

УДК: 612.17:612.1

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИЙАКТИВИРУЕМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ

С.С. Майорова, аспирант; А.П. Солодков, д.м.н., профессор

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов

медицинский университет»

Целью работы было определить возможность ограничения нарушения функциональной активности кальций-активируемых калиевых каналов (BK_{Ca} -каналы) гладкомышечных клеток коронарных сосудов после 6-часового иммобилизационного стресса. Функциональную активность BK_{Ca} каналов определяли как процент изменения объемной скорости коронарного потока, вызванного введением в перфузионный раствор тетраэтиламмония (1мМ). О редокс-состоянии клеток судили по соотношению восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона. Также определяли концентрацию нитратов и нитритов, активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и общую антиоксидантную активность (АОА) плазмы крови.

Под влиянием тетраэтиламмония объемная скорость коронарного потока в группе стрессированных животных снижалась в меньшей степени (на 9%), чем в контроле (на 26%). При этом наблюдалась активация ПОЛ на 13% и угнетение АОА плазмы крови на 19%, а также накопление окисленного глутатиона и снижение соотношения GSH/GSSG на 46%. Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина полностью предупреждало постстрессорное уменьшение функциональной активности BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов, а также активацию ПОЛ и нарушение соотношения GSH/GSSG.

На основании полученных результатов можно заключить, что N-ацетил-L-цистеин обладает способностью предупреждать вызываемое стрессом окисление глутатиона и, как следствие этого, постстрессорное снижение функциональной активности BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов.

Ключевые слова: BK_{Ca} -каналы, N-ацетил-L-цистеин, редокс-регуляция, иммобилизационный стресс.

The objective of this study was to determine the limitation possibility of the functional activity changes of Ca-activated K channels (BK_{Ca} - channels) in coronary smooth muscle cells after 6-hours immobilization stress. Functional activity of BK_{Ca} - channels has been defined as a percentage of volume velocity changes in coronary flow evoked by tetraethylammonium (1mM) addition in the perfused solution. The cellular redox status has been estimated according to reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione ratio. The concentration of nitrates and nitrites activity of lipid peroxidation (LPO) and general antioxidant activity (AOA) of blood plasma have been defined in this work.

The volume velocity of coronary flow is reduced (9%) less under the influence of tetraethylammonium in the group of stressed animals than in control one (26%). LPO activation 13%, AOA inhibition of blood plasma 19%, accumulation of oxidized glutathione and reduction of GSH/GSSG ratio 45% have been observed. The preliminary N-acetyl - L-cysteine injection completely prevented the poststressor reduction of functional activity of BK_{Ca} - channels in smooth muscle cells of coronary vessels, activation of lipid peroxidation and GSH/GSSG ratio change.

The given results let us to make a conclusion that N-acetyl - L-cysteine can prevent glutathione oxidation evoked by stress and the resulting of it the poststressor reduction of functional activity of BK_{Ca} - channels in smooth muscle cells of coronary vessels.

Key words: BK_{Ca} - channels, N-acetyl - L - cysteine, redox-regulation, immobilization stress.

Введение

Одним из механизмов нарушения тонуса артериальных сосудов при стрессе является дисфункция эндотелиоцитов, характеризующаяся гиперпродукцией монооксида азота, активных форм кислорода, в частности, супероксид-анионов, и других vasoактивных веществ [4]. Действие активных форм кислорода и азота на клетку может приводить к изменению ее редокс-состояния, которое определяется соотношением восстановленного и окисленного глутатиона, НАДН и НАД⁺, НАДФН и НАДФ⁺ [6, 10]. Важная роль в поддержании редокс-состояния клеток принадлежит редокс-системе глутатиона (восстановленный/окисленный глутатион) [11]. Установлено, что SH-группы цистеина, входящего в состав белков, играют роль “редокс-сенсоров”. К таким молекулам относятся NO-синтаза, факторы транскрипции (AP-1, NF-kB, NIF-1), киназы (JNK, CDK, p 38 MAP киназа), фосфа-

тазы, регуляторы внутриклеточного метаболизма кальция (рианодиновый рецептор и L-тип кальциевых каналов), протеины АТФ-зависимых калиевых каналов, а также молекулы, регулирующие сократительную активность гладкой мышцы коронарных сосудов [7].

