

**РОЛЬ  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -КОТРАНСПОРТА В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ГЛАДКИХ МЫШЦ СОСУДОВ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ****Бирулина Ю.Г.<sup>1</sup>, Буйко Е.Е.<sup>1,2</sup>, Габитова И.О.<sup>1</sup>, Иванов В.В.<sup>1</sup>, Смаглий Л.В.<sup>1</sup>, Носарев А.В.<sup>1</sup>, Ковалев И.В.<sup>1</sup>, Гусакова С.В.<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Московский тракт, 2, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: birulina20@yandex.ru<sup>2</sup> Томский политехнический университет  
пр. Ленина, 30, г. Томск, 634050, РФ  
Поступила в редакцию: 09.07.2020

**Аннотация.** Регуляция сосудистого тонуса обеспечивается констрикторной активностью гладкомышечных клеток (ГМК), находящихся в стенках кровеносных сосудов. Изменение сократительных ответов ГМК может происходить при различных патологических состояниях, в том числе и при метаболическом синдроме (МС). Наряду с кальциевой и калиевой проводимостью мембраны ГМК, особое значение в развитии сосудистой дисфункции имеет  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспортер (НКСС), обеспечивающий симпорт ионов натрия, калия и хлора. Модель МС выполнена на крысах-самцах Wistar, которые были распределены на контрольную и опытную группу. Крысы контрольной группы получали стандартный корм. Крысы экспериментальной группы в течение 12 недель содержали на высокожировой и высокоуглеводной диете, обогащенной животным жиром и фруктозой. Сократительную активность гладкомышечных сегментов аорты крыс контрольной и экспериментальной групп исследовали механографическим методом, электрические свойства изучали методом двойного сахарозного моста. Установлено, что при стимуляции сокращений гладких мышц аорты агонистом адренорецепторов фенилэфрином происходило снижение амплитуды контрактуры сегментов крыс экспериментальной группы. Подавление сократительных ответов и чувствительности ГМК аорты крыс с МС сопряжено со снижением тока ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через кальциевые каналы. У животных, содержащихся на высокожировой и высокоуглеводной диете, наблюдалось снижение вазорелаксирующего действия ацетилхолина, что доказывает развитие эндотелиальной дисфункции при МС. Предобработка кольцевых сегментов буметанидом, ингибитором НКСС, вызывала снижение сократительной активности и мембранного потенциала ГМК аорты крыс экспериментальной группы. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности трансмембранных ионных токов, в том числе обусловленных оперированием НКСС, в регуляцию сокращений гладких мышц сосудов при МС.

**Ключевые слова:**  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт, гладкомышечные клетки, метаболический синдром.

Метаболический синдром (МС) является одной из наиболее актуальных проблем современной биомедицины и представляет собой кластер факторов повышенного риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [1-3]. Во всём мире распространённость МС довольно высока. В разных популяциях в соответствии с критериями Международной федерации диабета она составляет 27,5-68,7% [4, 5]. В последние годы в большинстве стран мира и в нашей стране значительно увеличилось число лиц с ожирением, что и определило возросшую распространённость МС [6]. Абдоминальное ожирение само по себе может вызывать системный окислительный стресс, а возникновение окислительного стресса в жировой ткани рассматривается в качестве основной причины дисрегуляции адипокинов и развития МС [7, 8]. Как известно, окислительный стресс вызывает нарушение соотношения между продукцией активных форм кислорода и антиоксидантными защитными факторами.

Дисбаланс выработки адипокинов, инсулинорезистентность, дисрегуляция метаболизма липидов, окислительный стресс и системное воспаление при МС способствуют развитию эндотелиальной дисфункции и повреждению гладкомышечных клеток (ГМК) кровеносных сосудов [9, 10]. ГМК занимают центральное место в регуляции просвета сосудов, а, следовательно, системного артериального давления (АД). В результате изменения их сократительной функции, диспропорциональности эффектов вазоконстрикторных и вазодилатационных эндотелиальных факторов нарушается регуляция сосудистого тонуса, повышается внутрисосудистое сопротивление, увеличивается чувствительность сосудистой стенки к прессорным воздействиям, что в конечном итоге приводит к развитию артериальной гипертензии [10, 11].

