

О. Я. Андрухов, В. Ф. Сагач

Механізм впливу оксиду азоту на чутливість скорочувального апарату гладеньких м'язів до Ca^{2+}

В работе исследовалась роль сульфгидрильных групп сократительных белков гладких мышц в изменениях чувствительности сократительного аппарата к Ca^{2+} при действии оксида азота. Показано, что как модификация, так и восстановление сульфгидрильных групп вызывают расслабление максимально активированных скинированных препаратов воротной вены крысы. Расслабляющие эффекты восстановителя сульфгидрильных групп дитиотреитола и донора оксида азота нитропрусида натрия не были аддитивными. После расслабления, вызванного влиянием одного из этих веществ, влияние другого было незначительным. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что уменьшение чувствительности сократительного аппарата гладких мышц к Ca^{2+} под действием оксида азота является результатом его взаимодействия с сульфгидрильными группами сократительных белков.

ВСТУП

Речовини ендотеліального походження відіграють важливу роль у регуляції судинного тонусу [2, 12]. Однією з таких речовин є оксид азоту (NO), який викликає розслаблення судинних гладеньких м'язів (ГМ) [4, 18]. Молекула NO містить непарну кількість електронів, один з яких має неспарений спіні [8]. Наявність цього електрона і зумовлює високу реакційну спроможність молекули NO. У біологічних системах NO вступає в хімічні реакції з киснем, супероксид-аніоном, іонами перехідних металів і сульфогідрильними групами білків-мішеней [21]. Основним механізмом розслаблюючого впливу оксиду азоту на ГМ є цГМФ-залежний сигнальний шлях і активація цГМФ-залежної протеїнкінази, що призводить до зменшення вмісту $[Ca^{2+}]_i$ та зниження чутливості скорочувальних білків до Ca^{2+} [16]. Крім того, ефект оксиду азоту може реалізовуватися за допомогою безпосередньої взаємодії з білками-мішенями, що призводить до зміни їх функцій [7, 21]. Нещо

давно нами було показано, що донори оксиду азоту нітропрусид натрію (НН) і нітрогліцерин викликали розслаблення скінованих препаратів судинних ГМ [3]. Такий ефект може бути пов'язаний з безпосередньою взаємодією оксиду азоту з скорочувальним апаратом ГМ. Скорочувальні білки ГМ мають сульфогідрильні групи, модифікація яких призводить до зміни їх властивостей, зокрема змін ферментативної активності та моторної функції міозину [14, 17]. Модифікація сульфогідрильних груп швидкості реакції перетворення G-актину в F-актин, а також до зміни властивості актину утворювати філаменти [9]. Наявність цих груп робить скорочувальні білки однією з можливих мішеней для молекули NO.

Метою нашої роботи було виявити, чи є сульфогідрильні групи скорочувальних білків ГМ критичними у регуляції скорочувальної активності ГМ, а також дослідити роль цих груп у реалізації прямого дилататорного ефекту NO на скіновані препарати ГМ.

© О. Я. Андрухов, В. Ф. Сагач

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на ізольованих препаратах ворітної вени щурів лінії Вістар масою 200 – 250 г за методикою, описаною раніше [3]. Скорочення шкінованих препаратів ворітної вени відтворювали додаванням до релаксуючого розчину CaCl_2 . Концентрацію іонів Ca^{2+} вираховували використовуючи методику, описану Fabiato [10]. Реєстрацію скорочень проводили у режимі близькому до ізометричного за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX1С. Дослідження проводили при кімнатній температурі (24-26 °С). Результати експериментів оброблено за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Підвищення концентрації Ca^{2+} в перфузаті до рівня 10^{-4} моль/л викликало тонічне скорочення шкінованих препаратів ГМ ворітної вени. Додавання N-етилмалеїніміду, що специфічно алкілує сульфогідрильні групи, в концентрації 0,5 ммоль/л до перфузуючого розчину після досягнення фази плато викликало суттєве зменшення амплітуди скорочення (на $85,4\% \pm 4,2\%$, $n=7$, $P<0,001$), причому цей ефект є незворотним (рис. 1,а).