BK_{Ca} -каналы играют центральную роль в ослаблении сосудистой гладкой мышцы, оказывая демпфирующий эффект на зависимую от деполяризации активацию кальциевых каналов, ограничивают количество входящего внутрь клетки ионов кальция, что способствует вазодилатации. Таким образом, BK_{Ca} -каналы, по принципу отрицательной обратной связи противодействуют миогенной вазоконстрикции и развитию вазоспазма. Кроме того, активность этих каналов может изменяться под влиянием сосудорасширяющих веществ или физических факторов, вроде внутрисосудистого давления, действующими через цГМФ зависимые меха-

низмы [7], а также оказывающих влияние на частоту и амплитуду Ca^{2+} залпов [6] из саркоплазматического ретикулума гладких миоцитов.

Реактивные формы кислорода и азота способны окислять либо нитрозировать различные белки, в частности, ионные насосы, ферменты, рецепторы и т.д., имеющие важное значение в регуляции сосудистого тонуса. Aherm и др. (1999), показали, что реактивные формы азота могут нитрозировать SH-группы белков, входящих в состав VK_{Ca} -канала. Dichiara и Reinhart (1997) считают, что частичная блокада VK_{Ca} -каналов обусловлена окислением сульфгидрильных групп цистеина.

В связи с этим в качестве одного из компонентов патогенетической терапии и профилактики нарушений функций органов и тканей, обусловленных «окислительным стрессом» в последнее время все более пристальное внимание стало уделяться низкомолекулярному тиолсодержащему антиоксиданту N-ацетил-L-цистеину. Ранее было показано, что предварительное введение N-ацетил-L-цистеина предупреждает наблюдающееся при кратковременном и долговременном иммобилизационном стрессе уменьшение содержания восстановленного глутатиона, окисление сульфгидрильных групп белковых молекул, повышение активности ферментов системы глутатиона (глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы) в миокарде и тиол/дисульфидного соотношения в эритроцитах, а также снижение тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда характерное для долговременного стресса [4]. Однако до сих пор не изучена роль данного препарата в постстрессорных изменениях функциональной активности VK_{Ca} -каналов.

Целью данной работы было определить возможность ограничения постстрессорного нарушения функциональной активности VK_{Ca} -каналов коронарных сосудов.

Материалы и методы

Опыты были проведены на изолированном сердце крысы, в полость левого желудочка которого вводили латексный баллончик постоянного объема. Сердце находилось в установке для перфузии изолированного сердца мелких лабораторных животных IH-SR тип 844/1 (HSE-NA, Германия), оборудованной датчиками для измерения объемной скорости коронарного потока (1RB-проточный, для флуометра TTFM тип 700, HSE), аортального и развиваемого внутрижелудочкового давления (Isotec pressure transducer), связанных с модулями для измерения давления TAM-A, HSE-NA. Все измерительное оборудование было соединено с компьютером, в котором при помощи программы ACAD (HSE, Германия) проводилась регистрация и обработка измеряемых показателей.

На первом этапе эксперимента сердце перфузировали раствором Кребса - Хензелейта, на втором – этим же раствором, но с добавлением тетраэтиламмония (1 mM, Sigma). Данная концентрация

тетраэтиламмония была выбрана как избирательно блокирующая VK_{Ca} каналы [12]. В ходе опыта перфузионное давление ступенчато повышали от 40 до 120 мм рт.ст. с шагом в 20 мм рт. ст. (коронарная ауторегуляция). Функциональную активность VK_{Ca} -каналов определяли как процент изменения объемной скорости коронарного потока, вызванного введением в перфузионный раствор тетраэтиламмония.

Стресс вызывали 6-часовой иммобилизацией крыс на спине без фиксации головы.

В отдельных группах крыс за 1 час до иммобилизации вводили N-ацетил-L-цистеин в дозе 40 мг/кг веса тела [3].

Определение стабильных продуктов деградации монооксида азота проводилось в плазме крови. Метод основан на восстановлении нитратов до нитритов цинковой пылью в щелочной среде в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди, с последующим фотометрическим определением нитрит-ионов с помощью реакции Грисса [2].

Оценку активности процесса перекисного окисления липидов и общую антиоксидантную активность в плазме крови производили на биохемилюминиметре БХЛ-06 (Россия). Метод индуцирования хемилюминесценции и перекисью водорода с сульфатом железа основан на том, что в представленной системе происходит каталитическое разложение перекиси водорода ионами металла с переходной валентностью – двухвалентным железом в соответствии с реакцией Фентона. Образующиеся при этом свободные радикалы вступают в процесс инициации свободнорадикального окисления в исследуемом биологическом субстрате. Для оценки активности ПОЛ и АОА плазмы регистрировали максимальную интенсивность свечения (I_{max} , мВ), пропорциональную уровню перекисного окисления липидов, светосумму (S , мВчсек) свечения, обратно пропорциональную антиоксидантной активности и $tg2\alpha$ – тангенс угла убывания сигнала после достижения максимальной интенсивности, характеризующий скорость снижения свободнорадикальных процессов [3].