Сократительные реакции клеток гладкой мускулатуры в значительной степени определяются их мембранным потенциалом, активностью ион-транспортующих систем, набором рецепторов, сигнальных молекул и сократительных белков, необходимых для поддержания артериального тонуса [12-14]. Следовательно, любое изменение свойств или функции этих элементов может приводить к сосудистой дисфункции. Документировано, что ожирение и МС модулируют экспрессию и активность ионных каналов в мышечных клетках [15]. Главным образом, это характерно для кальциевых и калиевых каналов, как основополагающих эффекторных механизмов регуляции электрогенеза и сократительных ответов ГМК. В то же время, роль электронейтрального котранспортера катионов и хлора ( $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт, НКСС), как возможной

мишени для регуляции сосудистого тонуса при МС, только начинает раскрываться, как и вклад хлорной проводимости мембраны миоцитов.

Целью настоящей работы явилось изучение механизмов регуляции сократительной активности гладких мышц аорты крыс при МС.

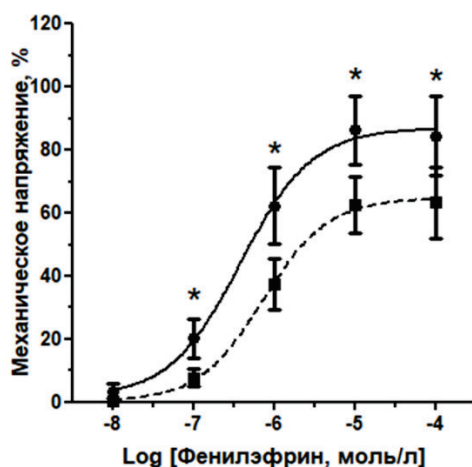
Модель МС была воспроизведена на аутбредных крысах Wistar (массой от 180 до 250 г, возраст на начало исследования 6 недель). Исследования выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Хельсинкской декларации и Европейского сообщества (86/609/ЕЕС). Животные содержались в стандартных условиях вивария с 12-часовой продолжительностью светового дня и свободным доступом к пище и воде. Случайным образом крысы были распределены на контрольную и экспериментальную группы (по 11 и 12 животных, соответственно). Крысы контрольной группы содержали на стандартной диете (корм «Дельта Фидс», Биопро, РФ). Крысы экспериментальной группы в течение 12 недель получали рацион, содержащий стандартный корм (66%) с добавлением животного жира (17%), фруктозы (17%), а питьевая вода была заменена на 20% раствор фруктозы. Животных выводили из эксперимента CO<sub>2</sub>-асфиксией.

Изучение механического напряжения (МН) изолированных интактных и деэндотелизованных гладкомышечных сегментов аорты крыс контрольной и опытной групп выполняли методом механографии с использованием четырехканальной системы Myobath II и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16 (Германия). Полученные сосудистые гладкомышечные сегменты помещали в рабочие аэрируемые камеры экспериментальной установки объемом 10 мл, растягивали нагрузкой 500 мг и фиксировали с помощью стальных крючков в соответствии с рисунком 1. После чего камеры заполняли физиологическим солевым раствором Кребса и термостатировали при 37,0±0,5 °С. Физиологический раствор Кребса содержал (в мМ): 120,4 NaCl, 5,9 KCl, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 5,5 глюкозы, 15 NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub> (pH 7,4). Перед началом исследования сегменты аорты крыс отмывали физиологическим раствором в течение 40-50 мин (pH 7,35-7,4), после чего дважды вызывали сокращение гиперкалиевым раствором Кребса (эквивалентно замещали 30 мМ NaCl на KCl). В ряде экспериментов сократительные реакции ГМК вызывали добавлением в раствор Кребса α<sub>1</sub>-адреномиметика фенилэфрина (ФЭ, 1 мкМ). Амплитуду сократительных ответов на действие гиперкалиевого раствора Кребса или ФЭ считали контрольной и принимали за 100 %.

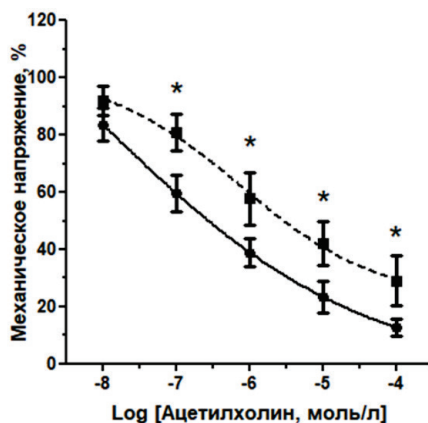
Регистрация электрической активности гладкомышечных препаратов аорты крыс контрольной и экспериментальной группы производилась с помощью установки двойного сахарозного моста (программное обеспечение L-Graph-II, «Л-КАРД», Россия). В качестве контрольных параметров (100 %) служили значения амплитуды пиковых компонент мембранного потенциала (МП), длительность МП, амплитуда сокращений гладкомышечного препарата в растворе Кребса.

