

УДК 591.462.1:591.185.23.044

DOI 10.20538/1682-0363-2016-3-48-54

Для цитирования: Ковалев И.В., Бирулина Ю.Г., Гусакова С.В. и др. Влияние гипоксии на электрические и сократительные свойства гладких мышц мочеточника морской свинки. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15(3): 48–54

Влияние гипоксии на электрические и сократительные свойства гладких мышц мочеточника морской свинки

Ковалев И.В.¹, Бирулина Ю.Г.¹, Гусакова С.В.¹, Смаглий Л.В.^{1,2},
Петрова И.В.¹, Носарев А.В.^{1,2}, Медведев М.А.¹, Орлов С.Н.^{1,3}

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия
634050, г. Томск, ул. Ленина, 30

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия
119991, г. Москва, Ленинские горы, 1

РЕЗЮМЕ

Цель – изучить влияние гипоксии на параметры электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток (ГМК) мочеточника морской свинки.

Материал и методы. Регистрацию параметров электрической и сократительной активности гладких мышц мочеточника осуществляли методом двойного сахарозного моста.

Результаты. Обнаружено, что снижение содержания кислорода в перфузионном растворе в течение 10 мин приводило к усилению электрической и сократительной активности ГМК мочеточника. Присутствие тетраэтиламмония хлорида (ТЭА, 5 мМ) – неселективного блокатора калиевой проводимости мембраны – в условиях гипоксии вызывало дополнительное увеличение амплитуды и длительности плато потенциала действия, сократительных ответов гладких мышц мочеточника. При воздействии гипоксии калиевая проводимость мембраны ГМК мочеточника снижалась. Угнетение влияния агониста α_1 -адренергических рецепторов – фенилэфрина (ФЭ, 10 мкМ) на электрические и сократительные свойства ГМК в условиях понижения парциального напряжения кислорода в растворе может служить указанием на участие С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы в эффектах гипоксии. Предобработка гладких мышц мочеточника селективным ингибитором Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспортера (НКСС) – буметанидом (100 мкМ) – вызывала снижение активирующего действия гипоксии на гладкомышечные сегменты мочеточника морской свинки, что является подтверждением вовлеченности данного ионного переносчика в механизмы действия гипоксии на гладкие мышцы.

Заключение. Таким образом, влияние гипоксии на механизмы регуляции электрической активности и сокращений гладких мышц мочеточника морской свинки может быть обусловлено изменением ионной проницаемости мембран ГМК и оперированием ион-транспортирующих систем клеток.

Ключевые слова: гипоксия, гладкие мышцы, калиевые каналы, Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорт.

Введение

Недостаточное поступление кислорода или же нарушение его утилизации в ходе биологического окисления может приводить к нарушению рабо-

ты функционально-метаболических систем организма [1, 2]. Процессы, запускаемые гипоксией, являются универсальными и протекают во многих клетках и тканях организма.

В последние годы были получены убедительные данные о том, что снижение парциального напряжения кислорода в клетках приводит к

✉ Ковалев Игорь Викторович, e-mail: kovalew@mail.ru

угнетению их функциональной активности [2]. Гладкомышечные клетки (ГМК) висцеральных органов и кровеносных сосудов в этом не являются исключением. Действие гипоксического фактора, как правило, нарушает процессы сопряжения возбуждения – сокращения гладких мышц [3, 4, 5]. Показано, что в условиях гипоксии наблюдается снижение миогенного тонуса сосудов, за исключением, может быть, легочных сосудов [6]. Имеются данные о том, что гипоксическое угнетение силы сокращений ГМК может быть обусловлено снижением кальциевого метаболизма, поскольку именно ионы Ca^{2+} играют главенствующую роль в цикле сокращение – расслабление мышечных клеток [4]. Однако при развитии релаксирующих эффектов гипоксии необходимо также учитывать вклад калиевой проводимости мембраны, активация которой при открывании калиевых каналов также приведет к ее гиперполяризации и расслаблению ГМК [3, 5]. Роль каждого из компонентов калиевой проводимости мембраны в реализации эффектов гипоксии на сократительные свойства ГМК до сих пор активно обсуждается. При этом нельзя исключить участие и других ион-транспортных систем, в частности Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспортера (NKCC), обеспечивающего поддержание неравновесного трансмембранного распределения ионов хлора в гладких мышцах [7]. Ранее отмеченная особенность оперирования NKCC в ГМК мочеточника морской свинки и вклад в механизмы регуляции сопряжения возбуждения – сокращения позволяют использовать этот висцеральный гладкомышечный объект в качестве маркера влияния гипоксии.

