

РОЛЬ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ И МОНООКСИДА УГЛЕРОДА В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЙ ГЛАДКИХ МЫШЦ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ КРЫСЫ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ОБЪЕМА КЛЕТОК

Гусакова С.В.¹, Гусакова В.С.¹, Голованов Е.А.¹, Смаглий Л.В.¹, Зайцева Т.Н.¹, Тотумачева Э.В.¹, Киреева А.В.¹, Зубова А.В.¹

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, e-mail: gusacova@yandex.ru

Методом четырехканальной механографии исследовали вклад калиевой проводимости мембраны в механизмы регуляции сократительной активности сегментов легочной артерии крысы при действии монооксида углерода в условиях моделирования набухания и стрикции гладкомышечных клеток. Сократительные ответы вызывали помещением кольцевых сегментов легочной артерии в гиперкалиевый раствор Кребса (15 мМ KCl), гиперосмотический раствор (120 мМ сахарозы), гипоосмотический раствор (40 мМ NaCl), а также нормальный раствор Кребса (120 мМ NaCl) после 60-минутной инкубации в гипоосмотической среде. Установлено, что блокирование калиевых каналов тетраэтиламмонием (10 мМ) увеличивает амплитуду сокращений сегментов легочной артерии в гиперкалиевом растворе, а также при моделировании гипер-, гипо- и изоосмотической стрикции. Донор оксида углерода (II) CORM II (50 мкМ) снижает величину сокращения сегментов легочной артерии в гиперкалиевом растворе, при этом тетраэтиламмоний устраняет релаксирующее действие монооксида углерода. Оксид углерода (II) также снижает величину механического напряжения сегментов при гиперосмотической и изоосмотической стрикции, но не влияет на гипоосмотическую стрикцию. Блокатор калиевых каналов уменьшает релаксирующее действие оксида углерода (II) при гипер- и изоосмотической стрикции, но не оказывает влияние на действие оксида углерода (II) при гипоосмотической стрикции.

Ключевые слова: легочная артерия, гладкие мышцы, сократительная активность, монооксид углерода, калий, объем клеток.

ROLE OF POTASSIUM CHANNELS AND CARBON MONOXIDE IN REGULATION OF RAT PULMONARY ARTERY SMOOTH MUSCLES CONTRACTIONS DURING CHANGES IN CELL VOLUME

Gusakova S.V.¹, Gusakova V.S.¹, Golovanov E.A.¹, Smaglyi L.V.¹, Zaitseva T.N.¹, Totumacheva E.V.¹, Kireeva A.V.¹, Zubova A.V.¹

¹Siberian State Medical University, Tomsk, e-mail: gusacova@yandex.ru

The role of membrane potassium conductivity in the volume-dependent mechanisms of regulation of the rat pulmonary artery smooth muscle cells contractile activity under the action of carbon monoxide was investigated by the method of mechanography. Contractile responses were elicited by placing of the pulmonary artery segments in hyghpotassium Krebs solution (15 mM KCl), hyperosmotic solution (120 mM sucrose), hyposmotic solution (40 mM NaCl), and normal Krebs solution (120 mM NaCl) after 60 minutes incubation in hyposmotic medium. It was revealed that potassium channel blocker tetraethylammonium (10 mM) increases the amplitude of pulmonary artery segments contraction in hyghpotassium solution, as well as in hyper-, hypo- and isoosmotic striction. CORM II (50 μ M), the donor of carbon monoxide, reduces the amplitude of contraction of the pulmonary artery segments in hyghpotassium solution, while tetraethylammonium eliminates the relaxing effect of carbon monoxide. Carbon monoxide also reduces the mechanical tension of the segments during hyperosmotic and isosmotic striction, but does not affect hyposmotic striction. The potassium channel blocker reduced the relaxing effect of carbon monoxide in hyper- and isosmotic striction, but did not affect the carbon monoxide effect in hyposmotic striction of pulmonary artery segments.

Keywords: pulmonary artery, smooth muscles, contractile activity, carbon monoxide, potassium, cell volume.

