

## РОЛЬ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ КОТРАНСПОРТА В СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ КРЫСЫ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ОБЪЕМА КЛЕТОК

Рыдченко В.С., Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Носарев А.В., Голованов Е.А.,  
Чибисов Е.Е., Сорокина Н.А.

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации

ул. Московский тракт, 2, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: ryd4enkoviknoriya@mail.ru

Поступила в редакцию: 01.08.2018.

**Аннотация.** Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из ведущих причин смертности среди населения развитых стран мира. По данным за 2016 год от заболеваний сердечно-сосудистой системы погибло 17,9 миллионов человек, что составляет примерно 44 % от общего числа смертей (World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals). Большой вклад в развитие болезней системы крови вносят патологические состояния, связанные с нарушением сократительных функций гладких мышц. Регуляция сократительных и электрических свойств гладкомышечных клеток (ГМК) на сегодняшний день активно изучается и является актуальной темой на протяжении последних десятков лет. Однако некоторые вопросы, касающиеся механизмов оперирования сопряжения возбуждения-сокращения в сосудистых гладкомышечных клетках, остаются открытыми. В частности, интерес представляет связь процессов, участвующих в регуляции клеточного объема и обеспечении сократительной активности гладкомышечных клеток. На сегодняшний день большинство авторов основным участником в регуляции объема клеток выделяют электронейтральный  $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{,2Cl}^-$  котранспорт (NKCC) [2-4]. В нормальных физиологических условиях изменение клеточного объема наблюдается при различных процессах, таких как пролиферация, рост и некроз и апоптоз клеток, а также при различных видах подвижности клеток [6, 7]. Помимо физиологических условий изменение клеточного объема может наблюдаться при патологических состояниях организма. Показано, что при развитии легочной гипертензии происходит набухание гладкомышечных клеток легочной артерии и ремоделирование сосудов [1]. Помимо участия в регуляции объема клеток  $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{,2Cl}^-$  котранспорт вносит важный вклад в регуляцию электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток. Это позволяет предположить о наличии взаимосвязи двух важных процессов жизнедеятельности гладкомышечных клеток, таких как сократительная активность и регуляция объема клеток. Однако, роль изменения объема клеток и объем-чувствительного  $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{,2Cl}^-$  котранспорта в регуляции сократительной активности ГМК легочной артерии изучена недостаточно. Что определяет необходимость выявления существующих взаимосвязей в объем-зависимой системе регуляции сократительной функции ГМК легочной артерии.

**Ключевые слова:** гладкомышечные клетки, легочная артерия,  $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{,2Cl}^-$  котранспорт (NKCC), объем клеток.

**Цель.** Изучить сократительную активность гладкомышечных сегментов легочной артерии крысы в условиях изменения объема клеток и определить вклад  $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{,2Cl}^-$  котранспорта в реализацию этих эффектов.

### МЕТОДЫ

Объектом исследования служили изолированные деэндотелизированные сегменты легочной артерии крыс линии Wistar. Исследование сократительной активности гладких мышц проводили методом механографии с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного обеспечения LAB-TRAX-4/16 (Германия). Амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от контрольного сокращения на действие 30 мМ KCl, которое принимали за 100 %. Вклад NKCC в сократительную активность легочной артерии исследовали путем блокирования переносчика буметанидом. В качестве непроникающего биологически неактивного осмолита использовали сахарозу (50-300 мМ). Аппликацию сахарозы использовали для моделирования гиперосмотической стрикции гладкомышечных клеток. Изоосмотическую стрикцию вызывали восстановлением ионного состава раствора после 60-минутной инкубации сегментов в гипоосмотической среде, содержащей 40 мМ NaCl. Для исследования сократительной активности сегментов в модели гипоосмотического набухания сегменты помещали в раствор с концентрацией NaCl равной 40-70 мМ. Анализ данных проводили при помощи программы SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version. Фактические данные представлены в виде «медиана  $\pm$  квартильный интервал». Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий нормальности Колмогорова-Смирнова. Сформированные выборки не подчинялись закону нормального распределения, поэтому для проверки статистических гипотез были использованы непараметрические критерии. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Для

проверки однородности парных или зависимых выборок был использован Т-критерий Уилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Достоверными считали различия при значении  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Использование гиперкалиевого раствора Кребса является классическим подходом в изучении рецептор-независимой деполяризации мембраны ГМК, связанный исключительно только с потенциал-зависимым входом  $Ca^{2+}$ . Эквимолярное замещение NaCl на KCl в концентрациях 10, 20, 30, 40, 60 и 80 мМ приводит к дозозависимому увеличению механического напряжения сосудистых гладкомышечных сегментов (СГМС) легочной артерии до 1,1 (0,83;1,34), 4,6 (4,0;4,64), 5,08 (4,39;5,33), 5,07 (4,7;5,5), 4,86 (4,31;5,29) и 4,5 (4,1;4,85) мН ( $n=8$ ), соответственно. В дальнейших экспериментах использовалось влияние 30 мМ KCl как контрольное сокращение, принимаемое за 100 %.