Целью настоящей работы явилось изучение эффектов гипоксии на сократительную и электрическую активность гладких мышц мочеточника морской свинки и выявление возможных молекулярных мишеней ее воздействия.

Материал и методы

Исследование выполняли на изолированных гладкомышечных препаратах мочеточника морской свинки, которых умерщвляли методом цервикальной дислокации в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Регистрацию параметров электрической и сократительной активности гладких мышц мочеточника осуществляли методом двойного сахарозного моста, представляющего собой ограниченную с двух сторон сахарозными секциями камеру (раствор сахарозы 0,3 М с удельным сопротивлением 15 мОм·см), омываемую рас-

твором Кребса следующего состава (в мМ): 120,4 NaCl, 5,9 KCl, 2,5 CaCl_2 , 1,2 MgCl_2 , 5,5 глюкозы, 15 $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ [tris(hydroxymethyl)-amino-methane], pH 7,35–7,40. Отпрепарированные гладкомышечные сегменты фиксировали в камере установки и перфузировали до начала эксперимента в течение 40–45 мин при 37 °С раствором Кребса. Отведение электрических потенциалов производили при помощи неполяризующихся электродов. Механическое напряжение (МН) гладкомышечных препаратов регистрировали изометрическим датчиком силы FT10G, соединенным с 14-битным АЦП L-791 (А-КАРД, Россия). Полученные сигналы обрабатывали с использованием соответствующего программного обеспечения (LGraph2, А-КАРД, Россия). В качестве контрольных (100%) служили значения параметров амплитуды анэлектротонических потенциалов при действии гиперполяризующего стимула и потенциала действия (ПД): амплитуда пикового компонента и длительность плато (величина сокращений ГМК при действии депольяризующего стимула).

Гипоксический раствор Кребса готовился непосредственно перед началом эксперимента путем пропускания газообразного азота через раствор Кребса в течение 10 мин. Содержание кислорода в растворе составляло не более $10,0 \pm \pm 0,5$ об.%, контролировалось портативным оксиметром HI 9146-04 (HANNA, Германия). Тестируемые растворы готовились путем добавления в раствор Кребса или его модификаций следующих реактивов: буметанида, тетраэтиламмония хлорида (ТЭА), фенилэфрина (ФЭ) (Sigma, США).

Анализ полученных результатов проводили при помощи программы SPSS Statistics 17.0.1 for Windows. Фактические данные представлены в виде медианы (*Me*) и интерквартильного размаха (Q_1-Q_3). Сравнение количественных показателей выполняли при помощи непараметрических критериев: U-критерий Манна – Уитни (U test Mann – Whitney) и T-критерий Уилкоксона (Wilcoxon Signed Ranks Test). Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты

После инкубации изолированных препаратов ГМК морской свинки в течение 40–45 мин в сбалансированном растворе Кребса регистрировали параметры исходного МН и мембранного потенциала (МП). При воздействии электрическим током в диапазоне 0,1–1,5 мкА регистрировались изменения МП гладкомышечных препаратов в виде кат- и анэлектротонических потенциалов. Увеличение силы тока приводило к линейному

росту величин обоих электротонических потенциалов. Однако, начиная с силы тока 0,5–0,7 мкА, катэлектротонический потенциал ГМК возрастал в меньшей степени, чем анэлектротонический потенциал (АЭТ). При дальнейшем повышении амплитуды раздражающего стимула эффект выпрямления сопровождался достижением порога раздражения и ответом на стимул в виде потенциала действия и сокращения.

Снижение содержания кислорода в перфузионном растворе в течение 30 мин не изменяло исходные значения МН и МП сегментов мочеточника. В условиях гипоксии происходило посте-

пенное достоверное угнетение амплитуды АЭТ вплоть до 20 мин исследования.

