

Д. С. Зеленський¹, В. М. Бондар², О. І. Жуковский²,
В. І. Поляков², А. І. Соловійов¹

Вплив діізопропілфосфат-олігоетиленгліколя таурохолевої кислоти на скорочення ізольованих фрагментів аорти щурів та внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+}

¹ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

²Міжнародний благодійний фонд «Київська Русь», м. Київ

Ключові слова: діізопропілфосфат-олігоетиленгліколь таурохолева кислота, Ca^{2+} , гладенькі м'язи судин, ендотелій

Дослідження полягало у вивченні внутрішньоклітинних механізмів дії діізопропілфосфат-олігоетиленгліколя таурохолевої кислоти (ДПОГТК), основної діючої речовини лабораторного зразка геропротекторного препарату «ОРІОН» [1]. Вплив цієї речовини на функціональний стан ефекторних елементів серцево-судинної системи не відомий. Це є серйозною прогалиною в доклінічному вивченні препарату, тому що саме хронічні захворювання серцево-судинної системи є основним чинником зменшення тривалості життя.

Особливий інтерес до жирних кислот (ЖК), представником яких є ДПОГТК, пов'язаний з дослідженнями останніх років, що показали наявність специфічних ядерних рецепторів BAR (bile acid receptor) відомих під назвою FXR або NR1H4 [2]. З функціональної точки зору існують дані, що активація цих рецепторів у гладеньком'язових клітинах (ГМК) може індукувати апоптоз клітин шляхом експресії цільових генів FXR – SHP (small heterodimeric partner) та PLTP (phospholipids transfer protein) [3]. Окрім того, відомі дані щодо релаксуючого ефекту таурохолату натрію на гладенькі м'язи (ГМ) [4, 5].

У дослідженнях 2008 року [6] було також показано, що FXR відіграють безпосередню роль у регуляції тонуус судин за рахунок активації промотора ендотеліальної NO-синтази, що призво-

дить до посилення синтезу NO в ендотеліальних клітинах судин.

Крім ядерних рецепторів, ідентифіковані рецептори плазматичної мембрани – серпентини (рецептори, супражені з G-білком), що взаємодіють з ЖК [6] (TGR5/Gbar1). Дія ЖК на клітини призводить до експресії цих рецепторів, синтезу цАМФ, активації MAP-кіназного сигнального шляху та інтерналізації останніх [7].

Останні дослідження [8] демонструють важливу роль ЖК у внутрішньоклітинній регуляції обміну жирів, вуглеводів, активації рецепторів, сполучених з G-білками. У той самий час відсутні дані щодо впливу ДПОГТК на тонус судин та Ca^{2+} -транзйенти в ГМК.

Мета дослідження – вивчення змін внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} та скоротливої активності кровоносних судин під впливом ДПОГТК.

Відомо, що скоротлива активність ГМК регулюється внутрішньоклітинним кальцієм. Тому досліджували взаємозв'язок між індукованими ДПОГТК змінами тонуусу та концентрацією внутрішньоклітинного кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) у судинній стінці. У з'ясуванні клітинних механізмів дії препарату «ОРІОН» є важливим дослідження взаємозв'язку індукованих змін тонуусу ГМК та концентрації $[Ca^{2+}]_i$.

Матеріали та методи. Для дослідів були використані сегменти грудного відділу аорти дорослих щурів-самців лінії Вістар-Кіото масою (210 ± 30) г. Усі процедури зі щурами проводили з використанням рекомендацій Європейської конвенції щодо захисту тварин,

що використовуються в експериментальних та інших цілях. Судини зовні ретельно вичищали від сполучної тканини та розрізали на кільця завширшки близько 2 мм. Усі процедури з судинами проводили за кімнатної температури в розчині Кребса, що мав наступний склад (ммоль/л): NaCl 122, KCl 4,7, NaHCO₃ 15,5, KH₂PO₄ 1,2, CaCl₂ 2,5, MgCl₂ 1,2 та глюкоза 11,5, рН 7,3-7,4. Досліди проводили з інтактними та деендотелізованими кільцями судин. Після препарування сегменти судин вивертали шаром ендотелію назовні. У разі необхідності з них видаляли шар ендотелію механічним способом за допомогою фільтрувального паперу. Належне видалення ендотелію перевіряли під мікроскопом та за відсутністю реакції на ацетилхолін. Аналізували одночасні зміни [Ca²⁺]_i та вазорелаксаційного відгуку, що виникають у ГМ, попередньо скорочених деполаризуючим гіперкалієвим розчином K⁺ (60 ммоль/л) або активацією адренорецепторів ГМ фенілефрином (10⁻⁶ моль/л).

