

В. Ф. Сагач, О. Я. Андрухов, Е. Б. Бабійчук,
В. С. Бабійчук, В. М. Данилова, А. Драгер

Вплив анексинів на скорочувальну активність гладеньких м'язів ворітної вени щура

В работе представлены результаты исследования влияния анексинов (внутриклеточных кальцийзависимых фосфолипидсвязывающих белков) на сократительные реакции гладких мышц воротной вены. Описан новый метод выделения анексинов из гладких мышц желудка свиньи. Показано, что в наномолярных концентрациях анексины вызывают увеличение частоты и уменьшение амплитуды фазных сокращений воротной вены. Этот эффект дозозависим и сопровождается увеличением интегральной сократительной активности препарата. Кроме того, анексины способствуют увеличению базального тонуса воротной вены. Таким образом, показана способность экзогенных анексинов изменять сократительные свойства сосудистых гладких мышц.

Вступ

Упродовж останніх років широко вивчається сімейство подібних за структурою білків — анексинів, основною властивістю яких є здатність зв'язуватися з кислими фосфоліпідами за наявності іонів кальцію [15]. Анексини є поширеними внутрішньоклітинними білками — їх питома вага становить більше ніж 2 % від загальної кількості клітинних білків [15], а різновиди анексинів знайдено майже в усіх типах клітин, за виключенням еритроцитів. У різних тканинах окремі різновиди анексинів експресовані нерівномірно. Так, у міокардіальній тканині та в гладеньком'язових клітинах найбільшою мірою експресовані анексини V та VI [4], а в ендотеліальних клітинах переважно анексин II [20]. Анексини також знайдено в плазмі крові, де їх концентрація становить від 0 до 100 нг/мл і змінюється за різних патологічних умов [5, 8]. Внаслідок властивості взаємодіяти з фосфоліпідами анексини можуть зв'язуватися з плазматичною мембраною, причому як з зовнішньою, так і з внутрішньою поверхнею [19]. Фізіологічне значення анексинів залишається нез'ясованим. Наслідком властивості всіх анексинів зв'язуватися з кислими фосфоліпідами є те, що вони пригнічують *in vitro* активність фосфоліпази A2 та фосфоліпази C конкурентним зв'язуванням з субстратом [15]. Пригнічення активності фосфоліпаз може також відбуватися за рахунок безпосередньої взаємодії анексинів з самими фосфоліпазами або з іншими білками плазматичної мембрани [15]. Але є і повідомлення, що анексин VI за певних умов збільшував активність фосфоліпази A2 [9]. Ще однією властивістю анексинів є їх здатність утворювати в плазматичній мембрані іонні канали з великою спорідненістю до Ca^{2+} [14]. Анексини також можуть регулювати функції інших білків, зокрема білків іонних каналів плазматичної мембрани та мембрани саркоплазматичного ретикулула [12, 13]. Анексини I, II, V, VI

© В. Ф. Сагач, О. Я. Андрухов, Е. Б. Бабійчук, В. С. Бабійчук,
В. М. Данилова, А. Драгер, 1999

беруть участь у регуляції пасивного транспорту іонів кальцію в фракції мембранних везикул [11]. Анексин VI пригнічує мембранну Ca^{2+} -АТФазу [7]. Анексини II та VI відіграють значну роль у формуванні везикул (кавеол) плазматичної мембрани ендотеліальних клітин і, можливо, впливають на секреторну функцію ендотелію [17, 20]. Анексини також здатні регулювати процеси, пов'язані з G-білками плазматичної мембрани і такі важливі клітинні процеси як, ендо- та екзоцитоз, клітинна адгезія, фібриноліз [15, 17], а також процеси, пов'язані з кальцієвою сигналізацією [18].

Завдяки наведеним фактам не виключена можливість їх впливу на судинні скорочувальні реакції, проте і сьогодні це питання залишається невивченим. Показано, що збільшення експресії анексину VI у серцевій тканині пригнічує скорочувальну активність кардіоміоцитів [6]. У гладеньком'язових клітинах анексин II модулює формування інозитолтрифосфату [16]. Тому мета нашої роботи — вивчення можливості впливу анексинів на скорочувальну активність гладеньких м'язів (ГМ) ворітної вени щура.

