

На правах рукописи

Килин Александр Андреевич

РОЛЬ  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -КОТРАНСПОРТА В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ  
АКТИВНОСТИ ГЛАДКИХ МЫШЦ АОРТЫ КРЫСЫ

03.00.13 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание  
ученой степени кандидата медицинских наук

ТОМСК - 2003

Работа выполнена в Сибирском государственном медицинском  
университете

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Баскаков Михаил Борисович**

**Официальные оппоненты:**

член-корреспондент РАМН,  
доктор медицинских наук,  
профессор

**Киселёв Валерий Иванович**

кандидат медицинских наук

**Ситожевский Алексей Викторович**

**Ведущая организация:**

Институт физиологии СО РАМН (г. Новосибирск)

Защита состоится " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2003 г. в \_\_\_\_ часов

на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском  
государственном медицинском университете (634050 г. Томск, Московский  
тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского  
государственного медицинского университета (г. Томск, проспект Ленина, 107).

Автореферат разослан " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2003 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

**Бражникова Н.А.**

## Актуальность проблемы

На протяжении четырех десятилетий основная и единственная роль в поддержании мембранного потенциала покоя (МПП), генерации потенциала действия (ПД), регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток (ГМК), а так же, в значительной степени, в обеспечении реакций на действие биологически активных веществ (БАВ) отводилась потенциал-зависимым и рецептор-управляемым ионным каналам мембраны ГМК [М.Ф. Шуба и др. 1988; Н. Kuriyama et al, 1998]. Движение ионов по этим каналам обусловлено электрохимическим градиентом для данных ионов. Создание и поддержание электрохимического градиента ионов является следствием оперирования систем активного ионного транспорта, таких как  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -насосы [М.Ф. Шуба и др. 1988; М.Е. O'Donnel, 1994; Н. Kuriyama, 1998].

Градиент ионов на плазматической мембране обеспечивает функционирование и систем пассивного ионного транспорта в клетках, внимание к которым в последнее время значительно выросло.

Классическими примерами пассивного ионного транспорта в ГМК являются  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  [М.Е. O'Donnel, 1994; Н. Kuriyama, 1998] и  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмены [N.E. Owen, 1986; В.С. Berk et al, 1987; N. Hatori, 1987; А. Nakamura, 1987], роль которых в сопряжении возбуждения и сокращения ГМК достаточно хорошо изучена. Вместе с тем, при исследовании роли пассивных ион-транспортирующих систем в регуляции функций ГМК основное внимание уделялось транспорту катионов. Тем не менее, имеются немногочисленные, но авторитетные данные о важной роли анионов в регуляции функций ГМК [W.F. Jackson, 2000; A.R. Chipperfield, 2000; K. Kitamura et al, 2001]. В последнее десятилетие все более пристальное внимание исследователей привлекают системы переноса анионов, такие как  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обмен,  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  - котранспорт и  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  - котранспорт [М.Е. O'Donnel, 1994; A.R. Chipperfield, 2000; N.C. Adragna et al, 2000].

Основная роль  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  котранспорта заключается в обеспечении переноса ионов хлора через мембрану внутрь клетки и поддержании внутриклеточной концентрации ионов хлора ( $\text{Cl}^-$ ) в гладких мышцах (ГМ) выше уровня электрохимического равновесия [A.R. Chipperfield, 2000; J.M. Russell, 2000].

В связи с этим возникает вопрос о роли  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -котранспорта в регуляции электрогенеза и сокращения ГМК, который до настоящего момента не нашел удовлетворительного решения. В литературе весьма ограниченно обсуждается участие анионов в регуляции электрической и сократительной активности ГМК.

Наиболее полно физиологическая роль и структурно-функциональные характеристики хлорных каналов электровозбудимых клеток изучены в кардиомиоцитах. Так было показано, что хлорные каналы кардиомиоцитов обладают уникальным свойством обеспечивать как входящий, так и выходящий ток во время потенциала действия [J.R. Castillo et al 1999] и, таким образом, оказывать влияние на его продолжительность и автоматию клеток [R.D. Harvey, et al 1990; P. C. Levesque et al, 1993; J.I. Vandenberg et al, 1997; X.Y. Du, et al, 1997; J.B. Mathews et al, 1998; M. Hiraoka et al, 1998].

