

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

На правах рукопису

ЗИМА Олексій Валентинович

**МЕХАНІЗМ ДІЇ ОКИСУ АЗОТУ НА КАЛЬЦІЄВІ ТА КАЛІЄВІ
КАНАЛИ ЕЛЕКТРОЗБУДЛИВОЇ МЕМБРАНИ
ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН**

03.00.05 - біофізика

**Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

КИЇВ - 1996

Дисертація є рукопис.

Ав. 35.889

Роботу виконано у відділі нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України

Науковий керівник: академік **Шуба Михайло Федорович**

Офіційні опоненти: академік **Магура Ігор Сільвестрович**,

кандидат біологічних наук **Лук'янець Олена Олександрівна**.

Провідна установа: Інститут фізіології Національного університету ім.Тараса Шевченка.

Захист відбудеться "26" листопада 1996 р. на засіданні

Спеціалізованої ради Д-01.13.01 при Інституті фізіології

ім.О.О.Богомольця НАН України за адресою:

252004, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України

Автореферат розісланий "25" листопада 1996 р.

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00739845 (-)

Вчений секретар

Спеціалізованої вченої ра

доктор біологічних наук

Сорокіна-Маріна З.О.

AB - 35.889

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Встановлення факту про те, що клітини живих організмів здатні синтезувати окис азоту (NO), обумовило великий інтерес дослідників, оскільки, як згодом виявилось, цей неорганічний газ бере участь, як регуляторна і сигнальна молекула, у різноманітних біологічних процесах. До його фізіологічних функцій відносять нейропередачу в різних ділянках нервової системи, контроль тонуусу кровоносних судин і клітинної адгезії, регуляцію імунних відповідей та інші.

Утворення NO в ендотеліальних клітинах і деяких нейронах з L-аргініну каталізується родиною специфічних ферментів - NO-синтаз (Palmer 1988, Moncada 1991, Calver 1993). Основним "рецептором" для NO в гладеньком'язових клітинах (ГМК) є залізо активного центру гуанілатциклази (Rapoport 1983, Murad 1986, Moncada 1991). Внаслідок активації цього ферменту відбувається підвищення рівня циклічного 3',5-гуанозинмонофосфату (цГМФ) в клітині. Припускається, що в основі NO/цГМФ-залежного пригнічення скорочення гладеньких м'язів лежить зменшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) внаслідок підсилення активного мембранного транспорту цих іонів та зниження чутливості скоротливого апарату до Ca^{2+} (Morgan 1984, Nishimura 1989, Magliola 1990, McDaniel 1992). Проте до сьогодні відсутні переконливі дані про роль іонних (головним чином кальцієвих) каналів в розслаблюючій дії NO на гладенькі м'язи. Хоча добре відомо (Шуба 1981, Somlyo 1989), що активація скорочення ГМК обумовлена збудженням їх плазматичної мембрани і збільшенням входу Ca^{2+} через потенціалкеровані Ca^{2+} канали.

Більшість досліджень, в яких вивчався ефект NO на збудження і скорочення гладеньких м'язів, виконано на багатоклітинних препаратах з

ЛНБ ім. В. Стефанива

використанням методу сахарозного містка і мікроелектродної техніки. Але ці методи мають ряд обмежень. Зокрема, вони не дають відповіді на запитання про те, які внутрішньоклітинні молекулярні механізми зміни іонної провідності мембрани ГМК. На наш погляд, найбільш адекватним підходом для вивчення механізмів дії NO на збудження гладеньких м'язів є дослідження іонних каналів мембрани ізольованої ГМК за допомогою методу фіксації потенціалу ("patch-clamp").

Мета і завдання роботи. Мета роботи - дослідити можливі механізми дії NO на іонні канали електрозбудливої мембрани ГМК *taenia coli* і мезентеріальної артерії морської свинки.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

1. Розробити методику виділення функціонально повноцінних ГМК *taenia coli* і мезентеріальної артерії морської свинки та застосувати до них метод фіксації потенціалу "patch-clamp".
2. Дослідити дію NO на високопороговий Ca^{2+} струм L-типу Ca^{2+} каналів мембрани ГМК *taenia coli* і мезентеріальної артерії морської свинки.
3. Визначити можливі внутрішньоклітинні молекулярні механізми дії NO на Ca^{2+} струм мембрани ГМК.
4. Дослідити дію NO на K^+ канали мембрани ГМК *taenia coli* морської свинки.

Наукова новизна роботи. 1. Вперше в дослідях на поодиноких ізольованих ГМК *taenia coli* і мезентеріальної артерії морської свинки детально досліджено механізм дії NO, що вивільнюється з нітрогліцерину внутрішньоклітинно, на потенціалкеровані Ca^{2+} канали. Показано, що NO інгібує високопороговий Ca^{2+} струм L-типу Ca^{2+} каналів завдяки активації цГМФ-залежної протеїнкінази.

2. Виявлено, що NO вивільнюваний в позаклітинне середовище (донор NO нітропрурид натрію), в залежності від концентрації викликає цГМФ-залежне інгібування або цГМФ-незалежну активацію Ca^{2+} струму струму L-типу Ca^{2+} каналів мембрани ГМК *taenia coli* морської свинки.
3. Показано, що NO вивільнюваний з обидвох донорів викликав тільки цГМФ-залежне інгібування високопорогового Ca^{2+} струму L-типу Ca^{2+} каналів мембрани ГМК *мезентеріальної артерії* морської свинки.
4. Встановлено, що NO вивільнюваний з обидвох донорів викликав цГМФ-залежне зростання активності Ca^{2+} -залежних K^+ каналів великої провідності мембрани ГМК *taenia coli* морської свинки. Цей ефект NO не вимагав вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо або надходження Ca^{2+} до ГМК з позаклітинного середовища.

Теоретичне та практичне значення роботи. Отримані результати досліджень дозволяють зробити припущення про існування двох механізмів NO-залежного пригнічення скорочення гладеньких м'язів, викликаного деполяризацією клітинної мембрани. Один із них пов'язаний з інгібуванням входу Ca^{2+} через L-тип Ca^{2+} каналів мембрани ГМК, другий - з активацією Ca^{2+} -залежних K^+ каналів, що буде приводити до гіперполяризації мембрани ГМК і як наслідок цього - до інактивації входу Ca^{2+} до клітини.

З'ясування молекулярних механізмів дії донорів NO (нітрогліцерину і нітропруриду натрію) має не тільки фундаментальне, але і прикладне значення в розумінні синтезу нового класу нітросполук з заданою вазодилаторною дією та розробки більш ефективних методів лікування цими сполуками судинних захворювань.

