

І. Б. Філіппов, З. Ю. Ткачук, І. Я. Дубей

Механізми регуляції судинного тонуру 2'-5'-олігоаденілатами

(Представлено академіком НАН України О. О. Мойбенком)

Показано гальмівний вплив “корових” 2'-5'-олігоаденілатів на скорочення гладеньких м'язів аорти та стегнової артерії щура, викликане деполаризацією мембрани гладеньком'язових клітин або активацією α_1 -адренорецепторів. Гальмівний ефект відбувається за рахунок активації 2'-5'-триаденілатами (2'-5' A₃) механізму Ca-залежної калієвої провідності гладеньком'язових клітин судин. Дію “корового” 2'-5' A₃ можна усунути, використовуючи блокатори Ca-залежних калієвих каналів високої провідності або блокатор протейнінази А. Ca-залежні калієві канали мембрани гладеньком'язових клітин активуються за рахунок здатності 2'-5' A₃ вивільняти кальцій з р'анодин(кофеїн)чутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулула гладеньком'язових клітин. Підтвердженням останнього є усунення їх гальмівного ефекту в присутності блокатора р'анодинових рецепторів/каналів р'анодину, а також збільшенням кофеїніндукованого скорочення судинних препаратів у присутності 2'-5' A₃. Гальмівний ефект олігоаденілатів здійснюється через ендотелійнезалежний механізм.

2'-5'-Олігоаденілати (2'-5' A) — унікальні олігорибонуклеотиди, в яких залишки аденозину зв'язані між собою фосфодієфірним зв'язком А(2')-р-(5') А між 5'- та 2'-гідроксильними групами, на відміну від звичайних олігонуклеотидів, що містять міжнуклеотидні зв'язки 3'-5' (рис. 1). 2'-5' A відіграють ключову роль у механізмі противірусної дії інтерферону. Крім того, система 2'-5' A важлива в процесах клітинного росту і диференціації, патогенезі діабету і атеросклерозу, апоптозі та ін., а тому ці препарати вважаються перспективними для онкології та гематології [1].

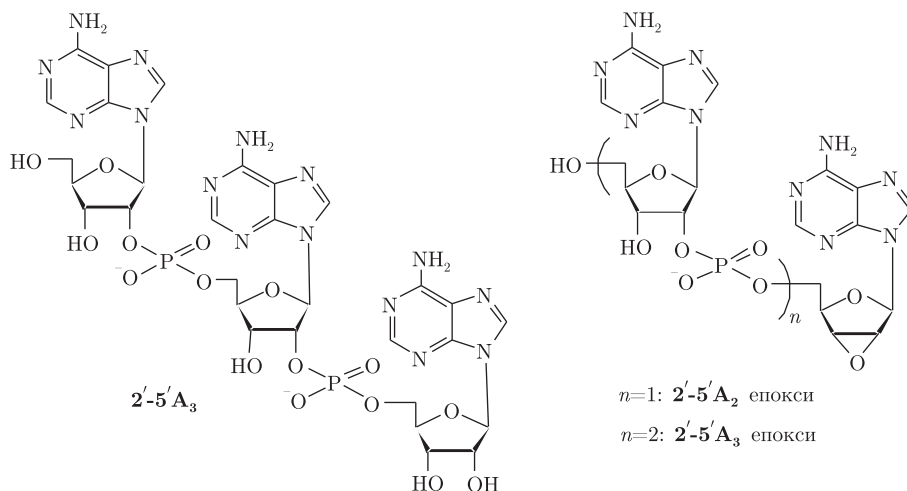


Рис. 1. Структури природного 2'-5'-триаденілату та епоксиданалогів ди- та тримеру 2'-5' A

