

Дослідження впливу форболового ефіру на стінку аорти

Важним и обязательным признаком сократительного процесса является связанное с сокращением изменение жесткости мышечной ткани. Работа посвящена изучению изменений данной характеристики механической реакции гладкомышечных тканей, вызванных действием синтетических имитаторов диацилглицерола — форболовых эфиров. В исследованиях использовался форбол-12-миристан 13-ацетат (ФМА). Показано, что сократительный ответ как на воздействие ФМА, так и на температурное воздействие не сопровождается изменением жесткости. Калиевая контрактура (ее развитие, амплитуда, релаксация) на плато индуцированный ФМА сократительного процесса полностью аналогична той, которая наблюдается при отсутствии форболового эфира. А относительно изменений жесткости — отмечается значительный ее рост. Это свидетельствует о независимости развития этих двух типов сократительных процессов. В то же время неизменность жесткости и схожие отношения оптической плотности к изменению механического напряжения в сокращениях под воздействием ФМА и температуры указывают на сходство механизмов генерирования силы в данных механохимических реакциях. Полученные результаты невозможно объяснить, исходя из общепринятой гипотезы актомиозинового взаимодействия. Сделан вывод, что форболовые эфиры при воздействии на гладкомышечную ткань активируют генерирование механического напряжения соединительнотканым матриксом.

Вступ

Останнім часом активно вивчається роль Ca^{2+} -фосфоліпідзалежної кінрази (протеїнкінази С) у регуляції скорочення гладеньких м'язів [12, 16, 17, 22]. Важливим чинником цих досліджень є використання синтетичних імітаторів діацилглицеролу — форболових ефірів, які проникають крізь мембрану гладеньком'язових клітин та активують протеїнкіназу С [3, 5, 20, 22]. Але, детальні дослідження показали, що скорочення гладеньком'язової тканини під дією діацилглицеролу та його синтетичних замінників не супроводжується змінами внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} [7, 14], а міра фосфорилювання легких ланцюгів міозину [6] не залежить від цілісності ендотелію [13]. Не дивлячись на це, автори згаданих досліджень дотримуються точки зору, що даний скорочувальний процес забезпечується актоміозиною взаємодією [5, 13, 14].

Відомо, що важливою і обов'язковою ознакою скорочувального процесу, який забезпечується актоміозиновим комплексом, є пов'язане зі скороченням зростання жорсткості м'язової тканини [4, 11, 15, 25] (з розвитком скорочувального акту розтяжність мускулатури зменшується). Це явище пояснюється збільшенням числа зачеплених із актиновими фібрилами поперечних міозинових містків під час скорочення м'язів [4, 9, 18], що зумовлює необхідність прикладання більшої сили для розтягування на задану довжину м'язової тканини. Проте на цей час ми не бачимо спроб дослідити

ці характеристики механічних реакцій гладеньком'язової тканини, викли-
каних дією форболових ефірів. У зв'язку з цим метою нашого дослідження
було вивчення перебігу змін жорсткості м'язової тканини при скороченнях,
індукованих синтетичними імітаторами діацилгліцеролу. Додатково ми
реєстрували зміни оптичної густини препаратів, що використовувалися в
дослідах.

Методика

Дослідження провадили на ізольованих смужках грудної ділянки аорти
морської свинки. Маса тварини становила близько 200 г. Препарати аорти
готувалися за загальнопринятою методикою [8].

Вирізані паралельно довгій осі судини смужки, розміром 10x1 мм,
прикріплювали в експериментальній камері одним кінцем до датчика сили
марки «Міотон-ЦА-012 МТ» (Росія), а іншим — до штоку генератора ме-
ханічних деформацій марки «Міотон-ЦА-012-ЗД» (Росія). Смужку розтя-
гували від початкової довжини $L_{\text{поч.}}$ до довжини L_0 , при якій генерувалася
максимальна сила. Довжину $L_{\text{поч.}}$ визначали згідно методики, викладеній
Pawlowski та Morgan [19], а знайдена нами довжина L_0 була аналогічна
значенню L_0 , вибраному з роботи Resnick з співавторами [21] і становила
1,4 $L_{\text{поч.}}$

