

# Исследование роли цитоскелета в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток аорты крысы

*Гусакова С.В.*

## The role of cytoskeleton in the regulation of contractile activity in smooth muscle cells from aorta of rats

*Gousakova S.V.*

*Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск*

© Гусакова С.В.

Механографическим методом исследовалось влияние модуляции цитоскелета колхицином и цитохалазином В на сократительные реакции гладкомышечных сегментов аорты крысы, вызванные физиологически активными веществами, деполяризацией мембраны и стрикцией клеток. Установлено, что микротубулы и актиновые элементы цитоскелета участвуют в развитии гиперкалиевого и фенилэфрининдуцированного сокращения, а также в расслаблении гладкой мышцы, индуцированном цАМФ. Цитохалазин В более эффективно, чем колхицин, угнетает оба вида сокращений гладкой мышцы аорты. Сократительные реакции при изоосмотической стрикции угнетаются только цитохалазином. Эффективность оперирования цАМФ-опосредованной сигнальной системы зависит от целостности актинового цитоскелета.

**Ключевые слова:** гладкомышечные клетки, цитоскелет, цАМФ-опосредованная сигнальная система.

Influence of cytoskeleton modulation by Colchicine and Cytochalasine B on contractile reactions of smooth muscle segments of rat's aorta caused by physiologically active substances, the membrane's depolarization and cells' striction was investigated by mechanographical method. Microtubules and actinic elements of the cytoskeleton were established to participate in the development of hyper-potassic and phenylephrine -induced contractions as well as in the smooth muscle relaxation induced by cAMP. Cytochalasine B suppresses both kinds of aortic smooth muscle contractions more effectively than Colchicine. Contractile reactions at isoosmotic striction are suppressed only by Cytochalasine. Efficacy of cAMP signal system operating depends on actinic cytoskeleton integrity.

**Key words:** smooth muscle cells, cytoskeleton, cAMP signal system.

УДК 576.3:599.323.4

### Введение

Несмотря на существенный прогресс в изучении механизмов регуляции электрических и сократительных свойств сосудистых гладкомышечных клеток (ГМК), а также патогенетических механизмов нарушения их функций многие вопросы этой проблемы остаются не изученными.

Наряду с развитием классических представлений о ключевой роли кальцийзависимых механизмов регуляции сократительной функции ГМК появляется все больше данных об участии актинового и тубулинового элементов цитоскелета в процессах сопряжения возбуждения — сокращения гладкомышечных клеток [4, 7, 12]. Именно цитоскелет может оказаться одним из эффекторных звеньев, к которому конвергируют раз-

личные внутриклеточные сигнальные пути, участвующие в регуляции сократительной активности сосудистых ГМК [7]. Было показано, что дезинтеграция актиновых микрофиламентов цитохалазинами снижает сократительные ответы гладких мышц на действие фенилэфрина, угнетает  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , 2СГ-котранспорт и нарушает оперирование потенциалзависимых кальциевых каналов сосудистых ГМК [10]. Сходное действие оказывают и активаторы цАМФ-опосредованной сигнальной системы [7]. На культуральных сосудистых ГМК было показано, что влияние цитохалазинов и циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) на ионный транспорт аддитивно [7], а это предполагает взаимодействие данных ветвей регуляции. Тем не менее до настоящего времени многие вопросы рассматриваемой проблемы

не нашли положительного решения. Немногие работы по изучению роли цитоскелета в механизмах регуляции вторичными посредниками сокращений ГМК выполнены на микрососудах [7, 10]. Влияние дезинтеграции цитоскелета на сократительную активность артерий практически не исследовалось.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось изучение роли микрофиламентов и микротубул в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток аорты крысы при деполяризации мембраны ГМК, увеличении внутриклеточной концентрации цАМФ, действии фенилэфрина, стрикции клеток.

## Материал и методы

В работе использовались изолированные деэндотелизированные гладкомышечные сегменты аорты беспородных белых крыс в возрасте 11—13 нед. После внутриперитонеальной анестезии нембуталом (70 мг на 1 кг массы тела) проводили декапитацию, выделяли аорту, помещали ее в физиологически сбалансированный солевой раствор Кребса, отпрепаровывали жировую и соединительную ткань и выделяли сегменты шириной 2—3 мм. Эндотелий удаляли механически, вращением деревянного шпателя в просвете сегмента в течение 1 мин.