Восстановленный и окисленный глутатион в эритроцитах определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [13]. На первом этапе пробы крови забирали в пробирку с 1,10-фенантралином. После центрифугирования в надосадочную жидкость добавляли восстановленный (0; 62,5; 125,0; 250,0 $\mu g/ml$) и окисленный (0; 25,0; 50,0; 100,0 $\mu g/ml$) глутатион. Депротеинизацию проводили метафосфорной кислотой. Затем пробы обрабатывали 2,4-динитрофторбензолом для того, чтобы образовались N-(2,4-динитрофенил) производные S-карбоксиметил восстановленного и окисленного глутатиона. Через 20 часов инкубации пробы вводили в хроматографическую колонку Zorbax NH2 250 x 4,6 мм, размер частиц 5 мкм высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1100 (система подачи и дегазации четырех раство-

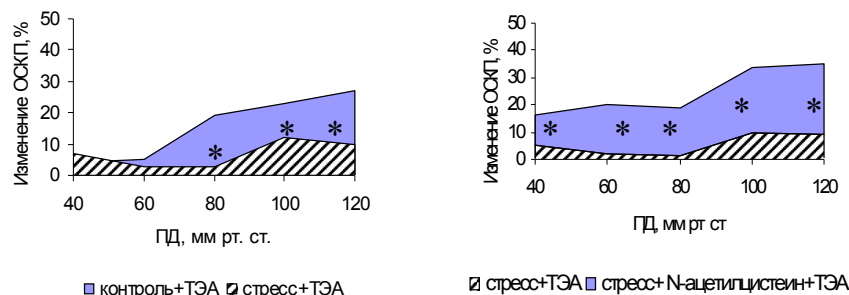
рителей G1311A, фотодиодноматричный детектор G1315B, термостат колонок G1316A, устройство для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G1313A). Элюирование осуществляли метанолом. Концентрации были рассчитаны путем экстраполяции калибровочного графика зависимости площади пика глутатиона от его концентрации в пробе (линейная регрессия, рассчитанная методом наименьших квадратов). Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения проводилась с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D.

Обработка полученных результатов проводилась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STATISTICA 6.0. Для сравнения двух количественных признаков применялся t-критерий Стьюдента. Результаты эксперимента выражали как среднее арифметическое плюс минус ошибку средней величины. Различия принимали достоверными при значении вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В изолированных сердцах крыс контрольных животных, перфузируемых раствором Кребса-Хензелята, содержащим тетраэтиламмоний наблюдалось снижение объемной скорости коронарного потока при перфузионном давлении 80-120 мм рт.ст. в среднем на 23% ($p < 0,05$, рис. 1 А) при неизменном развиваемом внутрижелудочковом давлении. При этом индекс ауторегуляции увеличивался в среднем на 38%. После блокады тетраэтиламмонием $ВК_{Ca}$ -каналов максимальный гиперемический коронарный поток, определяемый при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт.ст., снизился на 23 и 15%, соответственно ($p < 0,05$).

В группе животных перенесших иммобилизацию тетраэтиламмоний вызывал менее выраженное снижение объемной скорости коронарного потока (в среднем на 9% при перфузионном давлении 100 и 120 мм рт.ст., $p < 0,05$, рис. 1А, Б) и возрастание индекса ауторегуляции (в среднем на 31%, $p < 0,05$), по сравнению с контролем. Максимальный гиперемический коронарный поток и развиваемое внутрижелудочковое давление не изменялись.



А
Рисунок 1 - Изменение объемной скорости коронарного потока в группе животных перенесших стресс (А) до и после предварительного введения N-ацетил-L-цистеина (Б).

По оси абсцисс – перфузионное давление в мм рт.ст.; по оси ординат – % изменения. * - $p < 0,05$ -по сравнению с контролем

После предварительного внутрибрюшинного введения N-ацетил-L-цистеина блокада $ВК_{Ca}$ -каналов привела к снижению объемной скорости коронарного потока на 24%, что не отличалось от показателей контрольной группы животных. Однако следует отметить тот факт, что действие тетраэтиламмония начинало проявляться уже на уровне 60 мм рт.ст. Максимальный гиперемический коронарный поток снизился на 18%, а индекс ауторегуляции увеличился на 71%. Развиваемое внутрижелудочковое давление не изменялось.