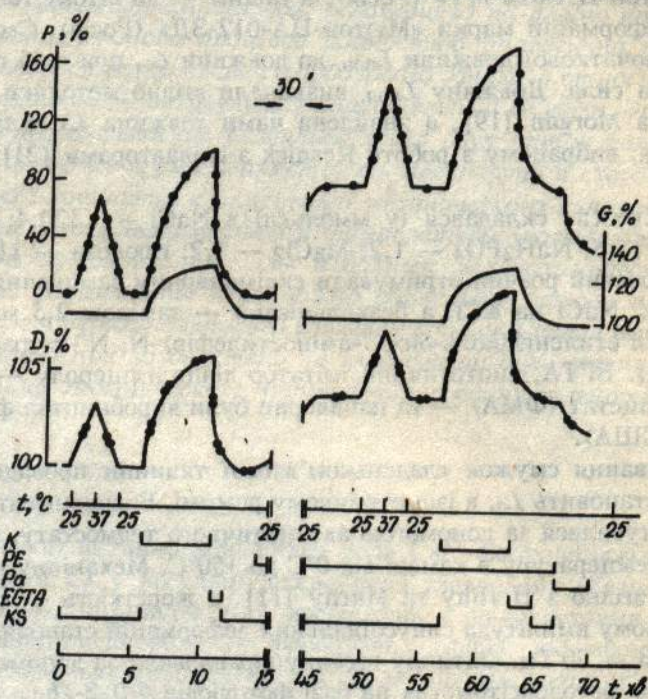
Розчин Кребса складався (у ммоль/л) з NaCl — 120,4; KCl — 5,9;
NaHCO₃ — 15,5; NaH₂PO₄ — 1,2; MgCl₂ — 1,2; глюкоза — 11,5; CaCl₂ —
2,5. Гіперкалієвий розчин отримували еквімолярним заміщенням у розчині
Кребса 75 % NaCl на KCl, а безкальцієвий — заміною 2,5 ммоль/л Ca²⁺
на 2 ммоль/л етиленгліколь-біс-(β -аміноетилефір)-N, N'-тетраоцтової кис-
лоти (ЕГТА). ЕГТА, синтетичний імітатор діацилгліцеролу — форбол-12-
мірістат 13-ацетат (ФМА) — та папаверин були виробництва фірми «Sigma
chemical» (США).

Усі тестування смужок гладеньком'язової тканини провадили при до-
вжині, яка становить L_0 , в ізометричному режимі. Експериментальна каме-
ра термостатувалася за допомогою автоматичного термостату, що дозволяв
змінювати температуру в камері від 0°C до +50°C. Механічну напругу роз-
раховували згідно з Herlihy та Murhy [11], а жорсткість — Kamm і Stull
[15], при цьому амплітуда синусоїдальних деформацій становила 0,5 % від
 L_0 , а частота — 30 Гц. Оптичну густину вимірювали за допомогою чотирь-
охканального фотоденситометра на базі фотодіодів ФД-2-16.

Результати та їх обговорення

Запис типового експерименту приведено на малюнку. Як бачимо, скорочу-
вальна відповідь на температурну дію не супроводжується помітними
змінами жорсткості, і це зрозуміло, коли прийняти до уваги, з одного боку,
встановлену нами «сполучнотканинну», в основному, природу термоме-
ханічної реакції стінки аорти [23], а з другого боку ймовірне існування
ефекту «маскування» змін жорсткості при довжинах смужок, що наближа-
ються до L_0 [19]. При наступному скороченні, викликаному дією
гіперкалієвого розчину, спостерігається істотне збільшення жорсткості, що
логічно пояснюється, виходячи з відомих властивостей актоміозинової
взаємодії [10, 18, 25, 26]. Однак, індукований ФМА розвиток механічної
напруги смужки після релаксації калієвої контрактири під дією без-
кальцієвого розчину та нетривалого витримування препарату в розчині

Кребса відбувається при відсутності будь-яких змін жорсткості. Не реєструються її зміни і при розслабленні викликаного форболовим ефіром скорочення під дією папаверину. В той же час калієва контрактура (її розвиток, амплітуда, релаксація) на плато індукованого ФМА скорочувального процесу повністю аналогічна попередній, котра відбувалася у відсутності форболового ефіру. Це стосується і змін жорсткості. Тобто, в даному випадку спостерігається своєрідна незалежність, адитивність, розвитку двох скорочувальних процесів. До речі, це саме явище має місце при накладанні калієвої контрактури, агоністіндукованих скорочень, з одного боку, та термомеханічних реакцій, з другого [2]. Остання обставина може вказувати на спорідненість механізмів генерації сили у викликаних дією температури та форболових ефірів механічних відповідей препаратів аорти. Про це саме свідчать як незмінність жорсткості, так і однакові у межах точності експерименту відношення змін оптичної густини D до змін механічної напруги P у вказаних двох типах скорочення гладеньком'язової тканини.



