УДК 577.352.4

ДИСРЕГУЛЯЦИЯ NO/CGMP/CADPR/CA^{2+}-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В СОСУДАХ И МИОКАРДЕ СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

[1]Андреева Л.А., [1]Накипова О.В., [1]Сергеев А.И., [1,2]Аверин А.С., [3]Лобанов А.В., [3]Рыков В.А., [1]Чемерис Н.К., [2]Гришина Е.В., [3]Мурашев А.Н., [2]Дынник В.В.

[1]ФГБУН «Российской академии наук Институт биофизики клетки РАН», Пущино;
[2]ФГБУН «Российской академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пущино;
[3]ФГБУН «Российской академии наук филиал Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Пущино, e-mail: dynnik@rambler.ru

Цель. В сравнительных экспериментах исследовать влияние фенилэфрина (PE) и ацетилхолина (Ach) на сократительные свойства аорты крыс в условиях гипертензии (ГТ). Материалы и методы. Использованы здоровые крысы линии WKY (8-10 недель и 10 месяцев) и спонтанно-гипертензивные крысы SHR (возраст 10 месяцев, артериальное давление AD > 200 mmHg) с недостаточностью сердца; стандартные методы регистрации AD и методы регистрации силы сокращений образцов аорты и папиллярных мышц миокарда. Результаты. Показано, что у крыс SHR, с недостаточностью сердца, регистрируемой как отсутствие «эффекта паузы» и изменения зависимости силы сокращений(F) от частоты стимуляции (f), отсутствует расслабляющий эффект Achна сокращение сосудов, вызываемое PE. Введение донора NO-SNP или ингибитора ADP-рибозилциклазы (или CD38) – никотинамида (NAM) обеспечивает полное сокращение сосудов в этих условиях. Прием многокомпонентного состава «Хелпер-1» улучшает характеристики «эффекта паузы» в папиллярных мышцах без улучшения сократительных свойств образцов аорты(F(f)). Выводы. Дисрегуляция автокаталитического Ca^{2+}/NOS/NO/sGS/cGMP/PKG/CD38/cADPr/RyR/Ca2 + -сигнального пути в эндотелии и миоцитах сосудов может быть одним из основных факторов дисфункции эндотелия и гипертензии сосудов.

Ключевые слова: дисрегуляция, Ca^{2+}-сигнальные пути, NO, гипертензия, папиллярная мышца, аорта

DYSREGULATION OF NO/CGMP/CADPR/CA^{2+}-SIGNALLING PATHWAY IN AORTA AND MYOCARDIUM OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

[1]Andreeva L.A., [1]Nakipova O.V., [1]Sergeev A.I.,[1,2]Averin A.S., [3]Lobanov A.V., [3]Rykov V.A., [1]Chemeris N.K., [2]Grishina E.V., [3]Murashev A.N., [2]Dynnik V.V.

[1]Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino;
[2]Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino;
[3]Branch of Institute ofbioorganical chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: dynnik@rambler.ru

Purpose. Comparative study of impairment of contractility of aorta rings and papillary muscles in Wistar-Kioto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). Methods. Male WKY (2 and 10 month old) and SHR (10 month, with AD > 200 mm Hg) rats were used. Aortic rings and papillary ventricular muscle strips were studied using the method of isometric tension measurements. Results. Papillary muscles of SHR exibit: abnormal Force (F) – frequency (f) relationships (initially independent and then weak negative dependence of F on f) and did not show rest potentiation response. Aortic rings of young WKY precontracted by phenylephrine (PE) show fast F oscillations (1 sec period) of low amplitude are relaxed by acetylcholine (Ach) which promotes slow F oscillations (30–60 sec) of high amplitude. In older WKY slow periodic regimes did not appear. Aortic rings of SHR did not relax in response to Ach. Donor of NO SNP or ADPribosylcyclase inhibitor – nicotinamide or both produce relaxation of rings precontracted by PE. Treatment of SHR rats with the composition «Helper-1» (per os, 1 month) improves myocardial but not aortic contractile responses. Conclusions. Dysregulation of autocatalytic Ca2 + /NOS/NO/sGS/cGMP/PKG/CD38/cADPr/RyR/Ca^{2+}-signallyng pathway in endothelium and myocytes may be related to endothelial dysfunction and myocytes hypertension in SHR.