При этом смена гипоксического перфузионного раствора на нормальный раствор Кребса приводила к восстановлению величины анэлектротонических потенциалов. Наблюдаемые колебания АЭТ могут быть связаны с изменением потенциал-зависимого компонента калиевой проницаемости мембраны под влиянием гипоксии.

Кроме этого понижение содержания кислорода в перфузионном растворе вызывало усиление электрической и сократительной активности ГМК мочеточника морской свинки (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Влияние гипоксии на параметры электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки, $Me (Q_1-Q_3)$					
Группа		Амплитуда АЭТ, %	Амплитуда ПД, %	Длительность ПД, %	Амплитуда сокращения, %
Контроль ($n = 9$)		100	100	100	100
Гипоксия ($n = 9$)	1 мин	96,2* (80,2–97,9)	98,5 (94,4–105,1)	100,4 (91,9–101,9)	106,3 (85,9–113,9)
	3 мин	98,3 (95,6–102,4)	97,2 (88,6–102,9)	99,9 (96,7–106,6)	112,8* (94,1–137,9)
	5 мин	93,9* (87,8–98,8)	101,8 (97,2–107,1)	104,8* (100,1–114,2)	124,1* (96,8–157,7)
	10 мин	99,1 (92,7–102,3)	104,7* (99,6–112,3)	107,1* (101,1–112,3)	123,7* (100,0–131,7)
	15 мин	85,7* (80,3–98,5)	108,8* (106,4–117,5)	112,0* (93,6–120,3)	125,6* (101,6–152,1)
	20 мин	84,1* (80,1–98,8)	104,3* (101,4–113,2)	104,5* (98,7–119,9)	131,3* (89,9–155,7)

* – различия по сравнению с контролем.

Так, начиная уже с 1-й мин, регистрировалось увеличение амплитуды и длительности плато ПД, как и величины сокращений исследуемых сегментов гладких мышц. Восстановление содержания кислорода в растворе Кребса приводило к постепенной нормализации величин изучаемых параметров электрической и сократительной активности.

Изменение проводимости калиевых каналов мембраны ГМК рассматривается как один из возможных механизмов реализации эффектов гипоксии на гладкие мышцы, поскольку она является одним из важнейших регуляторов электрических и сократительных свойств гладких миоцитов.

Для изучения роли калиевой проводимости мембраны ГМК мочеточника морской свинки в эффектах гипоксии использовали неизбирательный блокатор калиевых каналов – тетраэтиламмония хлорид. Добавление ТЭА в концентрации 5 ммоль в перфузионный солевой раствор Кребса приводило к статистически значимому возрастанию значений изучаемых параметров электрической и сократительной активности ГМК мочеточника. Амплитуда ПД при этом составила 127 (124,1–156,6)%, длительность плато ПД – 104,7 (99,4–129,4)%, амплитуда сокращения – 146,7 (138,1–155,2)%, $n = 6$, $p < 0,05$ соответственно от контрольных значений в нормальном растворе Кребса (рис.). На фоне действия ТЭА сни-

жение уровня кислорода в перфузионном растворе сопровождалось дополнительным приростом амплитуды и длительности плато ПД в ответ на электрический стимул, которые к 10-й мин исследования составили 131,5 (127,2–159,1)% и 112,7 (102,2–130,8)%, $n = 6$, $p < 0,05$ соответственно от контроля. Амплитуда сокращений гладких мышц мочеточника при аппликации ТЭА увеличилась до 161,23 (150,7–187,7)%, $n = 6$, $p < 0,05$ по сравнению с контролем. Присутствие ТЭА вызывало статистически значимое увеличение параметров электрической активности и МН гладких мышц мочеточника при гипоксии в сравнении с гипоксическим раствором в отсутствии блокатора калиевой проводимости. Таким образом, на фоне угнетения калиевой проводимости мембраны ГМК мочеточника морской свинки дополнительное активизирующее действие гипоксии сохранялось.



Рисунок. Влияние гипоксии на параметры электрической и сократительной активности ГМК мочеточника морской свинки в присутствии тетраэтиламмония, 5 мМ: А – сократительная активность, Б – электрическая активность. Справа – калибровочный сигнал и отметка времени.

