

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Кафедра биофизики и функциональной диагностики

На правах рукописи

Голованов Егор Александрович

NA⁺/K⁺-АТФАЗА В МЕХАНИЗМАХ ОБЪЕМ-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ
СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК
ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-
квалификационной работы (диссертации)

Направление подготовки: 06.06.01 Биологические науки

Профиль направления: Биофизика

Научный руководитель:
зав. кафедрой биофизики и функциональной диагностики,
д-р мед. наук, доцент,
Гусакова Светлана Валерьевна

Томск – 2024

Актуальность темы исследования. Na^+/K^+ -АТФаза - это повсеместно распространенный мембранный белок, ответственный за создание и поддержание ионного гомеостаза клеток, имеет решающее значение для многих клеточных функций и процессов в поперечнополосатой и сердечной мышечной ткани, нервной ткани и в гладких мышцах. В настоящее время существует два основных взгляда на роль Na^+/K^+ -АТФазы в функции клеток и экспрессии белков: традиционное представление, основанное на зависимом от транспорта ионов контроле внутриклеточного ионного гомеостаза и механизм, который зависит от внутриклеточной передачи сигнала [Hangaard L. et al, 2017; Xie J. et al, 2015; Yu H. et al, 2018]. Был охарактеризован ряд зависимых от Na^+/K^+ -АТФазы сигнальных путей, инициируемых связыванием убаина и других кардиотонических стероидов с самим белком [Yu H. et al, 2018]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе передачи сигналов Na^+/K^+ -АТФазы, сложны и предполагают слияние различных биологических путей. Na^+/K^+ -АТФаза играет важную роль не только в регуляции тонуса и сократимости сосудов, но и в модуляции периферического сосудистого сопротивления и артериального давления [Орлов С.Н. и др., 2014; Wenceslau C.F. et al, 2014].

Проявления гипоксии могут приводить к повреждению гладкомышечных клеток сосудов и нарушению их сократительной функции. Под данным исследований расстройства наблюдаются со стороны работы АТФ-зависимых ионных насосов, в том числе и Na^+/K^+ -АТФазы [Смаглий Л. В. и др, 2020; Hangaard L. et al, 2017]. Перераспределение ионов в сочетании с повышенной проницаемостью плазматической мембраны способствует поступлению в клетку из внеклеточной среды молекул воды с последующим развитием внутриклеточной гипергидратации, что, предположительно, может модулировать изменения регуляции клеточного объема [Гусакова С. В. и др., 2019]. Важность Na^+/K^+ -АТФазы в различных клеточных функциях обусловлена тем, что ее функциональную роль можно рассматривать только в сложной среде на субклеточном, клеточном и многоклеточном уровнях, где Na^+/K^+ -АТФаза структурно и функционально связана с другими мембранными переносчиками,

белками цитоскелета и сигнальными молекулами. В основе развития многих заболеваний, в том числе артериальной легочной гипертензии, лежит дисфункция ионных транспортеров, участвующих в регуляции клеточного объема [Орлов С.Н. и др., 2014; Орлов С.Н. и др., 2017].

Цели и задачи. Целью настоящей работы являлось исследование роли Na^+/K^+ -АТФазы в объем-зависимой регуляции стрикций легочной артерии крысы в условиях гипоксии. Достижение поставленной в работе цели предполагает решение следующих задач исследования:

1. Изучить влияние ингибитора Na^+/K^+ -АТФазы убаина на механическое напряжение гладкомышечных сегментов легочной артерии крысы в моделях изменения объема клеток.

2. Изучить участие Na^+/K^+ -АТФазы в механизмах регуляции сократительной активности гладких мышц легочной артерии в условиях гипоксии в моделях изменения объема клеток.

3. Исследовать роль Na^+/K^+ -АТФазы в механизмах регуляции сократительной активности гладких мышц легочной артерии в условиях гипоксии и ингибирования убаином в моделях изменения объема клеток.

Научная новизна. Впервые показано влияние ингибитора Na^+/K^+ -АТФазы убаина на механическое напряжение гладкомышечных сегментов легочной артерии крысы в моделях изменения объема клеток в условиях гипоксии. Изучено участие Na^+/K^+ -АТФазы в регуляции потенциала мембран ГМК в условиях гипоксии методом локальной фиксации потенциала patch-clamp.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили изолированные гладкомышечные сегменты и гладкомышечные клетки легочной артерии нормотензивных самцов крыс линии Wistar.

Для решения поставленных задач в ходе работы над диссертацией были использованы следующие методы исследования:

1. Регистрация ионных токов гладкомышечных клеток проводилась методом локальной фиксации потенциала клеток patch-clamp на базе Центра доклинических исследований ЦНИЛ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

2. Сократительная активность гладкомышечных сегментов исследовалась методом механографии с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II на базе кафедры биофизики и функциональной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Для изучения роли Na^+/K^+ -АТФазы в объем-зависимой регуляции сокращений легочной артерии крысы необходимо наличие изолированных от влияния нервно-гуморальной регуляции гладкомышечных сосудистых сегментов крыс. Крысы выбраны в следствие того, что они общепринято используются как стандартные модельные животные для исследований гладких мышц сосудов. Выбраны самцы крыс линии Wistar возрастом 11-13 недель, весом 250-350 г, без патологий, общим количеством 204 штуки крыс-самцов (из расчета 68 животных в год, на 4 года исследований). Количество животных, используемое в исследовании, достаточно для полной регистрации изучаемых эффектов.

Исследования проводились на изолированных деэндотелизированных гладкомышечных сегментах легочной артерии и свежеизолированных сосудистых гладкомышечных клетках, полученных из легочной артерии крыс-самцов линии Wistar. Регистрация ионных токов гладкомышечных клеток проводилась методом локальной фиксации потенциала patch-clamp. Сократительная активность гладкомышечных сегментов исследовалась методом механографии с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II.

