

На правах рукописи

ПУЗДРОВА ВИКТОРИЯ АНАТОЛЬЕВНА

**ТРОФИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ СИМПАТИЧЕСКОЙ
ИННЕРВАЦИИ НА КАЛЬЦИЕВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА ПОДКОЖНОЙ АРТЕРИИ
КРЫСЫ**

03.00.13 – физиология

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Москва
2007**

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета (заведующий – профессор А.А. Каменский), на кафедре биологической и медицинской химии факультета фундаментальной медицины (заведующий – академик В.А. Ткачук) МГУ им. М.В. Ломоносова, в Институте физиологии университета г. Росток (Германия), а также в Институте физиологии университета г. Орхус (Дания).

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

Ольга Сергеевна Тарасова доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Александр Вячеславович Воротников кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры биологической и медицинской химии Факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Татьяна Павловна Сторожевых доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории мембранологии с группой генетических исследований ГУ Научного центра здоровья детей РАМН

Аскер Юсуфович Хапчаев кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной подвижности ФГУ Российского кардиологического научно-производственного комплекса Росздрава РФ

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН

Защита диссертации состоится 19 ноября 2007 года в 15ч 30мин на заседании диссертационного совета Д 501.001.93 биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по адресу: Ленинские горы, д.1, строение 12, Москва, ГСП-1, 119991, ауд. М-1

Автореферат разослан 19 октября 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Известно, что симпатические нервы оказывают трофическое влияние на кровеносные сосуды: они регулируют пролиферацию, рост и дифференцировку гладкомышечных клеток (Орбели, 1962, Bevan 1984; Damon 2005). У многих млекопитающих, в том числе у крыс, становление симпатической иннервации органов происходит только после рождения, в раннем постнатальном периоде (Todd, 1980; Hill et al, 1983, Hill, 1999, Luff 1999, Sandow, Hill 1999), что совпадает во времени с процессом дифференцировки гладкой мышцы сосудов (Owens, 1995). Известно, что симпатическая иннервация необходима для формирования сократительного фенотипа гладкомышечных клеток в онтогенезе (Bevan 1984; Damon 2005), однако ни молекулярные мишени трофических воздействий, ни их взаимодействие на внутриклеточном уровне практически не исследованы. Кроме того, остается совершенно неясной роль симпатической иннервации в формировании функциональной активности сосудов. Сосудистые гладкие мышцы обладают характерной способностью к длительному поддержанию напряжения, т.е. тоническому сокращению. Поскольку нарушение тонического сокращения может быть причиной как локальных вазоспазмов, так и системных сердечно-сосудистых нарушений, выяснение физиологических механизмов формирования тонуса является весьма актуальным.

Данная работа направлена на проверку гипотезы о том, что трофическое влияние симпатических нервов связано с формированием определенного баланса Ca^{2+} -зависимых и Ca^{2+} -независимых механизмов регуляции сокращения гладкой мышцы сосудов за счет изменения уровня экспрессии их ключевых молекулярных компонентов. Мы предполагаем, что этот баланс определяет чувствительность сократительного аппарата к ионам Ca^{2+} и является важным механизмом формирования адекватной регуляции тонуса сосудов в онтогенезе, а повреждение симпатической иннервации приводит к его нарушению.

Трофическое влияние симпатических нервов в основном реализуется на пострецепторных этапах регуляции сокращения, поскольку рецепторный аппарат гладкомышечных клеток достаточно консервативен. Показано, что α_1 -адренорецепторы, которые в основном опосредуют вазомоторные и трофические эффекты симпатических нервов (Yu et al., 1996; Chen et al., 1995), не претерпевают значительных изменений ни в ходе становления иннервации сосудов, ни после денервации во взрослом возрасте (Bobik, Anderson, 1983; Nasser et al., 1985; Phillips et al., 1996; Phillips, Hill, 1999).

Всю последовательность событий от активации рецепторов наружной мембраны до сокращения гладкой мышцы можно разделить на два этапа. На первом этапе происходит повышение концентрации свободного кальция в цитоплазме гладкомышечных клеток ($[Ca^{2+}]_i$) (Thorneloe, Nelson, 2005). Здесь трофическое влияние симпатических нервов проявляется в контроле экспрессии канальных и транспортных белков, которые обеспечивают

типичные для гладкомышечных клеток уровень мембранного потенциала и кальциевый гомеостаз (Fleming, 1999).

На втором этапе Ca^{2+} взаимодействует с сократительным аппаратом, что приводит к сокращению. Симпатические нервы контролируют экспрессию гладкомышечных изоформ актина и миозина (Damon 2005). Однако вопрос о том, влияют ли они на активность механизмов, регулирующих актомиозиновое взаимодействие в гладкомышечных клетках, и осуществляется ли такое влияние через изменение экспрессии соответствующих регуляторных белков, к началу данной работы оставалось неисследованным.

Ключевым Ca^{2+} -связывающим белком гладкомышечных клеток является кальмодулин (Гусев, 2001). Основной мишенью комплекса Ca^{2+} -кальмодулин является киназа легких цепей миозина (КЛЦМ), которая фосфорилирует регуляторные легкие цепи (РЛЦ) миозина (Somlyo, Somlyo, 2003; Hirano, 2007), активируя миозиновый мотор и сокращение гладкой мышцы. Еще одной мишенью Ca^{2+} -кальмодулина является кальдесмон, который локализуется на нитях актина и вместе с тропомиозином блокирует участки сильного связывания миозина на актине, как это делает тропонин в поперечно-полосатой мускулатуре. Взаимодействие кальдесмона с комплексом Ca^{2+} -кальмодулин устраняет тропомиозиновый блок и тем самым делает возможным взаимодействие миозина с актином (Воротников и др., 2002). Снижение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме сопровождается инактивацией КЛЦМ и восстановлением ингибирующего действия кальдесмон-тропомиозина. Последующее расслабление определяется дефосфорилированием РЛЦ Ca^{2+} -независимой фосфатазой легких цепей миозина (ФЛЦМ), инактивацией миозина и переходом тонких филаментов в неактивное состояние.

Описанные выше механизмы обеспечивают *Ca^{2+} -зависимую регуляцию сокращения*, которая происходит при деполяризации наружной мембраны гладкомышечных клеток. Однако на самом деле процесс регуляции сокращения гладких мышц более сложный, поскольку в естественных условиях активация рецепторов наружной мембраны, ассоциированных с G-белками, приводит к запуску внутриклеточных сигнальных каскадов и изменению амплитуды и/или длительности сократительного ответа без существенных изменений $[Ca^{2+}]_i$ (Somlyo, Somlyo 2003; Воротников и др. 2002). Этот феномен известен как «*изменение Ca^{2+} -чувствительности сократительного аппарата гладкомышечных клеток*» (Hogowitz et al., 1996) и является одним из наиболее интенсивно исследуемых вопросов физиологии гладкой мышцы. При этом, увеличение силы сокращения при относительно неизменной $[Ca^{2+}]_i$ (повышение Ca^{2+} -чувствительности) обозначается как *Ca^{2+} -сенситизация*, а уменьшение сократительного ответа (снижение Ca^{2+} -чувствительности) – как *десенситизация к Ca^{2+}* .

Основным механизмом изменения Ca^{2+} -чувствительности является ингибирование ФЛЦМ, которое достигается действием двух ферментов: Rho-киназы и протеинкиназы С (Somlyo, Somlyo, 2003; Hirano, 2007). Это замедляет дефосфорилирование РЛЦ миозина и поддерживает сокращение даже при сравнительно низкой активности КЛЦМ. Дополнительное повышение силы

сокращения обеспечивается независимо от фосфорилирования РЛЦ миозина, путем Ca^{2+} -независимой активации каскада митоген-активируемых протеинкиназ (МАР-киназ). Это приводит к фосфорилированию кальдесмона и устранению его ингибирующего действия на актомиозиновое взаимодействие (Воротников и др., 2002, 2004). Кроме того, МАР-киназы могут усиливать сокращение путем активации КЛЦМ (Morrison et al., 1996; Kim et al., 2000).

Данная работа проводилась с использованием двух экспериментальных моделей. Во-первых, было исследовано формирование баланса Ca^{2+} -зависимых и Ca^{2+} -независимых регуляторных механизмов при развитии симпатической иннервации сосудов крыс в постнатальном периоде. Во-вторых, было исследовано изменение этого баланса при экспериментальной симпатической денервации сосудов взрослых животных. Этот подход позволил связать возрастные изменения Ca^{2+} -чувствительности сокращения гладкой мышцы с влиянием именно симпатических нервов, а не факторов иной природы (механической или гуморальной). В работе были зарегистрированы изменения силы сокращения и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ для сосудов с различной степенью симпатической иннервации. Эти данные были сопоставлены с изменением экспрессии ключевых белков-регуляторов взаимодействия актина и миозина в гладкомышечных клетках. В результате исследования были выявлены потенциальные мишени трофического воздействия симпатической иннервации и описан вероятный механизм становления функциональной активности, характерной для зрелых сосудов.

В качестве объекта исследования была выбрана подкожная артерия крысы (*a. saphena*). Это артерия мышечного типа, у взрослых крыс она густо иннервирована симпатическими волокнами (Todd, 1986; Тарасова и др., 2007), то есть является удобной моделью для исследования механизмов трофического влияния симпатической иннервации.

Целью настоящей работы являлось исследовать формирование механизмов, регулирующих чувствительность сократительного аппарата гладкомышечных клеток сосудов к Ca^{2+} , у крыс в период созревания симпатической иннервации, и их изменение при экспериментальной денервации сосудов во взрослом возрасте.