Досліди виконували в камері об'ємом 300 мкл, установлений на предметний стіл флуоресцентного мікроскопа ЛЮАМ-И2 (С.-Петербург, Росія), що входить до складу експериментальної установки [9-12]. Уміст [Ca²⁺]_i вимірювали з використанням флуоресцентного кальцієвого індикатора Fura-2 [13]. Завантаження барвником кілець аорти здійснювали при кімнатній температурі в захищеному від світла місці впродовж 4 год. Сегменти судин поміщали в завантажувальний розчин наступного складу: Fura-2AM 10 мкмоль/л; DMSO 2,5 % (за об'ємом); Pluronic F-127 0,5 % (за масою); розчин Кребса 95 % (за об'ємом) рН – 7,35. Після завантаження всі зразки сегментів судин переносили у ванночку з розчином Кребсу, де вони залишались протягом не менше 30 хв. Препарат судин фіксували на гачках датчика скорочень у робочій камері за температури розчину 36 °С під навантаженням (10-15) мН. Під час експерименту всі розчини подавали до камери зі швидкістю 1 мл/хв (перистальтичний насос Masterflex). Результати вимірювань

[Ca²⁺]_i представлені як відношення ($R = I_{340nm} / I_{380nm}$) інтенсивності флуоресцентних сигналів (I) при 340 та 380 нм, за вирахуванням значення фонові флуоресценції згідно з методикою [9, 14, 15]. Для цього наприкінці експерименту для гасіння флуоресценції барвника застосовували розчин Кребса з Mn²⁺ (20 ммоль/л).

Усі неорганічні сполуки одержували від Sigma Chemical Co. (США), Fura-2 AM – від Molecular Probes, Inc. (США).

Усі дані наведено у вигляді середнього арифметичного ± помилка середнього арифметичного. Порівняння отриманих величин проводили за методом Стьюдента для непарних вимірів. Розходження вважали статистично достовірними, якщо величина р була менше 0,05. Усі статистичні розрахунки проводили на персональному комп'ютері з використанням програм OriginPro 7.0.

Результати та їх обговорення. Для дослідження взаємозв'язку кальцієвого метаболізму та скоротливої активності ГМК під впливом ДПОГТК (у концентраціях від 10⁻⁴ до 10⁻⁶ моль/л) одночасно вимірювали силу скорочення та [Ca²⁺]_i. Відомо, що скорочення ГМ за фізіологічних умов розвивається за рахунок дії фізичних (тиск, температура) факторів і\або зв'язування екзо- та ендогенних речовин з їхніми специфічними рецепторами, що в результаті призводить до збільшення [Ca²⁺]_i та ініціації скорочення. Сила скорочення ГМ за умов *in vitro* залежить від базального стану та шляхів попередньої активації ГМК [16]. Тому принципово було дослідити дію препарату за різних способів активації судин та оцінити вплив ДПОГТК на базальний рівень [Ca²⁺]_i та тонус ГМК.

На рисунку 1 наведено оригінальний запис впливу ДПОГТК на базальний тонус сегмента грудного відділу аорти щура та [Ca²⁺]_i у ГМК. Додавання ДПОГТК у концентрації 10⁻⁴ моль/л призводило до стійкої констрикції на фоні транзиторного збільшення [Ca²⁺]_i.

Традиційно вважається, що сила скорочення ГМК має корелювати з величиною [Ca²⁺]_i. У той самий час отримані дані свідчать про те, що ДПОГТК викликала констрикцію ГМ