Keywords: dysregulation, Ca^{2+}-signalling, NO, hypertension, papillary muscles, aorta, SHR

Гипертензия (ГТ) сосудов является одним из основных риск-факторов развития сердечно-сосудистых и почечных заболеваний. Несмотря на существенный прогресс в понимании патофизиологических механизмов этого явления и широкого арсенала средств коррекции ГТ, основные молекулярные механизмы ГТ изучены недостаточно. ГТ характеризуется величинами диастолического/систолического артериального давления выше 90/140 мм. Hg. К числу фактов, способствующих усилению ГТ, относят ожирение, алкоголь, стрессы, солевую диету и др. [8].

Развитие ГТ чаще всего связывают с усилением вазоконстрикции сосудов [2] и с увеличением входа Ca^{2+} в гладкомышечные клетки через различные каналы, в присутствии агонистов – норадреналина (NE, α -адренорецепторы), ангиотензинаII, эндотелина-1 и др. и (или) с дисфункцией эндотелия и недостаточной продукцией ими факторов релаксации мышечных клеток сосудов – NO, H_2O_2, CO и производных

арахидоновой кислоты (AA) при действии ацетилхолина (Ach), брадикинина, NE (β – адренорецепторы) и др. [15].

Одним из важных показателей «нормального» состояния сосудистой системы является ритмическая активность сосудов, регистрируемая как Ca^{2+} колебания и волныв изолированных клетках гладких мышц [4] и эндотелия [3]; колебания силы сокращений сосудистых препаратов (препараты мышечных клеток и эндотелия сосудов) invitro [6], ритмические сокращения и волны, возникающие в сосудах invivo (регистрируемые с использованием методов лазерного или ультразвукового сканирования) [11]. Наличие таких автономных (эндогенных) периодических ритмов обычно связывают с наличием генератора колебаний в PLC/IP3/IP3-рецептор (IP3R)/ Ca^{2+}-сигнальном пути клеток [6,11], реже – в системе Ca^{2+} сигнализации с участием NO/cGMP/cADPr [4]. В условиях ГТ наблюдаемое ритмическое разнообразие утрачивается [6,11], поэтому анализ механизмов генерации периодических режимов в таких системах может быть важным инструментом при анализе механизмов дисрегуляции различных Ca^{2+}-сигнальных систем мышечных клеток и эндотелия и дисфункции сосудистой системы при ГТ. В качестве модели ГТ нами взяты спонтанно-гипертензивные крысы (SHR) линии Вистар-Киото (WKY). Ниже приведены результаты начального этапа сравнительных исследований сосудистых образцов и папиллярных мышц миокарда здоровых животных и животных с ГТ.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали здоровых крыс линии WKY в возрасте 2–3 месяца и 10 месяцев, а также крыс с ГТ SHR в возрасте 10 месяцев. Показателями ГТ у животных SHRсчитали: устойчивое наличие высокого артериального давления в интервале 200–230 mmHg, регистрируемого с помощью прибора NicoleitML-105 с капсулой Марра.

Половина животных из группы SHR (6 животных) получала с питьевой водой многокомпонентный состав гепатопротектора – БАД «Хелпер-1» («Х-1») из расчета 1,5 г/1 кг веса в день в течение 4 недель. Перед декапитацией животных использовали эфирный наркоз, затем быстро извлекали сердце и препараты аорты и помещали в аэрированные растворы Тироде. Исследования сократимости миокарда проводились на папиллярных мышцах (ПМ) правого желудочка сердца при температуре 30 ± 1 °С.