В работе решались следующие задачи:

- 1) исследовать динамику развития иннервации подкожной артерии в раннем постнатальном периоде;
- 2) исследовать, как изменяется чувствительность сократительного ответа подкожной артерии к $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при созревании симпатической иннервации;
- 3) исследовать, как изменяется чувствительность сократительного ответа подкожной артерии к $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при денервации во взрослом возрасте;
- 4) связать обнаруженные изменения чувствительности сократительного ответа к $[\text{Ca}^{2+}]_i$ с экспрессией регуляторных белков сократительного аппарата.

Научная новизна работы. Доказан факт существования долговременного трофического влияния симпатических нервов на регуляцию сокращения

гладкой мышцы сосудов путем изменения баланса Ca^{2+} -зависимых и Ca^{2+} -независимых регуляторных механизмов. Впервые показано, что становление симпатической иннервации сопровождается уменьшением роли Ca^{2+} -сенситизации в сокращении периферических резистивных сосудов большого круга кровообращения. Впервые показано, что нарушение симпатической иннервации приводит к обратным изменениям, то есть к увеличению роли Ca^{2+} -сенситизации в сокращении сосудов. Впервые в этих двух экспериментальных моделях сопоставлены изменения экспрессии белков, регулирующих зависимость силы сокращения от $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Важно, что весь комплекс физиологических и биохимических исследований выполнен на одном объекте, в отличие от предыдущих работ, где затрагивались только функциональные или только биохимические аспекты этой проблемы.

Практическая значимость работы. Значимость работы для фундаментальной и практической медицины обусловлена необходимостью разработки новых способов коррекции тонуса сосудов, лишенных симпатической иннервации: при регуляторных расстройствах у новорожденных детей, а также при нарушении иннервации во взрослом возрасте (в результате травм, аутотрансплантации или трансплантации тканей, диабетической нейропатии и др.). Результаты работы дают основание полагать, что развитие патологий сердечно-сосудистой системы, сопряженных с нарушением симпатической иннервации, может быть связано с уменьшением роли Ca^{2+} -зависимых и возрастанием роли Ca^{2+} -независимых механизмов регуляции сокращения гладких мышц сосудов. Следовательно, для лечения таких патологий следует использовать не традиционно применяемые блокаторы Ca^{2+} -каналов, а препараты, действие которых направлено на снижение активности Ca^{2+} -независимых механизмов регуляции сокращения.

Основное положение, выносимое на защиту. Трофическое влияние симпатических нервов на сосуды приводит к изменению экспрессии белков, обеспечивающих тоническое Ca^{2+} -независимое сокращение гладкой мышцы, что обеспечивает возможность динамической регуляции тонуса сосудов симпатическими вазомоторными влияниями.

Апробация материалов диссертации. Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных симпозиумах «Biological motility» (Пушино, 2004, 2006), на конференции «Центральные и периферические механизмы вегетативной нервной системы» (Донецк, 2003), на III и V Всероссийских конференциях с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2003, 2007); на III Всероссийской школе-конференции по физиологии кровообращения (Москва, 2004), на IX Международной конференции «Центральные и периферические механизмы вегетативной нервной системы» (Донецк-Славянск, 2007), на XX Съезде физиологического общества И.П. Павлова (Москва, 2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и 8 тезисов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на _____ страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения полученных данных, заключения и выводов. Список литературы включает _____ источников. Работа иллюстрирована 4 таблицами и 25 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на крысах линии Вистар в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Возраст животных составлял 3–8-днев («новорожденные»), 11–14-днев («2-недельные») и 2-3 месяца («взрослые»). Масса тела новорожденных крысят составляла 8-12 г, двухнедельных – 26-40 г, а взрослых – 300-350 г. Кроме того, в экспериментах использовали препараты подкожной артерии взрослых крыс, денервированные за 2-3 недели до эксперимента.

Модель хирургической денервации подкожной артерии. Для денервации сосудов задней части тела (в том числе, подкожной артерии) проводили удаление поясничных симпатических ганглиев. Поскольку при этом воздействию иннервация жизненно важных органов (сердца, головного мозга, почек) остается интактной, удается исключить нежелательные системные эффекты, которые неизбежно проявляются при химических способах денервации (Lew, Quay 1972; MacLean et al. 1980).

Под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, внутривенно) у крыс удаляли левую симпатическую цепочку от уровня L2 до бифуркации брюшной аорты, что приводило к практически полному исчезновению сплетения адренергических волокон в левой подкожной артерии. С правой стороны доступ к верхним поясничным ганглиям был ограничен, поэтому правую подкожную артерию в экспериментах не использовали. Контролем служили ложнопериоперированные крысы.

Визуализация адренергических нервных волокон в стенке сосуда. Сегмент артерии изолировали из тела крысы, промывали в физиологическом растворе и помещали в 0,1 М фосфатно-солевой раствор (рН 7,2) с добавлением глиоксиловой кислоты (2 %), сахарозы (10 %) и понтamina небесно-голубого (0,03 %). После 30-мин инкубации препарат расправляли на предметном стекле адвентицией вверх, высушивали (30 мин под струей теплого воздуха, 5 мин при 100 °С), заливали вазелиновым маслом и накрывали покровным стеклом. Использовали микроскоп ЛЮМАМ Р3 (ЛОМО, СССР; окуляр ×7, объектив ×40). Длина волны возбуждающего света составляла 380-440 нм, исследуемой люминесценции – 480-700 нм.

Эксперименты на изолированных сосудах

Измерение сократительной активности сосудов. Сокращение сосудов исследовали в изометрическом режиме с помощью системы wire myograph (модель 310, Danish Myo Technology A/S, Дания). Животных декапитировали гильотиной и выделяли подкожную артерию. Из средней части сосуда вырезали кольцевой сегмент длиной 2 мм и закрепляли его в миографе, содержащем раствор следующего состава (мМ): NaCl 120; NaHCO₃ 26; KCl 4,5; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,0; NaH₂PO₄ 1,2; D-глюкоза 5,5; EDTA 0,025; HEPES 5,0. Раствор непрерывно аэрировали карбогеном (5% CO₂ + 95% O₂) для поддержания pH равным 7,4.

После прогрева миографа до 37°C (40 мин) проводили процедуру нормализации (Mulvany, Halpern, 1977), в результате которой определялось растяжение препарата, оптимальное для проявления сократительной активности. Затем для активации препарата проводили несколько циклов сокращения-расслабления: путем добавления норадреналина (10 мкМ), серотонина (10 мкМ) или серотонина (10 мкМ) в 120 мМ KCl. Вызывали 2 или 3 сокращения длительностью 5 мин с 10-мин интервалами.

Измерение внутриклеточной концентрации свободного ионизированного кальция ($[Ca^{2+}]_i$). Для измерения $[Ca^{2+}]_i$ использовали индикатор fura 2, который обладает способностью к флуоресценции и в свободном от Ca²⁺, и в связанном с ним состоянии. Загрузку клеток сосуда проводили при 37°C с использованием ацетометильной формы индикатора (fura 2-AM).

В экспериментах на сосудах крыс разного возраста препараты инкубировали с 5 мкМ fura 2-AM, который предварительно растворяли в ДМСО (конечная концентрация ДМСО в растворе – 0,1%). Инкубацию проводили двукратно по 40 мин, заменяя раствор перед вторым периодом инкубации.

В экспериментах по исследованию эффектов денервации концентрация fura 2-AM в растворе составляла 6 мкМ, в качестве растворителя использовали смесь ДМСО, Cremophor EL и Pluronic F-127 (конечные концентрации в растворе: 0,16%, 0,3% и 0,007%, соответственно). Инкубацию проводили двукратно по 45 мин, заменяя раствор между инкубациями.

В обоих случаях эксперимент начинали после 20-мин отмывки препарата от избытка fura 2-AM. Для возбуждения флуоресценции препарат попеременно освещали ртутной (100 Вт) или ксеноновой (75 Вт) лампой при длине волны 340 нм (для fura 2, связанного с Ca²⁺) и 380 нм (для fura 2, свободного от Ca²⁺). Флуоресценцию регистрировали при 515-520 нм с использованием фотоумножителя, от которого сигнал поступал на персональный компьютер с соответствующим программным обеспечением.

В экспериментах на сосудах крыс разного возраста изменения $[Ca^{2+}]_i$ оценивали по отношению сигналов флуоресценции связанного с Ca²⁺ и свободного fura 2 (F340/F380). В экспериментах по исследованию эффектов денервации проводили калибровку сигнала флуоресценции по методике Jensen et al. (1992), что позволило определить истинные значения $[Ca^{2+}]_i$.

В экспериментах исследовали:

- реакции сосудов при активации α_1 -адренорецепторов метоксамином (поскольку в отличие от многих адреномиметиков метоксамин не захватывается нервными терминалями, с его использованием можно аккуратно сопоставлять реакции иннервированных и неиннервированных сосудов);
- реакции сосудов при активации рецепторов тромбоспандина агонистом U46619 («воздействие неадренергической природы»);
- реакции сосудов при «нерцепторной активации»: в ответ на добавление в окружающий раствор Ca^{2+} (0,03 – 3 мМ) на фоне деполяризации (120 мМ KCl). Для блокады действия норадреналина, выделяющегося при деполяризации из нервных окончаний, раствор содержал фентоламин (1 мкМ).

Все зависимости «концентрация-эффект» исследовали кумулятивно. Действие веществ в каждой концентрации длилось 3-5 мин, до стабилизации силы сокращения.