В группе животных, перенесших 6-часовую иммобилизацию на фоне предварительного внутрибрюшинного введения N-ацетил-L-цистеина, блокада $ВК_{Ca}$ -каналов приводила к снижению объемной скорости коронарного потока в пределах от 60 до 120 мм рт.ст. в среднем на 21%, что не отличалось от контроля (рис. 1 Б). Максимальный гиперемический коронарный поток снижался в среднем на 23%, индекс ауторегуляции увеличился на 44%. Развиваемое внутрижелудочковое давление не изменялось. Таким образом, поле 6-часового иммобилизационного стресса действие тетраэтиламмония на коронарный поток оказалось ниже, чем в контрольной группе животных, что может свидетельствовать о снижении функциональной активности $ВК_{Ca}$ -каналов коронарных сосудов. Предварительное внутрибрюшинное введение N-ацетил-L-цистеина в группе животных, перенесших стресс, предупредило постстрессорное нарушение функциональной активности $ВК_{Ca}$ -каналов.

В связи с тем, что снижение функциональной активности $ВК_{Ca}$ -каналов после иммобилизации может происходить в результате окисления или нитрозилирования сульфгидрильных групп цистеина, входящего в состав его белковых молекул, на следующем этапе определяли активность свободнорадикального окисления, общую АОА плазмы, концентрацию нитратов/нитритов, а также содержание GSH и GSSG в крови у крыс после иммобилизационного стресса до и после введения N-ацетил-L-цистеина.

После иммобилизационного стресса отмечалось статистически достоверное увеличение, по сравнению с контролем, показателей I_{max} на 13% (пропорционален уровню перекисного окисления липидов), суммарной суммы хемилюминесценции на 19% (S, обратно пропорциональна общей антиоксидантной активности) и скорости элиминации свободных радикалов на 10% (пропорционален $tg 2\alpha$). N-ацетил-L-цистеин не оказал влияния на уровень ПОЛ и АОА у контрольных крыс, а также полностью предупредил изменение данных показателей при стрессе.

После иммобилизационного стресса концентрация NO_2/NO_3 увеличилась на 53% (табл. 2).

Таблица 1 – Влияние N-ацетил-L-цистеина на показатели активности перекисного окисления липидов и общей антиоксидантной активности в плазме крови крыс после иммобилизационного стресса

Группы	I max, мВ	S, мВЧсек	tg 2α
Контроль (n=9)	1,137±0,042	10,4±0,3	-0,241±0,006
Стресс 6 часов (n=7)	1,281±0,040*	12,4±0,3*	-0,268±0,007*
N-ацетил-L-цистеин (n=7)	1,179±0,040	11,0±0,2	-0,279±0,030*
N-ацетил-L-цистеин + стресс (n=7)	1,072±0,050	10,3±0,5	-0,244±0,030

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем; n – количество животных в группе

Таблица 2 – Влияние N-ацетил-L-цистеина на концентрацию нитратов/нитритов у животных после иммобилизационного стресса

Группы	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ , мкМ/л
Контроль (n=10)	27,5±1,2
Стресс 6 часов (n=11)	42,0±1,2
N-ацетил-L-цистеин (n=7)	26,6±2,6
N-ацетил-L-цистеин + стресс (n=7)	28,9±2,5

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем; n – количество животных в группе

Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина животным, перенесшим иммобилизационный стресс, предупреждало характерное для стресса накопление продуктов разрушения монооксида азота. Таким образом, при 6-часовой иммобилизации происходила активация окислительного и нитрозилирующего стресса на фоне общего снижения АОА плазмы, что, в свою очередь, могло привести к окислению и/или нитрозилированию сульфгидрильных групп белковых молекул ВК_{Ca}-каналов.

После 6-часового иммобилизационного стресса достоверных различий абсолютных значений GSH и GSSG не обнаруживалось, однако их соотношение уменьшалось на 46% (табл.3). В группе животных, перенесших стресс, после предварительного внутрибрюшинного введения N-ацетил-L-цистеина, тиолдисульфидное оставалось таким же, как в контроле.