Блокирование хлорных токов в сосудистых ГМК вызывает гиперполяризацию мембраны, что свидетельствует об участии хлорных каналов в поддержании

мембранного потенциала покоя этих клеток [Н. Kuriyama et al, 1998; К. Kitamura et al, 2001]. Другой важной функцией хлорных токов является участие в регуляции клеточного объема [Н. Kuriyama et al, 1998; J.M. Russell, 2000].

Изучение роли  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта и хлорных токов в регуляции функций гладкомышечных клеток представляет большой интерес с позиций фундаментальной науки, поскольку дополняет существующие знания о механизмах сопряжения возбуждения – сокращения в ГМК.

Исследование роли  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта и хлорных токов актуально и с практической точки зрения. Нарушение функционирования гладких мышц сопутствует, и в ряде случаев является важным звеном в патогенезе таких патологических состояний как гипертоническая болезнь, инфаркт миокарда, инсульт, бронхиальная астма, дискинезии пищеварительной и репродуктивной систем и др. Современные схемы медикаментозного лечения и профилактики этих состояний, как правило, включают в себя препараты, воздействующие на кальциевую сигнальную систему и на внутриклеточный сигнальный путь, опосредованный циклическими нуклеотидами. Выяснение роли анионного транспорта и токов, носителями зарядов которых являются анионы, может способствовать развитию новых подходов к коррекции дисфункций гладкомышечных органов и сосудов.

**Цель работы:** Изучить роль  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта в регуляции сократительной активности гладких мышц аорты крысы.

### **Задачи исследования**

1. Изучить влияние ингибитора  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  – котранспорта буметанида и блокатора хлорных каналов нифлумовой кислоты на эффекты физиологически активных веществ в гладких мышцах аорты крысы.
2. Исследовать изменения механического напряжения сосудистых сегментов аорты при действии гетероосмотических растворов.
3. Изучить влияние ингибитора  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  – котранспорта буметанида и блокатора хлорных каналов нифлумовой кислоты на изменения механического напряжения гладких мышц аорты в гетероосмотических растворах.
4. Исследовать роль внеклеточных ионов кальция, натрия и хлора в изменениях механического напряжения гладких мышц аорты, индуцированных гетероосмотическими растворами.

### **Положения выносимые на защиту:**

1.  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорт участвует в генерации сократительных ответов гладких мышц аорты крысы при действии фенилэфрина, ангиотензина-II и деполяризующих гиперкалиевых растворов.
2. Модуляция хлорных токов является одним из ключевых звеньев в механизмах действия фенилэфрина и ангиотензина-II на гладкие мышцы аорты крысы.

3. Изменения осмотического давления среды вызывают повышение механического напряжения гладких мышц аорты крысы.
4. Гетероосмотические растворы влияют на механическое напряжение гладких мышц аорты крысы за счет изменения активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта.
5. В механизмы действия гетероосмотических растворов на механическое напряжение гладких мышц вовлекаются хлорные токи мембраны гладкомышечных клеток.
6.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмен является одним из компонентов обеспечения сократительных реакций гладких мышц аорты крысы в гипоосмотической гипонатриевой среде.

#### **Научная новизна**

Впервые показано, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорт оперирует в покоящихся гладкомышечных клетках аорты крысы.

Впервые продемонстрировано, что влияние биологически активных веществ на механическое напряжение гладкомышечных клеток аорты крысы связано с оперированием  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта и модуляцией хлорных токов.

Впервые установлено, что гетероосмотические растворы вызывают изменения механического напряжения гладкомышечных клеток аорты крысы за счет модуляции  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта и хлорных токов. В генерации сократительных ответов исследованных гладких мышц на действие гипоосмотических гипонатриевых растворов участвует  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмен.

Впервые показана возможность осмотического воздействия на независимую от внеклеточного кальция компоненту сократительного ответа гладкомышечных клеток аорты крысы в гиперосмотической среде.

#### **Научно-практическая значимость:**

Результаты исследования являются вкладом в развитие фундаментальных знаний о механизмах регуляции общего и локального тонуса кровеносных сосудов и сопряжения возбуждения-сокращения в гладкомышечных клетках.

