

РОЛЬ Na^+ , K^+ , 2Cl^- -КОТРАНСПОРТА И КАЛИЕВОЙ ПРОВОДИМОСТИ В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ ЭФФЕКТОВ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА В ГЛАДКИХ МЫШЦАХ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ ОРГАНОВ

Скворцов А.В., Медведев М.А., Студницкий В.Б., Ковалёв И.В.,
Погудин Ю.А., Гусакова С.В., Антонов О.И., Бирулина Ю.Г.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

РЕЗЮМЕ

Целью исследования явилось изучение роли Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта и калиевой проводимости в осуществлении эффектов монооксида углерода в гладких мышцах (ГМК) мочеточника и *taenia coli* морской свинки.

Материал и методы. Исследование проводилось методом двойного сахарозного мостика. Изучены эффекты донора монооксида углерода CORM2 в гладких мышцах мочеточника и *taenia coli* морской свинки в нормальном растворе Кребса на фоне блокатора Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта буметанида и блокатора калиевых каналов тетраэтиламмония (ТЭА).

Основные результаты. Выявлено, что CORM2 вызывает угнетение сократительной активности ГМК *taenia coli* и мочеточника морской свинки, а его действие ослабляется буметанидом и ТЭА. Показано, что буметанид вызывает угнетение сократительной активности ГМК *taenia coli*, а его действие ослабляется ТЭА.

Заключение. Существуют тканеспецифичные механизмы взаимосвязи с ионной проводимостью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гладкие мышцы, монооксид углерода, калиевая проводимость мембраны, Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорт.

Введение

Монооксид углерода наряду с такими веществами, как оксид азота и сероводород, является газовым трансммиттером – особым видом сигнальных молекул, вовлеченных во внутриклеточную и межклеточную коммуникацию с высокой специфичностью во многих, если не всех, клетках, тканях и органах млекопитающих. Хотя их функция феноменологически сходна с таковой для классических посредников, газовые трансммиттеры имеют отличительные признаки влияния на функции клеток. Поскольку они растворимы в липидах, их оперированию не препятствуют клеточные мембраны, а их хранение в везикулах и органеллах

невозможно. Изучение действия механизмов газовых трансммиттеров – важная задача современной физиологии [1, 2, 3, 4, 5].

Известно, что электрические и сократительные свойства гладкомышечных клеток (ГМК) регулируются кальциевой сигнальной системой и циклическими нуклеотидами. Взаимодействие газовых трансммиттеров с этими системами активно изучается. В частности не до конца ясна роль ионной проводимости в осуществлении эффектов газовых трансммиттеров в ГМК. В настоящее время имеются сведения о способности СО активировать калиевую проводимость мембраны ГМК, но ее вклад в происходящие при этом эффекты электрогенеза до конца не ясен. Имеются данные о том, что электрические и сократительные свойства гладкомышечных клеток могут

✉ Скворцов Александр Вадимович, nrbys@yandex.ru

модулироваться многочисленными ионотранспортирующими системами, в частности Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспортером (НКСС). Известно, что в ГМК мочеточника их выключение изменяет эффективность нитросоединений [6, 7, 8].

В этой связи возникает необходимость изучения основных закономерностей и особенностей реализации взаимодействия монооксида углерода с ионной проводимостью биологической мембраны ГМК и связанной с ней сократительной активностью. Целью данного исследования явилось изучение роли НКСС и калиевой проводимости в осуществлении эффектов монооксида углерода в ГМК *taenia coli* и мочеточника морской свинки.

Материал и методы

Объектами исследования служили изолированные препараты гладких мышц мочеточника и *taenia coli* морских свинок. Для одновременной регистрации электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток морской свинки применялся метод двойного сахарозного моста в модификации Д.П. Артеменко и М.Ф. Шубы с одновременной регистрацией электрической и сократительной активности гладкомышечных полосок. В качестве контрольных (100%) служили значения параметров анэлектротона и величина сократительного ответа гладкомышечных сегментов в нормальном растворе Кребса, а также в растворе Кребса с добавлением тетраэтиламмония и буметанида в концентрации 10^{-2} моль/л, 10^{-4} моль/л соответственно при действии деполяризующего стимула сверхпороговой силы.