Для исследования сократительной активности ГМК использовали метод механографии. Гладкомышечные сегменты фиксировали с помощью стальных крючков в камере объемом 1 мл, изготовленной из органического стекла. Камеру заполняли аэрируемым физиологическим раствором Кребса, ммоль: NaCl — 120,4; KCl — 5,9; MgCl<sub>2</sub> — 1,2; CaCl<sub>2</sub> — 2,5; трис-(оксиметил)-аминометан — 15,5; глюкоза — 11,5; pH = 7,4 — и термостатировали при температуре 37 °C в условиях проточной перфузии (1 мл/мин).

Перед началом эксперимента сегменты отмывали физиологическим раствором в течение 40—50 мин. В зависимости от целей эксперимента использовали модифицированный физиологический раствор, содержащий физиологически или осмотически активные вещества, а также тестируемые соединения. Для стимуляции цАМФ-опосредованной сигнальной системы использовали активатор аденилатциклазы форсколин. Состояние цитоскелета модулировали дестабилизатором микрофиламентов цитохалазином В, микротубул и микрофиламентов — колхицином.

Амплитуда сократительных ответов гладкомышечных сегментов рассчитывалась в процентах от амплитуды контрольного гиперкалиевого (эквивалентное замещение 30 ммоль NaCl на KCl) сокращения. Изменения механического напряжения регистрировали с помощью XY рекордера («Karl Zeiss Jena», Германия). Результаты представлены как среднее арифметическое и среднеквадратичное отклонение  $\sigma$  и обработаны с помощью программного пакета Statistica 6.0 с использованием непараметрического *U*-критерия Манна—Уитни. Достоверными считали различия при значении  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования

В первой серии экспериментов изучалось влияние колхицина, вызывающего деполимеризацию микрофиламентов и микротубул, в концентрациях 10 и 100 мкмоль на механическое напряжение гладкомышечных сегментов аорты крысы. Предобработка препаратов колхицином (10 мкмоль) в течение 90 мин снижала амплитуду гиперкалиевого сокращения до  $(62,9 \pm 12,6)\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n = 9$ ) по сравнению с контролем (рис. 1). Увеличение концентрации колхицина до 100 мкмоль не привело к дополнительному снижению амплитуды гиперкалиевой контрактуры.

Фенилэфрин (0,01 и 0,1 мкмоль) в растворе Кребса вызывал дозозависимое увеличение механического напряжения гладких мышц, составляя  $(10,8 \pm 7,4)$  и  $(74,1 \pm 9,2)\%$  ( $p < 0,05$ ;  $n = 9$ ) соответственно от контрольного гиперкалиевого сокращения. Ответ гладкомышечных сегментов на концентрации фенилэфрина 1 и 10 мкмоль  $((103,1 \pm 4,9)$  и  $(107,8 \pm 6,9)\%$ ) был сопоставим с контрольным гиперкалиевым сокращением. После предобработки гладких мышц колхицином амплитуда сокращений сосудистых сегментов, вызванных добавлением фенилэфрина в тех же концентрациях, статистически значимо снижалась, составляя  $(3,7 \pm 1,5)$ ;  $(31,1 \pm 2,8)$ ;  $(81,8 \pm 2,9)$ ;  $(87,7 \pm 10,3)\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ) соответственно от величины контрольного гиперкалиевого сокращения (рис. 2).

Добавление в физиологический раствор непроникающего осмолита сахарозы (150 ммоль) приводило к развитию воспроизводимого сокращения амплитудой  $(49,57 \pm 4,6)\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n = 15$ ). После предобработки колхицином (10 мкмоль) амплитуда гиперосмотической стрикции снизилась до  $(25,6 \pm 9,6)\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ) по сравнению с величиной гиперкалиевого со-

крашения. Амплитуда изоосмотической стрикции по-

сле предобработки колхицином не изменялась.