Для дослідження ролі сульфогідрильних груп у реалізації прямого ефекту оксиду азоту на ГМ вивчали НН на скорочувальну активність шкінованих препаратів ворітної вени при наявності відновника SH-груп дитіотрейтолу (ДТТ). У першу чергу, нами було досліджено, як сам ДТТ буде впливати на скорочувальну активність шкінованих препаратів ГМ. Додавання до перфузуючого розчину ДТТ у концентраціях 2-10 ммоль/л викликало дозозалежне зменшення амплітуди скорочення шкінованих препаратів ГМ (див. рис. 1,б). При концентрації ДТТ 2 ммоль/л розслаблення становило $13,9\% \pm 6,1\%$ ($n=7$, $P<0,05$), при 5 ммоль/л – $23,6\% \pm 7,0\%$ ($n=9$, $P<0,01$), а при концентрації 10 ммоль/л – $44,1\% \pm 4,8\%$ ($n=10$, $P<0001$) від початкової амплітуди скорочення. Для з'ясування ролі SH-груп у реалізації розслаблю-

ючого впливу оксиду азоту на шкіновані препарати ГМ нами було досліджено, чи є спільними механізми, задіяні в реалізації релаксуючого ефекту ДТТ та НН. Основною задачею цього етапу роботи було встановити, чи є ефекти НН та ДТТ адитивними. У першій серії експериментів досліджували вплив ДТТ на шкіновані препарати ворітної вени на фоні дії НН. У результаті було отримано, що НН (10^{-4} моль/л) викликав розслаблення шкінованих препаратів на $51,4\% \pm 7,9\%$ ($n=7$, $P<0,01$) від початкової амплітуди скорочення. Додавання до перфузуючого розчину ДТТ на фоні дії НН у концентрації 10 ммоль/л призводило до подальшого розслаблення ($63,8\% \pm 3,4\%$, $n=7$, $P<0,01$) від початкової амплітуди скорочення (рис. 2,а).

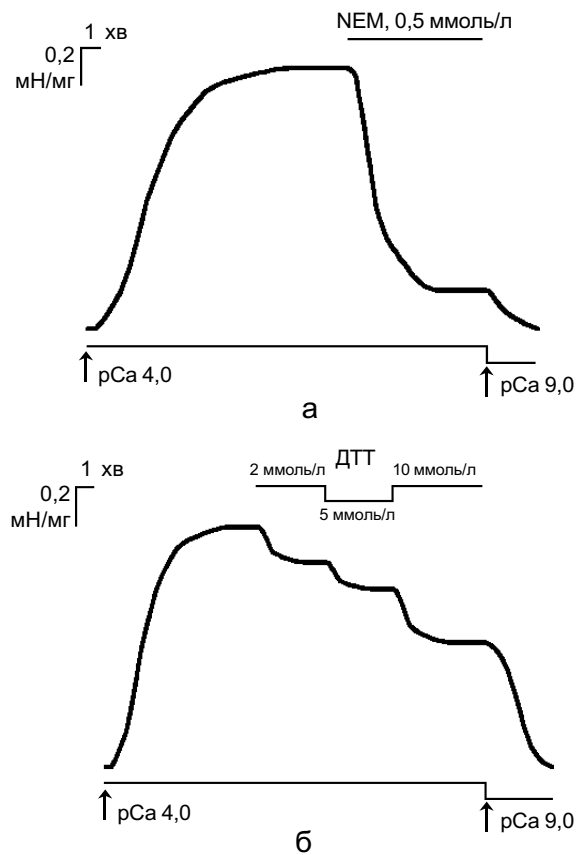


Рис. 1. Вплив N-етилмалеїніміду (а) та дитіотрейтолу (б) на скорочувальну активність шкінованих препаратів ворітної вени щура.