Проблема высокой смертности населения в России от сердечно-сосудистых заболеваний остается довольно острой [1]. В основе сосудистых заболеваний, таких как гипертензия, лежит нарушение регуляции сократительных и электрических свойств

гладкомышечных клеток (ГМК). Известно, что сократительная активность сосудистых ГМК изменяется при набухании или сжатии клеток [2]. В нормальных физиологических условиях изменение объема клеток наблюдается при пролиферации, росте, гибели клеток, при различных видах клеточной подвижности [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Также изменение клеточного объема может наблюдаться и при патологических состояниях. Так, было показано, что при развитии легочной гипертензии происходит увеличение объема гладкомышечных клеток легочной артерии [4]. Одним из основных регуляторов объема клеток является Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорт (NKCC), который влияет как на электрическую, так и на сократительную активность ГМК [2; Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Также предполагается, что в сократительных ответах ГМК на изменения объема участвуют неселективные механочувствительные калиевые каналы, реагирующие на растяжение. Изменение осмотического градиента при движении ионов через эти каналы может объяснять влияние растяжения и сжатия клеток на их электрофизиологические параметры [5].

Другим звеном регуляции сократительной активности сосудистых ГМК являются газотрансмиттеры (NO, CO, H_2S) [6]. В наших работах и в работах других авторов [6; Ошибка! Источник ссылки не найден.] было показано вазодилатирующее действие этих молекул. Газотрансмиттеры синтезируются во многих типах клеток, включая эндотелиальные и гладкомышечные [6; Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Обладая высокой липофильностью, газотрансмиттеры легко проходят через мембраны клеток и взаимодействуют с мембранными и внутриклеточными эффекторами, модулируя их активность [6]. Однако значение эндогенных газов в механизмах регуляции объема клеток, в том числе ГМК легочной артерии, изучено недостаточно. Это определяет необходимость выявления существующих взаимосвязей механизмов действия газотрансмиттеров и объем-зависимой системы регуляции сократительной функции ГМК легочной артерии.

Цель исследования: исследовать вклад калиевой проводимости мембраны в механизмы регуляции сократительной активности сегментов легочной артерии крысы при действии монооксида углерода в условиях моделирования набухания и стрикции гладкомышечных клеток.

Материал и методы исследования

Исследование проводили на кольцевых сегментах легочной артерии крысы (10 самцов линии Wistar массой 180–250 г) по стандартной методике, подробно описанной ранее в статье Баскакова М.Б. и соавт., 2013 [8]. Уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Европейской конвенции по защите позвоночных животных. После извлечения у животного ветвей легочной артерии, идущих вдоль бронхов крупных

калибров, отпрепарировали жировую и соединительную ткань, нарезали кольцевые сегменты (2-3 мм), эндотелий удаляли механически. Далее сегменты помещали в ванночку с раствором Кребса. Механическое напряжение (МН) гладкомышечных кольцевых сегментов сосудов измеряли с помощью установки Myobath II (World Precision Instruments). Во время эксперимента в омывающем сегмент растворе поддерживалась температура 37 °С. Состав используемого раствора Кребса: 120,4 мМ NaCl, 5,9 мМ KCl, 2,5 мМ CaCl₂, 1,2 мМ MgCl₂, 5,5 мМ глюкозы, 15 мМ NH₂C(CH₂OH)₃, pH 7,4. Гиперосмотическую стрикцию получали путем помещения сосудистого гладкомышечного сегмента (СГМС) в гиперосмотический раствор (добавление 120 мМ сахарозы в раствор Кребса). Для моделирования гипоосмотического набухания СГМС помещали в раствор Кребса, содержащий 40 мМ NaCl. Для получения изоосмотической стрикции СГМС инкубировали в течение 60 минут в гипоосмотическом растворе, а затем помещали в раствор Кребса. Гиперкалиевый раствор получали путем эквимольного замещения в растворе Кребса 15 мМ NaCl на KCl. Амплитуду сократительных ответов СГМС рассчитывали в процентах от амплитуды гиперкалиевого сокращения и/или от сокращения, индуцированного гиперосмотическим раствором. В экспериментах использовали реактивы (Sigma-Aldrich): донор монооксида углерода tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer (CORM II), неселективный блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЭА). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 17.0. Результаты представлены как медиана и межквартильный интервал (Q25–Q75). Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [9].