Раніше нами було показано, що “корові”, або дефосфорильовані, 2'-5'-тримери, а також їх модифіковані аналоги справляють принципово однакову дію на посилення та на кінетику ін-активації кальцієвих струмів культури клітин НВА, а отже, можливо, і на зростання ступеня фосфорилування клітинних білків [2]. Ці результати започаткували роботи по вивченню внутрішньоклітинного механізму дії “корових” 2'-5'-олігоаденілатів. Відомо, що кальцієві струми, які протікають через канали НВА, прямо пов'язані з активацією протеїнкіназ А та С. Методом комп'ютерного моделювання було показано, що “корові” 2'-5'-тринуклеотиди можуть зв'язуватися в активному центрі протеїнкінази С. Порівняльний аналіз виявив, що 2'-5'-олігоаденілати здатні перекривати центри зв'язування аденозину та АТФ протеїнкіназою, забезпечуючи безпосередній вплив на процеси фосфорилування білків мембрани [3].

Подібні механізми задіяні при функціонуванні гладеньких м'язів артерій, тому метою нашого дослідження було вивчення можливої ролі “корових” 2'-5'-олігоаденілатів та їх епоксианалогів (див. рис. 1) у механізмі регуляції скорочення гладеньких м'язів аорти та стегнової артерії, викликаного деполяризацією мембрани гладеньком'язових клітин (ГМК) та активацією α_1 -адренорецепторів.

Методика дослідження. Олігоаденілати синтезували раніше описаним нами методом [4]. Для досліджень використовували самців щурів лінії Вістар масою (341 ± 10) г. Тварин декапітували в умовах глибокої анестезії діетиловим ефіром. Після цього видаляли аорту (кондуктивна судина) та внутрішню стегнову артерію (резистивна судина), які потім очищували від сполучної тканини. В експериментах використовували артеріальні сегменти (1–2 мм), які прикріплювали в проточній термостатованій камері за допомогою тонкої волосіні (0,008 мм) з одного боку до ізометричного датчика сили, а з другого — до нерухомого гачка. Потім препарати розтягували для надання артеріальній стінці сегмента напруги, що відповідала 100 мм рт. ст. трансмурального тиску, створюючи тим самим умови, подібні до фізіологічних. За таких умов внутрішній діаметр сегментів стегнової артерії не перевищував (250 ± 20) мкм, а аорти — (1250 ± 55) мкм. Модифікований розчин Кребса, в якому знаходились артеріальні сегменти, був такого складу, ммоль/л: NaCl 119, KCl 2,7, NaHCO₃ 25, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1,7, HEPES 10, D-глюкоза 5,5, рН 7,4. Температура в робочій камері підтримувалася на рівні 37 °С. Скорочення ізольованих судинних препаратів записували на діаграмну стрічку самописцем КСП-4.

Результати статистичного аналізу подано як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього арифметичного для певної кількості (n) вимірів. Статистичне порівняння середніх величин контрольних та тестових вимірів проводили за законом t -розподілу. У всіх випадках рівень вірогідності параметрів (p), менший або рівний 0,05, розглядався як статистично значущий.

Обговорення результатів. У вихідному стані гладеньком'язовим препаратам стегнової артерії щура, на відміну від препаратів аорти, властивий незначний базальний тонус. 2'-5'-триаденілат у концентрації 10 мкМ не впливав на вихідний рівень базального тонусу як стегнової артерії, так і аорти.

Скорочення, викликане гіперкалієвим розчином Кребса ($[K^+]_0 = 60$ мМ), за умов блокади вивільнення нейромедіатора з адренергічних нервових терміналей або в присутності блокатора α -адренорецепторів фентоламіну (10^{-5} М) (деполяризація мембрани нервових терміналей іонами K^+ призводить до вивільнення норадреналіну), мало фазно-тонічну природу. Фазний компонент гіперкалієвого скорочення досліджуваних судин за цих умов майже ніколи не перевищував тонічний. Аплікація гіперкалієвого розчину Кребса на 10-й хв дії 2'-5'-олігоаденілату викликала збільшення амплітуди скорочення щодо контролю для