Т а б л и ц а 2

Влияние гипоксии на электрические и сократительные свойства ГМК мочеточника морской свинки при ингибировании Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспортера, $\text{Me} (\text{Q}_i - \text{Q}_j)$			
Группа	Амплитуда ПД, %	Длительность ПД, %	Амплитуда сокращения, %
Контроль ($n = 9$)	100	100	100
+Буметанид, 100 мкМ ($n = 9$)	101,1 (100,6–106,8)	98,2 (90,4–105,1)	96,7* (83,0–108,3)
Гипоксия ($n = 9$)	3 мин	102,1 (97,2–111,7)	85,3*# (81,8–104,6)
	5 мин	97,5 (88,1–99,5)	88,8*# (82,8–91,1)
	10 мин	100# (91,8–115,6)	90,7*# (76,8–103,1)

* – различия по сравнению с контролем; # – различия по сравнению с гипоксией в отсутствие буметанида.

Предобработка гладкомышечного препарата мочеточника селективным ингибитором Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспортера (НКСС) – буметанидом (100 мкМ) в течение 10 мин вызвала статистически значимое снижение величины амплитуды сокращений ГМК мочеточника до 96,7 (83–108,3)%, $n = 6$, $p < 0,05$, но не влияла на параметры ПД (табл. 2). При этом на фоне буметанида снижение кислорода в перфузионном растворе приводило к статистически значимому уменьшению активирующего воздействия на величину амплитуды, длительности плато ПД (на 10-й мин исследования), сокращения гладкомышечных сегментов мочеточника морской свинки. Таким образом, аппликация буметанида (100 мкМ) вызвала угнетение активирующего влияния гипоксии на параметры электрической и, в большей степени, сократительной активности гладких мышц мочеточника морской свинки, что может свидетельствовать о вовлечении НКСС в механизмы действия гипоксии на ГМК.

Добавление агониста α_1 -адренергических рецепторов – ФЭ (10 мкМ) в нормоксический перфузионный раствор Кребса привело к статистически значимому увеличению амплитуды и длительности ПД до 107,6 (92,1–113,4)% и 112,4 (105,2–118,1)%, $n = 6$, $p < 0,05$; сократительных ответов гладкомышечных препаратов до 153,4 (145,6–160,3)%, $n = 6$, $p < 0,05$ соответственно по сравнению с контролем. На фоне ФЭ снижение содержания кислорода в омывающем сегменты растворе индуцировало достоверный прирост величин изучаемых параметров электрической и сократительной активности ГМК мочеточника, но меньший, чем при действии адреномиметика в условиях нормоксии.

Обсуждение

Поддержание оптимального уровня парциального напряжения кислорода в клетках различных органов и тканей способствует стабильному протеканию метаболических и пластических процессов, обеспечивающих их функциональную активность [1]. В этом отношении ГМК не являются

исключением. Детальное изучение механизмов их регуляции как при физиологических, так и патологических процессах различного генеза лежит в основе формирования целостного представления о работе гладких мышц и, следовательно, двигательной функции внутренних органов.

Показано, что гипоксия оказывает активирующее действие на параметры электрической и сократительной активности ГМК мочеточника, увеличивая амплитуду, длительность плато ПД и величину их сокращений.

Важная роль в инициации сокращения ГМК отводится ионам Ca^{2+} , и повышение их внутриклеточной концентрации при гипоксии с помощью стимуляции α_1 -адренергических рецепторов ФЭ приводило к увеличению параметров ПД и сократительных ответов ГМК мочеточника. Данный эффект может быть обусловлен как увеличением проводимости потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов мембраны ГМК в гипоксических условиях, так и дополнительной активацией С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы [8]. Однако угнетение влияния ФЭ на параметры электрической и сократительной активности в условиях гипоксии по сравнению с нормоксией может свидетельствовать о том, что С-киназная ветвь кальциевой сигнальной системы более уязвима к снижению парциального напряжения кислорода [4, 9].

Участие калиевой проводимости как одной из основных эффекторных систем в гладких мышцах в механизмах действия гипоксии было подтверждено в экспериментах с использованием не-селективного блокатора калиевых каналов ТЭА. Дополнительное увеличение величин изучаемых параметров электрических и сократительных свойств ГМК при аппликации ТЭА могут свидетельствовать об угнетении потенциал-зависимых и Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов при гипоксии наряду с общепринятым мнением о ведущей роли АТФ-чувствительных калиевых каналов мембраны ГМК в реализации эффектов гипоксии [5].

