АЛ. Зашихин¹, Я. Селин² и А.О. Бармина¹

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛАДКИХ МИОЦИТОВ

¹ Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А.Л. Зашихин), Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск; ² Департамент интегративной медицинской биологии (дир. — проф. Я. Селин), Умео университет, г. Умео, Швеция, e-mail: zashihin2@atknet.ru

Проведен сравнительный анализ базального уровня цитоплазматического кальция в интактных изолированных гладких миоцитах (ГМ) с различными фенотипами, полученными из тонкой кишки мыши, и динамики изменения его концентрации при стимуляции сокращения. Исследование проведено на изолированных ГМ, полученных методом ферментной диссоциации ткани с помощью коллагеназы. Использована конфокальная и флюоресцентная микроскопия с соответствующими маркерами (Fura-2AM для анализа концентрации кальция и MitoTracker Red — для изучения активности митохондрий). Установлено, что ГМ разных фенотипов, несмотря на некоторые различия в базальном уровне цитоплазматического Ca²⁺, характеризуются аналогичными параметрами изменения данного показателя при стимуляции сокращения, что свидетельствует об идентичности механизмов запуска сократительной активности у разных типов ГМ.

Ключевые слова: гладкие миоциты, цитоплазматический кальций, ферментная диссоциация

Исследования ряда последних лет представляют все больше данных о сложной структуре гладкой мышечной ткани. Результаты работ свидетельствуют о фенотипическом разнообразии [2, 6, 7] и о неоднородности популяции гладких миоцитов (ГМ), входящих в состав различных внутренних органов [1, 10, 13]. Значительное количество исследований позволяют говорить о гетероморфии ГМ, которые отличаются по своим линейным параметрам, форме и организации органелл [3, 4, 9]. Ранее на основе комплексного анализа морфометрических и цитохимических показателей [1, 2] было установлено, что гладкая мышечная ткань различных висцеральных органов представлена несколькими фенотипами сократительных ГМ, которые различаются как по морфофункциональным характеристикам, так и по реакции на изменение функциональных нагрузок. Универсальным триггерным механизмом активации сокращения ГМ является изменение концентрации внутриклеточного Ca²⁺, оказывающее ключевое влияние на фосфорилирование легких цепей миозина [4, 14]. Тем не менее, вопрос об уровне концентрации цитоплазматического Са²⁺ и характере его изменения при стимуляции ГМ с различными фенотипами остается открытым.

Цель настоящего исследования — разработка метода получения функционально активных изолированных ГМ и сравнительное изучение особенностей Са-зависимых механизмов регуляции функции ГМ с разными фенотипами.

Материал и методы. Исследован материал, полученный от 60 беспородных лабораторных самцов мышей

от 60

56

массой 22-25 г в возрасте 6-7 мес. Проанализировано 250 ГМ каждого фенотипа. Эксперименты проведены в соответствии со стандартами, установленными Европейским комитетом Council Directive (86/609/ЕЕС9). Опыты также были утверждены Комитетом Северной Швеции по этике при экспериментах на животных. Фрагменты мышечной ткани тонкой кишки с помощью диссекционного микроскопа делили на кусочки объемом 1 мкм³, после чего помещали в питательный раствор, содержащий фермент коллагеназу Р (1-1,5 мг/мл, Roche Diagnostics GmbH, Mannhem, Германия). В качестве базового раствора использовали бикарбонатный буфер Кребса (ББК), содержащий: NaCl - 115 ммоль/л, КСl -4,7 ммоль/л, KH₂PO₄ — 1,2 ммоль/л, MgSO₄ — 1,2 ммоль/л, N-(2-гидроксилэтил)пиперазид-N'-2-(этансульфановая кислота) — 20 ммоль/л, глюкозу — 10 ммоль/л, с $95\%~{\rm O}_2 - 5\%$ CO₂, pH 7,40 (7,38–7,42) при температуре 20°C. Инкубацию проводили в течение 45 мин. Промежуточную оценку уровня жизнеспособности полученных изолированных клеток проводили с помощью окрашивания препаратов трипановым синим (BDH, Chemical Ltd, Англия). После этого пробирки помещали в контейнер со льдом на 5-10 мин для остановки процесса диссоциации. Полученную суспензию ГМ для отмывки ферментов однократно центрифугировали в останавливающем растворе с добавлением альбумина (1 мг/мл, бычий сывороточный альбумин, Sigma Chemical Co., США) при комнатной температуре (10 мин при 600 об/мин). Затем надосадочную жидкость удаляли с помощью микропипетки, оставляя около 1 мл суспензии живых клеток (рис. 1, а).