Нормальный раствор Кребса, использовавшийся в опытах, имел следующий состав (ммоль): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; NaHCO_3 – 15,5; NaH_2PO_4 – 1,2; MgCl_2 – 1,2; CaCl_2 – 2,5; глюкоза – 11,5. Раствор готовился на бидистиллированной воде из солей марки ХЧ, pH растворов 7,3–7,35; температура 36,5–37,0 °С. Изотонический раствор сахарозы (108,8 г/л) готовился на деионизированной воде. Удельное сопротивление раствора 3–5 мОм/см, pH – 6,2. Используемые реактивы: блокатор K^+ -проводимости мембраны – тетраэтиламмоний (ТЭА), блокатор Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта – буметанид, донор монооксида углерода (tricarboxyldichlororuthenium(2)-dimer (CORM2)).

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы Statistica 7.0 for Windows (фирма Statsoft, США). Для проверки однородности парных или зависимых выборок использовали Т-критерий Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Достоверными

считали различия при значении $p < 0,05$. Количество измерений (n) в каждой из выборок превышало или равнялось 5.

Результаты и обсуждение

В нормальном растворе Кребса полоски *taenia coli* морской свинки, как правило, обладали спонтанной электрической активностью, генерируя сложные потенциалы действия, состоящие из медленной волны, на гребне которой возникали пиковые потенциалы действия. Каждый такой электрический комплекс сопровождался сократительным ответом. Сам по себе буметанид в концентрациях 0,1–10000 мкмоль в течение 30–60 с вызывал дозозависимое снижение величины спонтанных и вызванных сокращений *taenia coli* морской свинки, в концентрациях свыше 10 мкмоль также уменьшал величину анэлектротона. Добавление блокатора калиевых каналов тетраэтиламмония в концентрации 10 мкмоль значительно ослабляло эффекты буметанида (рис. 1). Мочеточник морской свинки в нормальном растворе Кребса не обладал спонтанной активностью. На воздействие сверхпорогового электрического стимула мочеточник отвечал сокращением. Предобработка буметанидом практически не изменяла силу вызванных сокращений мочеточника морской свинки.

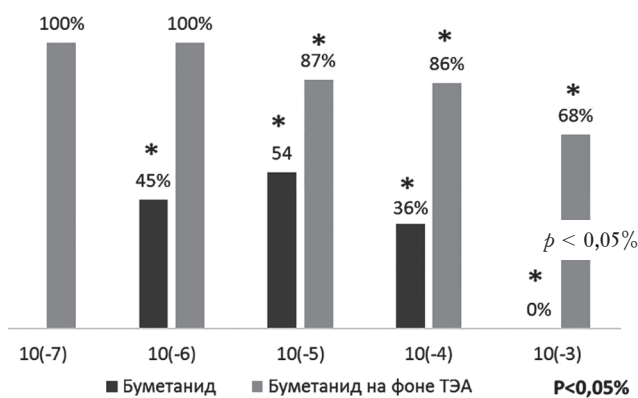


Рис. 1. Влияние буметанида на величину сократительной активности *taenia coli* морской свинки

CORM2 в концентрации менее 1 мкмоль не оказывал значимого влияния на величину электрической и сократительной активности *taenia coli* морской свинки. В концентрациях 10 мкмоль и более наблюдалось дозозависимое уменьшение силы сокращений гладкомышечных препаратов. На фоне действия блокатора Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта буметанида в концентрации 100 мкмоль

релаксирующее действие монооксида углерода ослабевало (рис. 2). В мочеточнике морской свинки CORM2 аналогично вызывал достоверное ($n = 6, p < 0,05$) уменьшение силы вызванных сокращений. На фоне действия буметанида этот эффект также ослабевал (рис. 3).

