

УДК 616-092.18

**ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И РЕОКСИГЕНАЦИИ НА  
МЕХАНИЧЕСКОЕ НАПРЯЖЕНИЕ ГЛАДКИХ  
МЫШЦ СОСУДОВ ПРИ АКТИВАЦИИ  
 $\alpha_1$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ**Бирулина Ю.Г., Гусакова С.В., Рязанцева Н.В., Ковалев И.В.,  
Смаглий Л.В., Алейник А.Н.<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет,  
г. Томск<sup>1</sup>Национальный исследовательский  
Томский политехнический университет, г. Томск  
E-mail: birulina20@yandex.ru

**Бирулина Юлия Георгиевна**, аспирант каф. патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ, г. Томск.  
E-mail: birulina20@yandex.ru  
Область научных интересов: молекулярные механизмы внутриклеточной сигнализации в гладкомышечных клетках, газотрансмиттеры, гипоксия.

**Гусакова Светлана Валерьевна**, зав. каф. биофизики и функциональной диагностики, д-р мед. наук ГБОУ ВПО СибГМУ, г. Томск.  
E-mail: gusacova@yandex.ru

Область научных интересов: молекулярные механизмы внутриклеточной сигнализации, объем-зависимые процессы в сосудах гладких мышцах, газотрансмиттеры.

**Рязанцева Наталья Владимировна**, зав. каф. молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики, д-р мед. наук, профессор ГБОУ ВПО СибГМУ, г. Томск.  
E-mail: nv\_ryazan@mail.ru

Область научных интересов: идентификация молекулярных мишеней и маркеров для разработки технологий персонализированного сопровождения социально значимых заболеваний; селективное управление апоптозом, пролиферацией и дифференцировкой нормальных и патологически измененных клеток.

**Ковалев Игорь Викторович**, д-р мед. наук, профессор каф. биофизики и функциональной диагностики ГБОУ ВПО СибГМУ, г. Томск.

E-mail: kovalew@mail.ru  
Область научных интересов: физиология висцеральных систем, механизмы межклеточной и внутриклеточной сигнализации в гладких мышцах, регуляция вторичными посредниками электрической и сократительной активности гладких мышц желудочно-кишечного тракта.

Проявления гипоксии ткани, а также последующей реоксигенации сопровождаются целым комплексом метаболических нарушений, которые приводят, в том числе, к повреждению гладкомышечных клеток сосудов и нарушению их сократительной функции. Гладкомышечные клетки играют важную роль в регуляции просвета кровеносных сосудов, а следовательно, системного артериального давления и локального снабжения тканей кислородом. Предполагается, что при гипоксии и реоксигенации сосудах гладких мышц происходит их расслабление и снижение силы сокращений. Механографическим методом было изучено влияние гипоксии и реоксигенации на сократительную активность изолированных гладких мышц аорты крысы на фоне действия  $\alpha_1$ -адреномиметика фенилэфрина. Проведенные нами исследования показали, что при активации  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов в условиях гипоксии и реоксигенации наблюдается снижение сократительной активности гладкомышечных клеток аорты крысы, причем в большей степени при реоксигенации. Блокирование калиевых каналов плазмалеммы тетраэтиламмонием позволило установить, что угнетающие эффекты гипоксии и реоксигенации на сократительную активность гладкомышечных клеток обусловлены повышением калиевой проводимости мембраны клеток.

**Ключевые слова:**

Гладкомышечные клетки сосудов, сократительная активность, гипоксия, реоксигенация, фенилэфрин.

**Введение**

Гипоксия традиционно рассматривается как типовой патологический процесс, возникающий в результате снижения содержания кислорода в тканях и/или нарушения его утилизации в процессе биологического окисления [1–3]. Известно, что метаболические и функциональные нарушения, возникающие при недостатке кислорода, прежде всего, связаны с дефицитом макроэргических соединений,

образуемых в сопряженных с окислительно-восстановительными процессами реакциях фосфорилирования на внутренней мембране митохондрий [1]. В условиях гипоксии происходит снижение электрического потенциала внутренней мембраны митохондрий, что влечет за собой

**Смаглий Людмила Вячеславовна**, канд. мед. наук, ассистент кафедры биофизики и функциональной диагностики ГБОУ ВПО СибГМУ, г. Томск.