Однако, как установлено, в эффекты гипоксии также вовлечены механизмы, опосредующие объем-чувствительный транспорт, которому от-

водится важная роль в регуляции гомеостаза внутриклеточных моновалентных ионов и сократительной функции ГМК. Таковым является электронейтральный ионный переносчик – НКСС. Участвуя в изменении электрохимического градиента анионов хлора, он способствует поддержанию хлорной проводимости мембраны гладких мышц [7, 10, 11]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что на фоне ингибирования НКСС буметанидом происходило ослабление активирующих эффектов гипоксии на параметры ПД и амплитуду сокращений ГМК мочеточника морской свинки. Известно, что активность данного котранспортера модулируется сигнальными каскадами, опосредуемыми «классическими» вторичными посредниками (циклические нуклеотиды и ионы Ca^{2+}), в том числе зависит и от степени фосфорилирования протеинкиназами [10].

В этом случае дополнительное включение внутриклеточных сигнальных и эффекторных систем при гипоксии, обусловленное особенностями их влияния на электрическую и сократительную активность ГМК, может служить указанием на молекулярные мишени, задействованные в изменении функциональной активности клеток.

Заключение

Таким образом, активирующее действие гипоксии на электрическую и сократительную активность гладких мышц мочеточника морской свинки обусловлены угнетением калиевой проницаемости мембран ГМК и оперированием НКСС. Нельзя также исключить и роль кальциевой проводимости мембраны ГМК в случае стимуляции ГМК мочеточника агонистами α_1 -адренорецепторов. Поиск и выявление внутриклеточных эффекторных механизмов, задействованных при гипоксии, может стать основой для разработки подходов к управлению электрофизиологическими свойствами ГМК при различных физиологических и патологических состояниях.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке РФФИ (соглашение №16-34-00419 от 27.01.2016 г.).

Литература

1. Лукьянова, Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции // *Биологические мембраны*. 2012. Т. 29, № 4. С. 238–252.
2. Semenza G.L. Vascular responses to hypoxia and ischemia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010. V. 30 (4). P. 648–652. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.181644.
3. Chan C.K., Vanhoutte P.M. Hypoxia, vascular smooth muscles and endothelium // *Acta Pharmacol. Sin.* B. 2013. V. 3 (1). P. 1–7. doi:10.1016/j.apsb.2012.12.007.
4. Shimizu Sh., Bowman P.S., Thorne G., Paul R.J. Effects of hypoxia on isometric force, intracellular Ca^{2+} , pH, and energetics in porcine coronary artery // *Circ. Res.* 2000. Vol. 86. P. 862–870. doi: 10.1161/01.RES.86.8.862.
5. Shimoda L.A., Polak J. Hypoxia 4. Hypoxia and ion channel function // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011. V. 300, № 5. P. C951–C967. doi: 10.1152/ajpcell.00512.2010.
6. Peng G., Ran P., Lu W., Zhong N., Wang J. Acute hypoxia activates store-operated Ca^{2+} entry and increases intracellular Ca^{2+} concentration in rat distal pulmonary venous smooth muscle cells // *J. Thorac. Dis.* 2013. V. 5 (5). P. 605–612. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.68.
7. Anfinozenova Y.J., Baskakov M.B., Kovalev I.V., Kilin A.A., Dulin N.O., Orlov S.N. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ cotransport, intracellular Cl^- and L-type Ca^{2+} channels // *Pflugers Arch.* 2004. V. 449 (1). P. 42–55.
8. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А., Бородин И.А., Попов А.А., Миноченко И.Л., Анфиногенова Я.Д., Капилевич Л.В. Миогенные эффекты циклического гуанозинмонофосфата в гладкомышечных клетках. Роль протеинкиназы C // *Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова*. 2003. Т. 89, № 4. С. 436–446.
9. Бирулина Ю.Г., Гусакова С.В., Рязанцева Н.В., Ковалев И.В., Смаглий Л.В., Алейник А.Н. Влияние гипоксии и реоксигенации на механическое напряжение гладких мышц сосудов при активации α_1 -адренорецепторов // *Вестник науки Сибири*. 2015. № 1 (15). С. 390–394.
10. Орлов С.Н., Кольцова С.В., Анфиногенова Я.Д., Капилевич Л.В., Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А. Натрий-калий-хлор-котранспорт в регуляции миогенного тонуса сосудов // *Бюллетень сибирской медицины*. 2014. Т. 13, № 6. С. 165–173. DOI:10.20538/1682-0363-2014-13-6-165-173.
11. Orlov S.N., Koltsova S.V., Tremblay J., Baskakov M.B., Hamet P. NKCC1 and hypertension: role in the regulation of vascular smooth muscle contractions and myogenic tone // *Ann. Med.* 2012. V. 44, Suppl. 1. P. S111–S118. doi: 10.3109/07853890.2011.653395.