Апробація роботи. Основні положення роботи доповідались і обговорювались: на міжнародному симпозіумі "Biology of Nitric Oxide" (Кьольн, Німеччина,

1993), на I-ому з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 1994), на XII-ому міжнародному фармакологічному конгресі (Монреаль, Канада, 1994), на щорічній конференції Англійського фізіологічного товариства (Оксфорд, Великобританія, 1995), на I-ому конгресі FEPS (Маастріхт, Нідерланди, 1995), на 40-ому конгресі Американського біофізичного товариства (Балтімор, США, 1996), на семінарах Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАНУ (Київ, 1993, 1994, 1995). За матеріалами роботи опубліковано 8 статей.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису методів дослідження, результатів дослідження, обговорення результатів, висновків та списку літератури з 233 найменувань. Робота викладена на 145 сторінках та ілюстрована 32 малюнками.

Декларація конкретного особистого внеску дисертанта в розробку наукових

результатів. 1. Розроблена методика виділення функціонально повноцінних ГМК *taenia coli* і мезентеріальної артерії морської свинки.

2. Досліджена дія NO на високопороговий Ca^{2+} струм L-типу Ca^{2+} каналів мембрани ГМК *taenia coli* і мезентеріальної артерії морської свинки.

3. Досліджена дія NO на K^+ канали мембрани ГМК *taenia coli* морської свинки.

МЕТОДИКА

Дослідження проводились на свіжоізольованих поодиноких ГМК *taenia coli* і мезентеріальної артерії морської свинки. Для виділення ГМК, смужку з *taenia coli* клали в безкальцієвий розчин Кребса, в якому була колагеназа (тип XI) 0.2% і бичачий сироватковий альбумін 0.3%. Ферментативна обробка тканини тривала 30-40 хв при температурі 34°C. Для отримання ізольованих клітин тканина розрізувалась на дрібні шматочки і багаторазово пропуссалась через отвір пастерівської піпетки в безкальцієвому розчині Кребса. Процедура

виділення ГМК з *мезентеріальної артерії* суттєво не відрізнялась від наведеної вище для *taenia coli*. Тканина інкубувалась на протязі 50-60 хв в безкальцієвому розчині Кребса, який містив колагеназу (тип XI) 0.2%, еластазу 0.05% і бичачий сироватковий альбумін 0.3%.

Дослідження трансмембранних іонних струмів здійснювалось за допомогою методу фіксації потенціалу - "patch-clamp" в конфігурації "whole-cell" (Hamill 1981). Мікропіпетки виготовляли з м'якого молібденового скла. Опір піпеток складав 2-3 МОм, коли вони були заповнені піпеточним розчином. Зовнішній розчин мав такий склад (мМ/л): NaCl 135; CsCl 6; CaCl₂ 2.5; MgCl₂ 1.2; TEA 5; d-глюкоза 5; HEPES 10; pH 7.4 (NaOH). Піпеточний розчин містив (мМ/л): CsCl 140; MgSO₄ 2; Na₂АТФ 2; Na₂ГТФ 0.2; EGTA 0.5; HEPES 10; pH 7.3 (CsOH).

Дослідження струмів поодиноких іонних каналів здійснювалось методом patch-clamp в конфігураціях "cell-attached", "inside-out" і "outside-out". Мікропіпетки виготовляли з тонкостінного боросилікатного скла. Опір піпеток складав 5 МОм, коли вони були заповнені піпеточним розчином. Для дослідження K⁺ каналів використовувався симетричний розчин такого складу (мМ/л): KCl 140; CaCl₂ 0.1; EGTA 0.6; HEPES 10; pH 7.3 (KOH); pCa 7. В дослідженнях Ca²⁺-каналів піпеточний розчин містив (мМ/л): BaCl₂ 0.1; TEA 30; BaуК 0.0001; HEPES 10; pH 7.3 (KOH).

Підсилення іонних струмів здійснювалось за допомогою підсилювача PATCH-CLAMP L/M EPC-5 з опором зворотнього зв'язку перетворювача струм-напруга 10 ГОм. Сигнал з виходу перетворювача надходив через фільтр низьких частот (частота зрізу 1 кГц) на аналого-цифровий перетворювач і далі в комп'ютер ІВМ РС/АТ. Дані аналізувались за допомогою програм "Screen", "Datasel", "pClamp 5.5". Для аналізу активності поодиноких іонних каналів

використовувались параметри “імовірність відкритого стану каналу (P_0)”: $nP_0 = (\sum t_0)/T$ та “середній час відкритого стану каналу (τ_0)”: $\tau_0 = (\sum t_0)/N$, де n - число каналів під мікропіпеткою, t_0 - час відкритого стану каналу, T - загальний час реєстрації активності каналів, N - число відкривань каналу.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Дія окису азоту на Ca^{2+} струм мембрани гладеньком'язових клітин

taenia coli морської свинки

Проведені дослідження показали, що в мембрані ГМК *taenia coli* морської свинки вхідний Ca^{2+} струм (I_{Ca}) переноситься через високопорогові Ca^{2+} канали L-типу. Це підтверджують наступні факти: 1) струм мав поріг активації при $-40 \dots -30$ мВ і максимум вольт-амперної характеристики при $+10$ мВ; 2) потенціал половинної інактивації струму становив -31 мВ; 3) провідність поодинокого кальцієвого каналу становила 27 пСм (носієм струму через Ca^{2+} канал були іони Ba^{2+} 80 мМ); 4) струм ефективно блокувався ніфедипіном ($K_d = 0.05$ мкМ), відомим блокатором L-типу Ca^{2+} каналів.

Як донор NO, використовували відомий вазодилатор нітрогліцерин (НГ). Виявлено, що НГ викликав дозо-залежне і зворотне інгібування I_{Ca} з концентрацією половинного інгібування (IC_{50}) 1 мкМ і максимальним ефектом 38% для 100 мкМ НГ (мал. 1,А). НГ блокував I_{Ca} без зміни порогу активації і максимуму вольт-амперної характеристики струму (мал. 1,Б). НГ також не приводив до зсуву кривої стаціонарної інактивації I_{Ca} . Отже дія НГ на I_{Ca} не була зв'язана зі зміною потенціалзалежних властивостей Ca^{2+} каналу.