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование влияния СО и калиевой проводимости на гиперкалиевое сокращение

Контрольное сокращение СГМК получали добавлением в камеру гиперкалиевого раствора Кребса (15 мМ KCl), который вызывает рецептор-независимую деполяризацию мембраны ГМК и активирует потенциал-зависимый вход Ca²⁺. Для исследования калиевой проводимости мембраны использовали неселективный блокатор калиевой проводимости ТЭА (10 мМ). ТЭА увеличивал исходное МН сосудистых сегментов до 50,93 (29,22; 58,65) % от контрольного гиперкалиевого сокращения ($p < 0,05$, $n=8$), а при аппликации во время фазы плато гиперкалиевого сокращения ТЭА повышал амплитуду сокращения до 107,33 (103,86; 111,36) % от контрольного гиперкалиевого сокращения ($p < 0,05$, $n=8$) (рис. 1).

Донор монооксида углерода CORM II (50 мкМ) снижал амплитуду гиперкалиевого сокращения до 83,16 (73,96; 87,70) % от контрольного сокращения (рис. 1). Предварительная обработка блокатором калиевых каналов уменьшала релаксирующее действие CORM II: величина гиперкалиевого сокращения составила 95,36 (91,48; 99,24) % от гиперкалиевого сокращения на фоне ТЭА ($p < 0,05$, $n=8$) (рис. 1).

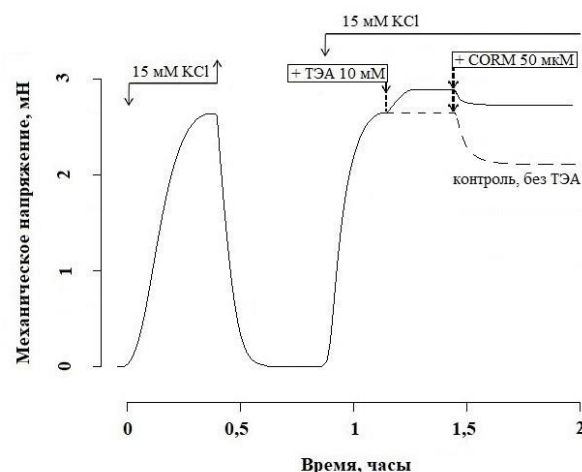


Рис. 1. Влияние ТЭА (10 мМ) и CORM II (50 мкМ) на амплитуду гиперкалиевого сокращения СГМС. Добавление и удаление тестирующих соединений показано стрелками

Исследование влияния СО и калиевой проводимости на гиперосмотическую стрижку

Помещение СГМС в раствор, содержащий 120 мМ сахарозы (гиперосмотический раствор), приводило к развитию сократительного ответа, амплитуда которого составила 66,2 (57,3; 75,45) % от гиперкалиевого сокращения. Добавление в этих условиях CORM II (50 мкМ) приводило к снижению амплитуды гиперосмотической стрижки до 73,08 (60,36; 77,05) % от гиперосмотического сокращения ($p < 0,05$, $n = 8$). ТЭА (10 мМ) дополнительно увеличивал величину гиперосмотической стрижки до 128,74 (124,71; 129,86) % от контрольного сокращения, но устранял релаксирующий эффект CORM II (50 мкМ): МН составило 99,43 (97,26; 101,83) % от гиперосмотической стрижки в присутствии ТЭА (рис. 2А).