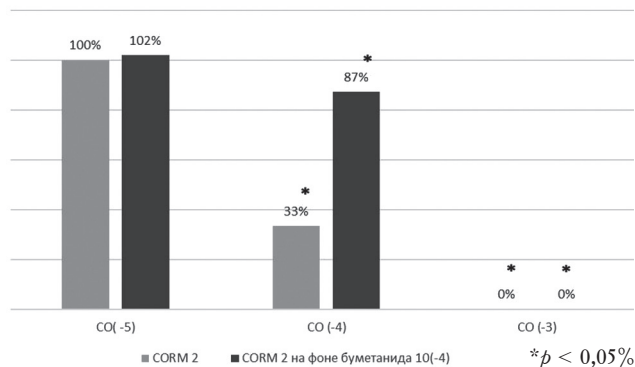


Рис. 2. Влияния донора монооксида углерода CORM2 на силу вызванных сокращений в *taenia coli* морской свинки на фоне действия буметанида в концентрации 10^{-4} моль/л и в нормальном растворе Кребса

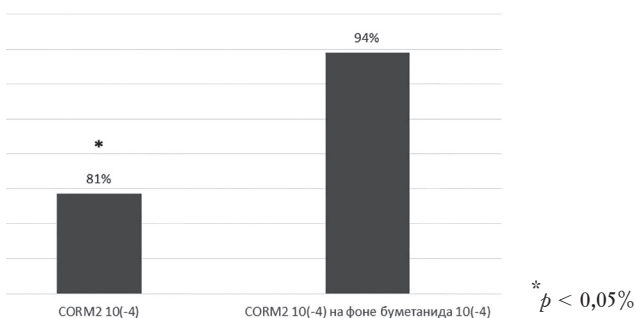


Рис. 3. Влияния донора монооксида углерода CORM2 на силу сокращения в мочеточнике морской свинки на фоне буметанида и в нормальном растворе Кребса

Известно, что реполяризация мембраны и угнетение сократительного ответа ГМК могут быть обусловлены усилением выходящих калиевых ионных токов. Для изучения влияния донора CO на проницаемость мембраны гладкомышечных клеток для ионов калия использовали блокатор калиевых каналов ТЭА. Само добавление ТЭА в раствор Кребса вызывало увеличение мембранного потенциала, длительности плато, амплитуды потенциала действия, силы сокращений гладких мышц по сравнению с контрольными значениями в нормальном растворе Кребса. На его фоне действие CO на силу сокращения гладкомышечных сегментов достоверно ($n = 5, p < 0,05$) уменьшалось, что указывает на то, что увеличение калиевой проводимости может являться одним из механизмов действия

монооксида углерода на сократительную активность гладких мышц в *taenia coli* (рис. 4). В мочеточнике морской свинки присутствие CORM2 в концентрации 1 мкмоль в растворе Кребса не вызывало значимых эффектов. Увеличение концентрации CORM2 до 10 мкмоль приводило к значимому снижению амплитуды сокращения гладкомышечных полосок ($n = 6, p < 0,05$). Добавление 5 ммоль ТЭА в раствор Кребса вызывало достоверное увеличение амплитуды ($n = 6, p < 0,05$) сокращения ГМК до 137% по отношению к сокращениям в нормальном растворе Кребса. На фоне ТЭА действие CORM2 достоверно ($n = 6, p < 0,05$) ослаблялось (рис. 5).