Соотношение GSH и GSSH играет важную роль в поддержании редокс-состояния клеток. Изменение этого соотношения может привести к изменению их функционирования. При иммобилизационном стрессе происходит активация ПОЛ, снижается АОА плазмы крови и соотношение GSH и GSSG изменяется в сторону накопления GSSG. Соотношение GSH и GSSH не только определяет редокс-состояние клеток, но и является своеобразным «молекулярным переключателем» их фенотипических свойств. Это связано с тем, что при изменении соотношения GSSG/GSH меняется характер активности целого ряда клеточных ферментов, факторов транскрипции (AP-1, NF-kB, HIF-1), молеку-

Таблица 3 – Концентрация восстановленного, окисленного глутатиона и их соотношение в крови крыс, перенесших стресс, до и после введения N-ацетил-L-цистеина

Группа животных	GSH мкг/мл крови	GSSG мкг/мл крови	GSH/ GSSG
Контроль (n=11)	521±53	166±25	4,29±0,78
Стресс (n=10)	424±76	176±21	2,29±0,34*
N-ацетил-L-цистеин (n=7)	483±92	154±24	3,37±0,62
N-ацетил-L-цистеин + стресс (n=7)	508±63	190±42	4,04±1,67

Примечание: * – p<0,029 по сравнению с контролем; n – количество животных в группе

лярных шаперонов, рецепторов, ионных каналов и др. В свою очередь, это может приводить к экспрессии генов, ответственных за синтез антиоксидантных ферментов и активации систем, восстанавливающих глутатион [1]. На основании полученных результатов можно заключить, что, наряду с антиоксидантным эффектом, N-ацетил-L-цистеин обладает способностью предупреждать вызываемое стрессом окисление глутатиона и, как следствие этого, постстрессорное снижение функциональной активности ВК_{Ca}-каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов.

Заключение

1. Стресс снижает функциональную активность ВК_{Ca}-каналов коронарных сосудов, которая восстанавливается под влиянием предварительного введения N-ацетил-L-цистеина.

2. Под влиянием иммобилизационного стресса наблюдается увеличение интенсивности перекисного окисления липидов на фоне ослабления общей антиоксидантной активности и накопление продуктов деградации монооксида азота.

3. После иммобилизационного стресса соотношение GSH и GSSH уменьшается, что приводит к изменению редокс-состояния клеток.

4. Предварительное введение N-ацетил-L-цистеина практически полностью устраняет постстрессорную активацию нарушения свободнорадикального окисления, накопление NO₂⁻/NO₃⁻ и восстанавливает соотношение GSH и GSSH.

Литература

1. Беляева Л.Е., Шебеко В.И., Солодков А.П. Редокс-зависимые механизмы действия N-ацетилцистеина // Вестник Витебского государственного медицинского университета. - 2008. - Т. 7, № 4. - С. 5-15.
2. Веремей И.С., Солодков А.П. Восстановление NO₃⁻ в NO₂ цинковой пылью в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди // Сборник научных трудов. - Витебск, 1999. - С. 274-277.
3. Беляева Л.Е., Шебеко В.И., Солодков А.П., Долженкова Е.В. Возможность коррекции нарушений тонуса коронарных сосудов при острой кровопотере N-ацетилцистеином // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования. Труды II республиканской научно-практической конференции. - Витебск, 2002. - С. 71-76.
4. Дорошенко А.С. Солодков А.П., Шебеко В.И. Влияние N-ацетил-L-цистеина на роль супероксид-анионов в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда при стрессе // Белорусский медицинский журнал. - 2005. - № 4. - С. 48-50.
5. Журавлев А.И., Журавлева А.И. Слабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике. - Москва, М., 1975 г. 127 с.
6. Солодков А.П., Божко А.П. Изменение активности эндотелиоцитов коронарных сосудов под влиянием стресса // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 1994. - Т. 80, № 4. - С. 65-72.
7. Шебеко В.И. Эндотелий и система комплемента. - Витебск: ВГМУ, 1999. - 149 с.
8. Jaggat J.H., Stevenson A.S., Nelson M.T. Voltage dependence of Ca²⁺ sparks in intact cerebral arteries // Am. J. Physiol. - 1998. - Vol. 274. - P. 1755-1761.
9. Nelson M.T., Quayle J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle // Am. J. Physiol. - 1995. - Vol. 268. - C. 799-822.
10. Paterno R., Faraci F.M., Heistad D.D. Role of Ca(2+)-dependent K+ channels in cerebral vasodilatation induced by increases in cyclic GMP and cyclic AMP in the rat // Stroke. - 1996. - Vol. 27. - P. 1603-1607.
11. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide / glutathione couple // Free Radic. Biol. Med. - 2001. - Vol. 30, № 11. - P. 1191-1212.
12. Vanhoutte P.I. M. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better // J. Clin. Invest. - 2001. - Vol. 107, № 1. - P. 23-25.
13. Yoshida T. Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection // Journal of Chromatography B. - 1996. - № 678. - P. 157-164.

Поступила 08.04.09