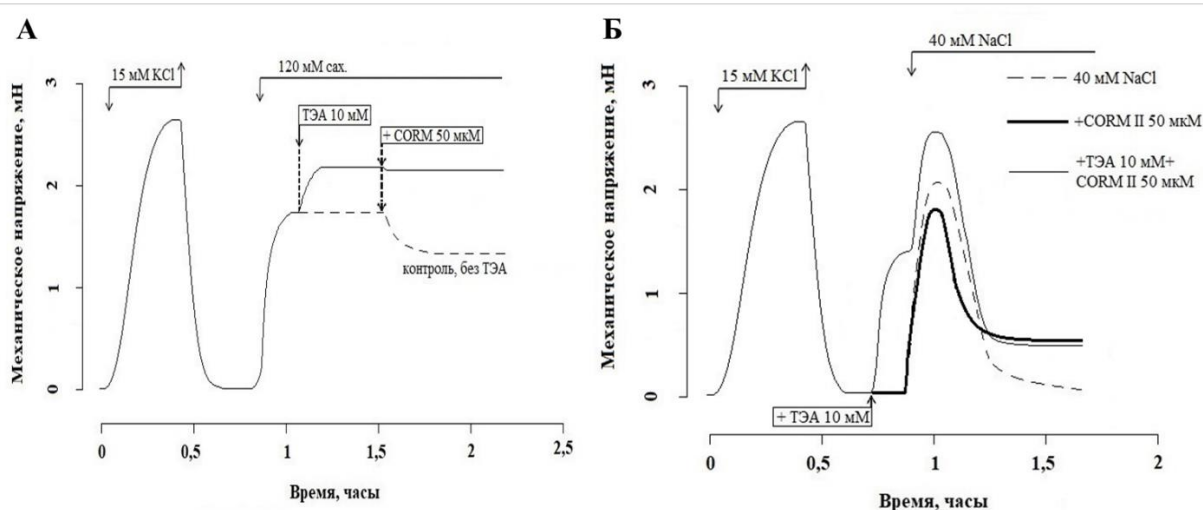


Рис. 2. Влияние ТЭА (10 мМ) и CORM II (50 мкМ) на амплитуду гиперосмотической (А) и гипоосмотической (Б) стрикции СГМС. Добавление и удаление тестирующих соединений показано стрелками

Исследование влияния СО и калиевой проводимости на гипоосмотическую стрикцию

Гипоосмотическую стрикцию получали помещением СГМК в гипоосмотический раствор, содержащий 40 мМ NaCl, при этом развивался транзиторный сократительный ответ амплитудой 80,7 (69,5; 91,6) % от контрольного гиперкалиевого сокращения. ТЭА достоверно увеличивал амплитуду гипоосмотической стрикции до 107,71 (103,95; 111,18) % от контрольного гиперкалиевого сокращения. Сокращение в присутствии ТЭА имело транзиторный характер, с выходом на поддерживаемый уровень амплитудой 8,53 (6,47; 11,86) % от контрольного гиперкалиевого сокращения ($p < 0,05$, $n=8$) (рис. 2Б).

Добавление CORM II (50 мкМ) не оказывало статистически значимого влияния на величину гипоосмотической стрикции (МН составило 68,8 (66,4; 84,7) % от контрольного сокращения), однако сегмент не расслаблялся полностью: МН после расслабления составила 16,1 (11,43; 23,3) % от контрольного гиперкалиевого сокращения (рис. 2Б). ТЭА не влиял на эффекты CORM II в СГМС в условиях гипоосмотической стрикции.

Исследование влияния СО и калиевой проводимости на изоосмотическую стрикцию

Помещение СГМС в нормальный раствор Кребса (120 мМ NaCl) после 60-минутной инкубации в гипоосмотическом растворе приводило к развитию транзиторной изоосмотической стрикции амплитудой 56,9 (55,36; 58,45) % от контрольного гиперкалиевого сокращения и длительностью 42,5 (35,8; 55,0) минуты. Предобработка сосудистых сегментов ТЭА (10 мМ, 30 мин.) увеличивала амплитуду изоосмотической стрикции до 99,44 (92,30; 103,14) % от контрольного гиперкалиевого сокращения ($p < 0,05$, $n=8$) (рис. 3А). CORM II (50 мкМ) достоверно ($p < 0,05$, $n=8$) снижал амплитуду изоосмотической стрикции до 10,57 (8,3; 11,29) % от контрольного гиперкалиевого сокращения. ТЭА (10 мМ) уменьшал релаксирующее действие CORM II (50 мкМ): МН составило 25,93 (23,16; 27,13) % от контрольного гиперкалиевого сокращения ($p < 0,05$, $n=8$) (рис. 3Б).