Видно, що на фоні дії НН, розслаблення, викликане ДТТ є незначним.

У наступній серії експериментів, навпаки, досліджувався вплив НН після дії ДТТ. Додавання нітропрусиду до перфузату на фоні розслаблення викликаного 10 ммоль/л ДТТ (на $44,2\% \pm 3,2\%$ від початкової амплітуди скорочення) спричиняло додаткове розслаблення ($59,9\% \pm 4,1\%$), проте як і в попередньому випадку це розслаблення було значно меншим ніж у контрольних препаратах (див. рис 2,б). Результати дослідження свідчать, що релаксуючі ефекти НН та ДТТ є не просто адитивними. Після розслаблення, викликаного однією з цих речовин, дія іншої є незначною.

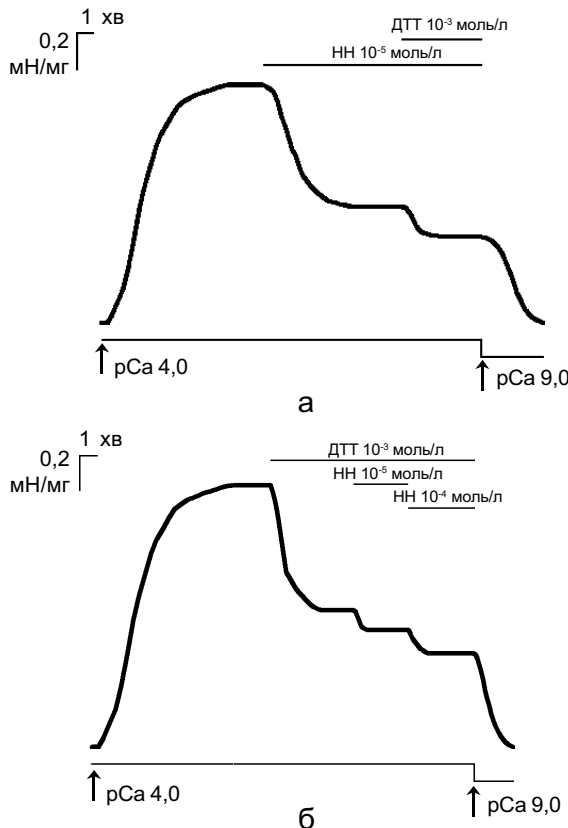


Рис. 2. Сумарний вплив дитіотретола (а) та нітропрусиду натрію (б) на скорочувальну активність скінованих препаратів ворітної вени щура залежно від послідовності дії: а – вплив дитіотретола на фоні дії нітропрусиду натрію; б -вплив нітропрусиду натрію на фоні дії дитіотретола.

У третій серії експериментів досліджували вплив НН на скорочувальну активність скінованих препаратів ГМ ворітної вени щура після дії при різних концентраціях ДТТ. Як і раніше, скорочення викликали підвищенням концентрації Ca^{2+} у перфузаті до 10^{-4} моль/л. Після досягнення фази плато до перфузату додавали ДТТ у концентраціях від 2 до 10 ммоль/л, що супроводжувалося розслабленням скінованих препаратів ГМ. По досягненні фази плато на фоні дії ДТТ до розчину додавали НН у концентраціях 10^{-5} - 10^{-4} моль/л, що спричинювало подальше розслаблення. З підвищенням концентрації ДТТ загальний його розслаблюючий ефект зростає, а ефект нітропрусиду, відповідно зменшується (рис. 3). В експериментах без ДТТ розслаблення у відповідь на 10^{-5} моль/л НН становило 30 - 35 % від початкової амплітуди розслаблення, тоді як після дії 10 ммоль/л ДТТ така концентрація НН розслаблення практично не викликає.