Обработка результатов. При обработке зависимостей «концентрация-эффект» определяли показания датчика силы и значение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в фоне (перед тестом) и при действии каждой из концентраций агониста (или Ca^{2+}), а затем для каждой из действующих концентраций вычисляли абсолютное изменение натяжения и $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В экспериментах на сосудах крыс разного возраста полученные значения нормировали на изменения при максимальном сокращении (10 мкМ серотонина в 120 мМ KCl). При исследовании эффектов денервации значения силы сокращения нормировали на ответ при максимальной концентрации агониста, значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ анализировали в ненормированном виде (в нМ).

По полученным данным для каждого из стимулов строили графики зависимости силы сокращения и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ от концентрации агониста (или $[\text{Ca}^{2+}]$ в растворе), а также зависимость силы сокращения от изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, что позволило сопоставить кальций-зависимость сокращения гладкой мышцы сосудов у разных групп крыс.

Fura-2 AM, Cremophor EL и Pluronic F-127 были получены из фирмы Molecular Probes (США), остальные фармакологические препараты – из фирмы Sigma (США).

Исследование экспрессии белков в гладкомышечных клетках сосудов

Разделение белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Экстракты тканей подвергали электрофорезу в пластинах полиакриламидного геля в присутствии анионного детергента (ДСН) и β -меркаптоэтанола по методу Леммли. В зависимости от массы разделяемых белков использовали 7% концентрирующий гель (0,5 мМ трис-HCl, pH 6,8, 0,4% ДСН) и 7,5, 10 и 12% разделяющие гели со стандартной сшивкой 2,7% (1,5 М трис-HCl, 0,4% ДСН, pH 8,8).

Иммуноблоттинг. Электроперенос белков на поливинилидендифлуоридные (PVDF) или нитроцеллюлозные мембраны (метод Western Blotting) проводили в буфере (0,025 М трис-0,192 М глицин, pH 8,3, 20%

этанол, 0,02% ДСН) сразу после завершения электрофореза. Электроперенос осуществляли с использованием прибора фирмы Biorad (Protean III для электропереноса, США) при силе тока 350 мА.

Время электропереноса для разных белков варьировало в зависимости от их молекулярной массы. Электроперенос РЛЦ миозина осуществляли в течение 40 мин, глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД), тяжелых цепей миозина, КЛЦМ, кальдесмона, МАРК p38 и МАРК p42/44 - в течение 60 мин, регуляторной субъединицы ФЛЦМ (МУРТ) – в течение 90 мин, а Rho-киназы - в течение ночи. Мембраны блокировали 1 ч при комнатной температуре 5% раствором сухого обезжиренного молока или 3% БСА (V фракция) на трис-солевом буфере с добавлением Tween 20 (ТСБТ: 20 мМ трис-НСl, рН 7,6, 20 мМ NaCl, 0,1% Tween 20). После блокирования неспецифического связывания мембрану отмывали тремя сменами ТСБТ по 10 мин и инкубировали с первичными антителами в 1% растворе обезжиренного молока или 1% БСА (V фракция) на ТСБТ в зависимости от определяемого белка. Затем в течение 1 ч мембрану инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, отмывали ТБСТ и проявляли с помощью хемилюминесцентной системы ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech).

В работе были использованы антитела к РЛЦ миозина (Sigma), КЛЦМ (K36) (Sigma), тяжелым цепям гладкомышечного миозина (Covance), МАРК p42-44 и МАРК p38 (Cell Signalling), МУРТ (AbCam), Rho-киназе (Bethil). Антитела к ГАФД были любезно предоставлены А.Г. Катрухой, а к кальдесмону – М.А. Крымским. Также использовали наборы вторичных антител (Amersham или Pierce).

Концентрацию белка в образцах ткани определяли по методу Шафнера и Вайсмана (Schaffner, Weissmann, 1973).

Обработка результатов. Полученные пленки сканировали, используя программу Quantity One (Bio-Rad Laboratories, США, 2000). Далее изображения обрабатывали в программе Image J (Scion Corporation, США).

Для каждого из исследуемых белков полученные данные нормировали на содержание ГАФД в тех же образцах. Данные литературы (Payne et al., 2005), а также результаты специально проведенных нами измерений свидетельствуют о том, что содержание ГАФД по отношению к общему белку в образцах ткани сосудов с возрастом и после денервации не изменяется.

В данных, полученных при сканировании каждой мембраны, усредняли значения, отражающие содержание данного белка в контрольных сосудах взрослых крыс. На это среднее нормировали значения, отражающие содержание белка в каждом из индивидуальных образцов данной мембраны (среднее значение для образцов взрослых крыс в контроле всегда равно 1). Нормирование данных на «взрослый контроль» позволило адекватно сопоставить содержание белка в сосудах разных групп крыс, а также объединить данные, полученные в разных сериях экспериментов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически

значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, n – объем выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика возрастных изменений морфологии сосудов крыс

Формирование нервного сплетения в подкожной артерии крысы происходит в первый месяц постнатального развития. В возрасте 3-5 дней нервные волокна в стенке подкожной артерии, как правило, отсутствуют. Формирование нервного сплетения начинается с 8-дневного возраста, с 11 по 14-й дни после рождения плотность периартериального нервного сплетения сильно увеличивается. В возрасте 24-28 дней в стенке артерии выявляется ярко флуоресцирующее сплетение нервных волокон, сопоставимое по плотности с сосудами взрослых крыс. Таким образом, формирование нервного сплетения в сосудах крыс происходит в первые недели постнатального развития и заканчивается к 1-месячному возрасту, что согласуется с данными других авторов (Todd, 1980; Sandow, Hill, 1999, Luff, 1999).

На основании полученных данных для дальнейших исследований были выбраны три возрастные группы крыс: «новорожденные» (возраст 3-8 дней, иннервация сосудов отсутствует или только начинает формироваться); «двухнедельные», (возраст 11-14 дней, период установления трофических влияний на сосуды); «взрослые» (возраст 2-3 месяца, законченные изменения гладкой мышцы сосудов вследствие трофического влияния симпатических нервов).

Взросление крыс сопровождается увеличением диаметра подкожной артерии (таблица 1). Величина максимального сократительного ответа при этом также растет, поскольку увеличивается количество слоев гладкомышечных клеток в стенке артерии (Sandow et al., 2004).

Таблица 1. Диаметр и величина максимального сокращения препаратов подкожной артерии у крыс разного возраста.

Группа крыс	Внутренний диаметр, мкм	Максимальное сокращение, мН/мм
Новорожденные (9)	190,0 \pm 10,4	0,82 \pm 0,04
Двухнедельные (9)	295,6 \pm 17,2	1,22 \pm 0,03
Взрослые (9)	389,9 \pm 17,8	4,36 \pm 0,27

Возрастное изменение Ca^{2+} -чувствительности сокращения подкожной артерии крысы

Ca^{2+} -зависимое сокращение гладкой мышцы сосудов с возрастом не изменяется. В экспериментах с постепенным повышением концентрации Ca^{2+} в наружном растворе на фоне деполяризации наружной мембраны у новорожденных, 2-недельных и взрослых крыс обнаружены одинаковые

изменения силы сокращения и F340/F380. Соответственно, зависимости «сила сокращения - F340/F380», построенные для трех групп крыс, достоверно не различаются (рис. 1). Это свидетельствует о том, что в отсутствие рецепторной стимуляции Ca^{2+} -зависимость сокращения гладкой мышцы сосудов с возрастом не изменяется.

Такое наблюдение согласуется с данными литературы, согласно которым «собственная» чувствительность сократительного аппарата к Ca^{2+} с возрастом может снижаться в артериях эластического типа (Акоров et al., 1997-1998), портальной вене (Brus, Nixon, 1997), мочевом пузыре (Ekman et al., 2005), но остается неизменной в артериях мышечного типа (Акоров et al., 1997-1998; Charles et al., 2007), к которым относится и подкожная артерия крысы.

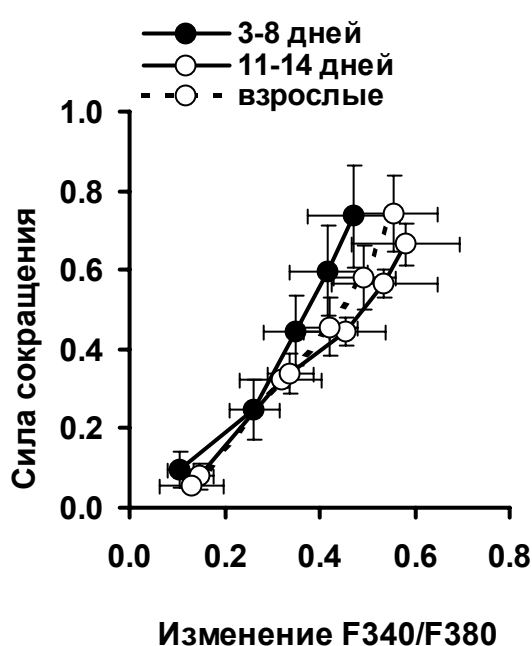


Рисунок 1. Зависимость силы сокращения от F340/F380 ($[Ca^{2+}]_i$) для сосудов новорожденных (n=5), 2-недельных (n=4) и взрослых (n=6) крыс в экспериментах с повышением наружной концентрации Ca^{2+} на фоне деполяризации наружной мембраны гладкомышечных клеток (120 мМ KCl). Значения силы и F340/F380 нормированы на соответствующие значения при действии 10 мкМ серотонина в 120 мМ KCl.