Методика

Дослідження проведено на ізольованих препаратах ворітної вени щурів лінії Вістар масою 200–250 г. Як відомо, ворітна вена має міогенну скорочувальну активність і тому є зручною моделлю для дослідження впливу різноманітних речовин на судини [2]. Вену вилучали одразу після декапітації, препарували та розрізали на 2–3 поздовжні сегменти. Препарат переносили в термостатовану камеру, розтягували з силою 4 мН, перфузували стандартним розчином Кребса (концентрації у ммоль/л): NaCl — 133, KCl — 4,7, NaHCO_3 — 16,3, NaH_2PO_4 — 1,38, MgCl_2 — 1,05, глюкоза — 12, CaCl_2 — 2,5, рН 7,4, залишали для стабілізації на 30 хв. Скорочувальну активність реєстрували у близькому до ізометричного режимі за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX1C. Дослідження проводили при 35–37 °С. Для дослідження впливу анексинів до перфузату додавали суміш анексинів II, V, VI у концентраціях від 0,5 до 50 нмоль/л.

Анексини виділяли за наступною методикою: 100 г гомогенату м'язів шлунка свині екстрагували в 300 мл буфера А (60 ммоль/л KCl , 2 ммоль/л MgCl_2 , 20 ммоль/л імідазол, рН 7,0), який містив 0,5 % тритон X-100 і 0,2 ммоль/л CaCl_2 , центрифугували при 6000 g протягом 30 хв, супернатант фільтрували через скловату та знову центрифугували при 50000 g протягом 90 хв. Отриманий осад промивали за допомогою трьох послідовних центрифугувань в 10 об'ємах буфера Б (120 ммоль/л KCl , 20 ммоль/л імідазол, рН 7,0), який містив 0,2 ммоль/л CaCl_2 , а потім екстрагували в буфері Б за допомогою 1 ммоль/л ЕГТА і центрифугували при 6000 g протягом 30 хв. Супернатант (так званий «неочищений анексин») концентрували за допомогою преципітації в 60 %-му сульфаті амонію і піддавали подальшій очистці за допомогою гел'фільтраційної хроматографії (SephacrylS-200 HR; Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden). Фракції, що містили анексини II та VI збирали та переводили в розчин Кребса за допомогою діалізу. Гомогенність препарату перевіряли за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі при наявності додецилсульфату натрію [10]. Концентрацію білка визначали за методом, описаним Бредфордом [3], використовуючи як стандарт альбумін бика. Всі етапи виділення проводили при 4 °С.

При аналізі міограми амплітуду, яку відносили до препарату, яку вираховували до його тону гладеньком'язового рівня міограми оброблено за допомогою

Результати та об

Контрольні експерименти активності ГМ ворітної вени розчином Кребса

Додавання до перфузату викликало зміну параметрів скорочень вени. Вплив анексинів на скорочення та характеризувався збільшенням амплітуди скорочень (рис 1, а). При цьому збільшувалася частота скорочень. Дія анексинів виявлялася на перших хвилинах після додавання міогенної скорочувальності дії препарату. Вплив анексинів на характер, і після вилучення скорочувальної активності в різних концентраціях, вищих за 50 нмоль/л мав дозозалежний характер.



Рис. 1. Вплив анексинів на скорочувальну активність ворітної вени щура. Стрілкою позначено додавання суміші 50 (б) нмоль/л.

При аналізі міограм вираховували частоту спонтанних скорочень, середню амплітуду, яку відносили до маси препарату, а також інтегральну активність препарату, яку вираховували як добуток амплітуди та частоти. Зміну базального тону гладеньком'язових клітин ворітної вени оцінювали за зміною початкового рівня міограми скорочень ворітної вени. Результати експериментів оброблено за допомогою критерію t Стьюдента.

Результати та обговорення

Контрольні експерименти показали, що параметри міогенної скорочувальної активності ГМ ворітної вени стабілізуються після 30–40 хв перфузії стандартним розчином Кребса і залишаються стійкими протягом 2–3 год.