У скінованих препаратах ГМ відсутні мембранні механізми транспорту Ca^{2+} і скорочувальна активність таких препаратів визначається в основному властивостями скорочувального апарату [20]. Як свідчать результати нашого дослідження, сульфогідрильні групи скорочувальних білків є важ-

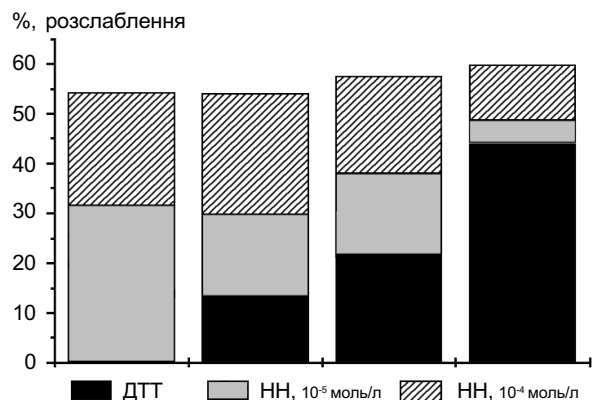


Рис. 3. Вплив нітропрусиду натрію (НН) на скорочувальну активність скінованих препаратів ворітної вени щура на фоні дії різних концентрацій дитіотретола (ДТТ): I-II – 2 ммоль/л, III – 5 ммоль/л, IV – 10 ммоль/л.

ливими у регуляції скорочувальної активності ГМ. Так, додавання до перфузату N-етилmaleїніміду призводить майже до повної втрати скорочувальної активності скінованих препаратів ГМ (див. рис. 1,а). ДТТ, який відновлює SH-групи, також викликає дозозалежне розслаблення скінованих препаратів ГМ. В інтактних препаратах ГМ ефект ДТТ може бути як скорочувальний, так і дилаторний [11]. За літературними даними, антагоністи ДТТ, окисники, викликають скорочення скінованих препаратів ГМ [13, 15]. Розслаблюючий ефект ДТТ, очевидно, пов'язаний з тим, що під час активації скорочення критичні сульфогідрильні групи знаходяться в окисненому стані. У скелетних м'язах ДТТ також викликає зменшення амплітуди тетанічного скорочення не змінюючи при цьому $[Ca^{2+}]_i$ [5]. Автори висловили гіпотезу, що відновлення SH-груп буде призводити до розслаблення активованих препаратів скелетних м'язів. Очевидно, в нашому випадку ми маємо справу з подібним механізмом у ГМ. Нещодавно було описано тримірну структуру скелетного міозину, яка показала, що ділянка молекули, що містить SH-групи, відділена від центру зв'язування нуклеотидів [19]. Беручи до уваги факт, що скорочувальний цикл супроводжується значним рухом у середині цієї ділянки, можна допустити, що відновлення більшої частини сульфогідрильних груп міозину може бути критичним у процесі актин-міозинової взаємодії. У ГМ, крім того, ділянка, що містить сульфогідрильні групи є важливою у реалізації зв'язку фосфорилювання регуляторного легкого ланцюга міозину - скорочення, і зміни стану SH-груп можуть призводити до порушення такого зв'язку [22].

Як оксид азоту, так і ДТТ викликають розслаблення ГМ внаслідок зменшення чутливості скорочувального апарату ГМ до Ca^{2+} . Дослідження одночасного впливу НН і ДТТ на скорочувальну активність ГМ свідчить, що ці ефекти не є адитивними. Загальний розслаблюючий вплив цих речовин практично не залежить від послідовності дії (див. рис. 3).