E-mail: lud.smagly@yandex.ru

Область научных интересов: механизмы внутриклеточной и межклеточной сигнализации в сосудистых гладких мышцах, газовые посредники, сероводород, натрий-зависимые ион-транспортующие системы.

**Алейник Александр Николаевич**, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. каф. прикладной физики Физико-технического института НИ ТПУ, г. Томск.

E-mail: aleinik@tpu.ru

Область научных интересов: спектроскопия, медицинская физика, ядерная электроника.

уменьшение, а затем и потерю митохондриями способности аккумулировать внутриклеточный кальций [3].

В последние годы были получены убедительные данные о том, что гипоксия и последующая реоксигенация приводят к повреждению не только клеток паренхиматозных органов, но и клеток сосудов: эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток (ГМК). Действие гипоксического фактора ведет к нарушению сократительной функции гладких мышц [4, 5]. Влияние гипоксии по степени и продолжительности неодинаково нарушает сократительные свойства ГМК. Как известно, их сокращение развивается при поддерживаемой деполяризации мембраны, открывании медленно инактивирующихся  $Ca^{2+}$ -каналов и обеспечивается оперированием С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы [6, 7].

Существующие на сегодняшний день данные свидетельствуют о том, что гипоксия и реоксигенация сосудистых мышц приводят к их расслаблению и снижают силу как спонтанных, так и вызванных деполяризацией мембраны ГМК или действием физиологически активных веществ сокращений. Но по-прежнему продолжается дискуссия в отношении наиболее вероятных клеточных механизмов гипоксической вазодилатации [4, 5]. Известно, что сосудистый эндотелий может способствовать гипоксическому расслаблению и снижению силы сокращений за счет освобождения релаксирующих

факторов [4, 8]. В противоположность этому имеется много свидетельств в пользу сосудистых гладких мышц как сенсора низкого напряжения кислорода независимо от метаболических факторов, освобождаемых эндотелием или окружающими тканями [3]. В понимании процессов гипоксической вазодилатации превалирует парадигма активация калиевой проводимости мембраны гладкомышечных клеток, в частности плазмолеммальных АТФ-чувствительных калиевых каналов ( $K_{ATP}$ ) на фоне снижения уровня внутриклеточного АТФ [3, 4]. Калиевые токи через открытые калиевые каналы и последующая гиперполяризация мембраны ведут к закрыванию потенциал-зависимых кальциевых каналов и подавлению входа кальция, а значит, и к расслаблению гладких мышц. Согласно вышесказанному необходимо установить механизмы эндотелий-зависимого и независимого гипоксического расширения/расслабления сосудов и снижения сократительных реакций ГМК на действие возбуждающих факторов; исследовать индуцированное гипоксией и реоксигенацией изменение ионной проводимости сосудистых гладких мышц.

### Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовались деэндоотелизированные гладкомышечные сегменты грудного отдела аорты самцов крыс линии Wistar.

Для исследования сократительной активности сосудистые гладкомышечные сегменты фиксировали с помощью стальных крючков в аэрируемых камерах объемом 10 мл четырехканальной механографической установки Muobath II, заполненных сбалансированным солевым раствором Кребса и термостатируемых при температуре 37 °С, pH=7,4. Механическое напряжение сосудистых сегментов изучалось с помощью аппаратно-программного обеспечения LAB-TRAX-4/16 (Германия). После 40–50-минутной инкубации сегментов в растворе Кребса дважды вызывали гиперкалиевое сокращение (эквиволярное замещение 30 mM NaCl на KCl). Далее, в зависимости от целей эксперимента, использовали физиологический раствор с добавлением тестируемых соединений. Гипоксический раствор Кребса создавали путем

пропускания через него газообразного азота (чистота 99,99 %) в течение 15 минут. Реоксигенация достигалась сменой гипоксического раствора на физиологический с нормальным содержанием кислорода. Уровень кислорода в растворе оценивали с помощью портативного оксиметра HI 9145 (HANNA). Объемная доля кислорода в гипоксическом растворе Кребса не превышала  $5,0 \pm 0,2$  %.

Все растворы готовили на основе дистиллированной воды путем добавления соответствующих реактивов. Физиологический раствор Кребса содержал (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> [tris(hydroxymethyl)-aminomethane] (pH 7,4). Тестирующие растворы готовились путем добавления в физиологический раствор Кребса или его модификаций следующих реактивов: фенилэфрина (ФЭ), тетраэтиламмония хлорида (ТЭА) (все Sigma).