Аналіз активності поодиноких Ca^{2+} каналів (конфігурація “cell-attached”) показав, що НГ викликає значне зменшення частоти відкривання Ca^{2+} каналу, хоча амплітуда струму, що проходив через канал, не зазнавала зміни. Розрахунки показали, що імовірність відкритого стану Ca^{2+} каналу

(nP_0) зменшувалась в присутності НГ (100 мкМ) приблизно в 3 рази (мал. 1,В). НГ викликав інгібування Va^{2+} струму (I_{Ba}) подібне до того, яке спостерігається у випадку I_{Ca} . Пригнічення I_{Ba} під впливом НГ було зворотнім і не залежало від рівня деполаризації мембрани.

Як відомо, НГ зазнає біотрансформації в молекулу NO усередині ГМК. Для перевірки, чи інгібуюча дія НГ на I_{Ca} пов'язана з позаклітинним виділенням NO, в зовнішній розчин додавався оксигемоглобін (50 мкМ), який специфічно зв'язує NO. Нами було встановлено, що інгібуючий ефект

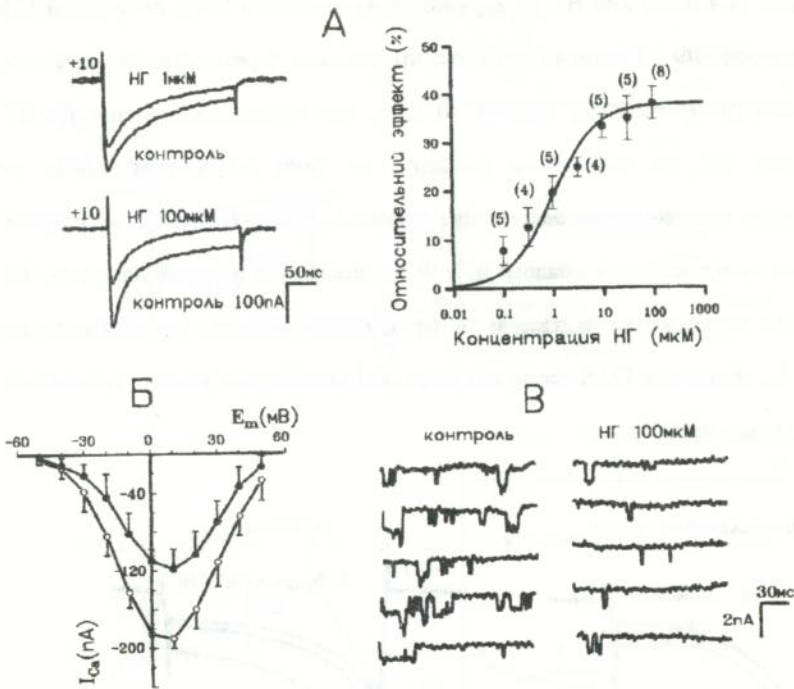


Рис. 1. Інгібуюча дія нітрогліцерину (НГ) на I_{Ca} мембрани гладеньком'язових клітин *taenia coli* морської свинки:

А - зміна I_{Ca} під дією НГ (1 і 100 мкМ) і крива доза-ефект блокування I_{Ca} під дією НГ. Експериментальні точки відповідають відносному ефекту НГ ($(I_{\text{контр}} - I_{\text{НГ}}) / I_{\text{контр}}$). Теоретична крива побудована за рівнянням Міхаеліса-Ментен ($E = E_{\text{max}}[NG] / (IC_{50} + [NG])$) з $IC_{50} = 1$ мкМ і $E_{\text{max}} = 38\%$. Б - вольт-амперні характеристики I_{Ca} в контролі (○) і при дії НГ (100 мкМ) (●). Підтримуваний потенціал -60 мВ. В - зміна активності Ca^{2+} каналів при дії НГ (100 мкМ) (конфігурація "cell-attached").

НГ (100 мкМ) на I_{Ca} , як в контрольних умовах (38%), так і при наявності оксигемоглобіну (35%), суттєво не відрізняється. Це свідчить на користь внутрішньоклітинного виділення NO і викликаного ним інгібування струму.

Відомо (Rapoport 1983, Murad 1986, Moncada 1991), що NO і нітросполуки, активуючи гуанілатциклазу, підвищують рівень цГМФ усередині клітини. В наступних експериментах була досліджена можлива участь цГМФ в інгібуючому ефекті НГ на I_{Ca} . Так, додавання в піпеточний розчин метиленового синього (20 мкМ), відомого блокатора гуанілатциклази, суттєво блокувало (в 4 рази) дію НГ на I_{Ca} (мал. 2,А). З іншого боку, аналоги цГМФ (дібутирил-цГМФ і 8-бром-цГМФ), які проникають через клітинну мембрану, викликали інгібування I_{Ca} подібне до того, яке спостерігалось при дії НГ. Додавання НГ до зовнішнього розчину, на фоні дії 8-бром-цГМФ, не спричиняло суттєвої зміни амплітуди і форми I_{Ca} (мал. 2,Б). Слід відзначити, що в тих випадках, коли аналоги цГМФ не викликали інгібування струму, НГ також був не ефективним. Ці факти переконливо свідчать, що інгібуюча дія НГ на I_{Ca} мембрани ГМК *taenia coli* морської свинки пов'язана з активацією гуанілатциклазного шляху.

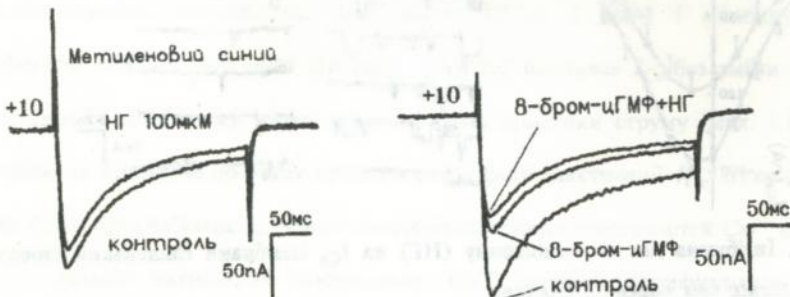


Рис. 2. Механізм інгібуючої дії нітрогліцерину (НГ) на I_{Ca} :

А - дія НГ (100 мкМ) на I_{Ca} при наявності метиленового синього (10 мкМ) у піпеточному розчині. Б - зміна I_{Ca} при дії 8-бром-цГМФ (200 мкМ) і при додаванні НГ (100 мкМ) на фоні дії 8-бром-цГМФ (200 мкМ).