Типовий запис одного із семи експериментів дослідження дії форболового ефіру ФМА на ізольовані смужки аорти: K — гіперкальцевий розчин; PE — розчин Кребса з форболовим ефіром (10^{-6} моль/л); $EGTA$ — безкальцевий розчин з 2 ммоль/л ЕГТА; Pa — безкальцевий розчин з 2 ммоль/л ЕГТА та папаверином (10^{-4} моль/л); KS — нормальний розчин Кребса; p — механічна напруга, вимірювана у відсотках до максимальної ($P_{\max}$ отримували при сумісній дії гіперкальцевого розчину та 10^{-5} моль/л морадреналіну); G — жорсткість; жорсткість смужки у відсутності стимуляції прийнята за 100 %; D — оптична густина; оптична густина нестимульованої смужки прийнята за 100 %.

На наш погляд, отримані результати неможливо пояснити, виходячи із загальноприйнятої гіпотези актоміозинової взаємодії, згідно якої генерування механічної напруги забезпечується послідовним зачепленням зростаючого числа поперечних містків між товстими та тонкими протофібрилами [9, 10, 15, 25, 26]. Враховуючи раніше висловлене нами припущення про активну участь сполучнотканинного матриксу у процесі генерування механічної сили гладеньком'язовою тканиною та те, що незмінність жорсткості при генеруванні сили є ознакою скорочення позаклітинних сполуче-

них структур, а також, що зміни оптичної густини під час скорочувального акту гладеньком'язової тканини не пов'язані, в основному, зі змінами її геометричних характеристик, а відображають внутрішні біохімічні процеси, викликані скороченням, дає нам змогу зробити висновок про активацію форболовими ефірами генерування механічної напруги сполучнотканинним матриксом.

На жаль, біохімічні механізми встановленого нами явища залишаються невідомими. Варто однак відзначити, що на денативовані препарати аорти, згідно наших результатів, форболові ефіри не діють, хоч термомеханічні реакції смужок за цих умов зберігаються майже без змін, не проявляючи при цьому чутливості до розслаблюючого впливу папаверину. У зв'язку з цим ми схильні вважати, що виявлений нами ефект дії форболового ефери опосереднений через певні біохімічні процеси в гладеньком'язовій тканині.

A.M.Shapovalov, M.F.Shuba

THE STUDY OF THE EFFECT OF PHORBOL ESTER ON THE AORTA WALL

Changes in the muscle tissue stiffness are important and necessary signs of the contractive process. The work is devoted to the study of this parameter of the smooth muscle tissue reaction during the action of phorbol esters, (namely, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)), synthetic imitators of diacylglycerole. The experiments were carried out on isolated native preparations of aorta thoracic area of guinea pige under isometric conditions. Contraction induced by PMA or by the temperature was not accompanied by the stiffness changes. Potassium contraction (its development, amplitude, relaxation) evoked on the plateau of the PMA-induced contraction was similar in all respects to that in control: the stiffness increased significantly. These findings prove independent development of these two types of contractive processes. At the same time, the stiffness invariability and similar ratios of optical density to mechanical strength changes in the contractions induced by PMA action or by temperature show the likeness of the force generation mechanisms in these mechano-chemical reactions. The results obtained cannot be explained in terms of the generally accepted hypothesis of actomyosin interaction. The conclusion is made that phorbolic esters during the action on the smooth muscle tissue activate the mechanical strength generation by the connective tissue matrix.