Оценку состояния митохондрий в полученных изолированных клетках проводили с помощью MitoTracker Red (Molecular probes Inc, CIIIA) — красителя, способного связываться с рецепторами митохондрий в живых клетках. Инкубацию ГМ с 70 нмоль MitoTracker Red проводили в течение 15 мин в темноте при температуре 37 °C. Затем промывали препараты в ББК, после чего переносили в перфузионную камеру конфокального микроскопа Leica SP2 (Mannheim, Германия), где поддерживали постоянную температуру 37 °C. Изображения красной эмиссии были получены с применением длины волны



Рис. 1. Гладкие миоциты (ГМ) тонкой кишки мыши.

а — изолированный живой ГМ; б — митохондрии в изолированном ГМ; в — малый изолированный ГМ; г — средний изолированный ГМ. а — конфокальная микроскопия; б — окраска Mito Tracker Red, конфокальная микроскопия; в, г — окраска Fura-2AM, флюоресцентная микроскопия. Ув.: а, б — 2000; в, г — об. 40, ок. 10.



Рис. 3. Изменения флюоресценции (а–и) в цитоплазме изолированных гладких миоцитов тонкой кишки мыши при стимуляции сокращения. Флюоресцентная микроскопия. Окраска Fura-2AM. Об. 40, ок. 10.



Рис. 2. Динамика изменения концентрации внутриклеточных ионов кальция в малых (I) и средних (II) изолированных гладких миоцитах тонкой кишки мыши.

По оси абсцисс — время эксперимента (с); по оси ординат — концентрация кальция (нмоль).

возбуждения 543 нм и 590 нм (см. рис. 1, б). Выполнена серия сканирующих послойных срезов каждой клетки 0,6 мкм толщиной с расстоянием между слоями 0,5 мкм. Область митохондрий в срезах определяли как проецируемую зону, которая соответствовала 3–4,5% клеточного объема.

Изолированные ГМ тонкой кишки мышей были инкубированы с Fura-2AM (Fura-2-ацетоксиметиловый эфир, Molecular probes Inc., США) для анализа изменения уровня цитоплазматического кальция. Fura-2AM (C₄₄H₄₇N₃O₂₄, молекулярная масса — 1001,85 дальтон) — флюоресцентный индикатор ионов кальция, который в несвязанном состоянии свободно проходит через клеточную мембрану и обладает способностью к селективному связыванию с ионами кальция.

Суспензию ГМ помещали в чашки Петри на покровные стекла, покрытые поли-L-лизином (Воеhringer, Германия) для фиксации клеток к стеклу. Инкубацию клеток с 5 мкмоль Fura-2AM на буфере проводили в течение 40–45 мин. После промывки клеток в буфере для удаления внеклеточного индикатора покровные стекла помещали в открытую перфузионную камеру инвертированного микроскопа на предметный стол, где поддерживалась постоянная температура 37 °C. Данная микроскопическая система включала: Nikon Diaphot-TMD (Bimica), Zeiss IM и Zeiss Ахiovert и аналитическую систему Openlab 3 (Improvision, Великобритания). Регистрацию сигналов проводили в течение 2–5 мин с интервалом в 2 с.

Сигнал Fura-2AM считывался при длине волны 340 и 380 нм в течение 20–22 мс с использованием ксеноновой лампы 75 Вт и полихроматора (TILL Photonics, Германия). Изображения были получены с помощью CCD-камер (Огса ER, Япония). Уровень концентрации ионов Ca²⁺ анализировали при отношении сигналов при λ_1 =340 нм и λ_2 =380 нм с помощью уравнения, описанного G.Grynkiewicz и соавт. [7] с K_d 224 нмоль, по формуле: [Ca²⁺]=K_d·(F–Fmin/Fmax–F), где F — среднее значение интенсивности флюоресценции; Fmax — интенсивность флюоресценции при λ_2 =380 нм; Fmin — интенсивность флюоресценции при λ_1 =340 нм; K_d — эффективный коэффициент диссоциации, 224 нмоль.