Статистический анализ экспериментальных данных проводили при помощи программы IBM SPSS Statistics 23 методами статистического описания и проверки статистических гипотез. Данные описывали с использованием медианы (Me) и межквартильного размаха (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>). Для оценки достоверности различий количественных показателей применяли непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни (U test Mann-Whitney) для независимых и T-критерий Вилкоксона (Wilcoxon Signed Ranks Test) для зависимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости p<0,05.

Содержание крыс на высокожировой, высокоуглеводной диете в течение 12 недель приводило к приросту массы тела животных, увеличению АД, развитию гипергликемии и снижению толерантности к глюкозе. Установлено, что при действии хлорида калия в концентрациях от 10 по 50 мМ не наблюдалось достоверных отличий МН кольцевых сегментов сосудов крыс контрольной и опытной групп. При стимуляции сокращений



**Рисунок 1.** Изменение сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты крыс при действии фенилэфрина. Сплошная линия – контрольная группа, пунктирная линия – экспериментальная группа, \* – достоверные различия с контрольной группой (p<0,05)



**Рисунок 2.** Изменение МН гладкомышечных сегментов аорты крыс при действии ацетилхолина. Обозначения как на рисунке 1

гладких мышц аорты агонистом адренорецепторов ФЭ в концентрациях от 0,01 до 100 мкМ происходило дозозависимое снижение амплитуды контрактуры сегментов сосудов большого круга кровообращения крыс контрольной и экспериментальной группы (рис. 1).

В исследованиях с сосудистыми сегментами аорты животных контрольной и опытной группы величина  $EC_{50}$  составила  $8,3 \times 10^{-7}$  М и  $4,9 \times 10^{-6}$  М, соответственно.

Подавление сократительных ответов и чувствительности ГМК аорты крыс с МС к действию ФЭ может быть сопряжено со снижением поступления ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазму ГМК и развития поддерживаемого сокращения. Кумулятивное действие блокатора  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа нифедипина (0,001-10 мкМ) вызывало угнетение ФЭ-индуцированного сокращения сегментов аорты крыс контрольной и опытной группы ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ), достоверно меньше у крыс с МС.

Одним из важнейших механизмов короткодистантной регуляции является эндотелий-зависимый контроль сократительных реакций гладких мышц сосудов [11]. Влияние агониста мускариновых рецепторов ацетилхолина (0,01-100 мкМ) на интактные гладкомышечные сегменты аорты крыс контрольной и экспериментальной группы на фоне аппликации ФЭ вызывало дозозависимое снижение амплитуды сокращений сосудистых ГМК в соответствии с рисунком 2 ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ). При этом релаксирующий эффект ацетилхолина был статистически значимо ниже в группе крыс с МС ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ), а  $EC_{50}$  увеличилось с  $1,7 \times 10^{-7}$  М до  $4,8 \times 10^{-7}$  М. В присутствии ацетилхолина (10 мкМ) наблюдалось снижение МП сосудистых гладких мышц аорты крыс контрольной и опытной группы. В ГМК крыс с МС падение МП было достоверно меньше, чем в контрольной группе животных ( $p<0,05$ ). Известно, что ацетилхолин активирует поступление ионов  $Ca^{2+}$  в клетки эндотелия, что повышает активность эндотелиальной NO-синтазы и приводит к синтезу и накоплению NO, который обладает сосудорасширяющим действием. В свою очередь, снижение вазорелаксирующего действия ацетилхолина может свидетельствовать о развитии эндотелиальной дисфункции при МС [16].

Учитывая важную роль  $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорта (NKCC) в поддержании неравновесного электрохимического потенциала ионов хлора, можно полагать, что объем-зависимый ионный транспорт может быть вовлечен в регуляцию сократительной и электрической активности ГМК при МС. Одним из предполагаемых механизмов действия селективного ингибитора NKCC буметанида является его способность вызывать гиперполяризацию мембраны ГМК за счет снижения NKCC-опосредованного хлорного градиента и, таким образом, подавления входящих потенциал-зависимых кальциевых токов [17].

Предобработка буметанидом (100 мкМ) гладкомышечных сегментов не изменяла исходного МН и МП сосудистых ГМК. Однако на фоне действия ингибитора NKCC происходило снижение амплитуды сокращений и величины МП ГМК аорты крыс контрольной и экспериментальной групп, вызванных действием гиперкалиевого раствора и ФЭ, в большей степени, характерное для сосудистых гладких мышц крыс с МС (табл. 1).