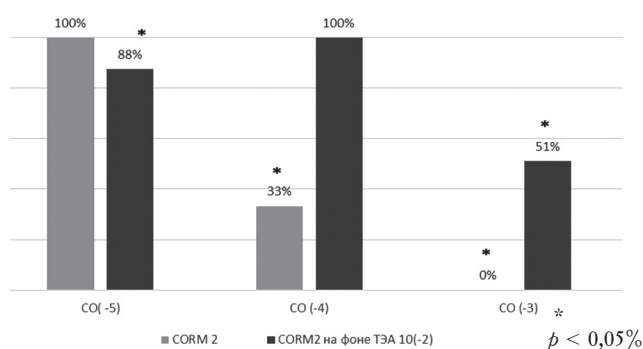


Рис. 4. Влияния донора монооксида углерода CORM2 на силу вызванных сокращений в *taenia coli* морской свинки на фоне ТЭА и в нормальном растворе Кребса

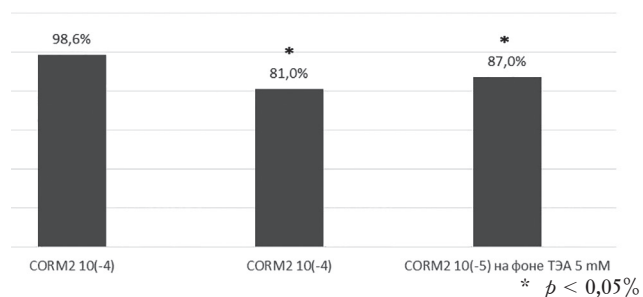


Рис. 5. Действие монооксида углерода мембранного потенциала на силу сокращений мочеточника морской свинки на фоне ТЭА и в нормальном растворе Кребса

Заключение

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что монооксид углерода оказывает релаксирующее действие на гладкие мышцы *taenia coli* и мочеточника морской свинки. Ингибирование натрий-калий-хлор-котранспорта и калиевых каналов достоверно снижает этот эффект в каждом из изучаемых объектов, что, по всей видимости, свидетельствует о них, как об универсальных мишенях для монооксида углерода. Сам по себе буметанид вызывает релаксацию

ГМК *taenia coli*, но не мочеточника, причем его действие ослабляется ТЭА, что указывает на наличие тканеспецифичного взаимодействия НКСС и калиевой проводимости. Таким образом, изучаемые ионтранспортирующие системы вносят вклад в реализацию эффектов монооксида углерода в гладких мышцах висцеральных органов, могут быть связаны с друг другом. Однако механизмы, лежащие в основе этой взаимосвязи, как и роль Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -котранспорта, тканеспецифичны.

Литература

1. Wu L., Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions and pharmacological applications. // *Pharmac. Rev.* 2005. V. 57. P. 585–630.
2. Баскаков М.Б., Юсубов М.С. Газовая атака, или Осторожно, газы! // *Бюллетень сибирской медицины.* 2010. Т. 9, № 6. С. 160–164.
3. Donat, Farugia et al. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. // *The journal of physiology.* 2004. V. 556. P. 325–336.
4. Коржов В.И., Видмаченко А.В., Коржов М.В. Монооксид углерода // *Журн. АМН Украины.* 2010. Т. 16, № 1. С. 23–37.
5. Leffler Ch.W., Parfenova H., Jaggar J.H. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011. V. 301. P. 1–11.
6. Anfinogenova Y.J., Baskakov M.B., Kilin A.A. et al. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -cotransport, intracellular Cl^- and L-type Ca^{2+} channels // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2004. V. 449. P. 42–55.
7. Peers Ch., Dallas M.L., Scragg J.L. Ion channels as effectors in carbon monoxide signaling // *Comm. Integ. Biol.* 2009. V. 2. P. 241–242.
8. Wilkinson W.J., Kemp P.G. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels // *J. Physiol.* 2011. V. 589, № 13. P. 3055–3062.

Поступила в редакцию 23.03.2016 г.

Утверждена к печати 15.03.2016 г.

Скворцов Александр Вадимович (✉) – аспирант кафедры нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).

Медведев Михаил Андреевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).

Студницкий Василий Борисович – канд. биол. наук, доцент кафедры нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).

Ковалёв Игорь Викторович – д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Погудин Юрий Анатольевич – канд. мед. наук, ст. преподаватель кафедры нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).