Изолированные ГМ, инкубированные с Fura-2AM, стимулировали кофеином. Показатели снимали синхронно с малых и средних ГМ находящихся в одной камере (см. рис. 1, в, г). Выделяли клетку, определяли ее границы, измеряли базальный уровень цитоплазматического кальция, затем максимально аккуратно с помощью микропипетки в объеме 30–35 мкл добавляли стимулятор: 10 ммоль кофеина (Sigma Chemical Co, CIIIA). Результаты оценивали по уровню интенсивности флюоресценции.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием прикладной статистической программы MS Excel (Microsoft, США). Различия считали значимыми (по критерию Стьюдента) при P<0,05.

Результаты исследования. Анализ характера распределения ГМ в составе стенки кишки по показателю объема клеток позволил установить, что гладкая мышечная ткань представлена тремя типами ГМ: малыми, средними и большими, различающимися по их морфометрическим параметрам. Статистический анализ характера распределения ГМ кишки по объемам цитоплазмы показал, что данный показатель у мышей имеет наиболее выраженный коэффициент вариации (74,07%) среди других изученных параметров. Это также подтверждалось положительной величиной эксцесса (+4,26) с учетом его ошибки репрезентативности, что свидетельствует о гетероморфии изучаемой популяции. Соотношение типов ГМ в составе ткани определяется функциональными потребностями различных отделов пищеварительного тракта.

Использование разработанного метода диссоциации с применением коллагеназы Р позволило получить изолированные ГМ, сохраняющие прижизненные структурно-функциональные параметры. При этом индикация нормального состояния митохондрий в полученных клетках с помощью MitoTracker Red (см. рис. 1, б) явилась важным условием осуществления данного исследования, поскольку уровень функционирования митохондрий в значительной степени обусловливает изменение содержания цитозольного Ca²⁺, что, в свою очередь, может привести к изменению многих клеточных функций.

Проведенный с помощью микрофлюорометрии с Fura-2AM сравнительный анализ базального уровня цитоплазматического кальция выявил его особенности в различных фенотипах интактных ГМ. Динамика этого показателя в ГМ при стимуляции отражает изменение их мембранного потенциала и характеризует активность кальциевых каналов L-типа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что, несмотря на некоторые различия в базальном уровне цитоплазматического Ca²⁺ в малых и средних ГМ, стимуляция их сократительной активности приводит к синхронизированному повышению уровня этого показателя (рис. 2). В процессе анализа уровень концентрации внутриклеточного кальция коррелирует с изменением интенсивности флюоресценции, фиксируемой в процессе активации ГМ (рис. 3).

Обсуждение полученных данных. Полученные результаты свидетельствует о том, что использованный метод диссоциации позволяет получать изолированные ГМ, полностью сохраняющие свои прижизненные функциональные характеристики. При проведении сравнительного анализа базального уровня цитоплазматического кальция выявлены различия данного показателя в изолированных ГМ тонкой кишки с разными фенотипами. Эти различия отражают неодинаковое функциональное состояние сократительного аппарата исследуемых объектов, что может определять особенности реакции ГМ на стимулирующие влияния [4, 11, 14]. Характер изменения содержания внутриклеточного Ca²⁺ может быть обусловлен как повышением активности потенциал-зависимых Са²⁺-каналов, так и поступлением его из внутриклеточных депо [11, 12].

Для ГМ характерны мелкоосцилляторные изменения базального уровня Ca²⁺. Данный факт, вероятно, объясняется тем, что в интактных ГМ может иметь место механочувствительная модуляция сократительной активности [5], что влияет на трансформацию фосфатидилинозитола, индуцированную мускариновыми рецепторами, и концентрацию цитоплазматического кальция. При этом стимуляция ГМ приводит к аналогичной реакции повышения цитоплазматического кальция у клеток, относящихся к различным фенотипам. Это дает основание полагать, что триггерный Ca²⁺-зависимый механизм является универсальным для запуска сократительной активности ГМ. При этом, сократительный аппарат различных висцеральных ГМ может обладать индивидуальной чувствительностью к действию стимулирующих факторов.