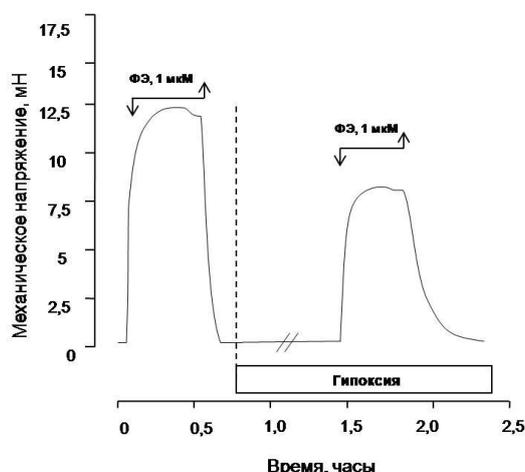
В качестве контрольных (100 %) служили значения амплитуды сократительных ответов на действие фенилэфрина. Анализ данных проводили при помощи программы SPSS 17.0 for Windows. Фактические данные представлены в виде «среднее  $\pm$  ошибка среднего» ( $M \pm m$ ). Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney test). Различия считали статистически значимыми при значении  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

В серии предварительных экспериментов нами было показано, что инкубация гладкомышечных сегментов в гипоксическом растворе Кребса в течение 60 минут не влияет на их исходный базальный тонус.

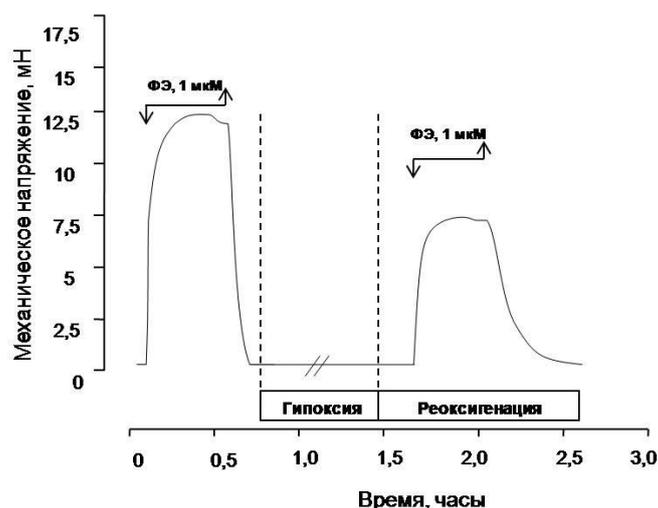
Обязательным условием для индукции сокращения в ГМК является использование внеклеточных ионов кальция. Повышение их концентрации внутри клетки можно воспроизводить с помощью физиологически активных веществ, например агонистов  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов. Связываясь со своим рецептором на плазматической мембране гладких мышц, данные соединения обеспечивают рецептор-управляемый вход Ca<sup>2+</sup> в клетку, активируют С-киназную ветвь кальциевой сигнальной системы и способствуют высвобождению Ca<sup>2+</sup> из депо.

Исследование влияния гипоксии и реоксигенации на сократительную активность сосудистых ГМК производили на фоне добавления в исследуемый раствор  $\alpha_1$ -адреномиметика ФЭ. Амплитуда сокращений сосудистых ГМК в ответ на добавление 1 мкМ ФЭ в нормоксический раствор Кребса была сравнима с ответной реакцией на действие гиперкалиевого раствора. Однако в условиях гипоксии происходило статистически значимое уменьшение амплитуды сокращения ГМК, вызванного действием 1 мкМ ФЭ (рис. 1). Так механическое напряжение составило  $73,4 \pm 2,5$  % ( $n=8$ ,  $p < 0,05$ ) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения в условиях нормоксии.



**Рис. 1.** Действие гипоксии на механическое напряжение гладкой мышцы аорты крысы, предсокращенной фенилэфрином (1 мкМ). По оси ординат – механическое напряжение (мН); по оси абсцисс – время (ч). Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов

Для исследования влияния реоксигенации гладкомышечные сегменты после 60-минутной инкубации в гипоксическом растворе Кребса помещали в раствор с нормальным напряжением кислорода и спустя 15 минут регистрировали их сократительную активность. Ранее было установлено, что реоксигенация не влияла на базальный тонус сегментов. В условиях реоксигенации амплитуда сокращения, вызванного ФЭ, статистически значимо снижалась (рис. 2), составив  $65,8 \pm 3,1$  % ( $n=8$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, от контрольного значения. Установлено, что на фоне реоксигенации сократительный эффект ФЭ угнетается сильнее, чем при гипоксии ( $p<0,05$ ).