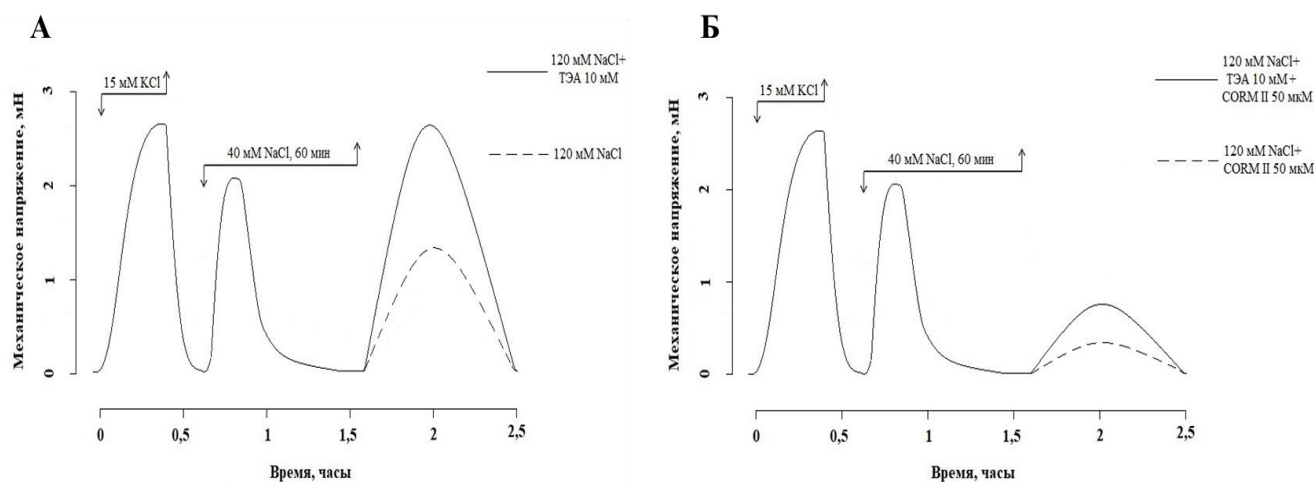


Рис. 3. Влияние 10 мМ ТЭА (А) и 50 мкМ CORM II (Б) на изоосмотическую стрикцию СГМС. Добавление и удаление тестирующих соединений показано стрелками

Закключение

Калиевые каналы возбудимых клеток участвуют в формировании потенциала покоя клетки, реполяризации мембраны во время потенциала действия, задействованы в регуляции клеточного объема и внутриклеточной сигнализации. Изменение сократительной активности сосудистых ГМК может быть опосредовано транспортом K^+ через различные типы калиевых каналов [10]. Действие СО в сосудах связано со снижением их тонуса вследствие расслабления ГМК [6]. Согласно полученным ранее данным, расслабление СГМК при действии СО опосредовано активацией гуанилатциклазы и ковалентной модификацией Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой проводимости (ВКС Ca^{2+} каналы) [11]. Предполагается, что α -субъединица ВКС Ca^{2+} канала содержит участок, связанный с гемом. Взаимодействие СО с атомом железа гема нарушает связь гема с каналом, устраняя его ингибирующее действие и повышая чувствительность канала к Ca^{2+} . Таким образом, локальные транзиторные всплески Ca^{2+} и активация ВКС Ca^{2+} могут являться ключевым звеном в релаксирующем действии СО. Как ингибирование внутриклеточных всплесков Ca^{2+} , так и блокирование ВКС Ca^{2+} подавляют релаксирующее действие СО на ГМК [11]. Напротив, активация ВКС Ca^{2+} инактивирует потенциал-чувствительные Ca^{2+} -каналы, снижает входящие кальциевые токи и приводит к гиперполяризации мембран сосудистых ГМК [11]. Ранее нами было показано, что сосудорасслабляющее действие СО обусловлено активацией потенциал-зависимых калиевых каналов (Кv-каналов) [8]. Согласно данным, представленным в статье, СО не влиял на величину сокращения сегментов легочной артерии в гипоосмотической среде, однако достоверно снижал в условиях гиперосмотической и изоосмотической стрикции. Известно, что данные сократительные ответы связаны с активацией Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -котранспорта:

поддерживаемой в случае гиперосмотической стрикции и транзиторной – в случае изоосмотической [2; 3; 12].