При активации рецепторов, связанных с G-белками, Ca^{2+} -чувствительность сократительного аппарата с возрастом уменьшается. Совершенно иная картина, чем при нерелепторной стимуляции, наблюдается при сокращении сосудов в ответ на метоксамин (рис. 2 А-В). У крыс разного возраста одинаковая сила сокращения (рис. 2А) развивалась при существенно различающемся изменении $[Ca^{2+}]_i$, что следует из изменений F340/F380 (рис. 2Б). У взрослых крыс сокращение развивалось на фоне значительного повышения $[Ca^{2+}]_i$, в то время как у новорожденных крысят $[Ca^{2+}]_i$ практически не изменялась. Соответственно, угол наклона зависимости «сила сокращения-F340/F380» у трех групп крыс сильно различается: у новорожденных крысят эта зависимость расположена почти вертикально, а у взрослых - наиболее пологая (рис. 2В).

Сходные результаты были получены при действии агониста рецепторов тромбоксана – U46619 (рис. 2Г). Таким образом, феномен снижения Ca^{2+} -чувствительности с возрастом не специфичен для α_1 -адренорецепторов,

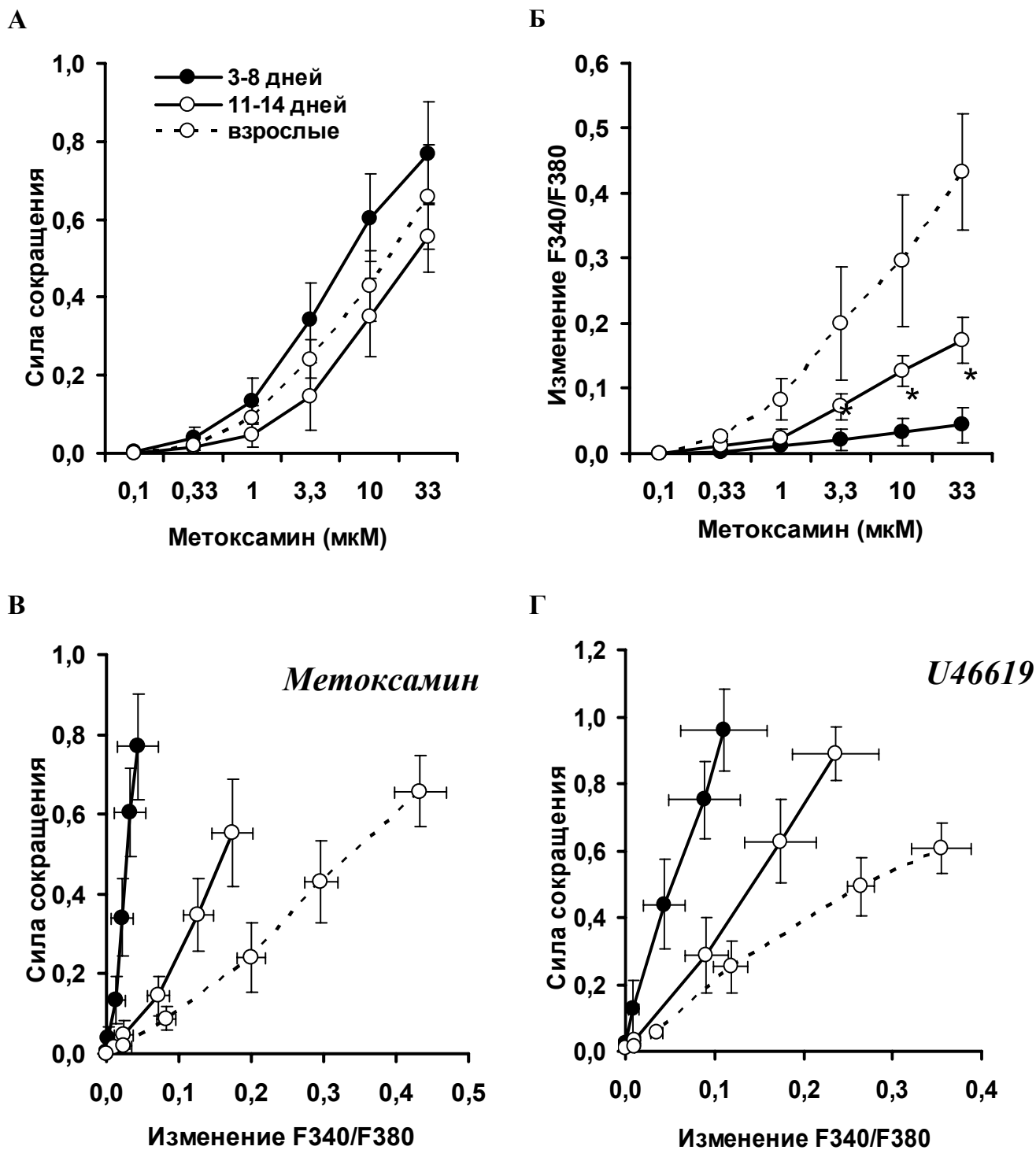


Рисунок 2. Изменения силы сокращения и F340/F380 ($[Ca^{2+}]_i$) у крыс разного возраста, зарегистрированные при действии метоксамина (А-В) и U46619 (Г). В экспериментах с метоксamiном использованы 6 препаратов новорожденных, 4 – 2-недельных и 6 – взрослых крыс; в экспериментах с U46619 число препаратов равно 7, 6 и 6, соответственно. Значения силы и F340/F380 нормированы на соответствующие значения при действии 10 мкМ серотонина в 120 мМ KCl. * $p < 0,05$ по сравнению с взрослыми.

поскольку он наблюдается и при активации рецепторов другого типа. Это свидетельствует о том, что механизмы, ответственные за изменение Ca^{2+} -чувствительности при созревании гладкой мышцы сосудов, являются общими и реализуются не на уровне рецепторов и активируемых ими G-белков, а на последующих этапах фармакомеханического сопряжения.

Для количественного анализа зависимостей «сила сокращения-F340/F380» и статистической обработки данных у трех групп крыс определяли изменение F340/F380 ($[Ca^{2+}]_i$), необходимое для повышения натяжения стенки до 40% от максимума (т.е. до значения «0,4» на рис. 1, 2В и 2Г). Результаты вычислений приведены на рис. 3. Видно, что при действии метоксамина изменение $[Ca^{2+}]_i$ у новорожденных и 2-недельных крыс значительно меньше по сравнению со взрослыми (в среднем на 94% и 52% соответственно). Такая же закономерность наблюдается и при действии U46619: в этом случае у новорожденных крыс повышение $[Ca^{2+}]_i$ на 80 % меньше, чем у взрослых, а у 2-недельных – на 42%. В экспериментах с повышением внеклеточной концентрации Ca^{2+} различий между группами крыс не наблюдается.

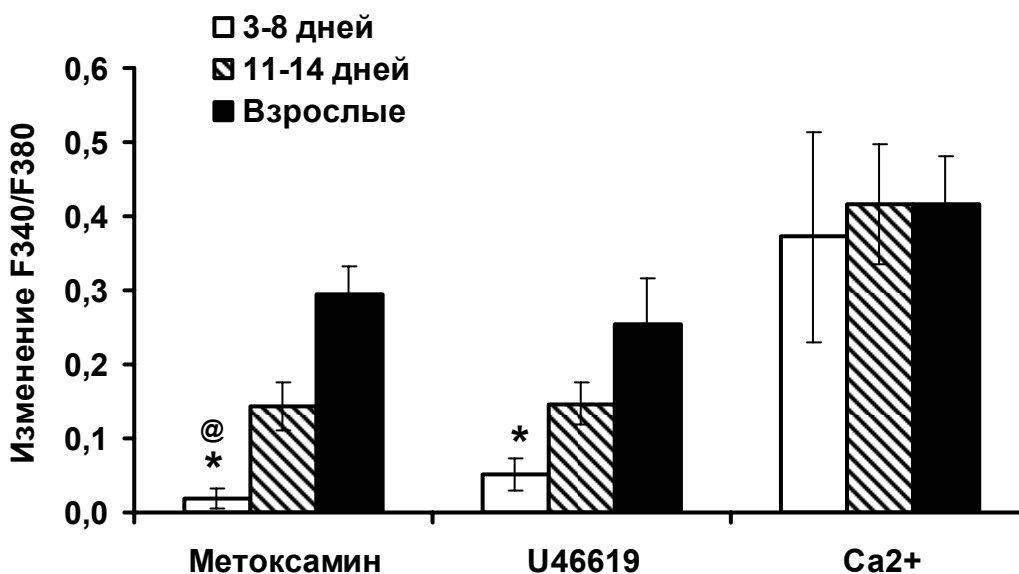


Рисунок 3. Изменение F340/F380 ($[Ca^{2+}]_i$), необходимое для развития силы, составляющей 40% от максимального значения, при сокращении в ответ на метоксамин, U46619 и на повышение наружной концентрации Ca^{2+} на фоне деполяризации (120мМ KCl) для препаратов подкожной артерии новорожденных, 2-недельных и взрослых крыс. * $p < 0,05$ по сравнению с взрослыми; @ $p < 0,05$ по сравнению с изменением F340/F380 у этой группы крыс при нерезепторной стимуляции.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что созревание симпатической иннервации сопровождается уменьшением Ca^{2+} -чувствительности сократительного аппарата гладкомышечных клеток сосудов.

Данные литературы о возрастном изменении Ca^{2+} -чувствительности при сокращении гладкой мышцы не очень многочисленны, но единодушны. Снижение значимости этого механизма с возрастом показано для артерий мозга овцы и кролика (Акоров et al., 1997-1998; Sandovall et al, 2007), бедренной артерии кролика (Акоров et al., 1998), портальной вены крысы (Brus, Nixon, 1997), то есть оно характерно для гладкой мышцы артерий эластического и мышечного типа, а также вен. Однако наша работа является первой, где обнаружены возрастные изменения Ca^{2+} -сенситизации при сокращении периферических резистивных сосудов.