**Рис. 2.** Влияние реоксигенации на амплитуду сократительного ответа гладкомышечного сегмента при действии 1 мкМ фенилэфрина. По оси ординат – механическое напряжение (мН); по оси абсцисс – время (ч). Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов

Таким образом, в условиях гипоксии и реоксигенации механическое напряжение сосудистых ГМК, предсокращенных раствором ФЭ, достоверно снижалось относительно контрольных сокращений в условиях нормоксии. Полученные результаты могут быть обусловлены угнетением оперирования С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы, которая обеспечивает поддерживаемый ответ клеток при активации адренергических рецепторов или же индуцированы изменением ионной проводимости мембраны.

В наибольшей степени в этих процессах, предположительно, задействована калиевая проводимость мембраны. Добавление 10 мМ неселективного блокатора калиевых каналов ТЭА на фоне ФЭ-индуцированного сокращения вызывало статистически значимое увеличение амплитуды сокращений ГМК до  $115,1 \pm 1,5$  % ( $n=8$ ,  $p<0,05$ ) по сравнению с контрольным ФЭ-индуцированным сокращением. В условиях действия гипоксии и реоксигенации при добавлении ТЭА наблюдалось увеличение механического напряжения ГМК до  $125,3 \pm 3,4$  % и  $116,4 \pm 4,5$  % ( $n=8$ ,  $p<0,05$ ) по сравнению с контрольными значениями при гипоксии и реоксигенации, соответственно (рис. 2). В результате было установлено, что только в гипоксических условиях по сравнению с нормоксией значимо усиливается констрикторное действие ТЭА на сокращение, индуцированное ФЭ ( $p<0,05$ ). Полученные данные позволяют предположить, что в реализации эффектов гипоксии и реоксигенации на сократительную активность ГМК могут быть задействованы калиевые каналы плазмалеммы. Так, на фоне гипоксии или реоксигенации происходит повышение выходящих калиевых токов, что, в свою очередь, приводит к гиперполяризации мембраны ГМК и их расслаблению.

### Заключение

Таким образом, полученные нами результаты позволяют утверждать, что гипоксия и реоксигенация оказывают угнетающее действие на сократительные свойства гладких мышц сосудов при активации  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов. Данный эффект реализуется, прежде

всего, за счет повышения калиевой проводимости мембраны гладкомышечных клеток. Согласно литературным источникам одним из наиболее вероятных механизмов действия гипоксии и последующей реоксигенации на сократительную функцию сосудистых гладких мышц является активация АТФ-чувствительных калиевых каналов плазмалеммы.

*Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № 14.740.11.0932, соглашение № 8487).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чеснокова Н.П. Современные представления о патогенезе гипоксий. Классификация гипоксий и пусковые механизмы их развития // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 5. – С. 23–27.
2. Semenza G.L. Oxygen homeostasis // WIREs Systems Biology and Medicine. – 2009. – V. 2. – P. 336–361.
3. Walshe T.E. The Role of Hypoxia in Vascular Injury and Repair // Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. – 2008. – V. 3. – P. 615–643.
4. Benoit J.N. Vascular reactivity following ischemia/reperfusion // Frontiers in Bioscience. – 1997. – V. 2. – P.28–33.
5. Otter D. Mechanisms of hypoxic vasodilatation of isolated rat mesenteric arteries: a comparison with metabolic inhibition // Journal of Physiology. – 1999. – V. 516. – № 1. – P. 249–259.
6. Миогенные эффекты циклического гуанозинмонофосфата в гладкомышечных клетках. Роль протеинкиназы C / И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков, М.А. Медведев и др. // Рос. Физиол. ж. им. Сеченова. – 2003. – Т. 89. – № 4. – С. 436–446.
7. Throckmorton D.C. Protein kinase C activation during Ca<sup>2+</sup>-independent vascular smooth muscle contraction // J. Surg Res. – 1998. – V. 78 (1). – P. 48–53.
8. Li Ch. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2002. – № 282. – P. 227–241.

Поступила 22.01.2015 г.