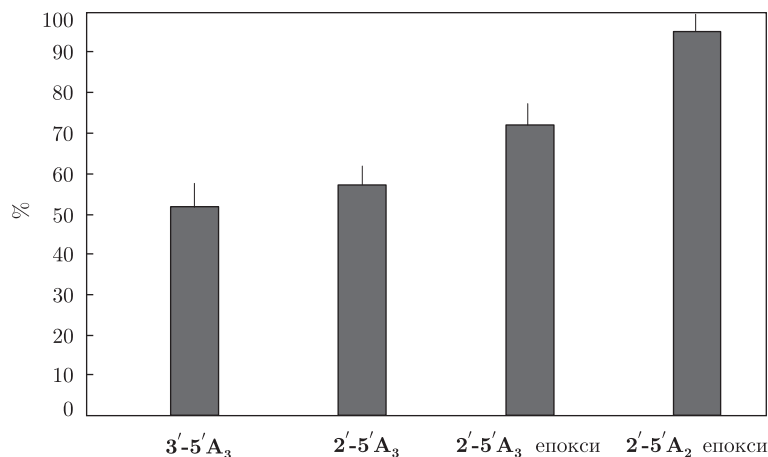


Рис. 2. Здатність різних олігоаденілатів у концентрації 10 мкМ пригнічувати тонічний компонент індукованого фенілефрин (10 мкМ) скорочення гладеньких м'язів аорти щура (%). Кількість експериментів для кожної групи — $n = 5$

препаратів аорти на $(45,0 \pm 9,0)\%$ ($n = 9$), стегнової артерії — на $(38,0 \pm 12,0)\%$ ($n = 9$). Аплікація 2'-5'-триаденілату на тонічному компоненті гіперкалієвого скорочення спричиняла до його збільшення в препаратах стегнової артерії на $(40,0 \pm 11,0)\%$ ($n = 9$), а в препаратах аорти — на $(35,0 \pm 8,0)\%$ ($n = 9$). Проведені експерименти виявили здатність 2'-5'-триаденілату потенціювати скорочення, викликане деполяризацією мембрани судинних ГМК.

При дослідженні дії 2'-5'-триаденілату незалежно від умов експерименту (активація агоністіндукованого скорочення на фоні дії олігоаденілату або аплікація його на тонічному компоненті цього скорочення) завжди спостерігали пригнічення агоністактивованого скорочення препаратів аорти та стегнової артерії щура, викликаного активацією α_1 -адренорецепторів (фенілефрин, 10 мкМ) або дією ангіотензину (0,1 мкМ). 2'-5'-триаденілат зменшував ангіотензиніндуковане скорочення препаратів стегнової артерії на $(73,0 \pm 7,8)\%$ ($n = 9$), а препаратів аорти — на $(57,0 \pm 7,0)\%$ ($n = 9$). Препарати судин відновлювали свою здатність відповідати скороченням на аплікацію досліджуваних агоністів протягом 60–90 хв. Треба зазначити, що дія 2'-5'-триаденілату не залежала від наявності або відсутності ендотелію.

Здатність пригнічувати агоністіндуковане скорочення судинних гладеньких м'язів мають також і інші форми олігоаденілатів. На рис. 2 порівнюється гальмівна дія деяких 2'-5'-олігоаденілатів та їх аналогів з різною кількістю аденолової кислоти та різними фосфодієфірними зв'язками на фенілефринвикликане скорочення препаратів аорти щурів. Як видно з рисунка, епоксианалоги 2'-5'-олігоаденілатів істотно пригнічують тонічний компонент скорочення судинних гладеньких м'язів. Особливо високу гальмівну здатність виявляє 2'-5'-епоксидіаденілат.

