]_i$ як відношення сигналів 340/380 (див.методику). Усі кільця скорочували за допомогою розчину Кребса з високим вмістом K^+ (70 ммоль/л). NO безпосередньо вводили за допомогою ін'єкції в експериментальну камеру, використовуючи шприц Гамільтона. Значення концентрації 10^{-6} моль/л вважається близьким до тих, що мають місце за фізіологічних умов, і було обрано для вивчення впливу NO. У контрольних експериментах NO (10^{-6} моль/л) викликав відносно тривале розслаблення ГМС, тоді як зменшення $[Ca^{2+}]_i$ залишалось короткочасним (див. рис. 1). Це свідчить про наявність у впливі NO компонента, дія якого опосередкована не через синтез цГМФ та безпосередню дію цГМФ на гомеостаз $[Ca^{2+}]_i$, а

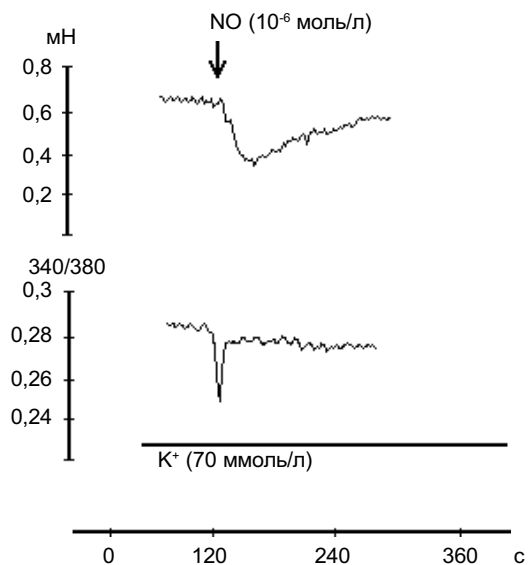


Рис. 1. Вплив оксиду азоту (NO) на силу скорочення та вміст внутрішньоклітинного кальцію (340/380) в ГМС хвостової артерії щура, скорочених розчином Кребса з високим вмістом K^+ (70 ммоль/л).

Рис. 2. Вплив оксиду азоту (NO) на силу скорочення та вміст внутрішньоклітинного кальцію (340/380) за умов інгібування рГЦ з допомогою LY83583 в ГМС хвостової артерії щура, скорочених розчином Кребса з високим вмістом K^+ (70 ммоль/л).

через інший вплив NO, не пов'язаний безпосередньо зі зміною $[Ca^{2+}]_i$, але такий вплив, що призводить до зміни скоротливої активності ГМС.

Для того, щоб перевірити, чи насправді існує альтернативний цГМФ-незалежний механізм дії NO на ГМС, ми інгібували активність рГЦ, безпосередньої мішені NO в ГМС. На рис. 2 зображено вплив NO на ГМС за умов інгібування накопичення цГМФ з допомогою LY83583 (10^{-6} моль/л). На рисунку показано, що NO викликав значні зміни як у силі скорочення, так і $[Ca^{2+}]_i$. Це свідчить, що в даному випадку NO впливав на ГМС хвостової артерії щура, змінюючи силу скорочення та $[Ca^{2+}]_i$ не через рГЦ, оскільки активність останньої була інгібована. Якщо порівняти характер змін оригінальних кривих сили скорочення та $[Ca^{2+}]_i$, то можна побачити, що характер зміни $[Ca^{2+}]_i$ лишається однаковим за цих умов, тоді як в силі скорочення відбуваються деякі зміни, зокрема зменшується час виходу значень сили на плато за умов інгібування рГЦ.

Наступним етапом було кількісне порівняння досліджуваних показників. На рис. 3 зображено порівняльну діаграму впливу NO на ГМС у нормі (NO) та за умов інгібування накопичення цГМФ з допомогою LY83583 (NO+LY). У контрольних експериментах викликане NO розслаблення становило $61,01 \pm 5,56\%$ від максимальної амплітуди скорочення, викликаного розчином Кребса з високим вмістом K^+ (70 ммоль/л), і зменшення $[Ca^{2+}]_i$ було $66,35 \pm 11,33\%$ ($P < 0,01$; $n = 6$). За умов інгібування рГЦ з допомогою LY83583 викликане