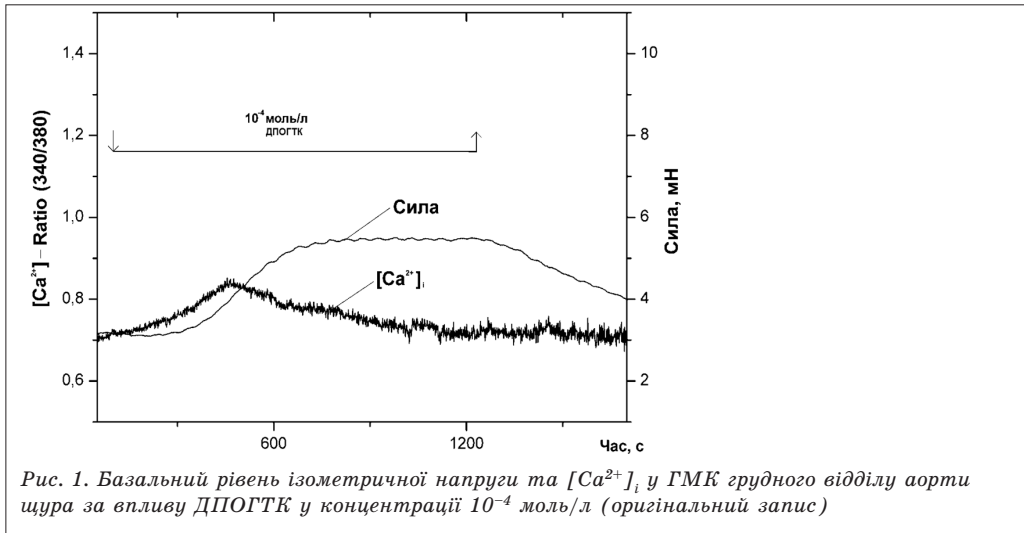


Рис. 1. Базальний рівень ізометричної напруги та $[Ca^{2+}]_i$ у ГМК грудного відділу аорти щура за впливу ДПОГТК у концентрації 10^{-4} моль/л (оригінальний запис)

за рахунок підвищення $[Ca^{2+}]_i$ лише на першій фазі скорочення. Після досягнення максимального значення $[Ca^{2+}]_i$ концентрація кальцію починала зменшуватися до вихідного базального значення, у той час як ізометрична напруга ГМ збільшувалася до свого сталого значення ($2,7 \pm 0,8$ мН, $n = 5$). Це свідчить про збільшення чутливості скоротливого апарату ГМК аорти щурів до іонів кальцію на фоні дії ДПОГТК.

Таким чином, отримані дані дозволяють припустити, що ДПОГТК у концентрації 10^{-4} моль/л викликає сталу констрикцію ГМК переважно за рахунок підвищення кальцієвої чутливості міофібрил.

Далі, для вивчення дії ДПОГТК на ГМК було використано два шляхи попереднього підвищення $[Ca^{2+}]_i$: використовували розчин з високим умістом K^+ (60 ммоль/л) та розчин фенілефрину (ФЕ) (10^{-6} моль/л).

На рисунку 2 наведено оригінальний запис впливу ДПОГТК на скоротливу активність та $[Ca^{2+}]_i$ у ГМК грудного відділу аорти щурів, попередньо скорочених деполяризуючим розчином K^+ . Середнє значення максимального скорочення у відповідь на дію K^+ становило $5,05 \pm 0,4$ мН.

У концентрації 10^{-6} моль/л ДПОГТК статистично достовірно не впливала на силу скорочення та $[Ca^{2+}]_i$, однак у концентрації 10^{-4} моль/л призводила до