Додавання до перфузату анексинів у концентрації від 1 до 5 нмоль/л викликало зміну параметрів міогенної скорочувальної активності ГМ ворітної вени. Вплив анексинів на скорочувальну активність препарату був фазотонічним та характеризувався підвищенням частоти та зменшенням амплітуди фазних скорочень (рис 1, а). Інтегральна скорочувальна активність ГМ смужки при цьому збільшувалася. Крім того, спостерігалось невелике підвищення базального тону ворітної вени, амплітуда якого становила від 0,05 до 0,1 мН/мг. Дія анексинів виявлялась одразу ж після їх додавання до перфузату, причому на перших хвилинах дії препарату була найбільше вираженою. Параметри міогенної скорочувальної активності стабілізувалися приблизно на 10-й хвилині дії препарату. Вплив анексинів у концентраціях до 5 нмоль/л мав зворотний характер, і після вилучення анексинів з перфузату параметри міогенної скорочувальної активності смужки відновлювалися до попередніх значень, а при концентраціях, вищих за 5 нмоль/л відмивання було неповним. Ефект анексинів мав дозозалежний характер (рис. 2) і спостерігався навіть при концентрації

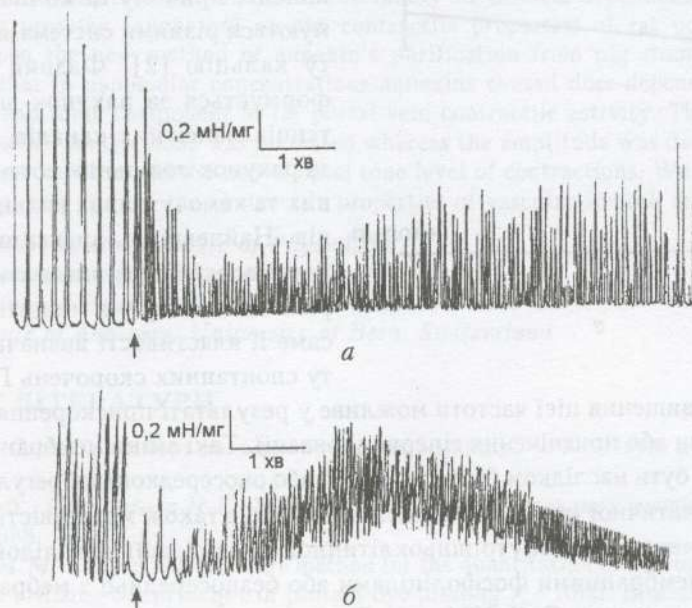


Рис. 1. Вплив анексинів на міогенну скорочувальну активність гладеньких м'язів ворітної вени щура. Стрілкою показано початок перфузії анексинів у концентраціях 5 (а) та 50 (б) нмоль/л.

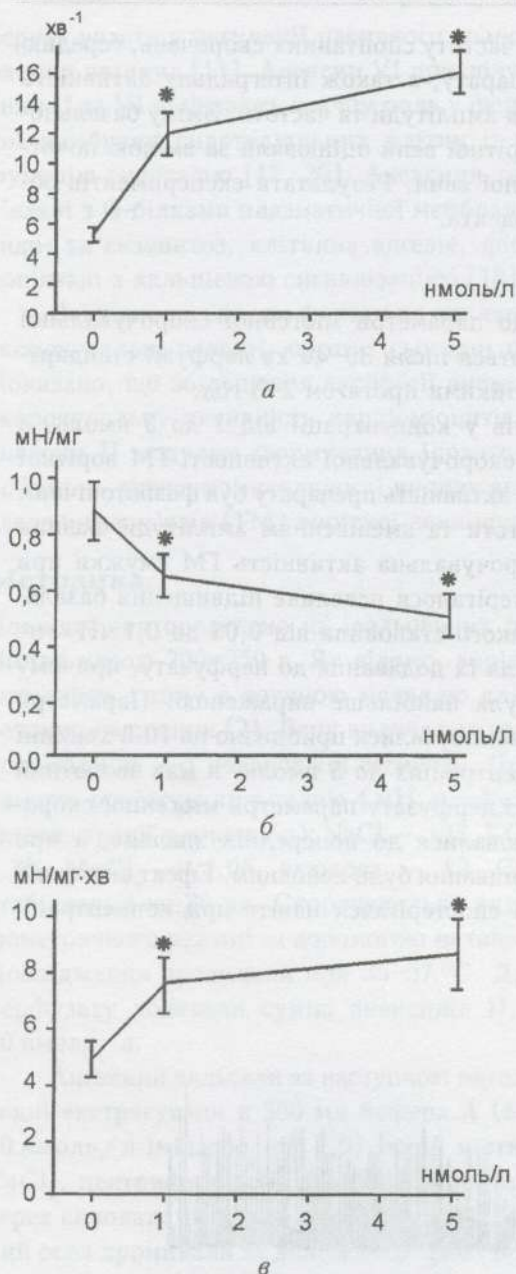


Рис.2. Дозозалежний ефект анексинів на параметри міогенної скорочувальної активності ворітної вени, (* $P < 0,01$): а — частота спонтанних скорочень; б — амплітуда спонтанних скорочень; в — інтегральна активність препарату.