Є всі підстави вважати, що кінцевим етапом цього шляху є активація цГМФ-залежної протеїнкінази, яка, мабуть, і діє на Ca^{2+} канали L-типу, пригнічуючи їх. Для того, щоб з'ясувати це питання, ми досліджували дію блокатора цГМФ-залежної протеїнкінази, Н-8, на I_{Ca} . Ці дослідження показали, що на фоні дії Н-8 (0.5 мкМ) НГ викликає не зменшення, а навпаки, збільшення амплітуди I_{Ca} . Слід відзначити, що сам Н-8 суттєво інгібував I_{Ca} з $\text{IC}_{50}=0.5$ мкМ і максимальним ефектом 50% для 3 мкМ Н-8. Аналогічне інгібування I_{Ca} спричиняли інші блокатори протеїнкіназ - Н-7 і стаураспорін.

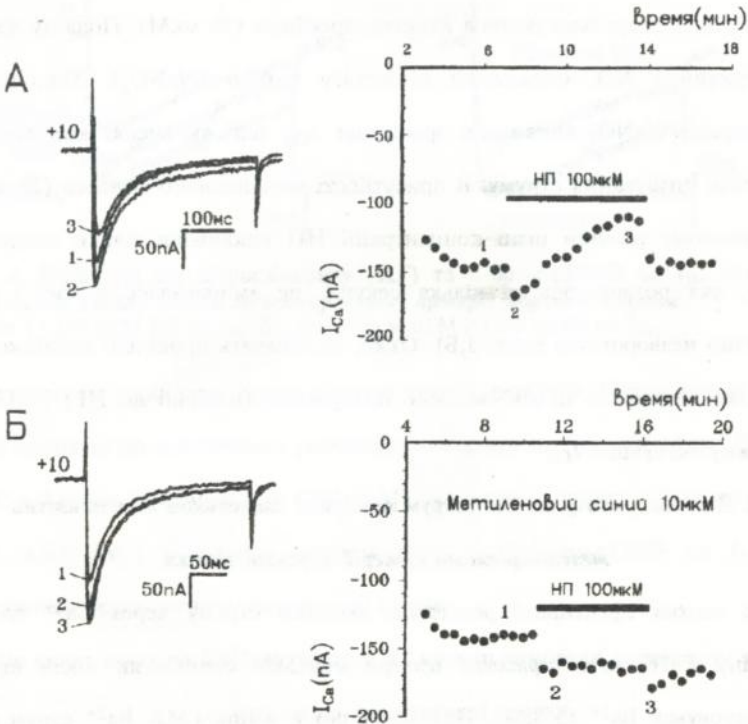


Рис. 3. Дія нітропрусида натрію (НП) на I_{Ca} мембрани гладеньком'язових клітин *taenia coli* морської свинки:

Зміна з часом амплітуди I_{Ca} при дії НП (100 мкМ) (А) і при дії НП (100 мкМ) в присутності метиленового синього (10 мкМ) в піпеточному розчині (Б).

В роботі було досліджено дію іншого донора NO, нітропрусиду натрію (НП), який спонтанно виділяє NO в зовнішній розчин. Встановлено, що низькі концентрації НП (1-10 мкМ) спричиняли зростання амплітуди I_{Ca} , яке суттєво зменшувалося з часом. Розрахунки показали, що НП (10 мкМ) збільшував I_{Ca} на 22% на 1 хв. після додавання його до розчину, тоді як ефект на 5 хв. складав тільки 4%. Високі концентрації НП (100-1000 мкМ) обумовлювали поступово зростаюче інгібування I_{Ca} (мал. 3,А). НП (1000 мкМ) викликав інгібування I_{Ca} на 27% на 5 хв. після додавання його до розчину.

Обидва ефекти НП на I_{Ca} були пов'язані з позаклітинною продукцією NO, оскільки вони блокувалися оксигемоглобіном (50 мкМ). Подібну дію на I_{Ca} спричиняв NO, отриманий із нітриту натрію (NaNO_2). Так, низькі концентрації NaNO_2 викликали зростання I_{Ca} , тоді як високі концентрації викликали інгібування струму. В присутності метиленового синього (20 мкМ) в піпеточному розчині різні концентрації НП викликали тільки активацію струму, яка розвивалась за кілька секунд, не змінювалась в часі і була практично незворотною (мал. 3,Б). Отже, як свідчать проведені дослідження, НП може викликати цГМФ-залежне інгібування (подібно до НГ) і цГМФ-незалежну активацію I_{Ca} .

2. Дія окису азоту на Ca^{2+} струм мембрани гладеньком'язових клітин мезентеріальної артерії морської свинки

З метою ефективної реєстрації вхідного струму через Ca^{2+} канали мембрани ГМК мезентеріальної артерії морської свинки як носій струму використовувався Ba^{2+} (5 мМ). Показано, що в даних ГМК Ba^{2+} струм (I_{Ba}) переноситься через L-тип Ca^{2+} каналів, високочутливих до дигідропіридинів (K_d для ніфедипіну становила 10 нМ).

Обидва донори NO (НГ і НП) спричиняли дозо-залежне інгібування I_{Ba} у більшості досліджуваних клітин. Так, НГ (100 мкМ) блокував струм на 40.4% (мал. 4, А). Інгібуючий ефект НГ і НП мав деяку потенціалзалежність, обумовлену прискоренням інактивації струму і збільшенням блокуючого ефекту при зростанні рівня деполяризації мембрани.

Дослідження можливих механізмів інгібуючої дії NO на I_{Ba} мембрани ГМК мезентеріальної артерії показало, що основним вторинним

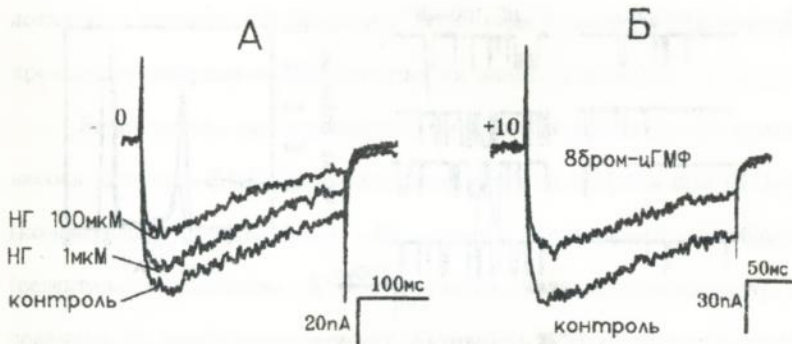


Рис. 4. Інгібуюча дія нітрогліцерину (НГ) та 8-бром-цГМФ на I_{Ba} мембрани гладеньком'язових клітин мезентеріальної артерії морської свинки: А - дія 1 і 100 мкМ НГ на I_{Ba} . Б - дія 8-бром-цГМФ (200 мкМ) на I_{Ba} .