Поступила в редакцию 11.04.2016 г.

Утверждена к печати 15.05.2016 г.

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

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

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

Смаглий Людмила Вячеславовна – канд. мед. наук, доцент кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ, доцент кафедры физического воспитания НИ ТПУ (г. Томск).

Петрова Ирина Викторовна – д-р биол. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Носарев Алексей Валерьевич – д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск), профессор кафедры прикладной физики НИ ТПУ (г. Томск).

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

Орлов Сергей Николаевич – д-р биол. наук, главный научный сотрудник ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск), профессор биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (г. Москва).

✉ Ковалев Игорь Викторович, e-mail: kovalew@mail.ru

УДК 591.462.1:591.185.23.044

DOI 10.20538/1682-0363-2016-3-48–54

Для цитирования: Kovalev I.V., Birulina Yu.G., Gusakova S.V. et al. The effect of hypoxia on electrical and contractile properties of smooth muscles of the guinea pig ureter. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15(3): 48–54

The effect of hypoxia on electrical and contractile properties of smooth muscles of the guinea pig ureter

Kovalev I.V.¹, Birulina Yu.G.¹, Gusakova S.V.¹, Smagliy L.V.^{1,2}, Nosarev A.V.^{1,2}, Petrova I.V.¹, Medvedev M.A.¹, Orlov S.N.^{1,3}

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

2 Moscow Trakt, Tomsk, 634050

² National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

30 Lenina Ave., Tomsk, 634050

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Leninskiye Gory, Moscow, 119991

ABSTRACT

Aim. The effect of hypoxia on the electrical and contractile activities of smooth muscles cells (SMCs) of the guinea pig ureter was studied by the method of the double sucrose bridge.

Materials and methods. This method allows registering simultaneously parameters of the action potential (AP) and the contraction of SMCs, caused by an electrical stimulus.

Results. It was found that lowering the oxygen content in the perfusion solution for 10 min resulted to an increase of electrical and contractile activity of ureteral SMCs. Addition of tetraethylammonium chloride (TEA, 5 mM) – nonselective blocker of potassium membrane conductance – in hypoxic conditions causing an additional increase in the amplitude of the AP, duration of the AP plateau and the contractile responses of smooth muscles. Thus, the hypoxia decreased the potassium membrane conductance of ureteral SMCs. Inhibition of the effect of the α_1 -adrenergic receptors agonist phenylephrine (PE, 10 mM) on the electrical and contractile properties of SMCs in hypoxic condition indicate the involvement of the protein kinase C-dependent signaling system in effects of hypoxia. Pretreatment of ureteral smooth muscles with bumetanide (100 mM) – selective inhibitor of Na^+ , K^+ , 2Cl^- - cotransporter (NKCC) – caused a decrease of the activating effect of hypoxia on the SMCs of guinea pig ureter.

Conclusion. Thus, the impact of hypoxia on the regulation of electrical activity and contractions of smooth muscles of guinea pig ureter may be due to changes in ion permeability of membranes SMCs and operation of ion-transporting systems.

Key words: hypoxia, smooth muscles, potassium channels, Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-cotransport.