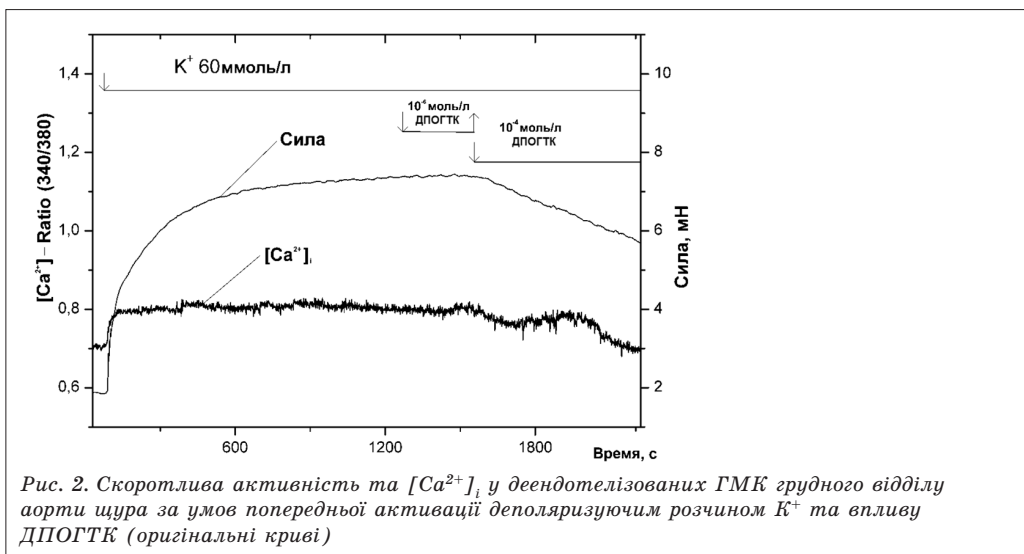


Рис. 2. Скоротлива активність та $[Ca^{2+}]_i$ у деендотелізованих ГМК грудного відділу аорти щура за умов попередньої активації деполяризуючим розчином K^+ та впливу ДПОГТК (оригінальні криві)

релаксації ГМ на $48,6 \pm 8,0$ % та $66,0 \pm 9,1$ % у деендотелізованих та інтактних судинах відповідно. При цьому спостерігалось зменшення $[Ca^{2+}]_i$ на $72 \pm 15,1$ % ($n = 5$).

Наведені дані дозволяють припустити, що ДПОГТК у концентрації 10^{-4} моль/л призводи́ла до закриття потенціал-залежних Са-каналів L-типу, що були відкриті внаслідок деполяризації мембрани розчином з високим умістом K^+ . Цей результат корелює з відомими даними про підвищення концентрації цАМФ у результаті зв'язування ДПОГТК з рецептором TGR5 [17].

На рисунку 3 відображено оригінальний запис скоротливої активності та $[Ca^{2+}]_i$ у деендотелізованих ГМК грудного відділу аорти щурів за умов попереднього скорочення ФЕ (10^{-6} моль/л) та впливу ДПОГТК. Середні значення сили скорочення на ФЕ (10^{-6} моль/л) становили $6,75 \pm 0,6$ мН.

У концентрації 10^{-4} ДПОГТК призводи́ла до релаксації ГМ на $54,5 \pm 9,0$ % та зменшення $[Ca^{2+}]_i$ до базального значення ($n = 5$). Отримані дані свідчать про те, що ДПОГТК, можливо, здатна інгібувати як Ca^{2+} -канали L-типу, так і рецептор-зв'язані Ca^{2+} -канали. У той самий час ДПОГТК у концентрації 10^{-6} моль/л не впливала на силу скорочення та $[Ca^{2+}]_i$ попередньо скорочених ГМК.

Згідно з сучасними уявленнями, одним із провідних патогенетичних

чинників серцево-судинних хвороб вважають порушення функції ендотелію [17, 18]. Ендотелій відіграє провідну роль у підтриманні нормального тону́су судин, забезпеченні локального гомеостазу та проліферації судинної стінки. Порушення балансу між вазодилататорами та вазоконстрикторами є ключовим фактором при ендотеліальній дисфункції [19]. Відомо, що зв'язування FXR з ДПОГТК призводи́ть до активації промотора NO-синтази та відповідного збільшення концентрації NO у клітинах ендотелію судин [4]. Тому важливо було виконати порівняльні дослідження щодо впливу ДПОГТК як на інтактних, так і деендотелізованих судинах.

На рисунку 4 наведено оригінальний запис впливу ДПОГТК на скоротливу активність ГМ, попередньо скорочених ФЕ (10^{-6} моль/л), та $[Ca^{2+}]_i$ в ендотеліальних клітинах грудного відділу аорти щурів. У концентрації 10^{-4} ДПОГТК призводи́ла до релаксації ГМ на $68,2 \pm 7,2$ % та збільшення на $15,0 \pm 6,6$ % загальної концентрації $[Ca^{2+}]_{ie}$ ($n=5$). Таким чином, ДПОГТК викликала ендотелій-залежне розслаблення ГМ інтактних судин грудного відділу аорти щурів, підвищуючи $[Ca^{2+}]_i$ в ендотеліальних клітинах, що призводи́ло до вивільнення NO з ендотеліоцитів та вазорелаксації ГМ. Після усунення дії ДПОГТК тону́с ГМ повертався до вихідного значення.