Данные о роли  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта в механизмах действия фенилэфрина и ангиотензина-II на сократительную функцию гладких мышц имеют принципиальное значение в создании общей схемы регуляции сосудистого тонуса.

Результаты исследований открывают новый подход к изучению регуляторных механизмов, реализуемых гладкомышечными клетками с участием электронейтральных анионных переносчиков.

Сведения о роли хлорных токов в обеспечении сократительных реакций сосудистых гладких мышц на действие физиологически активных веществ и гетероосмотических растворов расширяют существующие представления об эффекторных механизмах гладкомышечных клеток.

Обнаруженные эффекты гетероосмотических растворов могут внести определенную ясность в понимание механизмов нарушения сосудистого тонуса при некоторых патологических состояниях, а данные о роли  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта и хлорных токов в их реализации могут быть полезными при разработке новых средств и способов коррекции этих состояний.

Основные положения работы включены в курс лекций по нормальной физиологии и биофизике и спецкурсы «Сигнальные системы клетки», «Биофизика гладких мышц», читаемых на кафедре биофизики и функциональной диагностики

Сибирского государственного медицинского университета, используются в лекционных курсах по физиологии на кафедре нормальной физиологии СибГМУ. Полученные результаты применяются в научных исследованиях на кафедре физиологии человека и животных Алтайского государственного университета и могут быть использованы при чтении учебных курсов по физиологии, биофизике и фармакологии в других ВУЗах биологического и медицинского профиля.

Областями применения полученных данных являются физиология, биофизика, фармакология.

### **Структура диссертации**

Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы собственных результатов и их обсуждения и заключения. Библиография включает 248 ссылок, в том числе 10 – на работы отечественных авторов и 238 – зарубежных. Работа иллюстрирована 30 рисунками.

### **Апробация работы**

Результаты работы доложены на II международном конгрессе «Науки о человеке» (Томск, 2002), 11-ом и 12-ом Европейских съездах по гипертонии (Милан, Италия, 2001; Прага, Чехия, 2002) и 19-ом Международном Съезде по гипертонии (Прага, Чехия, 2002).

Основные результаты диссертации опубликованы в 8 печатных работах.

### **Материалы и методы исследования.**

Исследования проводились на изолированных деэндоотелизированных кольцевых сегментах грудного отдела аорты крысы. В работе использовались половозрелые беспородные белые крысы весом 180 - 200 гр.

Животных забивали без применения наркоза методом декапитации. После этого вскрывали грудную полость и удаляли грудной отдел аорты. Препаровка изолированной аорты производилась в ванночке с раствором Кребса при комнатной температуре. С наружной поверхности аорты удалялась адвентиция. Затем из средней части аорты вырезались кольцевые сегменты шириной 2 – 3 мм. Эндотелий удаляли вращением деревянного стержня в просвете сегмента в течение 1 мин [J. Sakici et al, 1993].

Для регистрации сократительных реакций изолированных гладкомышечных препаратов использовался метод механографии [Р. Блаттнер и др., 1983].

Механографическая установка изготовлена из органического стекла и представляет собой платформу с теплообменником, в верхней части которого находится кювета объемом 1 мл. В стенке кюветы закреплен крючок, выполненный из медицинской стали. Гладкомышечный сегмент закреплялся на крючке, и после растяжения нагрузкой 500 мг фиксировался на штоке механоэлектрического преобразователя, в качестве которого использовался ламповый механотрон 6МХ1Б.

В кювете постоянно перфузировался термостатируемый (35 – 37 °С) раствор Кребса со скоростью 1мл/мин.

Сигнал с анодных цепей механотрона подавался на предварительный усилитель, собранный на базе микросхем К140УД12, сигнал поступающий с усилителя регистрировался на самопишущем приборе «X – Y RECORDER endim 620.02».

## Растворы и реактивы.

Растворы готовились на основе дистиллированной воды. Все соли использованные для приготовления физиологических растворов - ХЧ Реахим РФ. В растворах поддерживались постоянные значения рН в пределах 7,3 – 7,4.

Используемые растворы:

Раствор Кребса (мМ): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; трис-(оксиметил)-аминометана – 15,5; глюкозы – 11,5.