Блокирование калиевых каналов приводило к увеличению амплитуды сократительных ответов во всех исследуемых условиях. При этом ТЭА (10 мМ) уменьшал релаксирующее действие СО при гиперосмотической и изоосмотической стрикции, но не влиял на его эффекты при гипоосмотической стрикции. Учитывая предыдущие работы, можно предположить, что СО приводит к активации Kv-каналов или харибдотоксин-чувствительных Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов [6-8] и, как следствие, реполяризации мембраны клетки. Подавление СО-индуцированного расслабления блокатором калиевых каналов подтверждает это предположение.

С другой стороны, снижение ТЭА-индуцированной деполяризации клеток при гипер- и изоосмотической стрикции может быть связано с активацией растворимой гуанилатциклазы и увеличением внутриклеточной концентрации цГМФ, активацией протеинкиназы G, которая снижает проницаемость для ионов Ca^{2+} , модулирует активность Na^+ - K^+ -АТФазы и смещает мембранный потенциал в сторону гиперполяризации.

Нарушение регуляции объема клеток может стать причиной развития патологии сосудов малого круга кровообращения. Так, набухание ГМК сопровождается стойкое повышение давления в легочной артерии [4]. Полученные данные демонстрируют возможные механизмы поддержания тонуса сосудов при изменении осмолярности межклеточной среды и могут быть использованы для разработки способов лечения и коррекции артериальной и легочной гипертензии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-44-700009.

Список литературы

1. Российский статистический ежегодник. 2020: Стат.сб. / Росстат. Р76 М., 2020 700 с.
2. Orlov S.N., Koltsova S.V., Kapilevich L.V., Dulin N.O., Gusakova S.V. Cation-chloride cotransporters: regulation, physiological significance, and role in pathogenesis of arterial hypertension. Biochemistry (Moscow). 2014. V. 79. №. 13. P. 1546-1561. DOI: 10.1134/S0006297914130070 .
3. Wilson C.S., Mongin A.A. Cell Volume Control in Healthy Brain and Neuropathologies. Curr Top Membr. 2018. V.81. P. 385–455. DOI: 10.1016/bs.ctm.2018.07.006.

4. Sun X.Z., Tian X.Y., Wang D.W., Li J. Effects of fasudil on hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014. V. 18 (7). P. 959–964.
5. Бокерия О.Л., Ахобеков А.А. Ионные каналы и их роль в развитии нарушений ритма сердца // *Анналы аритмологии.* 2014. Т. 11. № 3. С. 176-184. DOI: 10.15275/annaritmol.2014.3.6.
6. Гусакова С.В., Ковалев И.В., Смаглий Л.В., Бирулина Ю.Г., Носарев А.В., Петрова И.В., Медведев М.А., Орлов С.Н., Реутов В.П. Газовая сигнализация в клетках млекопитающих // *Успехи физиологических наук.* 2015. Т. 46. № 4. С. 53-73.
7. Huang Y.Q., Jin H.F., Zhang H., Tang C.S., Du J.B. Interaction among Hydrogen Sulfide and Other Gasotransmitters in Mammalian Physiology and Pathophysiology. *Adv Exp Med Biol.* 2021. V. 1315. P. 205-236. DOI: 10.1007/978-981-16-0991-6_9.
8. Баскаков М.Б., Желудева А.С., Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Алейник А.Н., Янчук П.И., Медведев М.А., Орлов С.Н. Ионные механизмы действия монооксида углерода на сократительные свойства гладких мышц артериальных сосудов // *Фізіол. Журн.* 2013. Т. 59. № 3. С. 18-24.
9. Glantz S.A. *Primer of Biostatistics, Seventh Edition.* New York, NY: McGraw-Hill, 2012. 320 p.
10. Jackson W.F. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. *Adv Pharmacol.* 2017. V. 78. P. 89–144. DOI: 10.1016/bs.apha.2016.07.001.
11. Nowaczyk A., Kowalska M., Nowaczyk J., Grześk G. Carbon Monoxide and Nitric Oxide as Examples of the Youngest Class of Transmitters. *Int. J. Mol Sci.* 2021. V. 22 (11). P. 6029. DOI: 10.3390/ijms22116029.
12. Wilson C.S., Mongin A.A. The signaling role for chloride in the bidirectional communication between neurons and astrocytes. *Neurosci Lett.* 2019. P. 689:33-44. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.01.012.