Выделение папиллярных мышц (ПМ), стимуляцию и измерение амплитуды сокращения в изометрическом режиме проводили по ранее описанной методике [10]. Механическая активность мышц регистрировалась с помощью механотрона 6Х-2М и автоматизированной установки на основе PC и плат АЦП-ЦАП (L-Card 154 и L-Card E14-440). Исследование механических свойств сосудистой системы проводили на кольцевых сегментах (длина 3–3,5 мм) грудной аорты по описанной ранее методике. Состав раствора Тироде для колец аорты (в моль/литр): Na + 150,0; K + 4,0; Mg2 + 1.0; Ca2 + 2,0; HCO_3^- 12,0; HPO_4^- 1,8; Cl^- 148,4; глюкоза 11,0; pH = 7,4). Регистрацию силы изометрического сокращения проводили с помощью механотрона 6Х2М на ПК и Linerecorder TZ 4221 (Чехия) при температуре раствора 20 °С. В работе использовались реагенты (в т.ч. агонисты и ингибиторы) TOCRIS bioscience.

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнительное исследование на папиллярных мышцах. Большинство патологий сердца сопряжено с перегрузкой клеток по кальцию. Саркоплазматический ретикулум (СР) является одной из ключевых структур кардиомиоцитов, отвечающих за внутриклеточный гомеостаз Ca2 + и сократительный резерв [1, 9].

Для оценки роли СР в регуляции сократительной активности миокарда крыс использовался эффект потенциации паузой («эффект паузы»), который описан в методике. Во время интервала покоя внеклеточный Ca^{2+} продолжает поступать в клетку и аккумулироваться в СР, в результате чего при первом после паузы сокращении в цитоплазму (а не в саркоплазму) высвобождается значительно большее количество кальция, чем при ритмическом сокращении. «Эффект паузы» выражен в миокарде с хорошо развитым СР. В миокарде с ослабленной функцией СР (при патологических состояниях) – эффект потенциации паузой значительно снижен [1, 9].

На рис. 1, а приведен пример регистрации «эффекта паузы» в сердце здоровой крысы WKY – имеет место позитивное влияние длительности паузы *t* (с) на амплитуду силы сокращений первого после паузы ответа (F_1). «Эффект паузы» полностью подавляется рианодином – блокатором Ca^{2+}-каналов саркоплазматического ретикулума (СР) (рис. 1, б). Таким образом, амплитуда (F_1) первого сокращения после паузы определяется емкостью кальциевого пула СР сердечной клетки. Из данных, представленных на рис. 1, в, г видно, что эффект паузы практически отсутствует у крыс SHR, что свидетельствует о нарушении функционирования системы поддержания Ca^{2+} гомеостаза на уровне СР. Эти данные согласуются с результатами других авторов [13]. Судя по предварительным данным, после проведенного приема «Х-1» величина «эффекта паузы»изменяется у крыс SHR и становится подобной характеристике, регистрируемой у здоровых животных (рис. 1, в), что может свидетельствовать о нормализации процессов регуляции кальциевого гомеостаза на уровне СР у крыс SHR.