ЛИТЕРАТУРА

- Зашихин А.Л. и Агафонов Ю.В. Структура популяции гладких миоцитов (аспекты внутриорганной организации гладкой мышечной ткани). Морфология, 1997, т. 112, вып. 4, с. 61–67.
- Зашихин А.Л. и Селин Я. Висцеральная гладкая мышечная ткань. Архангельск, Умео, изд. СГМУ, 2001.
- Зашихин А.Л., Селин Я. и Агафонов Ю.В. Структурно-функциональная организация темных и светлых гладких миоцитов в мускулатуре висцеральных органов. Морфология, 2004, т. 126, вып. 5, с. 41–45.
- Chung S-S., Ahn D-S., Lee H-G. et al. Inhibition of carbacholevoked oscillatory currents by the NO donor sodium nitroprusside in guinea-pig ileal myocytes. Exp. Physiol., 2005, v. 90, № 4, p. 577–586.
- Essin K., Welling A., Hofmann F. et al. Indirect coupling between Cav1.2 channels and ryanodine receptors to generate Ca2+ sparks in murine arterial smooth muscle cells. J. Physiol., 2007, v. 584 (Pt 1), p. 205–219.

- Giuriato L.E., Chiavegato A. and Pauletto P. Correlation between the presence of an immature smooth muscle cell population in tunica media and the development of atherosclerotic lesion. A study on different-sized rabbit arteries from cholesterol-fed and Watanabe heritable hyperlipemic rabbits. Atherosclerosis, 1995, v. 116, № 1, p. 77–92.
- 7. Groves G., Wang Z. and Newman W.H. Two distinct phenotypes of rat vascular smooth muscle cells:growth rate and production of tumor necrosis factor alpha. Am. Surg., 2005, v. 71, № 7, p. 546–550.
- Grynkiewicz G., Poenie M. and Tsien R.Y. A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties, J. Biol. Chem., 1985, v. 260, № 6, p. 3440–3450.
- Halayko A.J. and Solway J. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. J. Appl. Physiol., 2001, v. 90, № 1, p. 358–368.
- Halayko A.J., Stelmack G.L. and Yamasaki A. Distribution of phenotypically disparate myocytes subpopulations in airway smooth muscle. Can. J. Physiol. Pharmacol., 2005, v. 83, № 1, p. 104–116.
- Ma T., Qi Q-H., Xu J. et al. Signal pathways involved in emodininduced concentration of smooth muscle cells rat colon. World J. Gastroenterol., 2004, v. 10, № 10, p. 1476–1479.
- Mooren F.C. and Kinne R.K. Cellular calcium in health and disease. Biochim. Biophys. Acta, 1998, v. 1406, № 2, p. 127–151.
- Neylon C.B., Avdonin P.V. and Dilley R.J. Different electrical responses to vasoactive agonists in morphologically distinct smooth muscle cell types. Circ. Res., 1994, v. 75, № 4, p. 733– 741.
- Takeuchi T., Kushida M., Hirayama N. et al. Mechanisms involved in carbachol-induced Ca2+ sensitization of contractile elements in at proximal and distal colon. Br. J. Pharmacol., 2004, v. 142, № 4, p. 657–666.

Поступила в редакцию 07.11.09 Получена после доработки 24.05.10

MECHANISMS OF THE CONTRACTILE ACTIVITY CONTROL IN SMOOTH MUSCLE CELLS

A.L. Zashikhin, J. Sehlin and A.O. Barmina

A comparative analysis of the basal level of the cytoplasmic calcium concentration in the intact intestinal isolated smooth muscle cells (SMC) of different phenotypes and the dynamic changes of its concentration in the SMC during the stimulation of their contraction, was performed. In this study, the SMC were isolated from the proximal colon, using collagenase dissociation. Confocal and fluorescence microscopy with the fluorescent probes Fura-2AM, to study the concentration of Ca²⁺ and MitoTracker Red, to study the activity of mitochondria, were used. It was found that the different phenotypes of visceral SMC, despite some differences in the basal levels of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration, were characterized by the similar calcium response during the contraction stimulation, which indicates the identity of the mechanisms triggering contractile activity in different types of SMC.

Key words: smooth muscle cells, cytoplasmic Ca^{2+} , enzyme dissociation

Department of Histology, Cytology and Embryology, Northern State Medical University, Arkhangelsk; Department of Integrative Medical Biology, Section for Histology and Cell Biology, Umeå University, Sweden