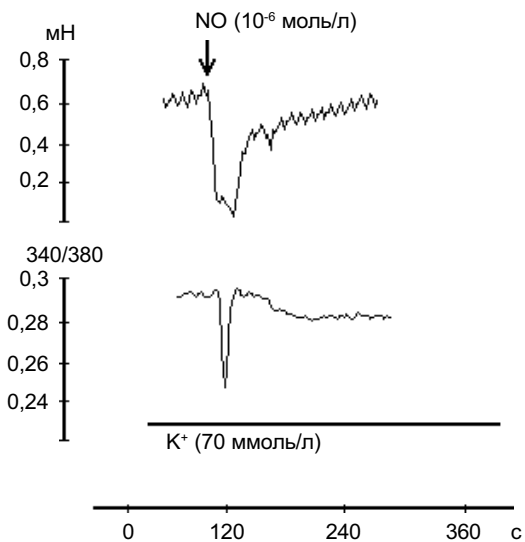
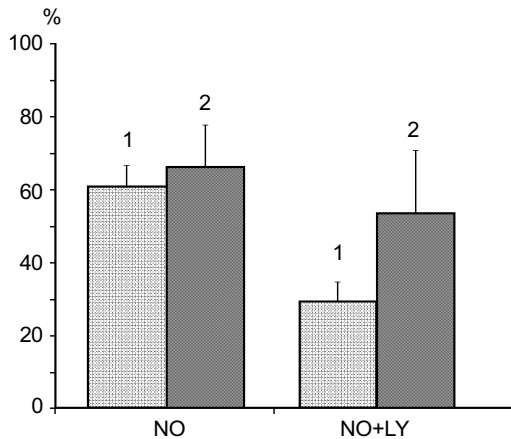


Рис. 3 Діаграма викликаного NO (10^{-6} моль/л) розслаблення та зменшення $[Ca^{2+}]_i$ в нормі (NO) та за умов інгібування рГЦ з допомогою LY83583 (10^{-6} М) (NO+LY). Сила розслаблення (1) виражена як відсоток від скорочення, викликаного розчином Кребса з високим вмістом K^+ (70 ммоль/л). Значення $\Delta[Ca^{2+}]_i$ (2) подані як відсоток від максимального значення, викликаного розчином Кребса з високим вмістом K^+ .



NO розслаблення становило $29,41\% \pm 5,17\%$ від максимальної амплітуди скорочення, викликаного розчином Кребса з високим вмістом K^+ (70 ммоль/л), і зменшення $[Ca^{2+}]_i$ було $53,68\% \pm 16,93\%$ ($P < 0,01$; $n = 6$). Цікаво, що сила скорочення/розслаблення за різних умов достовірно відрізняється ($P < 0,01$). Так, за умов інгібування рГЦ вона є достовірно меншою за значенням, ніж за контрольних умов, тоді як значення для $[Ca^{2+}]_i$ достовірно не відрізняються. Можна припустити, що саме цей факт пояснює таку властивість ГМС, як зміна Ca^{2+} -чутливості клітинних білків, зокрема актино-міозинового комплексу [22].

Наші результати узгоджуються з результатами, одержаними раніше. Так, у дослідях зі скинованими ГМС Соловійов та співавтори виявили, що NO зменшує Ca^{2+} -чутливість міофіламентів незалежно від активації рГЦ [26]. Крім того, вплив NO був зменшений після обробки ГМС дитіоеритритолом, за властивість якого вважається підтримка SH-груп у відновленому стані, що робить їх нездатними до нітрозилування [27]. Це свідчить про безпосередній вплив NO на білки ГМС та зміну їх активності або існування вторинних/третинних посередників, відмінних від цГМФ. Отже, повного розуміння всіх клітинних подій, що відбуваються в ГМС та передують розслабленню поки немає.

Таким чином, розслаблення судин та зменшення $[Ca^{2+}]_i$ в ГМС за умов інгібування рГЦ свідчить про існування альтернативного цГМФ-незалежного шляху розслаблення ГМС і передбачає існування іншого/інших посередників та/або безпосередній вплив NO на білки, зокрема, на скорочувальний апарат ГМС.

**A.I.Soloviev, V.V.Legen'kyy, S.M.Zelensky, O.O.Moibenko,
O.V.Stefanov**

cGMP-INDEPENDENT EFFECT OF NITRIC OXIDE ON CONTRACTILITY AND INTRACELLULAR CALCIUM LEVEL OF RAT TAIL ARTERY SMOOTH MUSCLES

The effects of nitric oxide (NO, 10^{-6} M) on contractility and intracellular calcium level ($[Ca^{2+}]_i$) of rat tail artery smooth muscles in control and under inhibition of soluble guanylate cyclase (sGC) with 6-anilino-5,8-quinolinedione (LY83583, 10^{-6} M) are investigated. NO-induced relaxations of vascular smooth muscles comprised $61,01 \pm 5,56\%$ of maximum induced amplitude of K^+ -contracture, and decreases in $[Ca^{2+}]_i$ comprised $66,35 \pm 11,33\%$. Under the inhibition of sGC with LY83583 NO-induced relaxations of vascular smooth muscles comprised $29,41 \pm 5,17\%$ of maximum induced amplitude of K^+ -contracture, and decreases in $[Ca^{2+}]_i$ comprised $53,68 \pm 16,93\%$. Thus, cGMP-independent relaxation of vascular smooth muscle and decrease in $[Ca^{2+}]_i$ of rat tail artery is confirmed.