Контрольные гиперкалиевые сокращения проводилась во всех экспериментах для стандартизации ответов сосудистых сегментов легочной артерии крыс в моделях их изо-, гипо- и гиперосмотических стрикций. Амплитуду гиперкалиевых сокращений принимали за 100%, а все данные других моделей сократительных ответов рассчитывали в % от контрольного гиперкалиевого сокращения. Гиперкалиевое сокращение является признанным стандартом в исследовании функций гладких мышц, и представляет собой аппликации модифицированного гиперкалиевого раствора Кребса, полученного путем эквимольного замещения 15 мМ NaCl на KCl в составе раствора. В предварительных экспериментах было показано, что в линейке экспериментов с

разными молярными концентрациями гиперкалиевого раствора, от 10 до 80 мМ КСl, раствор, содержащий 15 мМ КСl, вызывал сократительную реакцию с полумаксимальной амплитудой.

Аппликацию сахарозы в концентрации 120 мМ 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 мМ. В экспериментах Na⁺/K⁺-АТФазу ингибировали уабаином (Ouabain, sigma) в концентрации 100 мкМ. Данная концентрация была выбрана по литературным данным, а также подтверждена в серии предварительных экспериментов как концентрация, оказывающая значимый эффект на сократительную активность ГМК легочной артерии крыс. Гипоксические условия создавали путем вытеснения кислорода из растворов аргоном в течение 6 мин 30 сек непосредственно перед добавлением раствора в камеры с сосудистыми сегментами. Время было выбрано в серии экспериментов от 5 до 7 минут с шагом в 15 сек, (n = 6 для каждого времени) с использованием показаний жидкостного оксиметра Hanna HI 9142. Уровень содержания кислорода в растворе падал до ~10% из 100% (или ~2% из 21% от объемной доли кислорода в воздухе, растворенном в измеряемой жидкости).

Свежеизолированные ГМК ЛА крысы получали по собственной методике, основанной на литературных данных из открытого доступа [Anfinogenova Y. J. et al, 2011; Touyz R. M. et al, 2017]. Для исследования ионных токов гладкомышечные клетки помещались в камеру инвертированного микроскопа SliceScope Pro 2000 (Scientifica, Великобритания) системы для проведения двухканального patch-clamp. Для исследования использовались клетки веретенообразной формы. Измерение ионных токов производилось в конфигурации whole cell. Сигнал от электродов передавался на сдвоенный усилитель для пэтч-клампа EPC10 (НЕКА, Германия) и обрабатывался с помощью программного обеспечения Patchmaster. Обработка

сигналов осуществлялась программой Fitmaster (НЕКА, Германия). Регистрирующие пипетки изготавливались из капилляров, выполненных из боросиликатного стекла (Warner Instruments, США) с помощью вытяжителя пипеток (модель p-1000, Sutter, США). Для работы использовали пипетки, которые, после заполнения внутриклеточным раствором, имели сопротивление 3-6 МОм в инкубационном (внутриклеточном) растворе. Для получения whole cell конфигурации мембрану втягивали в отверстие электрода путем подачи отрицательного давления. Потенциал между пипеткой и инкубационным раствором обнулялся сразу после достижения контакта с клеточной мембраной ≥ 1 Гом. Емкости пипетки и мембраны компенсировали с помощью встроенных функций усилителя в программе Patchmaster. Исследования проводились при комнатной температуре (22-24°C). Для оценки влияния Na^+/K^+ -АТФазы на мембранный потенциал ее ингибировали аппликацией уабаина (Ouabain, Sigma) в концентрации 100 мкМ непосредственно в омывающий клетки раствор, после налажки контакта с мембраной клетки.

Статистическая обработка количественных данных проводилась с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics 21. Данные представлены в виде медиана + первый и третий квартили. 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 (U test). Достоверными считали различия при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования. Проведенное исследование позволяет установить новые подходы в лечении ряда опасных для жизни заболеваний, таких как гипертония и сердечная недостаточность. Исследована роль Na^+/K^+ -АТФазы в изменениях механического напряжения гладких мышц легочной артерии, индуцированных гетероосмотическими растворами в условиях гипоксии. Полученные данные носят фундаментальный характер, предполагая дальнейшее развитие темы исследования флуктуаций объема клеток. Такие условия

моделируют состояние изменения осмолярности крови и межклеточной среды, например, при заболеваниях почек, ассоциированных с артериальной гипертензией или сахарным диабетом. Гипоксические условия в тканях сосудов могут наблюдаться у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. Также, данные исследования позволяют теоретически обосновывать коррекцию лечения пациентов, получающих сердечные гликозиды (в том числе убаин) в составе комплексной терапии заболеваний сердца и сосудов.

Выводы

1. Na^+/K^+ -АТФаза активно вовлечена в механизмы регуляции объема в модели гиперосмоса в гипоксических условиях, т.к. ее ингибирование вызывает значительное снижение амплитуды гиперосмотической стрикции в условиях низкого содержания кислорода в омывающем растворе.

2. Гипоксия, как и ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы не оказывает значимого влияния на тонус ГМК в модели гипоосмотической стрикции. Роль этого транспортера в гипоосмотических условиях незначительна.

3. Ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы вызывает повышение тонуса ГМК легочной артерии крыс на фоне изоосмотической стрикции, после 30-минутной предобработки сегментов убаином. Ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы убаином устраняет эффект гипоксии на изоосмос. Таким образом, Na^+/K^+ -АТФаза вовлечена в механизмы регуляции объема в модели изоосмоса в гипоксических условиях.