Проте ефект НН на фоні дії ДТТ є значно меншим, ніж слід було того очікувати, якщо б ефекти були просто адитивними. Цей факт може доводити те, що в реалізації розслаблюючих ефектів оксиду азоту та ДТТ можуть бути задіяні спільні механізми. Оскільки дія ДТТ пов'язана з відновленням сульфогідрильних груп, а оксид азоту може нітрозувати ці групи, то можна припустити, що в реалізації ефектів як оксиду азоту, так і ДТТ, задіяні ті самі SH-групи. Підтвердженням цієї гіпотези є результати дослідження впливу НН на скорочувальну активність скінованих препаратів ГМ на фоні дії різних концентрацій ДТТ (див. рис. 3). Як видно з цього рисунку, сумарний вплив ДТТ і НН практично однаковий при різних концентраціях ДТТ. Невелике зростання загального розслаблення, що спостерігається з підвищенням концентрації ДТТ можна пояснити збільшенням кількості речовин, що можуть реагувати з SH-групами. З підвищенням концентрації ДТТ розслаблюючий ефект НН стає меншим. Очевидно, що ДТТ викликає відновлення критичних SH-груп, що і є причиною розслаблення. Проте при низьких концентраціях ДТТ відновлюються не всі SH-групи. Тому додавання НН натрію призводить до нітрозювання решти сульфогідрильних груп і подальшого розслаблення. З підвищенням концентрації ДТТ кількість відновлених SH-груп збільшується, і залишається менше мішеней для дії оксиду азоту. Тому ми і спостерігаємо зменшення розслаблюючого ефекту НН. Найбільш імовірною мішенню для дії NO можна вважати SH-групи міозину. Таке припущення можна зробити, враховуючи отримані нами раніше дані, що прямий ефект NO на скорочувальний апарат є більш специфічним для ГМ [6], в яких регуляція скорочувальної активності є міозинзв'язаною [1]. На користь цього припущення свідчить також той факт, що модифікація сульфогідрильних груп міозину призводить до порушення зв'язку "фосфорилювання - скорочення" в ГМ [22].

Підсумовуючи отримані результати слід зазначити, що сульфогідрильні групи скоро-

чувальних білків є критичними у регуляції скорочувальної активності ГМ, і вони можуть бути залучені у реалізацію дилаторного ефекту оксиду азоту в ГМ. Зміна стану цих груп: алкілювання за допомогою N-етилmaleїміду, відновлення за допомогою ДТТ призводить до розслаблення активованих скінованих препаратів ГМ. Зменшення чутливості скорочувального апарату ГМ до Ca^{2+} , що спостерігаються при дії оксиду азоту, очевидно відбуваються внаслідок його взаємодії з сульфогідрильними групами скорочувальних білків ГМ.

О.У. Andrukhov, V.F. Sagach

THE MECHANISM OF NITRIC OXIDE EFFECTS ON THE SMOOTH MUSCLE CONTRACTILE APPARATUS Ca^{2+} -SENSITIVITY OF FORCE DEVELOPMENT

It was investigated whether the SH-groups of contractile proteins are involved in NO-induced relaxation of saponin-skinned smooth muscle strips. Both, the thiol-specific alkylating agent N-ethylmaleamide (NEM), and thiol-reducig agent dithiotreitol (DTT) induced relaxation of maximally activated skinned rat portal vein preparations. The relaxing effects of DTT and nitric oxide donor sodium nitroprusside were not additive. After the relaxation, induced by one of this agent, the effect of the other one was negligible. We suggest that NO-induced smooth muscle relaxation be due to decreasing of force sensitivity to Ca^{2+} . This effect of nitric oxide is realized by its interaction with critical thiol groups of smooth muscle contractile proteins.