Изменение Ca^{2+} -чувствительности сокращения подкожной артерии крысы при симпатической денервации

После удаления поясничных симпатических ганглиев внутренний диаметр контрольных ($548,2 \pm 20,4$ мкм, $n=8$) и денервированных ($529,6 \pm 24,0$ мкм, $n=9$) препаратов не различался. Также не обнаружено различий в величине максимального сокращения препаратов: контроль - $8,70 \pm 0,46$ мН/мм, после денервации - $7,97 \pm 0,51$ мН/мм. Это свидетельствует о том, что сравнительно кратковременное (в течение 2-3 нед) устранение симпатической иннервации у взрослых крыс не приводит к структурным изменениям стенки артерии (а именно, толщины меди).

Даже в отсутствие стимуляции денервированные препараты развивали спонтанный миогенный тонус. В среднем миогенное сокращение денервированных препаратов составило $1,01 \pm 0,17$ мН/мм ($n=8$), тогда как для иннервированных препаратов оно было незначительным ($0,22 \pm 0,05$ мН/мм, $n=9$, $p < 0,05$). Базальное значение $[Ca^{2+}]_i$ в денервированных сосудах ($121,0 \pm 15,2$ нМ, $n=9$) также было выше, чем в контроле ($79,4 \pm 11,6$ нМ, $n=8$, $p < 0,05$). Феномен усиления миогенной активности сосудов после денервации был описан ранее (Fleming, 1999). Его причиной служит стойкая деполяризация мембраны гладкомышечных клеток, которая провоцирует вход в клетки Ca^{2+} через потенциалуправляемые каналы (в основном, L-типа).

Денервация сосудов взрослых крыс приводит к Ca^{2+} -сенситизации сокращения гладкой мышцы.

Как видно из рис. 4А, денервированные сосуды характеризуются более высокой чувствительностью к метоксамину. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ при низких концентрациях метоксамина для денервированных сосудов также несколько больше, чем в контроле. Однако при дальнейшем повышении концентрации метоксамина кривые пересекаются и, начиная с концентрации $1,6$ мкМ, зависимость для денервированных сосудов лежит значительно ниже, чем для контрольных сосудов.

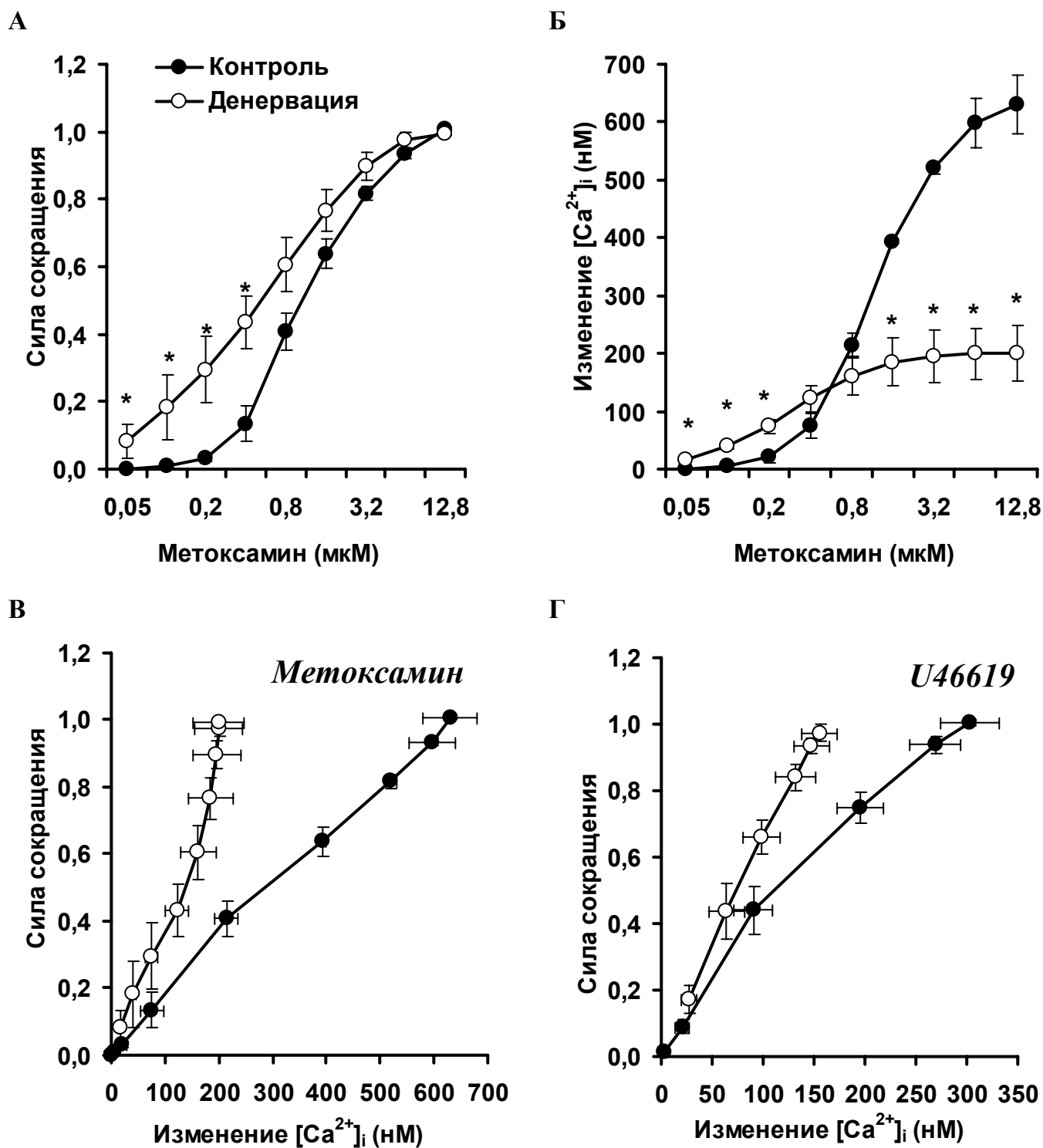


Рисунок 4. Изменения силы сокращения и $[Ca^{2+}]_i$ для денервированных и иннервированных артерий взрослых крыс, зарегистрированные при действии метоксamina (А-В) и U46619 (Г).

В экспериментах с метоксamiном использованы 3 денервированных и 3 контрольных препарата, в экспериментах с U46619 число препаратов равно 5 и 6, соответственно. Значения силы нормированы на величину максимального сокращения при действии метоксamina (А, В) или U46619 (Г). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Угол наклона зависимости «сила сокращения-[Ca²⁺]_i», для денервированных препаратов значительно больше, чем в контроле (рис. 4В). Такой характер расположения кривых свидетельствует о том, что для развития сходного усилия денервированным препаратам требуется меньшее повышение [Ca²⁺]_i. Сходные результаты получены при действии агониста тромбоксановых рецепторов (рис. 4Г).

Для сравнения кальций-зависимости сокращения гладкой мышцы иннервированных и денервированных сосудов вычисляли изменение [Ca²⁺]_i, необходимое для развития натяжения стенки сосуда до 40% от максимума, а также вычисляли изменение [Ca²⁺]_i, необходимое для 80% максимального сокращения.

Как видно из рис. 5, повышение [Ca²⁺]_i, соответствующее 40% сокращению, в денервированных сосудах по сравнению с иннервированными при действии метоксамина уменьшено в среднем на 56%, а при действии U46619 – на 30%. В случае 80% сокращения различия между двумя группами сосудов еще более значительные: для метоксамина - 64%, а для U46619 – 45%. Таким образом, после денервации сокращение гладкой мышцы меньше зависит от повышения [Ca²⁺]_i, чем в контроле.

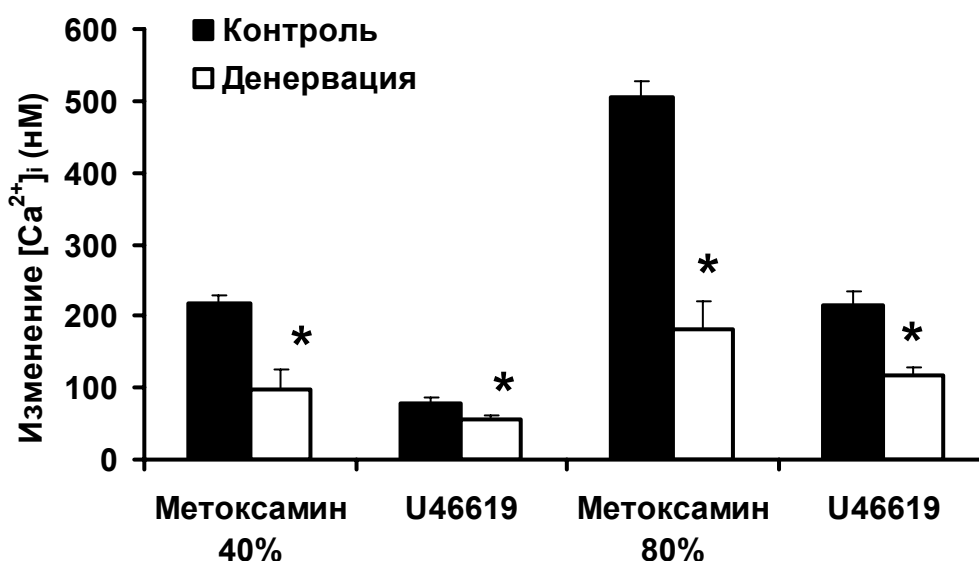


Рисунок 5. Изменение [Ca²⁺]_i, необходимое для развития силы, составляющей 40% и 80% от максимального значения, при сокращении иннервированных и денервированных сосудов в ответ на метоксамин и U 46619.