посередником, який бере участь в цьому ефекті, є цГМФ. Метиленовий синій, який додавали до піпеточного розчину, зменшував інгібуючий ефект НГ (100 мкМ) в 5 разів. 8-бром-цГМФ (200 мкМ) викликав незворотне блокування I_{Ba} (мал. 4,Б). Як і у випадку донорів NO, дія 8-бром-цГМФ на I_{Ba} була пов'язана з прискоренням інактивації струму.

3. Дія окису азоту на Ca^{2+} -активовані K^+ канали мембрани гладеньком'язових клітин *taenia coli* морської свинки

В наступній частині роботи було досліджено дію донорів NO на K^+ канали мембрани ГМК *taenia coli* морської свинки. Як було встановлено раніше (Жолос 1986, Yamamoto 1989), в плазматичній мембрані цих клітин K^+

струм (I_K) переноситься через K^+ канали двох типів: канали затриманого випрямлення і Ca^{2+} -залежні канали.

Розділення I_K мембрани ГМК на потенціал- і Ca^{2+} -залежний можна заблокувавши I_{Ca} , і, таким чином, усунути Ca^{2+} -залежний компонент I_K . Коли Ca^{2+} канали були заблоковані Co^{2+} (3 мМ), залишався тільки I_K затриманого випрямлення. Проведені дослідження K^+ струму затриманого випрямлення виявили, що донори NO і 8-бром-цГМФ не викликали змін цього струму.

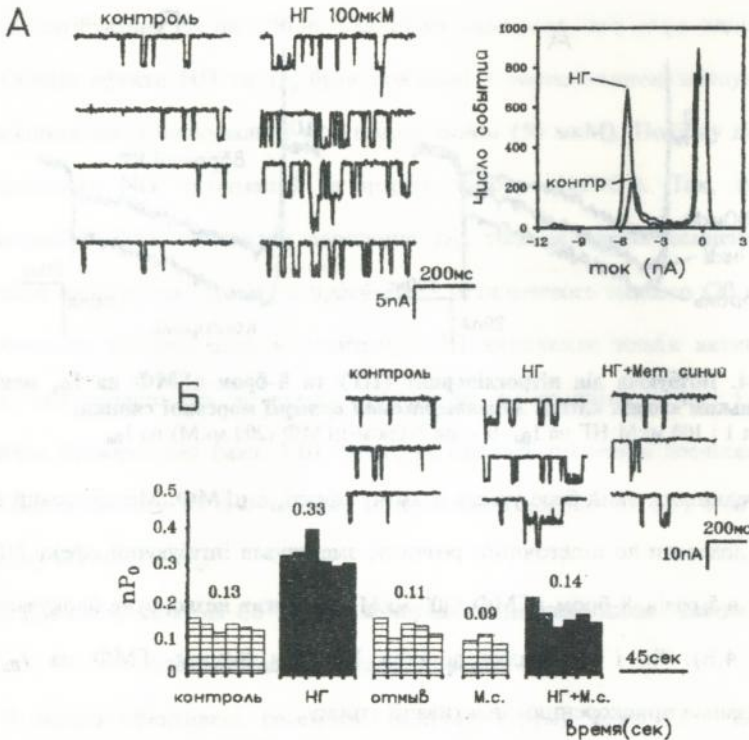


Рис. 5. Дія нітрогліцерину (НГ) на активність $K^+(Ca^{2+})$ каналів (кофігурація "cell-attached") мембрани гладеньком'язових клітин *taenia coli* морської свинки: А - зміна активності $K^+(Ca^{2+})$ каналів при дії НГ (100 мкМ) (потенціал фіксації -40 мВ) і амплітудні гістограми струму $K^+(Ca^{2+})$ каналу в контролі і дії НГ (100 мкМ). Б - зміна активності $K^+(Ca^{2+})$ каналів при дії НГ (100 мкМ) при наявності метиленового синього (10 мкМ) та зміна з часом ймовірності відкритого стану (pO) $K^+(Ca^{2+})$ каналу.

Дослідження дії NO на вихідний Ca^{2+} -залежний K^+ струм проводились на рівні поодиноких Ca^{2+} -залежних K^+ ($\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$) каналів. Є дві обставини, що примушують проводити ці дослідження на рівні поодиноких іонних каналів. По-перше, на рівні макрострумів не можна в ізольованому вигляді досліджувати Ca^{2+} -залежний I_K , оскільки його кінетика і амплітуда залежать від I_{Ca} , тобто від кількості іонів Ca^{2+} , що входять до клітини і активують відповідні K^+ канали. По-друге, тільки дослідження поодиноких каналів дозволяє з'ясувати, які біофізичні параметри каналу (час відкритого стану, провідність) змінюються під дією того чи іншого чинника.

Встановлено, що в мембрані ГМК *taenia coli* морської свинки існує висока щільність $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналів з провідністю 125 пСм при $[\text{K}^+]_o/[\text{K}^+]_i=14$ (конфігурація "outside-out"). Ці канали блокувалися карібдотоксином (селективний блокатор $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналів великої провідності) і ТЕА, доданими до зовнішнього розчину. Активність $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналів зростала при збільшенні мембранного потенціалу і $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

В конфігурації "cell-attached" обидва донори NO (НГ і НІІ) спричиняли збільшення активності $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ каналів в умовах відсутності входу Ca^{2+} через клітинну мембрану або його звільнення з внутрішньоклітинних депо. Дія NO була пов'язана із збільшенням імовірності (nP_o) і середнього часу (τ_o) відкритого стану $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ каналу. При цьому NO не змінював амплітуду струму поодинокого каналу. Так, НГ (100 мкМ) спричиняв збільшення nP_o в 2.6 рази і τ_o в 2.3 рази при потенціалі фіксації -40 мВ (мал. 5).

В роботі було встановлено, що стимулююча дія NO на активність $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ каналів обумовлена завдяки активації гуанілатциклази. В присутності метиленового синього (10 мкМ) в зовнішньому розчині, ефект 100 мкМ НГ зменшувався в 2.2 рази (мал. 5,Б). 8-бром-цГМФ, подібно донорам

NO, виявляв стимулюючу дію на активність $K^+(Ca^{2+})$ каналів. 1 мМ 8-бром-цГМФ збільшував nP_o в 3 рази і τ_o в 2.5 рази, не змінюючи амплітуду струму через поодинокий канал.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Дія окису азоту на Ca^{2+} струм мембрани гладеньком'язових клітин

В поданій роботі були проведені дослідження дії NO на високопороговий I_{Ca} L-типу Ca^{2+} каналів мембрани ГМК, виділених з *taenia coli* і мезентеріальної артерії морської свинки.