Надалі робота була сконцентрована на дослідженні механізму 2'-5'-триаденілату пригнічувати агоністіндуковане скорочення гладеньких м'язів судинних препаратів. Так, було виявлено, що блокатор ріанодинових рецепторів/каналів саркоплазматичного ретикулума ріанодин (10 мкМ) усуває гальмівну дію 2'-5'-триаденілату. Це дало змогу припустити, що активація останнім вивільнення кальцію із саркоплазматичного ретикулума ГМК може активувати Са-залежні калієві канали мембрани судинних міоцитів. Той факт, що 2'-5'-триаденілат здатен вивільнювати кальцій з ріанодинчутливого кальцієвого депо саркоплазма-

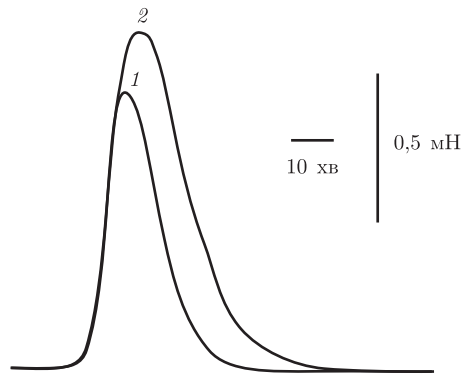


Рис. 3. Дія 2'-5'-триаденілату на кофеїніндуковане скорочення гладеньких м'язів аорти щура в номінально безкальцієвому розчині Кребса. 1 — скорочення, викликане аплікацією 10 мМ кофеїну в контролі; 2 — скорочення, викликане аплікацією 10 мМ кофеїну на 10-й хв дії 10 мкМ 2'-5'-триаденілату

тичного ретикулума ГМК, підтвердили результати експериментів з кофеїном. Кофеїн використовується для вивільнення кальцію з ріанодинчутливого кальцієвого депо ендо/саркоплазматичного ретикулума клітин різних типів тканин. Так, на 10-й хв преаплікації 10 мкМ 2'-5'-триаденілату в нормальному розчині Кребса скорочення препаратів аорти щура, індуковане 10 мМ кофеїну, збільшувалося на $(12,0 \pm 7,8)\%$ ($n = 5$) (рис. 3), а препаратів стегнової артерії — на $(14,0 \pm 5,0)\%$ ($n = 5$). При використанні блокаторів Са-залежних калієвих каналів малої (апамін, 0,1 мМ) та великої (тетраетиламоній, 1–3 мМ) провідності показано, що 2'-5'-триаденілат пригнічує агоністіндуковане скорочення судинних препаратів за рахунок активації кальційзалежних калієвих каналів великої провідності ($ВК_{Са}$). Відомо [5], що цАМФ-залежна протеїнкіназа здатна підвищувати активність $ВК_{Са}$ каналів ГМК за рахунок їх фосфорилування. Блокування цАМФ-чутливої протеїнкінази високоселективним блокатором Rp-8-bromo-cAMPS (0,01 мМ) сприяло усуненню гальмівної дії досліджуваного олігоаденілату.

Таким чином, проведені дослідження показали, що 2'-5'-триаденілат за рахунок вивільнення кальцію з ріанодин(кофеїн)чутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулума судинних ГМК і наступної активації $ВК_{Са}$ каналів мембрани ГМК здатен пригнічувати агоністіндуковане скорочення судинних гладеньких м'язів. Активоване 2'-5'-триаденілатом вивільнення кальцію з ріанодин(кофеїн)чутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулума може спричиняти і потенціювання скорочення, викликаного гіперкалієвим розчином Кребса. В останньому випадку калієва провідність не активується, і тому мобілізація кальцію з ріанодин(кофеїн)чутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулума ГМК буде істотно впливати на приріст амплітуди скорочення.