* p<0,05 по сравнению с контролем.

Ранее проблема Ca²⁺-чувствительности сокращения гладкой мышцы после денервации исследовалась лишь в одной работе (Ramos et al., 1985). В ней использовали препараты семявыносящего протока, но не сосудов, после грубого скинирования тритоном X-100. Оцениваемая таким образом Ca²⁺-чувствительность сократительного аппарата оказалась выше для

денервированных препаратов. Однако так и осталось невыясненным, как при денервации работают сигнальные пути, запускаемые регуляторами-лигандами рецепторов наружной мембраны и обеспечивающие Ca^{2+} -сенситизацию сократительного аппарата.

Сопоставление данных, полученных в двух сериях экспериментов (с использованием сосудов новорожденных крыс и денервированных сосудов) позволяет сделать следующее заключение. В обоих случаях при действии агонистов гладкая мышца сосудов, лишенная симпатической иннервации, по сравнению с иннервированными сосудами, развивает сокращение на фоне менее значительного повышения $[Ca^{2+}]_i$.

Влияние возраста и денервации на экспрессию сократительных и регуляторных белков в гладкомышечных клетках подкожной артерии

Наши результаты свидетельствуют о том, что процесс дифференцировки гладкомышечных клеток в подкожной артерии крысы к моменту рождения еще не завершен. Особенно ярко на это указывают данные об экспрессии изоформ кальдесмона (рис. 6 А-Б). У новорожденных крыс в значительном количестве экспрессируется *l*-изоформа, которая не характерна для дифференцированных гладкомышечных клеток (Ueki et al, 1987; Iijima et al., 2001). Созревание гладкой мышцы сопровождается переключением экспрессии кальдесмона на *h*-изоформу.

Вместе с тем, в сосудах новорожденных крыс уже имеется сформированный сократительный аппарат, о чем свидетельствует достаточно высокий уровень экспрессии тяжелых цепей гладкомышечного миозина (данные не представлены). Интересно, что содержание РЛЦ миозина у новорожденных крыс значительно выше, чем у взрослых (данные не представлены), то есть соотношение РЛЦ и тяжелых цепей миозина в гладкомышечных клетках сосудов новорожденных крыс значительно увеличено по сравнению со взрослыми. Можно предположить, что значительная часть миозина в сосудах новорожденных животных представлена немышечной изоформой, которая замещается гладкомышечной на ранних этапах постнатального развития (Eddinger, Meer, 2007; Hutanu et al., 2007). При этом немышечный миозин также может участвовать в развитии сокращения: его ингибирование блеббистатином не влияет на сократительный ответ гладкомышечных препаратов мочевого пузыря взрослых мышей, но уменьшает его у новорожденных (Ekman et al., 2005).

После денервации экспрессия тяжелых и РЛЦ миозина не изменяется (данные не представлены), что согласуется с отсутствием изменений максимального сокращения.

Содержание белков, регулирующих Ca^{2+} -зависимое сокращение гладкой мышцы

Созревание гладкой мышцы сопровождается увеличением экспрессии двух основных мишеней комплекса Ca^{2+} -кальмодулин: КЛЦМ (рис. 6В) и *h*-кальдесмона (рис. 6Б). В сосудах новорожденных крыс содержание КЛЦМ

уменьшено на 42%, а *h*-кальдесмона – на 57% по сравнению со взрослыми животными. Такое повышение экспрессии КЛЦМ согласуется с данными литературы (Belik et al., 2005). Денервация гладкой мышцы сосудов приводит к обратному изменению (снижению) экспрессии обоих белков – и КЛЦМ, и *h*-кальдесмона (рис. 6Б,В).

Экспрессии регуляторной субъединицы ФЛЦМ (МУРТ) у новорожденных крысят также снижена по сравнению со взрослыми животными (на 30% - рис. 6Г). Денервация приводит к двукратному снижению экспрессии МУРТ по сравнению с контролем.

Таким образом, созревание гладкой мышцы сосудов в постнатальном периоде сопровождается повышением экспрессии белков, регулирующих Ca^{2+} -зависимое сокращение гладкой мышцы. Денервация сосудов обращает эти изменения, то есть приводит к снижению экспрессии этих белков.

Содержание белков, потенцирующих сокращение по Ca^{2+} -независимому пути

Согласно данным, представленным на рис. 7А, экспрессия Rho-киназы в сосудах крысят (новорожденных и 2-недельных) увеличена по сравнению со взрослыми крысами приблизительно в 1,6 раза. Однако между денервированными и иннервированными сосудами взрослых крыс различий в экспрессии этого белка не обнаружено.

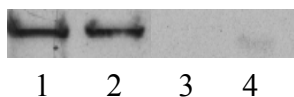
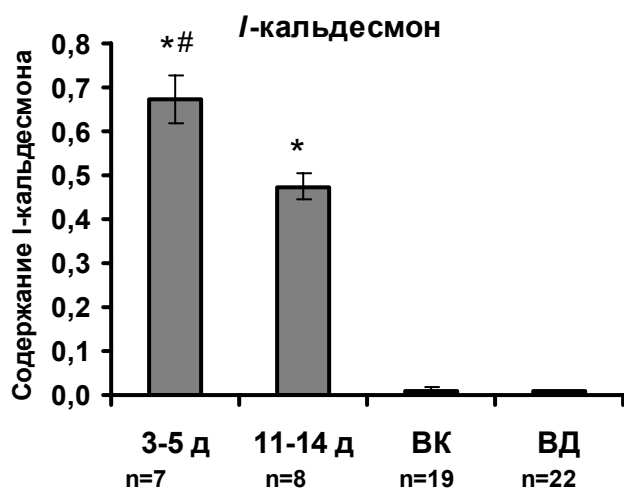
Экспрессия MAP-киназ с возрастом значительно падает (рис. 7Б и 7В). У новорожденных крысят содержание MAPK p42/44 и MAPK p38 больше, чем у взрослых: в 4,6 и 3,7 раза соответственно. Существенные различия в экспрессии этих регуляторных белков наблюдаются также между контрольными и денервированными сосудами взрослых крыс. После денервации экспрессия обеих MAPK возрастает: MAPK p42/44 - в 1,7 раза, а MAPK p38 – в 1,9 раза. Таким образом, с возрастом экспрессия MAPK в гладкомышечных клетках снижается, но вновь возрастает после денервации сосудов.

Таким образом, с возрастом происходит снижение экспрессии регуляторных белков, обеспечивающих Ca^{2+} -независимую регуляцию сокращения гладкой мышцы по миозиновому (Rho-киназа) и актиновому (MAP-киназы) механизмам. Интересно, что денервация сосудов приводит к увеличению экспрессии MAP-киназ.

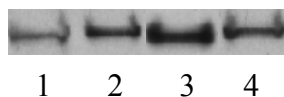
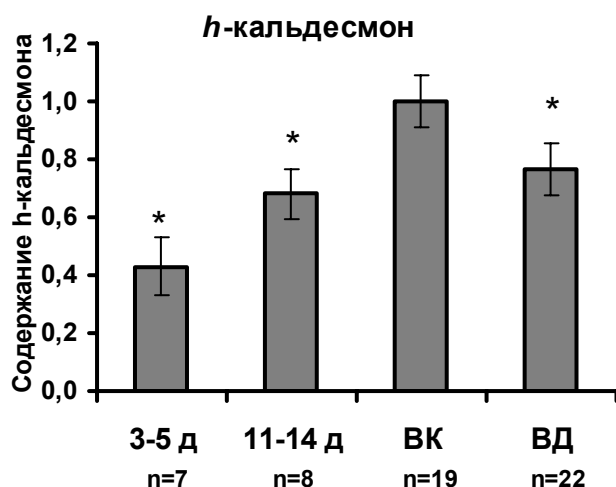
В данной работе был исследован уровень экспрессии регуляторных белков, но не уровень их активности в гладкомышечной ткани. Следует заметить, что увеличение экспрессии МУРТ с возрастом обычно сопровождается повышением общей активности ФЛЦМ (Belik et al., 2005; Ekman et al., 2005; Payne et al., 2006), причем это может наблюдаться и при неизменном содержании каталитической субъединицы ФЛЦМ (Belik et al., 2005).