Як донор NO використовувався відомий вазодилатор нітрогліцерин (НГ). Відомо що, процес утворення NO із НГ відбувається при дії специфічних ферментів (глутатіон S-трансферази, цитохрома P₄₅₀) усередині клітини (Gerland 1991, Bennett 1994). Нами виявлено, що НГ спричиняє зворотне дозо-залежне інгібування високопорогового I_{Ca} в ГМК *taenia coli* морської свинки. Зменшення I_{Ca} при дії НГ не було потенціалзалежним, а також воно не пов'язане з процесом Ca^{2+} -залежної інактивації Ca^{2+} струму. На рівні аналізу активності поодиноких Ca^{2+} каналів було встановлено, що виявлене зменшення амплітуди Ca^{2+} макроструму під дією НГ зумовлено зниженням частоти відкривання Ca^{2+} каналів L-типу, а не зменшенням амплітуди струму, що проходить через цей канал.

За класичною схемою, дію NO на різні ГМК пояснюють через збільшення рівня цГМФ завдяки активації цитоплазматичної гуанілатциклази (Raroport 1983, Murad 1986, Moncada 1991). В нашому випадку, виявлене в експерименті зменшення амплітуди I_{Ca} під дією НГ було обумовлене активацією цГМФ-шляху. Цей висновок впливає з таких фактів: 1) ефект НГ інгібувався метиленовим синім, блокатором гуанілатциклази; 2) мембранопроникні аналоги цГМФ (дібутирил- і 8-бром-цГМФ) спричиняли

подібне інгібування I_{Ca} ; 3) НГ не спричиняв суттєвого блокування I_{Ca} на фоні дії 8-бром-цГМФ.

Відомо, що кінцевим етапом гуанілатциклазного шляху є активація цГМФ-залежної протеїнкінази, яка, мабуть, і діє на воротний механізм Ca^{2+} каналу, пригнічуючи його. Експерименти з використанням Н-8, блокатора протеїнкінази, показали, що інгібування I_{Ca} при дії НГ дійсно пов'язане з активацією цГМФ-залежної протеїнкінази. Важливо відмітити, що блокатори протеїнкіназ Н-8, Н-7 та стауросоприн приводили до інгібування I_{Ca} . Як відомо, ці сполуки можуть блокувати активність протеїнкіназ циклічних нуклеотидів та протеїнкінази С. Можна припустити, що в ГМК *taenia coli* морської свинки наявна базальна активність протеїнкіназ (цАМФ-залежної і/або протеїнкінази С), яка обумовлює збільшення активності Ca^{2+} каналу.

Отримані результати свідчать, що активація цГМФ-залежної протеїнкінази спричиняє пригнічення активності L-типу Ca^{2+} каналів мембрани ГМК *taenia coli* морської свинки. Очевидно, цей механізм лежить в основі NO-залежного інгібування скорочення гладеньких м'язів. Проте до сьогодні не ідентифіковано ділянку Ca^{2+} -каналу, яка зазнає фосфорилювання цГМФ-залежною протеїнкіназою. Можна також припустити, що дія цГМФ-залежної протеїнкінази пов'язана з активацією фосфатази і наступним дефосфорилюванням каналу, що спричиняє інгібування I_{Ca} .

В наших дослідженнях інший донор NO, нітропрурид натрію (НП), спричиняв два різнонаправлені ефекти на I_{Ca} . Один із цих ефектів ми віднесли до цГМФ-залежного інгібування I_{Ca} , механізм якого подібний до дії НГ та аналогів цГМФ на I_{Ca} . Інший ефект НП - збільшення I_{Ca} , яке незалежало від активності гуанілатциклази. Відмінності в дії НГ і НП на I_{Ca} можна пояснити різними механізмами виділення NO з цих сполук. Використання

оксигемоглобіну, який зв'язує NO, показало, що обидва ефекти НП на I_{Ca} обумовлені виділенням NO в зовнішній розчин. Нами зроблено припущення, що у випадку НП дія NO може проявлятися як із зовнішнього боку мембрани (пряма дія на Ca^{2+} канал), так і внутрішньоклітинно через активацію цГМФ-залежної протеїнкінази.

Не зовсім зрозуміле фізіологічне значення стимулюючого ефекту NO на I_{Ca} , хоч добре відомо, що НП і NO викликають розслаблення різних гладеньких м'язів. Ми вважаємо, що в гладеньких м'язах розслаблююча дія NO завдяки активації цГМФ-процесів є домінуючою, а незначне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ в примембранній ділянці, за рахунок збільшення I_{Ca} , буде швидко ліквідоване Ca^{2+} -депо і тому не буде впливати на скоротливий апарат м'язу. Проте останній ефект може бути корисним для активації різних Ca^{2+} -залежних каналів (K^+ - і Cl^- - каналів).

На відміну від клітин *taenia coli* в ГМК мезентеріальної артерії морської свинки, донори NO (НГ і НП) викликали тільки інгібування I_{Ba} . Цей ефект був пов'язаний з активацією гуанілатциклази і збільшенням рівня цГМФ. Крім того, в ГМК мезентеріальної артерії ефект донорів NO і 8-бром-цГМФ виявляв деяку залежність від мембранного потенціалу, обумовлену прискоренням інактивації струму і збільшенням інгібуючого ефекту при зростанні рівня деполяризації мембрани. Ці результати добре узгоджуються із даними авторів (Clapp 1991, Ishikawa 1993, Blatter 1994), які вивчали дію NO і цГМФ на Ca^{2+} канали ГМК судин. Можливо, що дія NO, яка пов'язана з цГМФ-залежним інгібуванням входу Ca^{2+} через Ca^{2+} канали, є загальним механізмом пригнічення скорочення гладеньких м'язів, викликаного деполяризацією клітинної мембрани.

2. Дія окису азоту на K^+ канали мембрани гладеньком'язових клітин

Заслугує на увагу дослідження дії NO на K^+ канали мембрани ГМК. І це тим більше, що, як засвідчують літературні дані (Fujino 1991, Tornbury 1991, Garland 1992, Robertson 1993, Murphy 1995), в дію NO на гладенькі м'язи можуть втягуватись як Ca^{2+} -залежні, (високо- або низько- провідні), так і АТФ-залежні K^+ канали. Більше того, складається враження про те, що тип K^+ каналів, що втягуються в дію NO, може мати тканинну і навіть видову специфічність. В усякому разі, модулювання цих каналів NO обов'язково супроводжується зміною збудливості цих клітин. Дійсно, NO, що виділяється з нервових закінчень, викликає в ГМК кишечника "синаптичну" гіперполяризацію, під час якої збудливість гладеньких м'язів пригнічується. Зокрема, згідно нашим дослідям в *taenia coli* морської свинки стимуляція певного класу периферичних (неадренергічних) нейронів спричиняє генерування двохфазного гальмівного постсинаптичного потенціалу, повільний компонент якого блокується інгібітором синтезу NO - L-NMMA (Загороднюк 1994).