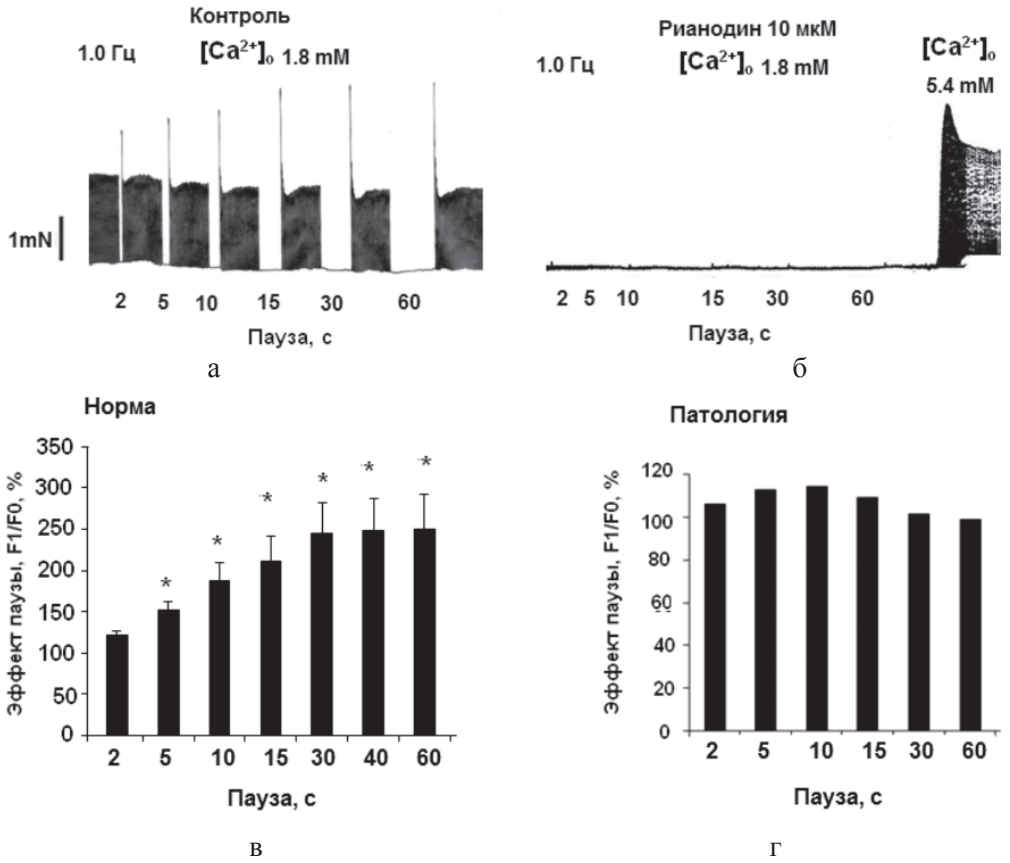

Рис. 1. Эффект паузы как качественный показатель содержания Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме:
*А – типичный пример регистрации «эффекта паузы» в сердце крысы WKY (10 месяцев) на частоте стимуляции 1,0 Гц; Б – подавление эффекта паузы рианодином. Сокращения восстанавливаются только при повышении концентрации Ca^{2+} в составе перфузирующего раствора до 5,4 мМ; В, Г – сравнительная картина эффекта паузы в ПМ крысы WKY (В) и SHR (Г). * – достоверность отличия потенцирующего эффекта паузы от его величины при длительности паузы 2 с ($p < 0,05$)*

Сила сокращений $F(f)$, развиваемая полосками папиллярных мышц крыс SHR, в 3–4 раза ниже силы сокращений, развиваемых здоровыми животными. Ниспадающие кривые зависимости силы F от частоты стимуляции f – $F(f)$ наблюдаются у здоровых животных при низких частотах стимуляции и при увеличении f может иметь место рост силы F с увеличением частоты стимуляции f (не показано). Обычно такой рост F при физиологических частотах стимуляции связан с ростом Ca^{2+}_i в миокардиоцитах объясняется активацией выброса Ca^{2+} из рианодинового рецептора (RyR) при его фосфорилировании CaMKII [5]. В условиях гипертрофии и недостаточности миокарда [1, 9, 7] избыточное фосфорилирование *RyR* с участием PKA или CaMK II [12] может переводить канал в полуоткрытое состояние с ростом уровня Cai в покое (в диастоле) с нарушением формы характерных для здоровых животных зависимостей $F(f)$. У крыс SHR форма зависимости $F(f)$ существенно меняется. При малых частотах стимуляции f сила сокращений F почти не зависит от f, а при физиологических частотах стимуляции ($f > 1$ гЦ) сила сокращений F незначительно уменьшается с ростом f (не показано). У крыс SHR, принимавших «Х-1», кривая зависимости $F(f)$ имеет отрицательный наклон, однако рост силы сокращений при больших частотах стимуляции не восстанавливается (не показано). Учитывая положительные изменения эффекта паузы, можно говорить лишь о частичном улучшении сократительных функций миокарда при введении препарата «Х-1». В состав «Х-1» входят: L-карнитин, который может улучшать сократительную функцию мышц и снижать окислительный стресс при диабете 2 типа, а также L-аргинин – источник синтеза NO.