Далее, мы имеем косвенные свидетельства тому, что активность Rho-киназы в подкожной артерии крысы с возрастом также снижается. Согласно результатам, полученным С.В. Мочаловым (пока не опубликовано), селективный ингибитор Rho-киназы Y27632 намного сильнее подавляет сокращение препаратов подкожной артерии у новорожденных крыс, чем у взрослых. Примечательно, что такое уменьшение сократительного ответа не

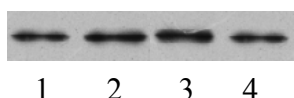
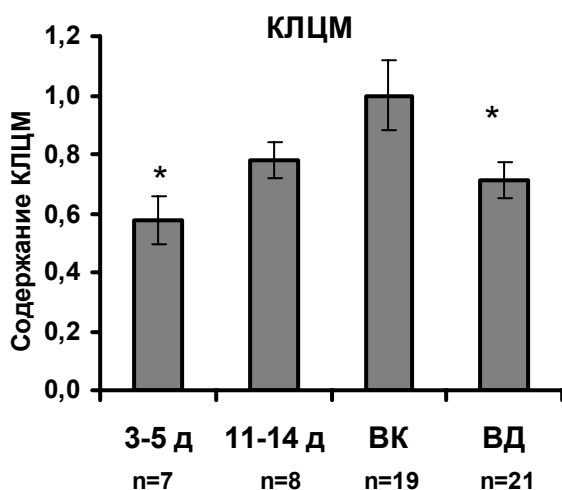
А



Б



В



Г

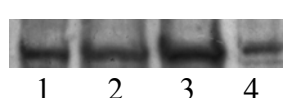
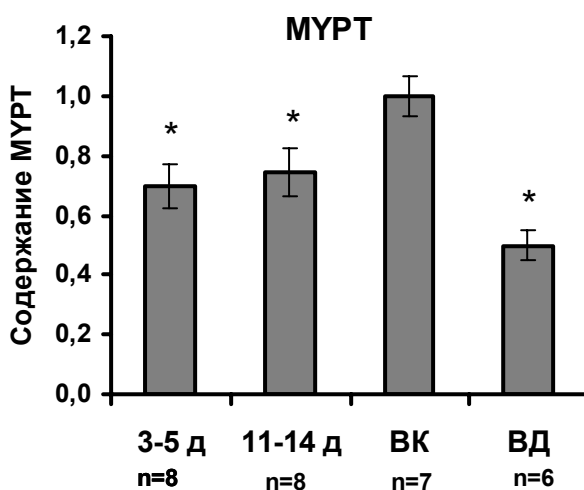
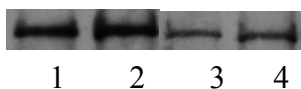
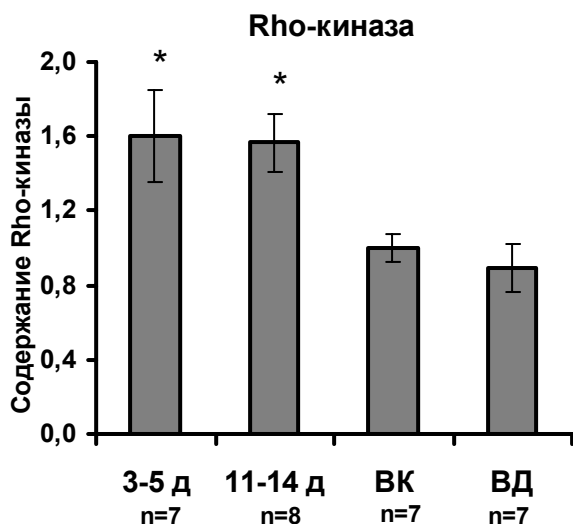


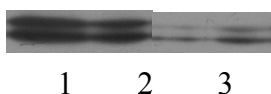
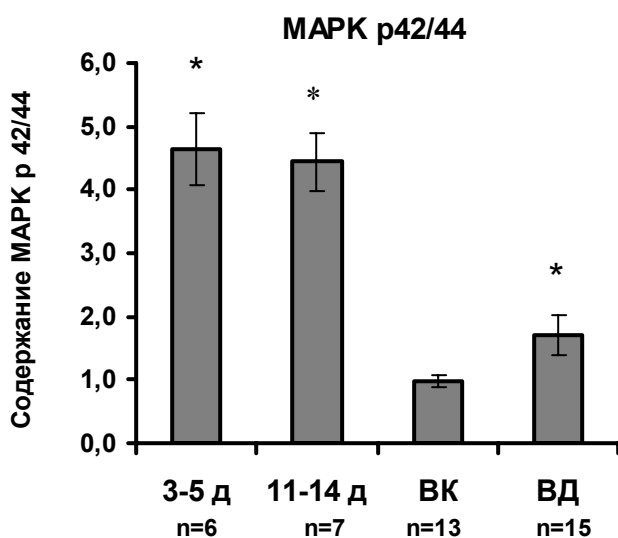
Рисунок 6. Содержание *l*-кальдесмона (А), *h*-кальдесмона (Б), киназы легких цепей миозина (В) и регуляторной субъединицы фосфатазы легких цепей миозина – МУРТ (Г) в образцах подкожной артерии крыс в возрасте 3-5 дней, 11-14 дней, взрослых контрольных (ВК) и взрослых после денервации (ВД). Содержание белков нормировано на среднее значение в группе ВК (за исключением *l*-кальдесмона, содержание которого нормировано на среднее для *h*-кальдесмона в группе ВК).

Условные обозначения: 1 – 3-5 дней; 2 – 11-14 дней; 3 – взрослые-контроль; 4 – взрослые-денервация. * $p < 0,05$ по сравнению с ВК, # $p < 0,05$ по сравнению с крысами в возрасте 11-14 дней; *n* – число образцов в группе.

А



Б



В

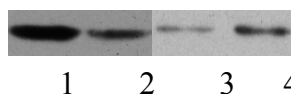
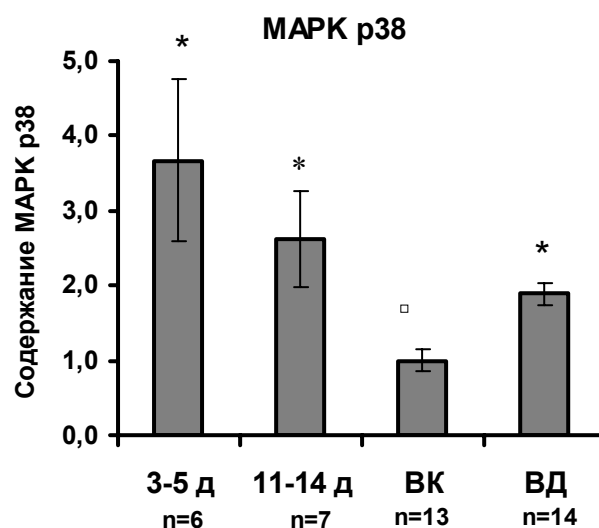


Рисунок 7. Содержание Rho-киназы (А) и митоген-активируемых протеинкиназ: MAPK p42/44 (Б) и MAPK p38 (В) в образцах подкожной артерии у в образцах подкожной артерии крыс в возрасте 3-5 дней, 11-14 дней, взрослых контрольных (ВК) и взрослых после денервации (ВД). Содержание белков нормировано на среднее значение в группе ВК.

Условные обозначения: 1 – 3-5 дней; 2 – 11-14 дней; 3 – взрослые-контроль; 4 – взрослые-денервация. * $p < 0,05$ по сравнению с ВК; n – число образцов в группе.

сопровождается снижением $[Ca^{2+}]_i$. Об уменьшении роли Rho-киназного пути в сокращении гладкой мышцы при взрослении организма свидетельствуют и данные литературы (Belik et al., 2005; Ekman et al., 2005).

В отличие от MAP-киназ, экспрессия Rho-киназы после денервации не изменяется. Тем не менее, ранее было показано, что, как и сосуды новорожденных крыс, денервированные сосуды более чувствительны к ингибирующему действию Y27632 (Tarasova et al., 2006). В связи с этим нельзя исключить, что после денервации роль Rho-киназного сигнального пути все же повышается, но не за счет увеличения экспрессии самой Rho-киназы, а в результате обнаруженного нами снижения экспрессии МУРТ, путем фосфорилирования которой Rho-киназа ингибирует ФЛЦМ и тем самым провоцирует сокращение гладкой мышцы.

В данной работе остался неисследованным еще один Ca^{2+} -независимый механизм – ингибирование ФЛЦМ через протеинкиназу С. Однако наши результаты, а также данные литературы дают основание полагать, что в регуляции сокращения подкожной артерии крысы этот путь задействован в меньшей степени, чем ингибирование ФЛЦМ Rho-киназой. Ни у новорожденных, ни у взрослых крыс, как в контроле, так и после денервации, ингибитор протеинкиназы С GF 109203X не оказывает видимых эффектов на сокращение препаратов подкожной артерии (С.В. Мочалов, пока не опубликовано, Tarasova et al., 2006). Основываясь на этих наблюдениях, мы пришли к заключению, что протеинкиназа С не играет большой роли в регуляции сократительной активности подкожной артерии крысы и сочли возможным исключить ее из числа анализируемых регуляторных каскадов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты, полученные в данной работе, суммированы в приведенной ниже таблице. Видно, что в большинстве случаев созревание симпатической иннервации в постнатальном периоде и денервация приводят к противоположным изменениям регуляции сокращения гладкой мышцы и уровня экспрессии ключевых регуляторных белков.

С возрастом происходит десенситизация сократительного аппарата подкожной артерии к Ca^{2+} (т.е., снижается Ca^{2+} -чувствительность сокращения за счет подавления Ca^{2+} -независимых сигнальных каскадов, запускаемых рецепторами, связанными с G-белками). После устранения симпатической иннервации во взрослом возрасте происходит обратный процесс Ca^{2+} -сенситизации сократительного аппарата и Ca^{2+} -чувствительность сокращения, напротив, увеличиваются. Такие противоположные изменения дают основание полагать, что трофическое влияние симпатических нервов имеет важное значение для постнатального формирования механизмов регуляции сокращения гладкой мышцы, характерных для данного сосуда.

Таблица 2. Изменение регуляции сокращения подкожной артерии крысы, происходящие с возрастом (при созревании симпатической иннервации сосудов) и после денервации.