Knot і Nelson [6] вважають, що $ВК_{Са}$ канали виконують роль негативного зворотного механізму в контролі міогенного тонуусу в артеріальних гладеньких м'язах шляхом їх активації іонами кальцію за механізмом Са-опосередкованого вивільнення кальцію з внутрішньоклітинного кальцієвого депо ГМК. Останнє призводить до гіперполяризації мембрани ГМК і розслаблення судин. Можливість того, що $ВК_{Са}$ канали послаблюють дію вазоконстрикторної стимуляції, підтверджують результати дослідження внутрішньоклітинної концентрації кальцію та потенціалзалежності активації $ВК_{Са}$ каналів. Відкриття каналів відбувається в області мембранного потенціалу $-50 \dots -60$ мВ при внутрішньоклітинній концентрації кальцію $10^{-8} - 10^{-7}$ М, а вірогідність збільшується разом з величиною мембран-

ного потенціалу. Таким чином, збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, викликане їх надходженням до клітини через потенціалзалежні кальцієві канали під час деполяризації, призводитиме до активації VK_{Ca} каналів.

Існує й інший шлях активації цих каналів. Спонтанне вивільнення іонів кальцію із саркоплазматичного ретикулула призводить до виникнення спонтанних транзйентних вихідних струмів (STOCs), які викликаються одночасною активацією до 100 VK_{Ca} каналів [7, 8]. STOCs можна спостерігати в області мембранного потенціалу $-50 \dots -60$ мВ, збільшення їх частоти може відбуватися за умов активації вивільнення іонів кальцію з ріанодин(кофеїн)чутливого депо саркоплазматичного ретикулула ГМК прикладанням 1 мМ кофеїну. Підвищення калієвого струму блокується харибдотоксином або 1–3 мМ тетраетиламонієм (ТЕА) (вищі концентрації ТЕА блокують поряд з VK_{Ca} каналами і потенціалзалежні калієві канали). Таким чином, вивільнення Ca^{2+} з ріанодин(кофеїн)чутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулула спричинятиме розслаблення гладеньких м'язів завдяки активації K^+ каналів плазматичної мембрани ГМК [9, 10]. На противагу цьому в серцевому м'язі вивільнення Ca^{2+} з ріанодин(кофеїн)чутливого кальцієвого депо кардіоміцитів забезпечує $> 90\%$ Ca^{2+} , необхідного для скорочення.

Експерименти, коли скорочення викликалося гіперкалієвим розчином Кребса, показали, що 2'-5'-триаденілат здатен підвищувати тонічний компонент цього скорочення, мабуть, за рахунок додаткового вивільнення кальцію з ріанодинчутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулула ГМК. Підтвердженням останнього є той факт, що за умов дії гіперкалієвого розчину Кребса ($[K^+]_0 = 60$ мМ) потенціалзалежні кальцієві канали мембрани ГМК максимально активовані і тому збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію в цитозолі може відбуватися за рахунок мобілізації останнього з внутрішньоклітинного депо. Досліди з кофеїном (кофеїн використовується для ідентифікації ріанодин(кофеїн)чутливого внутрішньоклітинного кальцієвого депо) у номінально безкальцієвому розчині Кребса показали, що на фоні дії 2'-5'-триаденілату кофеїніндуковане скорочення збільшується. Здатність 2'-5'-триаденілату вивільнювати кальцій із цього кальцієвого депо ГМК підтверджують експерименти з використанням блокатора ріанодинових рецепторів/каналів саркоплазматичного ретикулула ріанодину. З іншого боку, блокування цАМФ-залежною протеїнкіназою розслаблюючої дії 2'-5'-триаденілату на фенілефриніндуковане скорочення судинних препаратів може свідчити про те, що цей нуклеотид, очевидно, здатен пригнічувати скорочувальні відповіді за рахунок декількох механізмів, а саме: шляхом активації 2'-5'-триаденілатом цАМФ-залежної протеїнкінази стимулювати вивільнення кальцію з ріанодин(кофеїн)чутливого внутрішньоклітинного кальцієвого депо ГМК і активувати VK_{Ca} канали. Додатково цАМФ-залежна протеїнкіназа може прямо фосфорилувати VK_{Ca} канали, приводячи їх в активний стан, або інші клітинні білки, що регулюють скорочення-розслаблення ГМК.