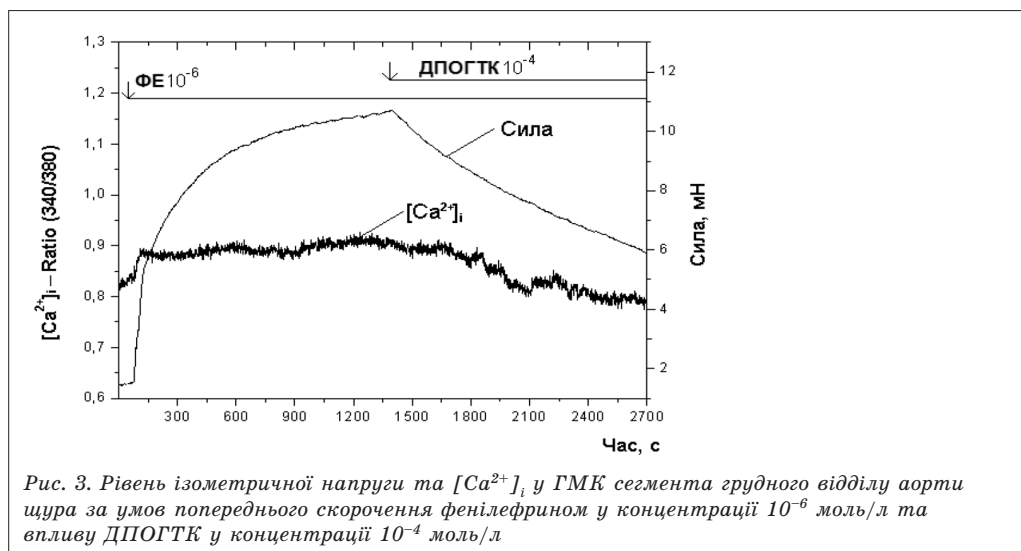


Рис. 3. Рівень ізометричної напруги та $[Ca^{2+}]_i$ у ГМК сегмента грудного відділу аорти щура за умов попереднього скорочення фенілефрином у концентрації 10^{-6} моль/л та впливу ДПОГТК у концентрації 10^{-4} моль/л

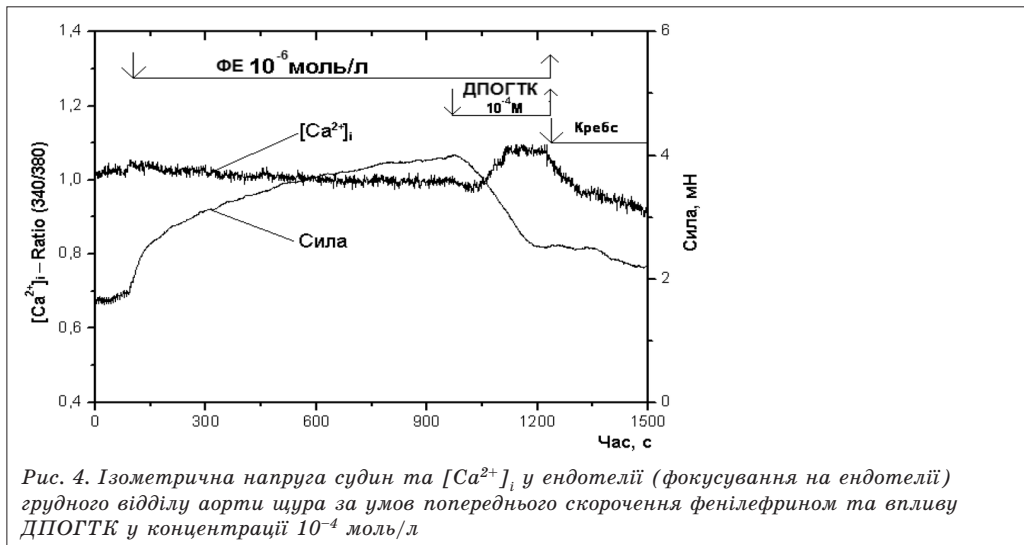


Рис. 4. Ізометрична напруга судин та $[Ca^{2+}]_i$ у ендотелії (фокусування на ендотелії) грудного відділу аорти щура за умов попереднього скорочення фенілефрином та впливу ДПОГТК у концентрації 10^{-4} моль/л

Висновки

1. У концентрації 10^{-4} моль/л ДПОГТК (діюча речовина препарату «ОРИОН») викликала констрикцію неактивованих ГМ. Констрикція неактивованих ГМ під дією ДПОГТК розвивалася на фоні підвищення кальцієвої чутливості міофібрил. У концентрації 10^{-6} моль/л ДПОГТК статистично достовірно не впливала на скоротливу активність ГМ та $[Ca^{2+}]_i$ неактивованих ГМ.