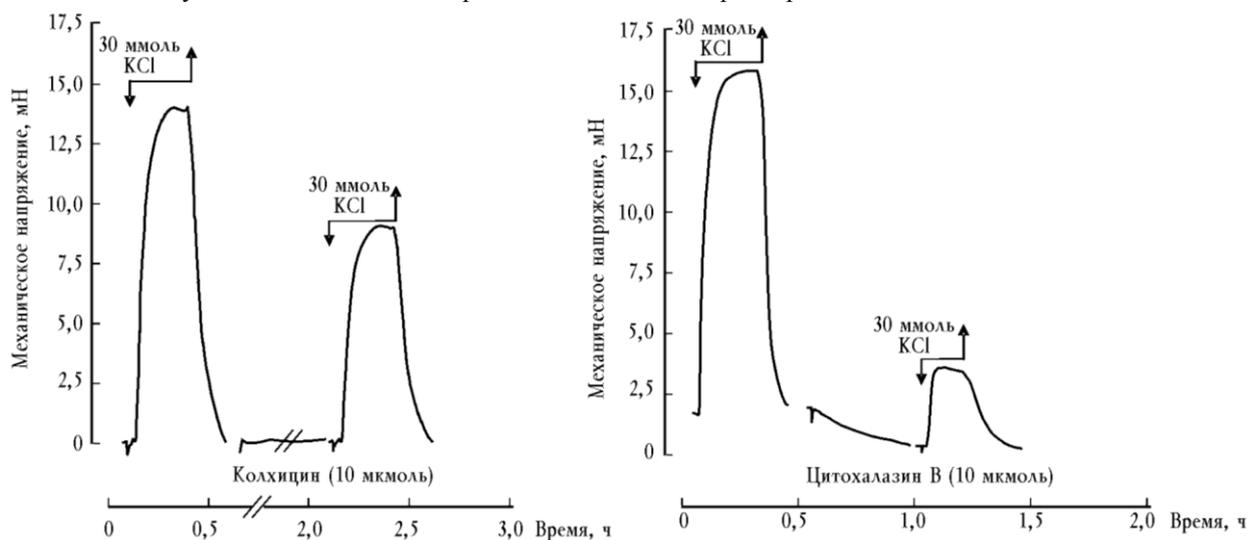


Рис. 1. Влияние колхицина и цитохалазина В на гиперкалиевое сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы

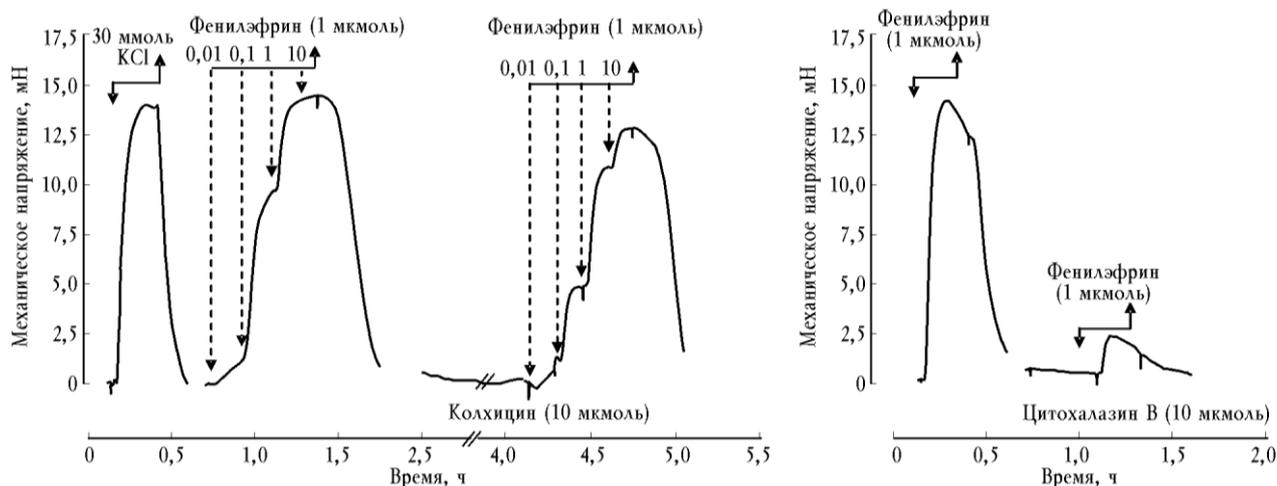


Рис. 2. Влияние колхицина и цитохалазина В на амплитуду фенилэфрин-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы

В следующей серии экспериментов исследовалась роль актинового компонента цитоскелета. Для деполимеризации микрофиламентов использовался цитохалазин В. После инкубации сегментов в течение 40 мин в растворе, содержащем 10 мкмоль цитохалазина В, амплитуда гиперкалиевого сокращения уменьшилась до  $(40,0 \pm 4,9)\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ) от контрольного в нормальном растворе Кребса (рис. 1). Амплитуда фенилэфрининдуцированного (1 мкмоль) сокращения на фоне цитохалазина В снизилась до  $(20,6 \pm 3,7)\%$  ( $n = 3$ ) от контрольного гиперкалиевого сокращения (рис. 2). Амплитуда изоосмотической

стрикции после предобработки гладкой мышцы цитохалазином В снизилась до  $(6,5 \pm 1,5)\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ). Величина амплитуды гиперосмотического сокращения ГМК аорты уменьшилась до  $(17,2 \pm 3,8)\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ).