Taras Shevchenko University of Kiev,
Ministry of Education of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шаповалов А.Н. Термомеханические и механические свойства коллагена и немусечный компонент сосудистого тонуса // VI Всесоюз. конф. по биохимии мышц. — Тбилиси, 1989. — С. 256—258.
2. Шаповалов А.Н. Исследование оптико-механических свойств гладких мышц сосудов // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — К., 1990. — 21 с.
3. Baraban J.M., Gould B.J., Peroutka S.J., Snyder S.H. Phorbol ester effect on neurotransmission: interaction with neurotransmitter and calcium in smooth muscle // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1985. — 82, № 3. — P. 604—607.
4. Brozovich F.A., Yates L.D., Gordon A.M. Muscle force and stiffness during activation and relaxation // J.Gen.Physiol. — 1988. — 912, № 2. — P. 399—420.
5. Chardonnens D., Lang U., Possier V. et al. Inhibitory and stimulatory effects of phorbol ester on vasopressin-induced cellular responses in cultured rat aortic smooth muscle cells // J. Biochem. — 1990. — 265, № 15. — P. 10451—10457.
6. Chatterjee V., Tejada M. Phorbol ester induced contraction in chemically skinned vascular smooth muscle // Amer. J. Physiol. — 1986. — 251, № 2. — P. C356—C361.
7. De Feo T.T., Morgan R.G. Calcium-force coupling mechanism during vasodilator-induced relaxation of ferret aorta // J. Physiol. — 1989. — 412, № 1. — P. 123—133.
8. Dobrin P.B. Mechanical properties of arteries // Physiol. Rev. — 1978. — 58, № 2. — P. 397—480.
9. Goody R.S., Holmes K.C. Cross — bridges and the mechanism of muscle contraction // Biochem. and Biophys. Acta. — 1983. — 726, № 1. — P. 13—39.
10. Hellstrand P., Johansson L. Analysis of the length response to a force step in smooth muscle from rabbit urinary bladder // Acta physiol. scand. — 1979. — 106, № 2. — P. 221—238.

11. *Herlihy L.T., Murhy R.A.* Length — tension relationship of smooth muscle of the hog carotid artery // *Circulation Res.* — 1973. — 33, № 3. — P. 275—283.
12. *Hidaka H., Infgali M., Kawamoto S., Sasaki Y.* Isoguinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase C // *Biochem.* — 1984. — 23, № 21. — P. 5036—5041.
13. *Itoh H., Lederis K.* Contraction of rat thoracic aorta strips, induced by phorbol 12-myristate 13-acetate // *Amer. J. physiol.* — 1987. — 252, № 2. — P. C244—C247.
14. *Jiang M.J., Morgan K.G.* Intracellular calcium levels in phorbol ester-induced contractions of vascular muscle // *Idid.* — 1987. — 253, № 10. — P. H1365—H1371.
15. *Kamm K.E., Stull J.T.* Activation of smooth muscle contraction. Relation between myosin phosphorylation and stiffness // *Science.* — 1986. — 232, № 1. — P. 80—82.
16. *Khall R.A., Morgan K.G.* Phenylephrine-induced translocation of protein kinase C and shortening of two types of vascular cells of the ferret // *J. Physiol.* — 1992. — 455, № 4. — P. 585—599.
17. *Lanerolle P., Nishikawa M.* Regulation of embrionic smooth muscle myosin by protein kinase C // *J. Biochem.* — 1988. — 263, № 7. — P. 9072—9074.
18. *Meiss R.A.* Nonlinear forse response of active smooth muscle subjected to small stretches // *Amer. J. Physiol.* — 1984. — 246, № 1. — P. C114—C124.
19. *Pawlowski J., Morgan K.* Mechanisms of intrinsic tone in ferret vascular smooth muscle // *J. Physiol.* — 1992. — 448, № 1. — P. 121—132.
20. *Rasmussen H., Forder J., Kojima I., Scriabine A.* TPA-induced contraction of isolated rabbit vascular smooth muscle // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1984. — 122, № 6. — P. 776—784.
21. *Resnick M.S., Maitland L.A., Morgan L.G.* Floseguinan, a vasodilator with a novel mechanism of action // *Brit. J. Pharmacol.* — 1991. — 102, № 8. — P. 974—978.
22. *Ruzycky A.L., Morgan K.G.* Involvement of the protein kinase C system in calcium-force relationships in ferret aorta // *Ibid.* — 1989. — 97, № 4. — P. 391—400.
23. *Shapovalov A.N., Shuba M.F., Mirutenko V.I.* Temperature influence on optical and mechanical properties of smooth muscles // *Docl. Acad. Sci. USSR.* — 1989. — 308, № 8. — P. 748—752.
24. *Shapovalov A.N., Shapovalova I.V.* The aorta intrinsic temperature-dependent tone is generated by the connective tissu ematrix of the blood vessel wall // *XXI Europ. Mus. Congr. Abstr.* — Bielefeld. — 1992. — P. 75.
25. *Warshaw D.M., Fay F.S.* Tension tranients in single isolated smooth muscle cell // *Science.* — 1983. — 219, № 25. — P. 1438—1441.
26. *Warshaw D.M., Fay F.S.* Cross-bridge elasticity in single smooth muscle cells // *J. Jen. Physiol.* — 1983. — 82, № 2. — P. 157—199.

Київ. ун-т ім. Тараса Шевченка
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 01.07.93