анексинів 0,5 нмоль/л. При концентрації білка 5 нмоль/л частота спонтанних скорочень підвищувалася на $229\% \pm 24\%$ ($n = 11$, $P < 0,01$), амплітуда зменшувалася на $45,3\% \pm 6,2\%$ ($n = 11$, $P < 0,01$), а інтегральна активність збільшувалася на $74\% \pm 21\%$ ($n = 11$, $P < 0,01$). Підвищення базального тону становило 0,1 мН/мг. При подальшому збільшенні концентрації (50 нмоль/л) вплив був настільки вагомим, що окремі імпульси формували скорочення, подібне до тетанічного (див. рис. 1, б).

Наведені результати свідчать, що анексини здійснюють вплив на міогенну скорочувальну активність ГМ ворітної вени. Як відомо, скорочувальна активність ГМ ворітної вени складається з фазної та тонічної компонент, причому ці компоненти формуються різними системами транспорту кальцію [2]. Фазний компонент формується за рахунок швидких потенціалзалежних каналів, а тонічний за рахунок повільних потенціалзалежних та хемочутливих кальцієвих каналів. Найпевніше, анексини змінюють деякі властивості плазматичної мембрани пейсмеркерних міоцитів, оскільки саме її властивості визначають частоту спонтанних скорочень ГМ ворітної

вени [2]. Підвищення цієї частоти можливе у результаті прискорення деполяризації мембрани або пригнічення гіперполяризації. Такі зміни мембранного потенціалу можуть бути наслідком безпосередньої або опосередкованої регуляції іонних каналів плазматичної мембрани анексинами. Існує також можливість модуляції анексинами механізмів внутрішньоклітинної сигналізації внаслідок взаємодії анексинів з мембранними фосфоліпідами або безпосередньо з мембранними білками, або пригнічення Ca^{2+} -АТФази. Літературні дані не виключають можливості такої взаємодії [7, 9, 17]. Зменшення амплітуди спонтанних скорочень може бути наслідком скорочення інтервалу між окремими імпульсами. Невели-

ке підвищення базальних повільних потенціалів каналів. Підвищення плазматичної мембрани, які мають високу спонтанну активність, збільшувати механізмом впливу на бути ендотеліязалежними мембрани ендотелію кавеол ендотеліальних структурами плазматичними кардіоміоцитів. У цих як G -білки, Ca^{2+} -АТФаза оксиду азоту, калієві гладеньком'язових аніонів чий вплив на функції препарату ворітної вени здійснюють вплив. Механізми цього впливу вивчення.

V. F. Sagach¹,
V. M. Danilova²

THE EFFECT OF ANNEXINS ON THE CONTRACTILE ACTIVITY OF RAT PORTAL VEIN

This study examined the effect of annexins on the contractile activity of rat portal vein. It was found that in the presence of annexins, the frequency of spontaneous contractions increased, the amplitude of spontaneous contractions decreased, and the integral activity increased. The effect was dose-dependent. At a concentration of 5 nmol/l, the frequency of spontaneous contractions increased by $229\% \pm 24\%$ ($n = 11$, $P < 0.01$), the amplitude of spontaneous contractions decreased by $45.3\% \pm 6.2\%$ ($n = 11$, $P < 0.01$), and the integral activity increased by $74\% \pm 21\%$ ($n = 11$, $P < 0.01$). The basal tone was 0.1 mN/mg. At further increase in concentration (50 nmol/l), the effect was so significant that individual impulses formed contractions similar to tetanic (see Fig. 1, b).

¹ A.A. Bogomoletz
National Academy of Sciences of Ukraine

² Institute of Physiology

³ Institute of Anatomy

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Костерин С. А. Трактат по физиологии, 216 с.
2. Шуба М.Ф., Кочемасов В.П. Механизмы регуляции мышечной активности, 1988. — 252 с.
3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a dye-binding technique. *Anal. Biochem.* 1976. — 72. — P.248-254.
4. Doubell A.F., Lazurkin A.B. The localization of annexins in the heart. *Res.* — 1993. — 27, 1-2.