Для исследования участия микрофиламентов и микротубул в реализации эффектов цАМФ использовался активатор аденилатциклазы форсколин.

Форсколин в концентрации 1 мкмоль вызвал полумаксимальное снижение механического напряжения гладкомышечного препарата, предсокращенного гиперкалиевым раствором  $((49,7 \pm 7,8)\%$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ).

Расслабляющее действие форсколина на гладкую мышцу аорты сохранялось после обработки препарата колхицином (10 мкмоль), но усиливалось после вы-

держивания гладкомышечного препарата в растворе с цитохалазином В (рис. 3).

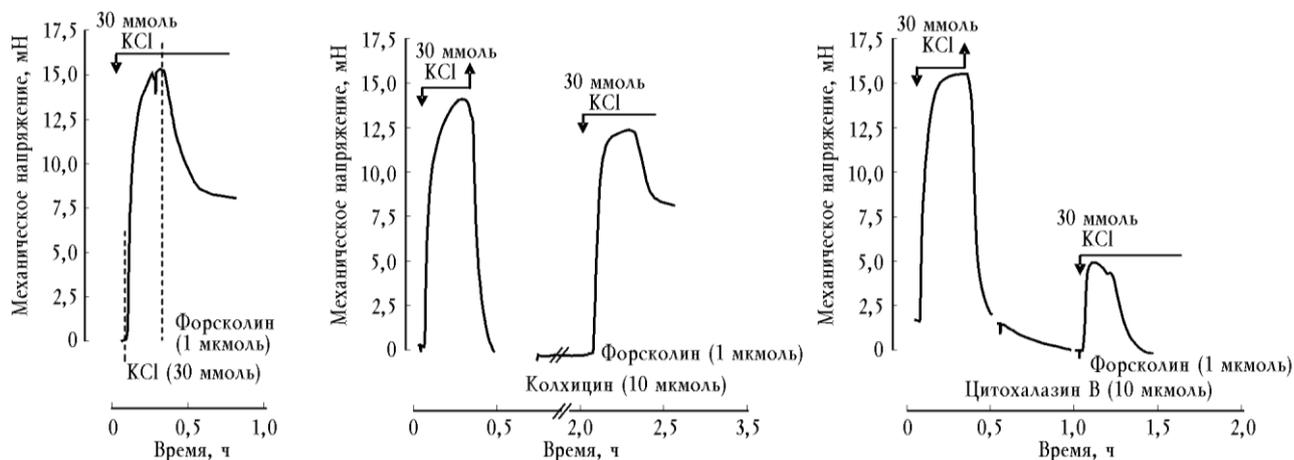


Рис. 3. Влияние колхицина и цитохалазина В на форсколин-индуцированное расслабление гиперкалиевого сокращения гладкомышечных клеток аорты крысы

## Обсуждение результатов

Актиновый цитоскелет, состоящий из микрофиламентов и актинсвязывающих белков, является динамической структурой, которая играет ключевую роль во многих клеточных процессах [3]. Под его контролем находится регуляция функций ГМК гормонами и медиаторами, оперирование ионных каналов, в частности, потенциалзависимых  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа [10], активность мембранных транспортеров, а также форма и объем клеток [7, 9].

Как следует из полученных данных, актиновые элементы цитоскелета вовлекаются в развитие гиперкалиевого и фенилэфрининдуцированного сокращений. Угнетение цитохалазином В сокращений гладкой мышцы аорты в ответ на деполяризацию мембраны может быть обусловлено нарушением оперирования потенциалзависимых  $Ca^{2+}$ -каналов, открывание которых в этом случае является основным механизмом увеличения концентрации ионов кальция в цитозоле и активации сокращения. По мнению N. Sperelakis (1990), такой эффект цитохалазина связан с освобождением нерецепторной формы тирозиновой протеинкиназы (с-Src) от цитоплазматической поверхности плазмалеммы в цитозоль [11]. Как следствие, будет нарушаться Туг-РК-зависимое фосфорилирование  $Ca^{2+}$ -каналов и их способность активироваться при деполяризацион-

ных смещениях мембранного потенциала, которые могут быть индуцированы как гиперкалиевым раствором, так и фенилэфрином.