Модифицированные растворы:

1. Гиперкалиевый гиперосмотический (376,4 мОсм) раствор (мМ): NaCl – 120,4; KCl – 35,9; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; трис-(оксиметил)-аминометана – 15,5; глюкозы – 11,5;
2. Гиперкалиевый изоосмотический (316,4 мОсм) раствор (мМ): NaCl – 90,4; KCl – 35,9; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; трис-(оксиметил)-аминометана – 15,5; глюкозы – 11,5;
3. Гипоосмотический (216,4 мОсм) гипонатриевый гипохлорный (ГГГР1) раствор (мМ): NaCl – 40,4; KCl – 5,9; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; трис-(оксиметил)-аминометана – 15,5; глюкозы – 11,5; сахарозы – 60;
4. Гипоосмотический (216,4 мОсм) гиперкалиевый (ГГГР2) раствор (мМ): NaCl – 40,4; KCl – 35,9; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; трис-(оксиметил)-аминометана – 15,5; глюкозы – 11,5;
5. Гипоосмотический (216,4 мОсм) гипонатриевый гипохлорный (ГГГР3) раствор (мМ): NaCl – 70,4; KCl – 5,9; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; трис-(оксиметил)-аминометана – 15,5; глюкозы – 11,5;
6. Гипоосмотический (216,4 мОсм) гипонатриевый гипохлорный (ГГГР4) раствор (мМ): NaCl – 40,4; KCl – 5,9; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; трис-(оксиметил)-аминометана – 15,5; глюкозы – 11,5; холинхлорида – 30;
7. Гиперосмотический (466,4 мОсм) раствор (ГР), состав (мМ): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; трис-(оксиметил)-аминометана – 15,5; глюкозы – 11,5; сахарозы – 150;
8. Изоосмотический (316,4 мОсм) гипонатриевый гипохлорный (ИГГР) раствор (мМ): NaCl – 40,4; KCl – 5,9; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; трис-(оксиметил)-аминометана – 15,5; глюкозы – 11,5; сахарозы – 160;

Используемые реактивы: верапамил, (финоптин, «Орион», Финляндия); буметанид («Sigma»); нифлумовая кислота (дональгин, «Гидеон Рихтер», Будапешт, Венгрия), нитропруссид натрия («Serva»), метиленовый синий («Реахим», РФ), сахароза («Реахим», РФ), фенилэфрин (мезатон, Россия), ЭГТА («Serva»), холин хлорид («Реахим», РФ), глютаминат натрия («Реахим, РФ»), ангиотензин-II («Sigma»).

Полученные результаты обрабатывались методами вариационной статистики.

Данные представлены в виде «среднее арифметическое ± средне квадратическое отклонение».

Для оценки достоверности различий использовался непараметрические критерии Манна-Уитни, Вилкоксона и Крускала-Уоллиса при  $p < 0,05$ .

Достоверность отличия средних величин регистрируемого механического напряжения сосудистых сегментов при действии тестирующих реактивов от контрольных значений обозначалась как  $p_1$ .

Достоверность отличия средних величин регистрируемого механического напряжения сосудистых сегментов при действии тестирующих растворов с различной концентрацией исследуемого вещества обозначалась как  $p_2$ .

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Для решения поставленных задач мы использовали два подхода. Один из них заключался в изучении вклада котранспортера и хлорных токов в регуляцию сократительной активности сосудистых гладких мышц биологически активными веществами. В основу второго подхода положена способность котранспортера активироваться в гиперосмотической среде и ингибироваться в растворах с пониженным осмотическим давлением [J. Russel, 2000].

#### **Изучение роли $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ – котранспорта и хлорных токов в механизмах действия биологически активных веществ.**

*Влияние буметанида на исходное механическое напряжение и гиперкалиевую контрактуру гладких мышц аорты.*

Добавление буметанида в раствор Кребса влияло на исходное механическое напряжение и сокращение гладких мышц аорты в гиперкалиевом растворе Кребса.