Сравнительные исследования на препаратах аорты. На рис. 2 представлены

данные записей силы сокращений (сила *F*) образцов кольца аорты здоровых животных WKY в возрасте 3 месяца (рис. 2, а) и 10 месяцев (рис. 2, б, в), а также крыс SHR, получавших чистую питьевую воду (рис. 2, г) и воду, содержащую состав «Х-1» (рис. 2, е).

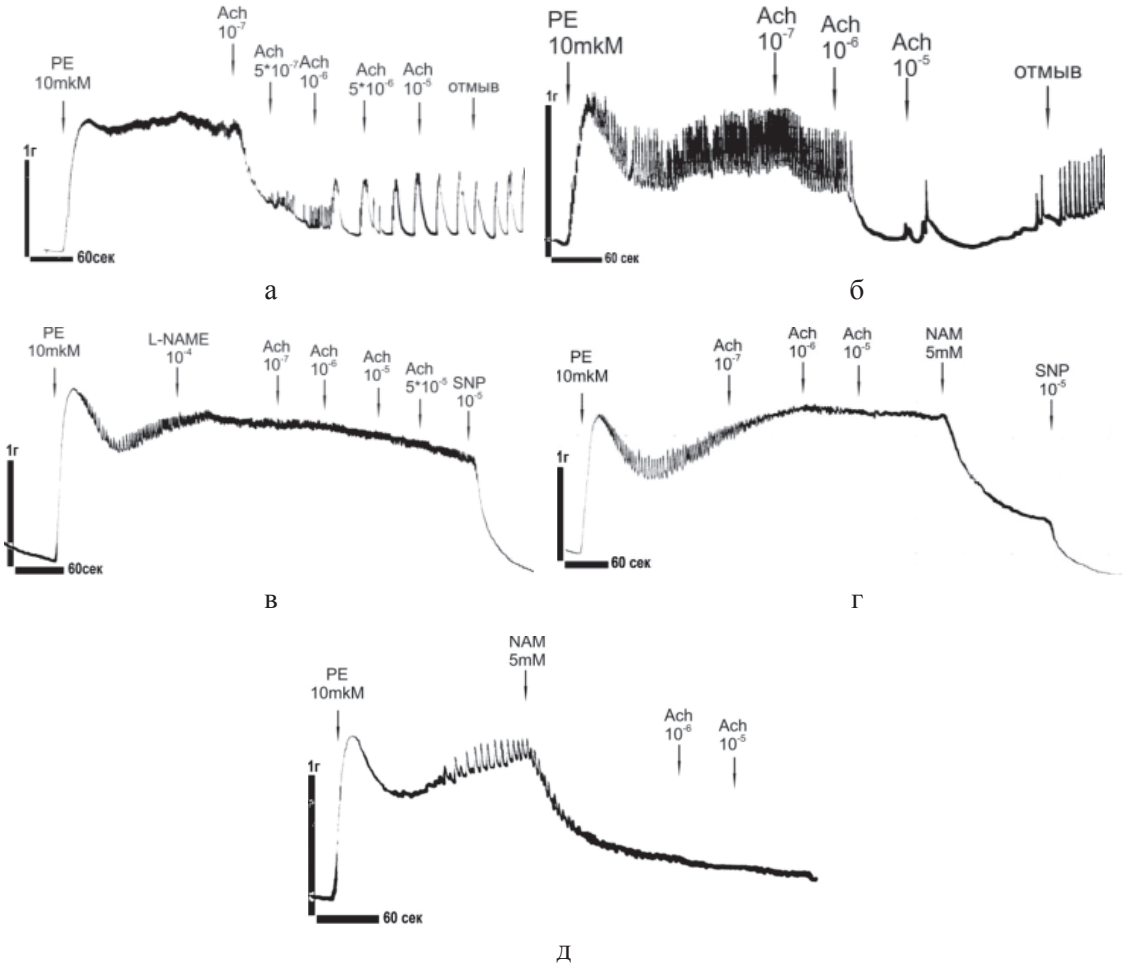

Рис. 2. Влияние PE и Ach на сокращение колец аорты здоровых крыс WKY в возрасте 3 месяцев (а) и 10 месяцев (б, в) и крыс SHR, не принимавших (г) и принимавших (Д) многокомпонентный состав «Х-1». Пояснение в тексте

Из рис. 2, а видно, что сокращение кольца аорты, вызванное PE, сопряжено с ритмическими изменениями величины *F* (с периодом 1–5 с). Аппликация Ach приводит к полному расслаблению образцов аорты с последующей генерацией медленных (период более 30 с) колебаний силы сокращений F высокой амплитуды. Генерация быстрых колебаний *F* обычно наблюдается в различных типах сосудов при аппликации NE, Ach и др. и объясняется наличием генератора колебаний в Ca^{2+}-сигнальной системе с участием PLC/IP3/IP3 рецептора [6, 11]. Медленные колебания *F* большой амплитуды (рис. 2, а) зарегистрированы впервые. У здоровых животных в возрасте 10 месяцев (рис. 2, б) наблюдаются только быстрые колебания F как при действии PE, так и при отмывке Ach. Сам по себе Ach, вызывающий эффективное расслабление