2. Ступінь вазодилатації судин щурів, попередньо активованих розчином з високим вмістом K^+ (60 ммоль/л), складав $48,6 \pm 8,0$ % та $54,5 \pm 9,0$ % для активованих розчином ФЕ (10^{-6} моль/л). Розслаблення ГМК супроводжувалося зменшенням $[Ca^{2+}]_i$ до базального рівня ($n = 5$).

3. У концентрації 10^{-4} моль/л ДПОГТК впливав на функцію ендотеліоцитів: підвищував рівень $[Ca^{2+}]_i$ в ендотелії та викликав ендотелій-залежне розслаблення.

1. Мурадян Х. К. Влияние препарата «ОРИОН» на выживаемость в стрессорных условиях и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* / Х. К. Мурадян, В. Н. Бондарь, В. В. Безруков // Журн. АМН Украины. – 2009. – Т. 16. – С. 246–262.
2. Makishima M. Identification of a nuclear receptor for bile acids / Makishima M., Okamoto A. Y., Repa J. J. // Science. – 1999. – V. 284. – P. 1362–1365.
3. Li YTY. Farnesoid X receptor ligands inhibit vascular smooth muscle cell inflammation and migration / Li YTY, Swales KE, Thomas GJ // Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio. – 2007. – V. 27. – P. 2606–2611.
4. Rask-Madsen C. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes / Rask-Madsen C, King GL. // Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. – 2007. – V. 3. – P. 46–56.
5. Romero F. Role of Na^+/Ca^{++} exchange in the relaxant effect of sodium taurocholate on the guinea-pig ileum smooth muscle / Romero F, Frediani-Neto E, Paiva TB. // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. – 1993. – V. 348. – P.325–331.
6. Li J. FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells / Li J., Wilson, A., Kuruba, // Cardiovasc. Res. – 2008. – V. 77. – P. 169–177.
7. Kawamata Y. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids / Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M. // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 9435–9440.
8. Maruyama T. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR) / Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – V. 298. – P. 714–723.
9. Lehen'kyi V. V. Ca^{2+} -sensitivity and cGMP-independent effects of NO in vascular smooth muscle / Lehen'kyi V. V., Zelensky S. N., Stefanov A. V. // Nitric Oxide. – 2005. – V. 12. – P. 105–113.
10. Lehen'kyi V. V. Effects of nitric oxide donors on vascular smooth muscles depend on a type of vascular smooth-muscle preactivation / Lehen'kyi VV, Zelensky SN, Stefanov AV. // Cardiovasc Toxicol. – 2002. – V. 2. – P. 151–160.
11. Soloviev A. Nitric oxide relaxes rat tail artery smooth muscle by cyclic GMP-independent decrease in calcium sensitivity of myofilaments / Soloviev A, Lehen'kyi V, Zelensky S. // Hellstrand P. Cell Calcium. – 2004. – V. 36. – P. 165–173.
12. Soloviev A. Ionizing radiation alters myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: potential role of protein kinase C / Soloviev A. I., Tishkin S. M., Zelensky S. N. // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. – 2005. – V. 289. – P.755–762.

13. Kawamata Y. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids / Kawamata Y., Fujii R., Hosoya M. // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 9435–9440.
14. Grynkiewicz G. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties / Grynkiewicz G., Poenie G. M., Tsien R. Y. // J. Biol. Chem. – 1985. – V. 260. – P. 3440–3450.
15. Blatter L. A. Intracellular diffusion, binding and compartmentalization of the fluorescent calcium indicators indo-1 and fura-2 / Blatter L. A., Wier W. G. // Biophys J. – 1990. – V. 58. – P. 1491–1499.
16. Baylor S. M. Measurement and interpretation of cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signals from calcium-indicator dyes / Baylor S. M., Hollingworth S. // News Physiol. Sci. – 2000. – V. 15. – P. 19–25.
17. Berridge M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms / Berridge M. J. // J. Physiol. – 2008. – V. 586. – P. 5047–5061.
18. McDaniel N. L. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and uncoupling stress from myosin phosphorylation / McDaniel N. L., Chen X. L., Singer H. A. // Am. J. Physiol. – 1992. – V. 263. – P. 461–467.
19. Su X. Cyclic nucleotides relax contractions of α -toxin permeabilized arteries without a proportional change in myosin light chain phosphorylation / Su X., Katoch S. S., Moreland R. S. // Biophys. J. – 1996. – V. 70. – P. 385–391.