В даній роботі, використовуючи метод фіксації потенціалу, ми досліджували дію донорів NO на K^+ канали мембрани ГМК *taenia coli* морської свинки. Показано, що в цих клітинах є два типи K^+ каналів: канали затриманого випрямлення і Ca^{2+} -залежні канали. Як показали наші дослідження, тільки Ca^{2+} -залежні K^+ ($(K^+(Ca^{2+}))$) канали великої провідності втягуються в дію NO на ГМК.

$K^+(Ca^{2+})$ канали великої провідності ідентифіковані в багатьох типах гладеньких м'язів. Вони активуються завдяки зростанню $[Ca^{2+}]_i$ і таким чином вони виконують роль "від'ємного зворотнього зв'язку", який контролює мембранний потенціал при збудженні клітини. В ГМК *taenia coli* морської

свинки присутні $K^+(Ca^{2+})$ канали великої провідності (125 пСм), які чутливі до карібдотоксину і TEA.

В даних дослідженнях донорами NO були вищезгадані нітрогліцерин та нітроприсид натрію. При дії цих сполук на ГМК *taenia coli* морської свинки імовірність відкритого стану (P_0) $K^+(Ca^{2+})$ каналів зростала в 3 рази, а середній час відкритого стану (τ_0) каналів збільшувався в 2-3 рази. В той же час амплітуда іонного струму каналу не змінювалась. Слід зазначити, що цей ефект NO не вимагав вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо і входу до ГМК Ca^{2+} через Ca^{2+} канали з позаклітинного середовища. Метиленовий синій, блокатор гуанілатциклази, перешкодив зміні згаданих біофізичних параметрів (P_0 , τ_0) $K^+(Ca^{2+})$ каналів, що говорить про участь в цьому ефекті цГМФ-залежних механізмів. Припускається, що стимулююча дія NO на $K^+(Ca^{2+})$ канали пов'язана з активацією цГМФ-залежної протеїнкінази і наступним фосфорилуванням каналу. Справді, мембранопроникний аналог цГМФ, 8-борм-цГМФ, викликав такі ж зміни в параметрах досліджуваних K^+ каналів, як і донори NO.

З функціональної точки зору викликані зміни біофізичних параметрів (P_0 , τ_0) $K^+(Ca^{2+})$ каналів великої провідності під впливом NO мають істотне значення, бо в розглянутих умовах вони неодмінно приведуть до гіперполяризації мембрани ГМК і як наслідок цього - до пригнічення збудливості, а отже і до зменшення входу іонів Ca^{2+} до м'язових клітин, що беруть участь в активації скорочення. Поруч з цим, виявлена в цих дослідженнях блокуюча дія NO на Ca^{2+} канали L-типу, тільки посилюватиме пригнічуючу дію NO на скоротливий процес.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою методу фіксації потенціалу ("patch-clamp") досліджувалась дія NO, який вивільняється з нітрогліцерину та нітропрусида натрію, на Ca^{2+} - та K^{+} -канали електрозбудливої мембрани ГМК *taenia coli* і мезентеріальної артерії морської свинки.
2. NO, що вивільнюється з нітрогліцерину внутрішньоклітинно, спричиняв оборотне дозо-залежне інгібування Ca^{2+} струму L-типу Ca^{2+} каналів. Зменшення Ca^{2+} струму при дії NO не було потенціалзалежним, а також воно не пов'язане з процесом Ca^{2+} -залежної інактивації Ca^{2+} струму.
3. Встановлено, що інгібуюча дія NO на Ca^{2+} струм обумовлена активацією такого внутрішньоклітинного шляху: NO \rightarrow гуанілатциклаза \rightarrow цГМФ \rightarrow цГМФ-залежна протеїнкіназа \rightarrow Ca^{2+} канал L-типу.
4. В гладеньком'язових клітинах *taenia coli* морської свинки виявлено базальну активність протеїнкіназ (цАМФ-залежної і/або протеїнкінази C), яка спричиняє зростання активності Ca^{2+} каналу.
5. Виявлено, що NO вивільнюваний в позаклітинне середовище (донор NO нітропрусид натрію), в залежності від концентрації викликає цГМФ-залежне інгібування або цГМФ-незалежну активацію Ca^{2+} струму L-типу Ca^{2+} каналів мембрани ГМК *taenia coli* морської свинки.
6. Показано, що NO вивільнюваний з обидвох донорів викликав тільки цГМФ-залежне інгібування високопорогового Ca^{2+} струму L-типу Ca^{2+} каналів мембрани ГМК мезентеріальної артерії морської свинки.
7. Використовуючи метод фіксації потенціалу в конфігураціях "cell-attached", "outside-out" і "inside out", показано, що в гладеньком'язових клітинах *taenia coli* морської свинки містяться Ca^{2+} -залежні K^{+} канали великої провідності (125 пСм), які чутливі до карібдотоксину.

8. NO, що вивільняється з нітрогліцерину та нітропрусиду натрію, спричиняв цГМФ-залежне збільшення активності Ca^{2+} -залежних K^+ каналів. Цей ефект NO не вимагав вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо і входу Ca^{2+} через Ca^{2+} канали з позаклітинного середовища.

9. В природних умовах NO може здійснювати пригнічення скорочення гладеньких м'язів, яке було викликане деполяризацією клітинної мембрани, завдяки інгібуванню входу Ca^{2+} через L-тип Ca^{2+} каналів, а також може викликати гіперполяризацію мембрани внаслідок активації Ca^{2+} каналів великої провідності.

Перелік робіт, опублікованих за матеріалами дисертації.