колец аорты, не приводит к генерации колебаний *F* в этих условиях. У животных этого возраста (так же как и у молодых животных) введение ингибитора NO-синтаз (NOS) – L-NAME приводит к подавлению расслабляющего эффекта Ach. Считается, что Ach может вызывать расслабление сосудов, обеспечивая генерацию факторов релаксации – NO, H_2O_2, а также производных АА [15]. Слабое увеличение силы сокращений *F* при последовательных добавках Ach может быть связано в этих условиях с малым вкладом метаболитов АА в расслабляющий эффект Ach, поскольку последующие добавки донора NOSNP приводят к полному расслаблению колец аорты (Рис. 1В). Считается, что NO в этих условиях активирует PKG по цепочке NO/cGMP/PKG, обеспечивая активацию K+-каналов, гиперполяризацию и расслабление миоцитов [15].

Ранее нами было показано[14], что автокаталитический Ca^{2+}-сигнальный путь:

$$Ca^{2+}/NOS/NO/sGC/cGMP/PKG/CD38/cADPr/RyR/Ca^{2+} \quad (1)$$

играет важную роль в регуляции уровней Ca^{2+}, NO и активности PKG и RyR в адипоцитах и может быть источником Ca^{2+} и NO колебаний и волн в этих и других типах клеток.

По нашему мнению, активация PKG в цепочке (1) должна также способствовать расслаблению миоцитов за счет уменьшения уровня Ca^{2+}_i при активации SERCA и PMCA, с одновременным ингибированием различных Ca^{2+}-каналов с участием PKG, как это имеет место в адипоцитах [14].