**Таблица 1.** Влияние NKCC на электрическую и сократительную активность гладких мышц аорты крыс с МС при действии фенилэфрина

Параметр	Контрольная группа		Экспериментальная группа	
	-Буметанид	+Буметанид	-Буметанид	+Буметанид
Амплитуда МП (%) (n=8)	100	96,5* (85,6-106,8)	100	90,1*# (81,8-110,6)
Длительность МП (%) (n=8)	100	97,2 (90,9-105,2)	100	89,5# (81,3-109,4)
Амплитуда сокращения (%) (n=8)	100	93,6* (83,1-108,3)	100	88,8*# (76,9-103,9)

Примечание – Различия по сравнению с контрольной группой (\*), различия по сравнению с данными в отсутствии буметанида (#)

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что вазоконстрикторные реакции мышечных клетках на фоне метаболических и гемодинамических нарушений при МС, вероятно, обусловлены увеличением активности НКСС. Таким образом, установлено, что сократительные реакции сосудистых ГМК при МС обусловлены не только нарушением эндотелиально-гладкомышечных взаимодействий, но и изменением кальциевой проводимости их мембраны, модуляцией активности НКСС и хлорной проводимости. Полученные результаты о вовлеченности трансмембранных ионных токов в регуляцию сокращений и МП гладких мышц сосудов и открывают перспективы для разработки и тестирования новых лекарственных препаратов, направленных на коррекцию сосудистой дисфункции при МС.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Томской области в рамках научного проекта №19-415-703015.*

#### **Список литературы / References:**

1. Ройтберг Г.Е. *Метаболический синдром*. М.: МЕД-М54 пресс-информ, 2007, 224 с. [Roytberg G.E. *Metabolic Syndrome*. М.: MED-M54 press-inform, 2007, 224 p. (In Russ.)]
2. Potenza M.V., Mechanick J.I. The metabolic syndrome: definition, global impact, and pathophysiology. *Nutr. Clin. Pract.*, 2009, vol. 24, no. 5, pp. 560-577. DOI: 10.1177/0884533609342436.
3. Aydin S., Aksoy A., Aydin S., Kalayci M., Yilmaz M., Kuloglu T., Cital C., Catak Z. Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition*, 2014, vol. 30, no. 1, pp. 1-9. DOI: 10.1016/j.nut.2013.05.013.
4. Moore J.X., Chaudhary N., Akinyemiju T. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-2012. *Prev. Chronic. Dis.*, 2017, vol. 14, p. E24. DOI: 10.5888/pcd14.160287.
5. Ranasinghe P., Jayawardena R., Katulanda P., Constantine G.R., Ramanayake V., Galappathy P. Translation and Validation of the Sinhalese Version of the Brief Medication Questionnaire in Patients with Diabetes Mellitus. *Diabetes Res.*, 2018, vol. 2018, p. 62. DOI: 10.1155/2018/7519462.
6. Hossain P., Kawar B., Nahas M.El Obesity and diabetes in the developing world – a growing challenge. *N. Engl. J. Med.*, 2007, vol. 356, no. 3, pp. 213-215. DOI: 10.1056/NEJMp068177.
7. Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, 2004, vol. 114, no. 12, pp. 1752-1761. DOI: 10.1172/JCI21625.
8. Kobayasi R., Akamine E.H., Davel A.P., Rodrigues M.A., Carvalho C.R., Rossoni L.V. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J. Hypertens.*, 2010, vol. 28, no. 10, p. 2111-2119. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32833ca68c.
9. Bondia-Pons I., Ryan L., Martinez J.A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J. Physiol. Biochem.*, 2012, vol. 68, no. 4, pp. 701-711. DOI: 10.1007/s13105-012-0154-2.
10. Berg A.H., Scherer P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 2005, vol. 96, no. 9, pp. 939-949. DOI: 10.1161/01.RES.0000163635.62927.34.
11. Hartge M.M., Unger T., Kintscher U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab. Vasc. Dis. Res.*, 2007, vol. 4, no. 2, pp. 84-88. DOI: 10.3132/dvdr.2007.025.
12. Navedo M.F., Amberg G.C., Votaw V.S., Santana L.F. Constitutively active L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 31, pp. 11112-11117. DOI: 10.1073/pnas.0500360102.
13. Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr. Physiol.*, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 485-581. DOI: 10.1002/cphy.c160011.
14. Носарев А.В., Бирulina Ю.Г., Ковалев И.В., Смаглий Л.В., Гусакова С.В., Петрова И.В., Рыдченко В.С., Поливщикова В.А., Медведев М.А. Роль Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup>-котранспорта в H<sub>2</sub>S-опосредованной регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток легочной артерии крыс. *Артериальная гипертензия*, 2017, т. 23, № 5, с. 395-402. [Nosarev A.V., Birulina Yu.G., Kovalev I.V., Smaglii L.V., Gusakova S.V., Petrova I.V., Rydchenko V.S., Polivshchikova V.A., Medvedev M.A. The role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> -cotransport in the H<sub>2</sub>S-dependent regulation of contractile activity of smooth muscle cells from rat pulmonary artery. *Arterial Hypertension*, 2017, vol. 23, no. 5, pp. 395-402. (In Russ.)]. DOI: 10.18705/1607-419X2017-23-5-395-402.
15. Lu T., Ye D., He T., Wang X.L., Wang H.L., Lee H.C. Impaired Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the coronary artery smooth muscle cells of Zucker Diabetic Fatty rats. *Biophys. J.*, 2008, vol. 95, no. 11, pp. 5165-5177. DOI: 10.1529/biophysj.108.138339.
16. Носарев А.В., Бирulina Ю.Г., Петрова И.В., Ковалев И.В., Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Тесля Е.С., Шаманаев А.Ю., Пушкина Е.В., Медведев М.А. Особенности ион-транспортных процессов в модели артериальной гипертензии. *Бюллетень сибирской медицины*, 2018, т. 17, № 4, с. 103-109. [Nosarev A.V., Birulina Yu. G., Petrova I.V., Kovalev I.V., Gusakova S.V., Smaglii L.V., Teslya E.S., Shamanaev A. Yu., Pushkina E.V., Medvedev M.A. Features of ionic transport processes in a model of arterial hypertension. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2018, vol. 17, no. 4, pp. 103-109. (In Russ.)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-4-103-109.
17. Orlov S.N., Koltsova S.V., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Dulin N.O. NKCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension. *Genes Dis.*, 2015, vol. 2, no. 2, pp. 186-196. DOI: 10.1016/j.gendis.2015.02.007.