В настоящее время получены свидетельства в пользу того, что актиновый цитоскелет вовлечен в регуляцию клеточного объема, воспринимая и опосредуя внеклеточные стимулы. В частности, известно, что актиновые микрофиламенты поддерживают и организуют клеточную мембрану и функции, связанные с мембраной. В данном контексте это в первую очередь касается оперирования цитоскелета как «сенсора» изменений и эффектора в сохранении постоянства клеточного объема. Актиновый цитоскелет может влиять на ионные каналы и транспортеры, вовлекаемые в реакции, на изменение объема клеток непосредственно, связывая субъединицы транспортных белков с цитоскелетной сетью, или опосредованно, взаимодействуя с сигнальными молекулами (G-белками, протеинкиназами, фосфолипазами и аденилатциклазой). Недавние исследования показали способность малых ГТФаз (Rho, Cdc-42, Rac) Rho-семейства регулировать реорганизацию цитоскелета при действии внеклеточных стимулов [5]. Имеются сведения о возможной взаимосвязи между Rho-1 ГТФазами, ионными каналами, мембранными транспортерами и регуляцией объема [6].

Нарушение восприятия изменений объема клеток при альтерации актиновых филаментов и оперирования механизмов передачи сигнала об этих изменениях на ионные транспортеры, в первую очередь  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспорт, может лежать в основе угнетения цитохалазином В гипер- и изоосмотических сокращений ГМК аорты.

### Заключение

Как следует из полученных результатов, эффективность оперирования цАМФ-опосредованной сигнальной системы зависит от целостности актинового, но не тубулинового элементов цитоскелета. Усиление расслабляющего действия форсколина после обработки гладкой мышцы цитохалазином В может быть обусловлено активацией аденилатциклазы при разрушении микрофиламентов и суммацией этих эффектов.

### Литература

1. Баскаков М.Б., Медведев М.А., Ковалев 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. Bárány M., Barron J.T., Gu L., Bárány K. Exchange of the actin-bound nucleotide in intact arterial smooth muscle // *J. Biol. Chem.* 2001. 276. P. 48398—48403.
4. Chitaley K., Webb R.C. Microtubule depolymerization facilitates contraction of vascular smooth muscle via increased activation of RhoA/Rho-kinase // *Med. Hypotheses.* 2001. V. 56. № 3. P. 381—385.
5. Li S., Moon J., Miao H. et al. Signal transduction in matrix contraction and the migration of vascular smooth muscle cells in three-dimensional matrix // *J. Vasc. Res.* 2003. July—Aug. № 40 (4). P. 378—88.
6. Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl-channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor // *Am. J. Physiol.* 1997. V. 273. P. 755—789.
7. Orlov S.N., Tremblay J., Hamet P. Cell volume in vascular smooth muscle is regulated by bumetanide-sensitive ion transport // *Am. J. Physiol.* 1996. V. 270. P. 1388—1397.
8. Paul R.J., Bowman P.S., Kolodney M.S. Effects of microtubule disruption on force, velocity, stiffness and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in porcine coronary arteries // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000. V. 279. № 5. P. H2493—H2501.
9. Polte T.R., Eichler G.S., Wang N., Ingber D.E. Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2004. № 286 (3). P. 518—528.
10. Shaw L., Ahmed S., Austin C., Taggart M.J. Inhibitors of actin filament polymerisation attenuate force but not global intracellular calcium in isolated pressurised resistance arteries // *J. Vasc. Res.* 2003. V. 40. № 1. P. 1—10.
11. Sperelakis N. Properties of calcium channels in cardiac muscle and vascular smooth muscle // *Molecular. and Cell Biochem.* 1990. V. 99. P. 97—109.
12. Zhang D., Wang Z., Jin N. Microtubule disruption modulates the Rho-kinase pathway in vascular smooth muscle // *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* 2001. V. 22. № 2. P. 193—200.

Поступила в редакцию 01.11.2006 г.

Утверждена к печати 20.11.2006 г.