1. Adah S. A., Bayly S. F., Cramer H. et al. Chemistry and biochemistry of 2',5'-oligoadenylate-based anti-sense strategy // *Curr. Med. Chem.* – 2001. – **8**, No 10. – P. 1189–1212.
2. Kostyuk P. G., Kozlov A. V., Tkachuk Z. Yu. et al. Effect of “core” 2'-5'-oligoadenylates on the phosphorylation-dependent calcium channels in GH3 cells // *Ukr. Biochem. J.* – 1995. – **67**, No 1. – P. 26–32.
3. Козлов А. В., Китам В. О., Ткачук З. Ю. Молекулярная модель взаимодействия 2'-5' олигоаденилатов с протеинкиназой С // *Доп. НАН України.* – 2009. – № 3. – С. 171–175.
4. Ткачук З. Ю., Дубей І. Я., Яковенко Т. Г. та ін. Синтез 2'-5'-олігоаденилатів та їхній вплив на проліферацію і міграцію стовбурових клітин кісткового мозку мишей *in vitro* та *in vivo* // *Біополімери і клітина.* – 2007. – **23**, № 1. – С. 14–20.

5. Ko E. A., Han J., Jung I. D., Park W. S. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells // J. Smooth Muscle Res. – 2008. – **44**, No 2. – P. 65–81.
6. Knot H. J., Nelson M. T. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels // Science. – 1992. – **256**. – P. 532–535.
7. Benham C. D., Bolton T. B. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular muscle cells of the rabbit // J. Physiol. – 1986. – **371**. – P. 385–406.
8. Li P., Zeng X., Yang Y. et al. Role of calcium mobilization in the regulation of spontaneous transient outward currents in porcine coronary artery myocytes // Sci. China C. Life Sci. – 2007. – **50**, No 5. – P. 660–668.
9. Jaggard J. H., Wellman G. C., Heppner T. J. et al. Ca²⁺ channels, ryanodine receptors and Ca²⁺-activated K⁺ channels: a functional unit for regulating arterial tone // Acta Physiol. Scand. – 1998. – **164**, No 4. – P. 577–587.
10. Kotlikoff M. L., Wang Y. X., Xin H. B., Ji G. Calcium release by ryanodine receptors in smooth muscle // Novartis Found. Symp. – 2002. – **246**. – P. 108–119; discussion P. 119–124, P. 221–227.

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
 НАН України, Київ
 Інститут молекулярної біології і генетики
 НАН України, Київ

Надійшло до редакції 17.08.2009

I. B. Filippov, Z. Yu. Tkachuk, I. Ya. Dubei

Mechanisms of vessel tone regulation by 2'-5'-oligoadenylates

“Core” 2'-5'-oligoadenylates (2'-5' A) are shown to inhibit the contraction of smooth muscles of aorta and femoral artery of a rat caused by the depolarization of the membranes of smooth muscle cells (SMC) or α1-adrenoreceptors activation. Inhibitory effect of 2'-5' A₃ is realized by the activation of calcium-dependent potassium conductivity of the membrane of vessel SMCs. The effect of “core” 2'-5' A₃ can be eliminated by either the blockers of calcium-dependent high conductivity potassium channels or protein kinase A blocker. Ca-dependent potassium channels of SMC membranes are activated due to the ability of “core” 2'-5' A₃ to release calcium from ryanodine(caffeine)-sensitive calcium depot of SMC sarcoplasmic reticulum. This mechanism can be confirmed by the elimination of the 2'-5' A effect in the presence of the blockers of ryanodine receptors/channels, as well as by the increase of caffeine-induced contraction of vessel preparations in the presence of 2'-5' A₃. The inhibiting effect of oligoadenylates is realized via the endothelium-independent mechanism.