References

1. Luk'janova, L.D., Kirova Ju.I., Sukojan G.V. Signal'nye mehanizmy adaptatsii k gipoksii i ih rol' v sistemnoj reguljacii [Signal mechanisms of adaptation to hypoxia and their role in system regulation]. *Biologicheskie membrany – Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2012, vol. 29, no 4, pp. 238–252 (in Russian).
2. Semenza G.L. Vascular responses to hypoxia and ischemia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010. V. 30 (4). P. 648–652. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.181644.
3. Chan C.K., Vanhoutte P.M. Hypoxia, vascular smooth muscles and endothelium // *Acta Pharmacol. Sin. B.* 2013. V. 3 (1). P. 1–7. doi:10.1016/j.apsb.2012.12.007.
4. Shimizu Sh., Bowman P.S., Thorne G., Paul R.J. Effects of hypoxia on isometric force, intracellular Ca²⁺, pH, and energetics in porcine coronary artery // *Circ. Res.* 2000. Vol. 86. P. 862–870. doi: 10.1161/01.RES.86.8.862.
5. Shimoda L.A., Polak J. Hypoxia 4. Hypoxia and ion channel function // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011. V. 300, № 5. P. C951–C967. doi: 10.1152/ajpcell.00512.2010.
6. Peng G., Ran P., Lu W., Zhong N., Wang J. Acute hypoxia activates store-operated Ca(2+) entry and increases intracellular Ca(2+) concentration in rat distal pulmonary venous smooth muscle cells // *J. Thorac. Dis.* 2013. V. 5 (5). P. 605–612. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.68.
7. Anfinogenova Y.J., Baskakov M.B., Kovalev I.V., Kilin A.A., Dulin N.O., Orlov S.N. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransport, intracellular Cl⁻ and L-type Ca²⁺ channels // *Pflugers Arch.* 2004. V. 449 (1). P. 42–55.
8. Kovalev I.V., Baskakov M.B., Medvedev M.A., Borodin I.L., Popov A.A., Minochenko I.L., Anfinogenova Ja.D., Kapilevich L.V. Miogennye jeffekty ciklicheskogo guanozinmonofosfata v gladkomyshechnyh kletkah. Rol' proteinkinazy S [Myogenic effects of cyclic guanosine monophosphate in smooth muscle cells. Role of protein kinase C]. *Ross. fiziol. zhurnal im. I.M. Sechenova – Neuroscience and Behavioral Physiology – Sechenov Physiology Journal*, 2003, vol. 89, no 4, pp. 436–446 (in Russian).
9. Birulina Ju.G., Gusakova S.V., Rjazanceva N.V., Kovalev I.V., Smaglij L.V., Alejnik A.N. Vlijanie gipoksii i reoksigenacii na mehanicheskoe naprijazhenie gladkih myshec sosudov pri aktivacii α₁-adrenoreceptorov [Effect of hypoxia and reoxygenation on the mechanical tension of vascular smooth muscles by activation α₁-adrenoreceptors]. *Vestnik nauki Sibiri*, 2015, no. 1 (15), pp. 390–394 (in Russian).
10. Orlov S.N., Kol'cova S.V., Anfinogenova Ja.D., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Smaglij L.V., Baskakov M.B., Medvedev M.A. Natrij-kalij-blor-kotransport v reguljacii miogennogo tonusa sosudov [Sodium-potassium-chloride cotransport in the regulation of vascular myogenic tone]. *Bjulleten' sibirskoj mediciny. – Bulletin of Siberian Medicine.* 2014, vol. 13, no. 6, pp. 165–173 (in Russian) DOI:10.20538/1682-0363-2014-13-6-165-173.
11. Orlov S.N., Koltsova S.V., Tremblay J., Baskakov M.B., Hamet P. NKCC1 and hypertension: role in the regulation of vascular smooth muscle contractions and myogenic tone // *Ann. Med.* 2012. V. 44, Suppl. 1. P. S111–S118. doi: 10.3109/07853890.2011.653395.

Kovalev Igor V. (✉), MD, professor, Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Birulina Julia G., assistant, Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Gusakova Svetlana V., MD, chief of Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Smaglij Ludmila V., PhD, associate professor of Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk; Associate Professor of Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

Petrova Irina V., DBS, professor, Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Nosarev Aleksey V., MD, professor of Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University; Professor of Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

Medvedev Mikhail A., MD, chief of Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Orlov Sergey N., DBS, research officer, Siberian State Medical University, Tomsk; Professor of Moscow State University, Moscow, Russian Federation.

✉ **Kovalev Igor V.**, e-mail: kovalew@mail.ru.