Institute of pharmacology and toxicology, Academy of medical sciences of Ukraine, Kiev; Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Archer S. L., Huang J. M., Hampl V. et al. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – **91.** – P. 7583-7587.
2. Baylor S. M., Hollingworth, S. Measurement and interpretation of cytoplasmic $[Ca^{2+}]_i$ signals from calcium-indicator dyes // *News Physiol. Sci.* – 2000. – **15.** – P. 19-25.
3. Blatter L. A., Wier W. G. Intracellular diffusion, binding and compartmentalization of the fluorescent calcium indicators indo-1 and fura-2 // *Biophys. J.* – 1990. – **58.** – P. 1491-1499.
4. Blatter L. A., Wier W. G. Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current // *Cell Calcium.* – 1994. – **15.** – P. 122-131.
5. Collins P., Griffith T. M., Henderson A. H., Lewis M. J. Endothelium-derived relaxing factor alters calcium fluxes in rabbit aorta: a cyclic guanosine monophosphate-mediated effect // *J. Physiol.* – 1986. – **381.** – P. 427-437
6. De May J. G., Grand S. D. Endothelium-dependent reactivity in resistance vessels // *Prog. Appl. Microcirc.* – 1985. – **8.** – P. 181-187.
7. Furchgott R. F. Role of endothelium in response of vascular smooth muscle // *J. Vasc. Res.* – 1983. – **53.** – P. 557-573.
8. Furchgott R. F., Vanhoutte P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors // *FASEB J.* – 1989. – **3.** – P. 2007-2018.
9. Furchgott R. F., Zawadzki J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *Nature.* – 1980. – **228.** – P. 373-376.
10. Furukawa K.-I., Ohshima N., Yawada-Iwata Y., Shigekawa M. Cyclic cGMP stimulates Na^+/Ca^{2+} exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture // *J. Biol. Chem.* – 1991. – **266.** – P. 12377-123341.
11. Griffith T. M., Edwards D. H., Lewis M. J., Henderson A. H. Evidence that cyclic guanosine monophosphate (cGMP) mediates endothelium-dependent relaxation // *Europ. J. Pharmacol.* – 1985. – **112.** – P. 195-202.
12. Grynkiewicz G., Poenie G. M., Tsien R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260.** – P. 3440-3450.
13. Gupta S., McArthur C., Grady C., Ruderman N. B. Stimulation of vascular $Na(+)-K(+)-ATPase$ activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect // *Amer. J. Physiol.* – 1994. – **266.** – P. 2146-2151.
14. Himpens B., Missiaen L., Casteels R. Ca^{2+} -homeostasis in vascular smooth muscle // *J. Vasc. Res.* – 1995. – **32.** – P. 207-219.
15. Ignarro L. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties // *FASEB J.* – 1989. – **3.** – P. 31-36.
16. Ignarro L. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein // *Circulat. Res.* – 1989. – **65.** – P. 1-21.
17. Karak H., Sato K., Ozaki H., Murakami K. Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle // *Europ. J. Pharmacol.* – 1988. – **156.** – P. 259-266.
18. Kuriyama H., Kitamura K., Nabata H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues // *Pharmacol. Rev.* – 1995. – **47.** – P. 491-499.
19. Magliola I., Jones A. W. Sodium nitroprusside alters Ca^{2+} flux components and Ca^{2+} -dependent fluxes of K^+ and Cl^- in rat aorta // *J. Physiol.* – 1990. – **421.** – P. 411-424.
20. Moncada S., Palmer R. M., Higgs I. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // *Pharmacol. Rev.* – 1991. – **43.** – P. 109-142.

21. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation // J. Clin. Invest. – 1986. - **78**. – P. 1-5.
22. Nishimura J., van Breeman C. Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1989. - **163**. – P. 929-935.
23. Otsuka Y., DiPiero A., Hirt E., Brennaman B., Lockette W. Vascular relaxation and cGMP in hypertension // Am. J. Physiol. – 1988. - **254**. – P. 163-169.
24. Palmer R. M., Feridge A. G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor // Nature. – 1987. - **327**. – P. 524-526.
25. Rapoport R. M., Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP // Circulat. Res. – 1983. - **52**. – P. 352-357.
26. Soloviev A., Hellstrand P., Stefanov A. Nitric oxide decreases myofilament Ca²⁺-sensitivity in rat tail artery smooth muscle independent of guanylyl cyclase activation (Abstract) // J. Vasc. Res. – 1996. - **33**. – P. 43.
27. Soloviev A., Hellstrand P., Stefanov A. Nitric oxide but not peroxynitrite relaxes a-toxin permeabilized smooth muscle of rat tail artery (Abstract) // Ibid. – 1997. - **34**. – P. 38.
28. Somlyo A. P., Himpens B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle // FASEB J. – 1989. - **3**. – P. 2266-2276.
29. Vrolix M., Raeymaekers L., Wuytack F. Et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasmalemmal Ca²⁺ pump of smooth muscle via phosphorylation of phosphatidylinositol // Biochem. J. – 1988. - **255**. – P. 855-863.
30. Wang R., Wu L., Wang Z. The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells // Pflugers Arch. – 1997. - **434**. – P. 285-291.

*Ін-т фармакології та токсикології
АМН України, Київ;*

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця
НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 07.06.2001*