ефект анексинів на скорочувальну активність ГМ ворітної вени (*P < 0,01): а — скорочень; б — скорочень; в — препарату.

л. При концен- / л частота спон- підвищувалася на (P < 0,01), амплітуда на 45,3 % ± 6,2 % а інтегральна активність на 74 % ± 21 %. Підвищення базального тону препарату становило 0,1 мН/мг. Підвищенні концентрації анексинів мали вплив на частоту спонтанних скорочень ГМ ворітної вени (рис. 1, б). Подібне до тетра- (рис. 1, в).

Результати свідчать, що анексини мають вплив на міогенну активність ГМ ворітної вени. Як відомо, скорочувальна активність ГМ ворітної вени складається з тонічної та фазичної компонентів. Фазична складова складається з фазичного та тонічного компонентів. Фазичний компонент характеризується швидкими скороченнями, а тонічний — повільними. Підвищення базального тону препарату становило 0,1 мН/мг. Підвищенні концентрації анексинів мали вплив на частоту спонтанних скорочень ГМ ворітної вени (рис. 1, б). Подібне до тетра- (рис. 1, в).

ке підвищення базального тону препарату може бути зумовлене активацією повільних потенціалзалежних кальцієвих каналів або хемочутливих кальцієвих каналів. Підвищення базального тону препарату може бути наслідком утворення в плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин так званих анексинових каналів, які мають високу спорідненість до іонів Ca [12, 13]. Крім того, анексини можуть збільшувати пасивний транспорт Ca²⁺ [1, 10]. Ще одним можливим механізмом впливу анексинів на скорочувальну активність ворітної вени може бути ендотеліалзалежний механізм. Так анексини II і VI є важливими компонентами мембрани ендотеліальних клітин. Анексини беруть участь у формуванні кавеол ендотеліальних клітин. Як відомо з літературних джерел, кавеоли є структурами плазматичної мембрани ендотеліальних і гладеньком'язових клітин, кардіоміоцитів. У цих структурах зосереджені такі функціонально важливі білки, як G-білки, Ca²⁺-АТФаза, рецептори інозитолтрифосфату, ендотеліальна синтаза оксиду азоту, кальмодулін [18]. Анексини шляхом взаємодії з кавеолами гладеньком'язових або ендотеліальних клітин можуть здійснювати модулюючий вплив на функцію цих білків і, таким чином, і на скорочувальну активність препарату ворітної вени. Результати наших досліджень показують, що анексини здійснюють вплив на міогенну скорочувальну активність ворітної вени. Механізми цього впливу можуть бути різноманітними і потребують подальшого вивчення.

V. F. Sagach¹, O. Y. Andrukhov¹, E. B. Babiychuk^{2,3}, V. S. Babiychuk², V. M. Danilova², A. Draeger³

THE EFFECT OF ANNEXINS ON THE CONTRACTILE ACTIVITY OF RAT PORTAL VEIN

This study examines the effects of the family of calcium-dependent phospholipids binding proteins (annexins) on the contractile properties of rat portal vein. We developed the new method of annexin's purification from pig stomach muscle. It found that in nanomolar concentrations annexins caused dose-dependent effects on phasic and tonic component of rat portal vein contractile activity. The frequency of spontaneous contractions was increased whereas the amplitude was decreased. At the same time we observed the rise of basal tone level of contractions. We suggested that annexins may change the contractile properties of vascular smooth muscle.

¹ A.A. Bogomoletz Institute of Physiology

National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev;

² Institute of Physiology, Kiev University, Ukraine;

³ Institute of Anatomy, University of Bern, Switzerland

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах. — К.: Наук. думка, 1990. — 216 с.
2. Шуба М. Ф., Кочемасова Н. Г. Физиология сосудистых гладких мышц. — К.: Наук. думка, 1988. — 252 с.
3. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72. — P. 248-254.
4. Doubell A. F., Lazure C., Charbonneau C., Thibault G. Identification and immunolocalisation of annexin V and VI, the major cardiac annexins in rat heart // Cardiovasc. Res. — 1993. — 27, №7. — P. 1359-1367.