ПАРАМЕТРЫ	Изменения с возрастом	Изменения после денервации	
<i>Ca²⁺-сенситизация сокращения</i>	↓	↑	} Ca²⁺-зависимая регуляция
<i>Тяжелые цепи миозина</i>	=	=	
<i>Регуляторные легкие цепи миозина</i>	↓↓	=	
<i>h-кальдесмон</i>	↑	↓	
<i>Киназа легких цепей миозина</i>	↑	↓	
<i>Регуляторная субъединица фосфатазы легких цепей миозина</i>	↑	↓	
<i>Rho-киназа</i>	↓	=	} Ca²⁺-независимая регуляция
<i>МАРК p42/44</i>	↓↓	↑	
<i>МАРК p38</i>	↓↓	↑	

Трофическое влияние симпатических нервов реализуется через изменение белкового состава гладкомышечных клеток. При этом следует отметить, что зависимость экспрессии разных белков от иннервации неодинакова. Из таблицы 2 видно, что содержание основных сократительных белков, исследованное в данной работе на примере миозина, после денервации не изменяется. То есть структура сократительного аппарата сосудов определяется не только влиянием иннервации, но и действием других факторов.

Вместе с тем, очевидно, что влияние симпатических нервов приводит к изменению экспрессии многих регуляторных белков. При этом изменения, характерные для данного белка, определяются его ролью в регуляции сокращения гладкой мышцы.

При созревании симпатической иннервации сосудов повышается значимость Ca²⁺-зависимых механизмов сокращения гладкой мышцы. Во-первых, растет экспрессия КЛЦМ, что обеспечивает увеличение фосфорилирования РЛЦ миозина. Во-вторых, увеличивается содержание кальдесмона, который совместно с Ca²⁺-кальмодулином регулирует тропомиозиновый блок актомиозинового взаимодействия.

Примечательно, что содержание регуляторной субъединицы ФЛЦМ (МУРТ) с возрастом также растет, что, вероятно, соответствует повышению активности ФЛЦМ. То есть происходит однонаправленное изменение активности двух ключевых ферментов, регулирующих фосфорилирование РЛЦ миозина. Вероятно, именно этим объясняется тот факт, что базальная Ca^{2+} -зависимость сократительного аппарата (регистрируемая при КС-деполяризации) с возрастом не изменяется.

Значимость механизмов, регулирующих сокращение относительно независимо от изменений внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , с возрастом, напротив, падает, а после денервации растет. В сосудах, лишенных иннервации, увеличено содержание MAP-киназ, которые могут усиливать сокращение путем ослабления кальдесмон-тропомиозинового блока и/или активации КЛЦМ; влияние MAP-киназ может облегчаться вследствие снижения содержания кальдесмона. Кроме того, в неиннервированных сосудах может быть увеличена просократительная роль Rho-киназного механизма. Усиление Ca^{2+} -независимой регуляции должно облегчать поддержание тонического сокращения сосудов. Следует отметить, что такой способ сокращения выгоден в энергетическом отношении, поскольку не требует дополнительных затрат АТФ на фосфорилирование РЛЦ миозина.

В каких же физиологических условиях может использоваться такой способ регуляции сокращения? Очевидно, что повышение роли Ca^{2+} -сенситизации в сокращении гладкой мышцы может обеспечивать поддержание тонуса сосудов и уровня артериального давления в период, когда еще отсутствует вазомоторная симпатическая регуляция. Оно может усиливать действие циркулирующих в крови вазоконстрикторных веществ: катехоламинов надпочечников, ангиотензина II и других.

Если нарушение иннервации сосудов происходит во взрослом возрасте, сниженная вследствие симпатических влияний Ca^{2+} -чувствительность сократительного аппарата вновь растет, что также способствует тоническому сокращению сосудов и обеспечивает поддержание кровотока через орган.

С другой стороны, для быстрой регуляции тонуса сосудов наиболее оптимален Ca^{2+} -зависимый механизм, поскольку Ca^{2+} -независимая регуляция сокращения более инертна. Она, как правило, реализуется в сосудах тонического типа и сопряжена с медленным расслаблением гладкой мышцы. Поэтому снижение Ca^{2+} -чувствительности сократительного аппарата сосудов может быть необходимым условием для динамической регуляции тонуса сосудов симпатическими регуляторными влияниями. Возможно, в разных сосудах этот феномен реализуется неодинаково, поскольку плотность иннервации артериальных сосудов в разных органах может существенно различаться (Фолков, Нил, 1976). Можно предположить, что снижение Ca^{2+} -чувствительности сокращения характерно в основном для сосудов, тонус которых во взрослом организме регулируется преимущественно нервным механизмом. В частности, к таким сосудам относятся артерии, приносящие кровь к коже, одной из которых и является подкожная артерия крысы.

ВЫВОДЫ

1. Сплетение адренергических волокон в стенке подкожной артерии крысы формируется в течение первого месяца постнатального развития.
2. При деполяризации наружной мембраны KCl сокращение сосудов новорожденных и взрослых крыс развивается на фоне одинакового повышения $[Ca^{2+}]_i$. Однако при активации рецепторов, сопряженных с G-белками, достижение одинаковой силы сокращения требует большего повышения $[Ca^{2+}]_i$ у взрослых крыс, чем у новорожденных, что свидетельствует о снижении роли Ca^{2+} -сенситизации в сокращении сосудов при постнатальном созревании.
3. Денервация подкожной артерии у взрослых крыс, напротив, приводит к повышению Ca^{2+} -сенситизации сокращения гладкой мышцы сосудов.
4. Постнатальное созревание гладкой мышцы сосудов сопровождается переключением экспрессии кальдесмона с *l*- на *h*-изоформу. Экспрессия тяжелых цепей гладкомышечного миозина с возрастом не изменяется, а регуляторных легких цепей миозина значительно падает. С возрастом в подкожной артерии происходит увеличение экспрессии белков, регулирующих Ca^{2+} -зависимое сокращение гладкой мышцы (киназы легких цепей миозина, регуляторной субъединицы фосфатазы легких цепей миозина и *h*-кальдесмона), и снижение экспрессии белков, обеспечивающих Ca^{2+} -сенситизацию сократительного аппарата (MAP-киназы и Rho-киназы).
5. После денервации происходят обратные изменения в экспрессии киназы легких цепей миозина, регуляторной субъединицы фосфатазы легких цепей миозина, *h*-кальдесмона и MAP-киназы. Эти белки могут рассматриваться как внутриклеточные мишени трофического влияния симпатических нервов на кровеносные сосуды.

Автор искренне благодарен профессору Р. Шуберту (Институт физиологии университета г. Росток), профессору К. Олкеру (Институт физиологии университета г. Орхус), профессору В.П. Ширинскому (ФГУ РКНПК РЗ РФ) и Т.В. Кудряшовой (ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова) за предоставленную возможность проведения исследований и неоценимую помощь в планировании экспериментальной работы и обсуждении результатов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тарасова О.С., Солуянова И.А., **Пуздрова В.А.**, Боровик А.С., Швалев В.Н. Последствия денервации подкожной артерии крысы при нормальном и сниженном давлении крови. Тезисы докладов конференции «Центральные и периферические механизмы вегетативной нервной системы», Донецк, 3-6 июня 2003 г., с. 50.
2. Тарасова О.С., **Пуздрова В.А.**, Каленчук В.У. Повышение чувствительности сосудов к констрикторным влияниям после денервации и снижении давления крови. Тезисы докладов конференции «Механизмы функционирования висцеральных систем», Санкт-Петербург, 29 сентября-01 октября 2003 г., с. 316-317.
3. **Пуздрова В.А.**, Тарасова О.С. Влияние трансмурального давления на характеристики нервного сплетения в стенке подкожной артерии крысы. Тезисы докладов III Всероссийской школы-конференции по физиологии кровообращения, Москва, 27–30 января 2004 г., с. 82.
4. Tarasova O.S., Kalentchuk V.U., **Puzdrova V.A.**, Borovik A.S. The impact of chronically lowered transmural pressure on post-denervation hypersensitivity of vascular smooth muscle to constrictor agents. Abstracts of the International Symposium "Biological motility", Puschino, 2004, p.157-158.
5. **V.A. Puzdrova**, O.S. Tarasova, R. Schubert. Calcium sensitivity of smooth muscle contraction in vessels from newborn rats. International Symposium "Biological Motility: Basic Research and Practice" Pushchino, May 11–15, 2006, p.137-138.
6. Тарасова О.С., **Пуздрова В.А.**, Каленчук В.У., Кошелев В.Б. Повышение чувствительности гладкой мышцы сосудов к констрикторным влияниям после денервации и при снижении давления крови. Биофизика, 2006, т. 51 (№5), с. 912-917.
7. О.С. Тарасова, **В.А. Пуздрова**, С.В. Мочалов, Д.К. Гайнуллина, Р. Шуберт, В.У. Каленчук, Т.В. Кудряшова, А.В. Воротников. К вопросу о трофическом влиянии симпатических нервов на кровеносные сосуды: регуляция чувствительности сократительного аппарата к ионам кальция - Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. 2007, т.3 (№1), с.49.
8. О.С. Тарасова, **В.А. Пуздрова**, С.В. Мочалов, В.У. Каленчук, Т.В. Кудряшова, А.В. Воротников. Внутриклеточные мишени трофического влияния симпатических нервов на кровеносные сосуды. Тезисы докладов XX Съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова, Москва, 4–8 июня 2007 г., с. 440.
9. Тарасова О.С., **Пуздрова В.А.**, Мочалов С.В., Гайнуллина Д.К., Шуберт Р., Каленчук В.У., Кудряшова Т.В., Воротников А.В. Трофическое влияние симпатических нервов на кровеносные сосуды связано с изменением активности белков, регулирующих актомиозиновое взаимодействие в гладкомышечных клетках - V Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем» Санкт-Петербург, Россия, 16–19 октября 2007 г., с. 306-307.
10. **В.А. Пуздрова**, Р.А. Каргина-Терентьева, О.С. Тарасова. Влияние хронической гипотензии на адренергическое нервное сплетение *a. saphena* и его регенерацию после повреждения бедренного нерва. Морфология. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии (Принято к печати).