В препаратах аорты, выделенных из животных с ГТ (крысы SHR), добавки Achne приводят к расслаблению колец аорты, вызванных PE (рис. 2, г), подобно тому, как это имеет место у контрольных животных при введении блокатора NOSL-NAME (рис. 2, в). Последующее введение донора NOSNP приводит к полному расслаблению колец (рис. 2, г), что свидетельствует о дисфункции автокаталитического Ca^{2+}/NO-сигнального пути эндотелия (1), связанной с низкой активностью eNOS [15] или с низким уровнем Ca^{2+} (активатора eNOS) в эндотелиальных клетках. Введение в этих условиях вместо SNP, продукта ADP рибозилциклазы (или CD38) – никотинамида (NAM, рис. 1, г) также приводят полному расслаблению миоцитов аорты. Ингибируя ADP рибозилциклазу, NAM приводит к уменьшению концентрации продукта этой реакции с ADP ribose в миоцитах, являющегося активатором RyR. Это приводит в свою очередь к полному блокированию сигнальной цепочки (1), к подавлению выброса $Ca2^{2+}$ из RyR-зависимых $Ca2^{2+}$ депо и к расслаблению миоцитов. Последующие добавки донора NOSNP усиливают расслабляющий эффект NAM (рис. 2, г), по-видимому, за счет накопления с GMP и активации PKG. В отличие от клеток сердечной мышцы прием состава «X-1» не приводит к улучшению сократительных функций миоцитов аорты или к снятию дисфункции эндотелия у крыс SHR (рис. 2, д).

Заключение

Неспособность Ach обеспечивать расслабление препаратов аорты крыс SHR может быть связана с дисфункцией Ca^{2+}/NOS/NO/sGS/cGMP/PKG/CD38/cADPr/RyR/Ca^{2+}-сигнального пути клеток эндотелия и миоцитов аорты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН (ФНМ, проект № 01201256033); грант РФФИ № 13-04-01234-а.

Список литературы/References

1. Bers D. Kluwer Acad. Publ. 2001.452 p.

2. Edwards G., Félétou M., Weston A.H. Pflugers Arch. 2010. Vol. 459. no. 6. pp. 863–79.

3. Jacob R., Merritt J.E., Hallam T.J., Rink T.J. Nature. Vol. 335. no. 6185. pp. 40–5.

4. Kannan M.S., Prakash Y.S., Brenner T., Mickelson J.R., Sieck G.C. Am J Physiol. 1997. Vol. 272. no. 4. pp. 659–64.

5. Kushnir A., Shan J., Betzenhauser M.J., Reiken S., Marks A.R. ProcNatlAcadSci U S A. 2010. Vol. 107. no. 22. pp. 10274–9.

6. Lefer D.J., Lynch C.D., Lapinski K.C., Hutchins P.M. Microvasc Res. 1990. Vol. 39. no.2. pp. 129–39.

7. Lehnart S.E., Maier L.S., Hasenfuss G. Heart Fail Rev. 2009. Vol. 14. no. 4. pp. 213–24.

8. Marshall I.J., Wolfe CD, McKevitt C. BMJ. 2012. Vol. 345. pp. 3953.

9. Mattera G.G., Vanoli E, Martinez V., Luciani M., Falco T., Borsini F. ActaPhysiol (Oxf). 2011. Vol. 202. no. 2. pp. 141–9.

10. Nakipova O.V., Zakharova N.M., Andreeva L.A., Chumaeva N.N. Averin A.S. Kosarskii L.S., Anufriev A.I. Lewinski D.V., Kockskamper J., Pieske BJ. Cryobiology, 2007, Vol. 55. no. 3. pp. 173–181.

11. Nilsson H., Aalkjaer C. MolInterv. 2003. Vol. 3. no. 2. pp. 79–89.

12. Ozawa T. Mol Med Rep. 2010. Vol. 3. no. 2. P. 199–204.

13. Pieske B., Maier L.S., Bers D.M., Hasenfuss G. Circ Res. 1999. Vol. 85. no. 1. pp. 38–46.

14. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Dolgacheva L.P., Zinchenko V.P., Dynnik V.V. PlosOne. 2013. http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0063483.

15. Woodman O.L., Wongsawatkul O., Sobey C.G. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000. Vol. 27. no. 1. pp. 34–40.

Рецензенты:

Асланиди К.Б., д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник, Лаборатория биофизики внутриклеточной регуляции, Учреждения Российской академии наук Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино;

Маевский Е.И., д.м.н., профессор, зам. директора Учреждения Российской академии наук Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 03.06.2013.