Для изучения сократительной активности сосудистых сегментов легочной артерии крысы в условиях уменьшения объема клеток был исследован эффект аппликации модифицированного физиологического раствора, содержащего 50, 100, 150, 200 и 300 мМ сахарозы в качестве непроникающего осмолита. Аппликация 50 мМ сахарозы не оказывала влияния на сократительную активность сегментов легочной артерии. При аппликациях 100, 150 и 200 мМ сахарозы наблюдался дозозависимый поддерживаемый сократительный ответ, амплитуда которого составляла 28,05 (14,02;41,66), 81,42 (61,59;91,75) и 86,87 (72,21;97,49) % от контрольного гиперкалиевого сокращения ( $n=8$ ,  $p < 0,05$ ). Амплитуда сократительного ответа на 250 и 300 мМ сахарозы составила 88,6 (72,69;97,61) и 87,63 (72,32;94,17) % ( $n=8$ ). Эффект, близкий к полумаксимальному, достигался при аппликации 120 мМ сахарозы. Сокращение на 120 мМ сахарозы является поддерживаемым в течении минимум 60-ти минут и воспроизводимым.

Как было выявлено ранее, как гиперосмотическая, так и гипоосмотическая стрикция клеток может в значительной степени активировать НКСС. Однако, существуют принципиальные отличия в данных процессах. Так, при гиперосмотическом воздействии активация НКСС носит постоянный характер, тогда как при гипоосмотическом – транзиторный. Использование модели изоосмотической стрикции дает возможность изучить альтернативный способ влияния уменьшения объема клеток на сократительную активность гладкомышечных клеток легочной артерии. Изоосмотическую стрикцию клеток добивались восстановлением ионного состава инкубационной среды после длительного воздействия гипоосмотического раствора. Амплитуда сократительного ответа при изоосмотической стрикции гладкомышечных клеток составила 31,34 (26,48;34,46) % от контрольного гиперкалиевого сокращения ( $n=11$ ,  $p < 0,05$ ). Время транзиторного сокращения составило 42,5 (35,75;55,0) минуты ( $n=11$ ,  $p < 0,05$ ).

Влияние гипоосмотической среды на сократительную активность гладкомышечных сегментов легочной артерии исследовали при снижении концентрации NaCl в растворе Кребса от 70 до 40 мМ. Сократительные ответы имели транзиторный характер. При снижении концентрации NaCl в растворе Кребса до 70, 60, 50 и 40 мМ амплитуда транзиторного сократительного ответа повышалась. Максимальная амплитуда ответа составила 38,21 (35,93;46,97) % от контрольного гиперкалиевого сокращения при действии 40 мМ NaCl ( $n=8$ ,  $p < 0,05$ ). Время транзиторного сокращения уменьшалось с увеличением концентрации NaCl и максимально составляло 32,5 (30,0;39,0) минуты.

Для исследования вклада НКСС в развитие сократительного ответа легочной артерии при гиперкалиевой деполяризации мембраны клеток использовалась предобработка гладкомышечных сегментов блокатором данного переносчика буметанидом. Предполагается, что буметанид способен вызывать гиперполяризацию мембраны сосудистых гладкомышечных клеток путем угнетения НКСС-опосредованного градиента хлора, являющегося причиной деполяризующего хлорного тока при активации хлорных каналов плазмалеммы. Это позволяет предположить, что буметанид должен оказывать ингибирующее действие на развитие сокращения, индуцированного гиперкалиевой деполяризацией мембраны гладкомышечных клеток легочной артерии.

Предобработка буметанидом приводила к снижению сократительного ответа гладкомышечных сегментов легочной артерии, степень которого статистически значимо не зависела от концентрации и времени предобработки блокатором. Предобработка сегментов легочной артерии буметанидом в концентрации 100 мкМ в течение 30 минут приводила к максимальному статистически значимому снижению сократительного ответа гладкомышечных сегментов, амплитуда которого составила 78,3 (74,0;88,4) % от контрольного сокращения.

Исследование вклада НКСС в реализацию сократительного ответа на гиперосмотическую стрикцию изучали на фоне 120 мМ раствора сахарозы. Предобработка гладкомышечных сегментов блокатором НКСС буметанидом в концентрации 10-100 мкМ в течение 5, 15, 30, 60 минут приводила к разнонаправленным эффектам. Так, при предобработке 10 мкМ буметанида в течении 30 минут наблюдалось повышение амплитуды сократительного ответа на 120 мМ сахарозы, а при 30-ти минутной предобработке 50 мкМ происходило снижение амплитуды сократительного ответа. Во всех случаях на фоне буметанида происходило увеличение времени развития сократительного ответа при действии 120 мМ сахарозы

Влияние буметанида на сократительную активность гладкомышечных сегментов легочной артерии при набухании клеток исследовалось при снижении концентрации NaCl в растворе Кребса до 40 мМ. При действии 10 мкМ буметанида статистически значимого снижения амплитуды сократительного ответа не наблюдалось. С увеличением времени предобработки до 15 и 30 минут достоверно уменьшалось время развития транзиторной

реакции. При действии 50 и 100 мкМ буметанида наблюдалось статистически значимое ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ) снижение амплитуды и времени развития сократительной реакции на воздействие гипоосмотической среды.