Гусакова Светлана Валерьевна – д-р мед. наук, заведующая кафедрой биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Антонов Олег Иванович – ассистент кафедры нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).

Бирулина Юлия Георгиевна – ассистент кафедры биофизики и функциональной диагностики медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

✉ Скворцов Александр Вадимович, pphys@yandex.ru

Сибирский государственный медицинский университет, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2, e-mail: office@ssmu.ru, тел. (382-2)-90-11-01.

ROLE OF Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -COTRANSPORTER AND POTASSIUM CONDUCTIVITY IN THE REALIZATION OF THE EFFECT OF CARBON MONOXIDE, IN THE SMOOTH MUSCLE OF VISCERAL ORGANS

Skvortsov A.V., Medvedev M.A., Studnitsky V.B., Kovalev I.V., Pogudin Y.A., Gusakova S.V., Antonov O.I., Birulina J.G.

Siberian State Medical University, Tomsk. Russian Federation

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the role of the Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -transport and potassium conductance, in the implementation of the effects of carbon monoxide in the SMC *taenia coli* and ureter of guinea pig.

Materials and methods. The study was conducted by the method of double saccharose bridge.

Was studied the effects of carbon monoxide donor CORM2 in ureter and smooth muscle of guinea pig of taenia coli, in normal Krebs solution, against inhibitor-bumetanide and potassium channel blocker tetraethylammonium chloride (TEA).

Studied the effects of bumetanide in normal Krebs solution and the background of TEA.

Main results. CORM2 causes inhibition of contractile activity of SMC taenia coli and guinea pig ureter. Its effect is weakened by bumetanide and TEA. Bumetanide causes inhibition of contractile activity of SMC taenia coli, and its effect is weakened by TEA.

Conclusions. In this way, it shows that there are tissue-specific mechanisms of interrelation effects CO and ion conductivity.

KEY WORDS: smooth muscle cells, carbon monoxide, smooth muscle, potassium conductance of the membrane, Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransporter.

Bulletin of Siberian Medicine, 2016, vol. 15, no. 2, pp. 65–69

References

1. Wu L., Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions and pharmacological applications. // *Pharmac. Rev.* 2005. V. 57. P. 585–630.
2. Baskakov M.B., Yusubov M.S. Gazovaya ataka, ili Ostorozhno, gazy! [Gas attack or gently, the gases!]. *Byulleten sibirskoj mediciny – Bulletin of Siberian Medicine*, 2010, no. 6, pp. 160–164 (in Russian).
3. Simon J., Gianrico F. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. // *The Journal of Physiology*. 2004. V. 556. P. 325–336.
4. Korzhov V.I., Vidmachenko A.V., Korzhov M.V. Monoosid ugleroda [Carbon monoxide]. *Gurnal AMN Ukraina – Journal of Academy of Medical Sciences of Ukraine*, 2010, vol. 16, no. 1, pp. 23–37 (in Russian).
5. Leffler Ch.W., Parfenova H., Jaggar J.H. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011. V. 301. P. 1–11.
6. Anfinogenova Y.J., Baskakov M.B., Kilin A.A. et al. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransport, intracellular Cl^- and L-type Ca^{2+} channels // *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 2004. V. 449. P. 42–55.
7. Peers Ch., Dallas M.L., Scragg J.L. Ion channels as effectors in carbon monoxide signaling // *Comm. Integ. Biol.* 2009. V. 2. P. 241–242.
8. Wilkinson W.J., Kemp P.G. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels // *J. Physiol.* 2011. V. 589. № 13. P. 3055–3062.

Skvortsov Alexandr V. (✉), Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Medvedev Michail A., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Studnitsky Vasiliy B., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Kovalev Igor V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Pogudin Yriy A., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Gusakova Svetlana V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Antonov Oleg I., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Birulina Uliya G., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ Skvortsov Alexandr V., e-mail: nphys@yandex.ru.

Siberian State Medical University, 2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, e-mail: office@ssmu.ru, ph. (382-2)-90-11-01.