Д. С. Зеленский, В. М. Бондарь, А. И. Жуковский, В. И. Поляков, А. И. Соловьев
Влияние диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты на сокращение изолированных фрагментов аорты крыс и внутриклеточную концентрацию Ca^{2+}

Известно, что Ca^{2+} -зависимые сигнальные пути играют ключевую роль в функционировании клеток. В данной работе изучали влияние диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоля таурохолевой кислоты (ДПОГТК), которая является основным действующим веществом лабораторного образца препарата «ОРИОН», на сократительную активность и внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в гладких мышцах (ГМ) аорты крыс. Полученные данные показали, что ДПОГТК в концентрации 10^{-6} моль/л статистически достоверно не влияла на сократительную активность ГМ и $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В концентрации 10^{-4} моль/л ДПОГТК вызвала констрикцию неактивированных и вазодилатацию предсокращённых сосудов крыс. Констрикция ГМ развивалась на фоне повышения чувствительности к кальцию миофибрилл и уменьшения $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Степень вазодилатации сосудов крыс, предварительно активированных раствором с высоким содержанием K^+ (60 ммоль/л), составляла $48,6 \pm 8,0$ % и $54,5 \pm 9,0$ % для гладких мышц, активированных ФЕ (10^{-6} моль/л). Расслабление ГМ сопровождалось уменьшением $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до базального уровня. В концентрации 10^{-4} моль/л лабораторный образец препарата влиял на функцию эндотелиоцитов, повышая базальный уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в эндотелиальных клетках, вызывая эндотелий-зависимое расслабление.

Ключевые слова: диизопропилфосфат-олигоэтиленгликоль таурохолевой кислоты, Ca^{2+} , гладкие мышцы сосудов, эндотелий

D. S. Zelenskiy, V. M. Bondar, O. I. Zhukovsky, V. I. Polyakov, A. I. Soloviev
Effects of taurocholic acid diisopropylphosphate oligoethyleneglycol on contractive force and calcium transients in rat thoracic aorta smooth muscle

It is known that taurocholic acid diisopropylphosphate oligoethyleneglycol (DOEGTA) possesses geroprotective properties. However, its effect on cardiovascular effectors, including vascular smooth muscles (SM) cells contractility and Ca^{2+} -signaling, till this time remains unknown. It is generally accepted that calcium homeostasis plays a crucial role in SM tone regulation. A tight control of calcium-dependent signaling pathways is required to allow the cell to function properly. Experimental design of this study comprised simultaneous recording of contractile force and intracellular calcium measurements in isolated rings of rat aorta. The effect of high (10^{-4} M) and low (10^{-6} M) concentrations of DOEGTA on SM contractility and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was studied. Low concentration of DOEGTA (10^{-6} M) was without effect on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and tension, while high-concentration (10^{-4} M) of the DOEGTA caused vasoconstriction of non-precontracted SM and vasodilatation of SM precontracted with high K^+ (60 mM) or phenylephrine (PE) (10^{-6} M) SM. It is important to note that DOEGTA-induced vasodilation accompanied by increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in endothelial cells. Sustained contraction of non-precontracted SM treated with DOEGTA (10^{-4} M) followed by transient increase in SM cytosolic Ca^{2+} only. The data obtained suggesting that DOEGTA in high concentration (10^{-4} M) can induce endothelium-dependent relaxation in preliminary activated SM, while non-preactivated SM react to DOEGTA with contraction due to an increased myofilaments Ca-sensitivity.

Key words: diisopropylphosphate oligoethyleneglycol taurocholic acid, Ca^{2+} , vascular smooth muscle, endothelium

Надійшла: 12.11.2013 р.

Контактна особа: Зеленський Дмитро Сергійович, аспірант, відділ «Експериментальної терапії», ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Ежена Потье, 14, м. Київ, 03680.
 Тел.: +38 091 333-77-99. Електронна пошта: dima.zelenskiyi@gmail.com