- 1) Загороднюк В.П., **Зима А.В.**, Владимірова І.А., Шуба М.Ф. / Механізм дії NO як нехолергического тормозящего медиатора в гладкомышечных клетках желудочно-кишечного тракта морской свинки. // *Нейрофизиология/Neurophysiology*, (1994) т.26, N 2, с.с. 108-114.
- 2) **Зима А.В.**, Белевич А.Э., Цугорка А.М., Шуба М.Ф. / Угнетающее действие нитроглицерина на потенциалактивируемый кальциевый ток изолированных гладкомышечных клеток кишечника// *Нейрофизиология/Neurophysiology*, (1994) т.26, N 3, с.с. 218-222.
- 3) **Зима А.**, Белевич А., Цищора Я., Шуба М./ Действие окиси азота на Ca^{2+} - и Ca^{2+} -активируемые K^{+} - каналы в гладкомышечных клетках *taenia coli* морской свинки.// *Физика живого*, (1996), т.4, N 1, с.с. 67-72.
- 4) **Zima A.V.**, Belevich A.E. and Shuba M.F. / Modulatory action of glyceryl trinitrate and sodium nitroprusside on potential-operated calcium channels in smooth muscle cells. // *Canad.J.Physiol and Pharmacol.*, (1994) v.72, suppl.1, p.580.
- 5) Belevich A., **Zima A.** and Shuba M. / Augmentation of potential-activated calcium current by GTP γ S-activated G proteins in taenia coli smooth muscle cells. // *J.Physiol.(London)*, (1995) v.487, p.198P.
- 6) Belevich A., **Zima A.** and Shuba M.F. / The mechanism of modulatory action of nitrocompounds on calcium activated K^{+} channels of taenia coli smooth muscle cells. // *Pflugers Arch.*, (1995) v.430, No.4, p.R28.
- 7) **Zima A.V.** & Shuba M.F. / Action of nitric oxide on calcium current in non-vascular smooth muscle cells. // *Biophysical J.*, (1996) v.70, No.2, p.A320.
- 8) M.F. Shuba, A.E. Belevich, A.V. Gurkovskaya, **A.V. Zima.** / Membrane and intracellular mechanisms of nitric oxide relaxing action on vascular smooth muscle. // *J.Vascular Research*, (1996) v.33, S2, p. 46.

Zima A.V. The mechanism of nitric oxide action on calcium and potassium channels in the membrane of smooth muscle cells. The dissertation (manuscript) is presented in accordance with requirements for the degree of candidate of biological sciences in speciality 03.00.05. - Biophysics, A.A.Bogomoletz Institute of Physiology. National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1996.

The action of nitric oxide (NO) on Ca^{2+} and K^{+} channels in smooth muscle cells (SMCs) isolated from guinea-pig *taenia coli* and *mesenteric artery* has been studied using the patch-clamp method. In *taenia coli* SMCs nitroglycerin (NG) reduced L-type Ca^{2+} -channel current (I_{Ca}) in a concentration-dependent manner (IC_{50} 1 μM) without significant altering voltage-dependence of current-voltage relationship and steady-state inactivation. Inhibitory action of NG on I_{Ca} was shown to be mediated by an increase in cGMP level and activation cGMP-dependent protein kinase. Sodium nitroprusside (SNP) (1-10 μM) caused cGMP-independent increase of I_{Ca} , while high concentrations (100-1000 μM) reduced current via cGMP-dependent pathway. SNP was not effective in presence of scavenger NO, oxyhemoglobin. NO, released from NaNO_2 , mimicked the effects of SNP on I_{Ca} . In contrast, in SMCs from guinea-pig *mesenteric artery* both NO donors (NG and SNP) evoked only cGMP-dependent inhibition of high-threshold I_{Ca} . The cell-attached configuration of patch-clamp method was used to study the action of NO on high-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} ($\text{K}^{+}(\text{Ca}^{2+})$) channels in SMCs isolated from guinea-pig *taenia coli*. Both SNP and NG increased activity of $\text{K}^{+}(\text{Ca}^{2+})$ channels in Ca-independent manner. Methylene blue partly blocked and 8-bromo-cGMP mimicked stimulatory action of NG and SNP on $\text{K}^{+}(\text{Ca}^{2+})$ channels.

Зима А.В. Механизм действия окиси азота на кальциевые и калиевые каналы электровозбудимой мембраны гладкомышечных клеток. Диссертация (рукопись) на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.05. - Биофизика, Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, Киев, 1996.

Методом фиксации потенциала ("patch-clamp") исследовалось действие доноров окиси азота (NO) на активность Ca^{2+} - и K^{+} -каналов в изолированных гладкомышечных клетках (ГМК) *taenia coli* и *мезентериальной артерии* морской свинки. В ГМК *taenia coli* морской свинки нитроглицерин (НГ) вызывал дозозависимое ингибирование высокопорогового Ca^{2+} тока (I_{Ca}) с IC_{50} 1 мкМ. Действие НГ не было потенциалзависимым, а также не было связано с Ca^{2+} -зависимой инактивацией I_{Ca} . Ингибирующий эффект НГ на I_{Ca} был связан с увеличением продукции цГМФ и последующей активацией цГМФ-зависимой протеинкиназы. Низкие концентрации нитропруссид натрия (НП) (1-10 мкМ) вызывали цГМФ-независимую активацию I_{Ca} , тогда как большие концентрации (100-1000 мкМ) приводили к ингибированию тока посредством цГМФ-зависимого пути. НП не вызывал изменений I_{Ca} в присутствии оксигемоглобина, вещества связывающего NO. NO полученный из NaNO_2 вызывал сходное изменение I_{Ca} , что НП. В отличие от ГМК *taenia coli* морской свинки в клетках *мезентериальной артерии* оба донора NO вызывали только цГМФ-зависимое ингибирование высокопорогового I_{Ca} . Используя конфигурацию "cell-attached" метода "patch-clamp" исследовалось действие NO на Ca^{2+} -активируемые K^{+} ($\text{K}^{+}(\text{Ca}^{2+})$) каналы большой проводимости в ГМК *taenia coli* морской свинки. НГ и НП приводили к увеличению активности $\text{K}^{+}(\text{Ca}^{2+})$ каналов в условиях отсутствия входа Ca^{2+} через Ca^{2+} каналы и его высвобождения из внутриклеточных депо. Активирующее действие доноров NO на $\text{K}^{+}(\text{Ca}^{2+})$ каналы блокировалось метиленовым синим. 8-бром-цГМФ вызывал сходное увеличение активности $\text{K}^{+}(\text{Ca}^{2+})$ каналов.

Ключові слова: метод фіксації потенціалу (patch-clamp), гладеньком'язові клітини, *taenia coli*, мезентеріальна артерія, окис азоту, нитрогліцерин, нитропруссид натрію, цГМФ, Ca^{2+} -струм, Ca^{2+} -активовані K^{+} -канали.

Підп. до друку 23.10.96
Формат 60x84 1/16. Друк офс.
Папір. офс. Умовн. друк. арк. 1,4.
Обл. -вид. арк. 1,6. Тираж 100.
Зам. 142.

Видавництво "Логос"
Київ, вул. Б. Хмельницького, 19

444485

48.55.889
AV 35.889