A.A.Bogomoletz Institute Physiology Ukrainian Academy of Sciences, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Данилова В.М. Біохімічні механізми регуляції скорочення гладеньких м'язів // Біополимери и клетка – 1996. – 12, № 4. – С.3-19.
2. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М. та ін. Роль ендотелію та біологічно активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу і діяльності серця // Фізіол.журн. – 1997. – 43, № 1-2. – С.3-18.
3. Сагач В.Ф., Андрухов О.Я. Вплив оксиду азоту на скорочувальну активність скінованих препаратів гладеньких м'язів ворітної вени щура // Там же. – 2000. – 46, № 1. – С.3-8.
4. Ткаченко М.М. Оксид азоту та судинна регуляція // Журн. АМН. України. – 1997. – 3, № 2. – С.251-254.
5. Andrade F.H., Reid M.B., Allen D.G., Westerblad H. Effects of hydrogen peroxide and dithiotreitol on contractile function of single skeletal muscle fibers from the mouse // J. Physiol. – 1998. – 509, Pt.2. – P.565-576.
6. Andrukhov O.Y. Sagach V.F. Effects of nitric oxide on the contractile activity of the skinned rat portal vein and papillary muscle // Neurophysiology. – 2000. – 32, № 3. – P.242-243.
7. Bolotina V.M., Najibi S., Palacino J.J. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle // Nature. – 1994. – 368. – P.850-853.
8. Butler A.R., Flittney F.W., Williams D.L. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: A chemist's perspective // Trends Pharmacol. Sci. – 1995. – 16, № 1. – P. 18-22.
9. Dalle-Donne I., Milzani A., Guistrani D. et al. S-NO-actin: S-nitrosylation kinetics and the effect on isolated vascular smooth muscle // J.Muscle. Res.Cell.Motil. – 2000. – 21, № 2. – P.171-181.
10. Fabiato A., Fabiato F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells // J. Physiol. (Paris). – 1979. – 75, № 5. – P.463-505
11. Fujioka H., Horiike K., Takahashi M. et al. Dithiotreitol-induced triphasic response of dog coronary arteries // Eur.J.Pharmacol – 1989 – 166, № 1. – P.13-22.
12. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // Nature. – 1980. – 288. – P.373-376.
13. Hoar P.E., Kerrick W.G. Mn^{2+} activates skinned smooth muscle cells in the absence of myosin light chain phosphorylation // Pflugers Arch. – 1988, – 412, № 3. – P. 225-230.
14. Kojima S.-I., Fujiwara K., Onishi H. SH1 (Cysteine 717) of smooth muscle myosin: its role in motor function // Biochemistry. – 1999. – 38, № 36. – P.11670-11676.
15. Lalli M.J., Obara K., Paul R.J. Vanadate oxidation activates contraction in skinned smooth muscle without myosin light chain phosphorylation // Amer. J.Physiol. – 1997. – 272, №.1. – P.C278-288.
16. Lincoln T.M., Cornwell T.L., Komalavilas P. et al. The nitric oxide – cyclic GMP signaling system. - In: Biochemistry of Smooth Muscle Contraction / Ed. by Barany M. – Acad. Press, NY, 1996. – P.257-268.

17. Onishi H. N-Iodoacetyl-N'-(5-sulfo-1-naphthyl) ethylenediamine modification of myosin from chicken gizzard // J.Biochem. (Tokyo) – 1985. – 98, № 1. – P.81-86.
18. Palmer R.M.J., Ferridge A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // Nature. – 1987. – 327. – P.524-526.
19. Rayment I., Rypniewski W.R., Schmidt-Bдсе K. et al. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor // Science – 1993. – 261, № 5117. – P.50-58.
20. Saida K., Nonomura Y. Characteristics of Ca²⁺- and Mg²⁺- induced tension development in chemically skinned smooth muscle fibers // J.Gen. Physiol. – 1978. – 72, № 1. – P.1-14.
21. Stamler J.S. Redox signalling: nitrosylation and related target interaction of nitric oxide // Cell. – 1994. – 78, № 6. – P.931-936.
22. Trybus K.M., Naroditskaya V., Sweeney L. The light chain-binding domain of the smooth muscle myosin heavy chain is not the only determinant of regulation // J.Biol.Chem. – 1998. – 273, № 29. – P.18423-18428.

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

*Матеріал надійшов
до редакції 23.07.2001*