Предобработка 100 мкМ буметанидом в течение 30 минут на фоне изоосмотической стрикции приводила к увеличению амплитуды и продолжительности развития сократительной реакции. Сократительный ответ терял транзиторный характер.

### ВЫВОДЫ

1. При действии гиперкалиевого раствора (эквимольное замещение NaCl на 10-80 мМ KCl) наблюдается сократительный ответ СГМС легочной артерии крысы. Амплитуда ответа возрастает с увеличением концентрации KCl в растворе.

2. При аппликации гиперосмотического раствора (50-300 мМ сахарозы) наблюдается поддерживаемое сокращение СГМС. Максимальная амплитуда сокращения достигается при действии 200 мМ сахарозы. При действии буметанида на сокращение, вызванное гиперосмотическим раствором, наблюдается разнонаправленные реакции, зависящие от концентрации буметанида и времени предобработки.

3. Инкубация сегментов в гипоосмотическом растворе приводит к развитию транзиторного сокращения. Амплитуда сократительного ответа и время транзиторной реакции увеличивается с уменьшением концентрации NaCl в растворе. Буметанид вызывает снижение величины и времени развития транзиторного сокращения в условиях гипоосмотического набухания клеток.

4. Восстановление осмолярности среды после гипоосмотического воздействия приводит к развитию сокращения, носящего транзиторный характер. При изоосмотической стрикции клеток буметанид вызывает увеличение амплитуды и времени развития сократительного ответа, а также устраняет транзиторный характер сократительного ответа.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 18-315-00296\18 и № 18-44-700009\18.*

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

1. Sun X.-Z. [et al.] Effects of Fasudil on hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2014, vol. 18, pp. 959-964.
2. Pedersen S.F., Klausen T.K., Nilius B. The identification of a volume-regulated anion channel: an amazing Odyssey. *Acta Physiologica*, 2015, vol. 213, no. 4, pp. 868-881.
3. Adragna N.C. [et al.] K-Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: possible implication in vasodilation. *Am. J. Physiol.*, 2000, vol. 278, pp. 381-390.
4. Akar F. [et al.] Contractile regulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol. (United States)*, 2001, vol. 281, pp. 579-84.
5. Russell J.M. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol. Rev.*, 2000, vol. 80, pp. 212-276
6. Barros J. [et al.] Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 2001, vol. 130, no. 3, pp. 401-9.
7. Van Cruchten S. [et al.] Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.*, 2002, vol. 31, no. 4, pp. 214-23.

**ROLE OF  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  -COTRANSPORT IN CONTRACTILE ACTIVITY OF RAT PULMONARY ARTERY SMOOTH MUSCLE CELLS MODULATED BY CHANGES IN CELL VOLUME****Rydchenko V.S., Gusakova S.V., Smaglyi L.V., Nosarev A.V., Golovanov E.A., Chibisov E.E., Sorokina N.A.**

Siberian State Medical University

Moskovsky trakt, 2, Tomsk, 634055, Russia; e-mail: ryd4enkoviknoriya@mail.ru

**Abstract.** Cardiovascular diseases are the leading causes of death among the population of the developed countries of the world for many years. According to statistic data 17.9 million people died from cardiovascular diseases in 2016 of the system, which is approximately 44 % of the total number of deaths (World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals). Great contribution to the development of cardiovascular diseases is made by pathological conditions associated with violation of contractile functions of smooth muscles. Regulation of contractile and electrical properties of smooth muscle cells is being actively studied and is an actual topic for the last decades. However, some questions concerning the mechanisms of excitation-contraction coupling in vascular smooth muscle cells remain unclear. In particular, interaction of processes involved in the regulation of the cell volume and smooth muscle cells contractile activity is of the great interest. At the present time, many authors consider electroneutral  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  cotransport as the main regulator of the cell volume [2-4]. Changes in cell volume are observed in various processes under normal physiological conditions, such as proliferation, growth, necrosis and apoptosis, as well as in various types of cell mobility [6, 7]. In addition, changes in cell volume may be also observed in different pathological conditions. Thus, it was shown pulmonary hypertension is accompanied with swelling of pulmonary artery smooth muscle cells along with remodeling of the vessels [1]. Besides of cell volume regulation  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  cotransport makes an important contribution to the regulation of electrical and contractile activity of smooth muscle cells. This allows suggesting relationship between two important processes in smooth muscle cells, such as contractile activity and regulation of cell volume. However, the role of cell volume and volume-sensitive  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  cotransport in the regulation of contractile activity of the pulmonary artery is not sufficiently studied. This determines the need to identify the relationships in volume-dependent regulation of contractile function of smooth muscle cells of the pulmonary artery.

**Key words:** smooth muscle cells, pulmonary artery,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  -cotransport (NKCC), Cell volume.