**ROLE OF  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  COTRANSPORT IN THE REGULATION OF CONTRACTILE REACTIONS OF VASCULAR SMOOTH MUSCLES IN METABOLIC SYNDROME****Birulina J.G.<sup>1</sup>, Buyko E.E.<sup>1,2</sup>, Gabitova I.O.<sup>1</sup>, Ivanov V.V.<sup>1</sup>, Smaglyi L.V., Nosarev A.V.<sup>1</sup>, Kovalev I.V.<sup>1</sup>  
Gusakova S.V.<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Siberian State Medical University

Moskovsky trakt, 2, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: birulina20@yandex.ru

<sup>2</sup> Tomsk Polytechnic University

Lenina av., 30, Tomsk, 634050, Russia

**Abstract.** The vascular tone regulation is provided by contractile activity of smooth muscle cells (SMC) located in the vessel wall. Change in SMC contractile responses may occur in case of various pathological conditions, including metabolic syndrome (MS). Along with the calcium and potassium conductance in the SMC membrane,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  cotransporter (NKCC), which provides a symport of sodium, potassium and chlorine ions, is of great importance in the vascular dysfunction's development. Male Wistar rats were used for MS modeling. Rats were divided into control and experimental groups. The rats from the control group were fed with standard laboratory diet. The rats from the experimental group were fed with a high-fat, high-carbohydrate diet rich in lard and fructose for 12 weeks. The contractile activity of the smooth muscle segments in the aorta of control rats and animals of experimental groups was studied by the mechanographic method. Its electrical properties were studied by the double sucrose-gap technique. It was found that stimulation of aortic smooth muscle contractile activity by an adrenoceptor agonist phenylephrine leads to the decrease in the amplitude of experimental rats' segments contracture. The suppression of the contractile responses and aorta SMC sensitivity in rats with MS is associated with a decrease in the  $\text{Ca}^{2+}$  ions input through calcium channels. Animals fed with high-fat, high-carbohydrate diet had demonstrated a decreased vasorelaxing effect of acetylcholine, which proves the development of endothelial dysfunction in MS. The pretreatment of the ring segments with bumetanide, an NKCC inhibitor, had led to a decrease in the contractile activity and membrane potential in aortic SMC of experimental rats. The data obtained indicate the involvement of transmembrane ion currents in the vascular smooth muscle contractions regulation in the state of MS, including the NKCC-cooperated ones.

**Key words:**  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  cotransport, smooth muscle cells, metabolic syndrome.