5. Dubois T., Bisangi-Faure A., Coste J. et al. High levels of antibodies to annexin V and VI in patients with rheumatoid arthritis // J. Rheumatol. — 1995. — 22, № 7. — P. 1230-1234.
6. Guntjeski-Hamblin A.M., Song G., Walsh R.A. et al. Annexin VI overexpression targeted to heart alters cardiomyocyte function in transgenic mice // Amer. J. Physiol. — 1996. — 270, №3(Pt2). — P.H1091-1100.
7. Hazarika P., Kaetzel M.A., Sheldon A. et al. Annexin VI associated with calcium-sequestering organelles // J. Cell Biol. — 1991. — 46, №1. — P.18-85.
8. Kaneko N., Matsuda R., Hosoda S. et al. Measurement of plasma annexin by ELISA in the early detection of acute myocardial infarction // Clin. Chim. Acta. — 1996. — 251, №1. — P. 65-80.
9. Koumanov K., Wolf C., Bereziat G. Modulation of human type II secretory phospholipase A2 by sphingomyelin and annexin VI // Biochem J. — 1997. — 326 (Pt.1). — P. 227-233.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — 227, № 259. — P. 680-685.
11. Matsuda R., Kaneko N., Horikawa Y. Presence and comparison of Ca^{2+} transport activity of annexin I, II, V, and VI in large unilamellar vesicles // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1997. — 237, №3. — P. 499-503.
12. Naciff J.M., Behbehani M.M., Kaetzel M.A., Dedman J.R. Annexin VI modulates Ca^{2+} and K^{+} conductances of spinal cord and dorsal root ganglion neurons // Amer. J. Physiol. — 1996. — 271, №6(Pt1). — P.C2004-2015.
13. Nilius B., Gerke V., Prenen J. et al. Annexin II modulates volume activated chloride currents in vascular endothelial cells // J. Biol. Chem. — 1996. — 271, №48. — P.30631-30636.
14. Pollard H.B., Guy H.R., Arispe N. et al. Calcium channel and membrane fusion activity of synexin and other members of the annexin gene family // Biophys. J. — 1992. — 62, №1. — P. 15-18.
15. Raynal P., Pollard H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins // Biochim. et Biophys. Acta. — 1994. — 1197. — P.63-93.
16. Scheming J.R., Gentry D.J., Dubyak G.R. Annexin II inhibition of G protein-regulated inositol triphosphate formation in rat aortic smooth muscle // Amer. J. Physiol. — 1996. — 270, №4(Pt2). — P.F682-690.
17. Schnitzer J.E., Liu J., Oh P. Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and CTPases // J. Biol. Chem. — 1995. — 270, №24. — P. 14399-14404.
18. Shaul P.W., Anderson R.G.W. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction // Amer. J. Physiol. — 1998. — 275, №5(Pt1). — P.L843-851.
19. Siever D.A., Erikson H.P. Extracellular annexin II // Int. J. Biochem. Cell Biology. — 1997. — 29, №11. — P.1219-1223.
20. Stan R.V., Roberts W.G., Predescu D. et al. Immunolocalization and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae) // Mol. Biol. Cell. — 1997. — 8, №4. — P.595-605.

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця
НАН України, Київ;
Інститут фізіології
при Національному Університеті
ім. Тараса Шевченка, Київ;
Інститут анатомії
при Бернському Університеті, Берн, Швейцарія

Матеріал надійшов
до редакції 27.07.99

UDC 612.275.1

T. V. Serebrovs
Z. A. Serebrovs

Intermittent Responses

Abstract

Intermittent hypoxia is one of some diseases and conditions. We studied (1) hypoxia during normobaric, intermittent lung ventilation and 5 min of breathing 100% O₂ (IHT regimen) on 12 (control) healthy mice, (2) decreasing PiO_2 . $P_{ET}O_2$ decreased to 10 min breaks between HVRs were the same challenge (slope of 45%) during severe hypoxia, an increase in HVRs to 158 and 200 %, maximum no significant changes in reactions during subsequent and 22 %, respectively. subjects with hypercapnia.

Two physiological responses to hypoxia causes profound significant pathological changes in nonspecific body responses to illnesses. Both of these influence, initial hypoxia reactivity. Intermittent prevention and treatment of asthma [31], rheumatoid exposure [30]. In achieving the highest response (HVR) is Susceptibility to hypoxia HVR [4, 14, 23]. A

© T. V. Serebrovska
Z. A. Serebrovska, 1999