Обработка сосудистых сегментов буметанидом в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ приводила к падению базального механического напряжения ГМ аорты крысы соответственно на  $4,1\% \pm 3,5\%$  ( $n = 5$ ),  $12,7\% \pm 3,9\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ),  $3,7\% \pm 4\%$  ( $n = 7$ ) от контрольной изоосмотической гиперкалиевой (KCl, 30 мМ) контрактуры. Низкая эффективность буметанида в концентрации 100 мкМ, вероятно, обусловлена неспецифическим действием препарата на сосудистый сегмент или взаимодействием с другими ион-транспортирующими системами, например  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  - котранспортом.

Амплитуда сокращений сосудистых сегментов, вызванных добавлением 30 мМ KCl в раствор Кребса уменьшалась после предварительной обработки сегментов аорты буметанидом (10, 50 и 100 мкМ) до  $69,9\% \pm 9\%$  ( $n=5$ ,  $p_1 < 0,05$ ),  $66,7\% \pm 10,7\%$  ( $n=5$ ,  $p_1 < 0,05$ ) и  $45,2\% \pm 8,7\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ), от исходной контрольной гиперосмотической гиперкалиевой (KCl, 30 мМ) контрактуры сосудистых сегментов.

Амплитуда изоосмотической гиперкалиевой контрактуры гладких мышц, вызванной эквимолярным замещением в растворе Кребса 30 мМ NaCl на KCl так же снижалась после предварительной обработки сегментов аорты буметанидом (10, 50 и 100 мкМ) до  $75,4\% \pm 11,2\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ),  $73,2\% \pm 7,4\%$  ( $n=5$ ,  $p_1 < 0,05$ ) и  $76,6\% \pm 3,5\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ) соответственно от контрольной изоосмотической гиперкалиевой (KCl, 30 мМ) контрактуры.

Величина снижения амплитуды изоосмотической гиперкалиевой контрактуры гладких мышц аорты на фоне 100 мкМ буметанида достоверно ( $p < 0,05$ ) отличалась от величины снижения гиперосмотической гиперкалиевой контрактуры сосудистых сегментов при действии буметанида в той же концентрации.

Полученные данные указывают на то, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  – котранспорт (NKCC1) вовлечен в механизмы, обеспечивающие поддержание базального тонуса



сосудистых гладких мышц и в генерацию сокращений сосудистых ГМ индуцированных деполяризацией мембраны ГМК.

Достоверное различие эффектов буметанида в гиперосмотической гиперкалиевой и изоосмотической гиперкалиевой среде указывает на разную степень активности НКСС1 в этих условиях. В пользу такой интерпретации полученных результатов свидетельствуют и литературные данные [F. Akar, e.a. 1999; M. Naas, e.a. 1998; M.E. O'Donnell, e.a. 1995].

Известно, что данная ион-транспортирующая система участвует в регуляции внутриклеточной концентрации ионов хлора [G.R. Ehring, e.a., 1994]. В связи с этим, возможным эффекторным механизмом, обеспечивающим сопряжение оперирования НКСС1 и механического напряжения гладких мышц аорты, могут быть хлорные токи.

Перфузия сосудистого сегмента блокатором кальций-активируемых и объем-зависимых хлорных каналов нифлумовой кислотой приводила к снижению исходного механического напряжения и уменьшению амплитуды изоосмотической гиперкалиевой контрактуры гладких мышц. Наиболее выраженное снижение исходного МН наблюдалось при действии на сосудистый сегмент нифлумовой кислоты в концентрации 100 мкМ. Оно составило  $59,7\% \pm 35,7\%$  ( $n = 8$ ,  $p_1 < 0,05$ ).

Предварительная перфузия сосудистых сегментов раствором, содержащим 10, 50 и 100 мкМ нифлумовой кислоты, приводила к обратимому, дозозависимому уменьшению амплитуды изоосмотической гиперкалиевой (КС1, 30 мМ) контрактуры до  $84\% \pm 2,5\%$  ( $n=5$ ,  $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ),  $53,7\% \pm 5,5\%$  ( $n=5$ ,  $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ) и  $16,3\% \pm 1,7\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ) соответственно.

Опираясь на полученные данные можно предположить, что в сосудистых гладких мышцах в состоянии покоя через мембрану ГМК протекает стационарный объем- и/или кальций-зависимый хлорный ток, который является одним из механизмов поддержания базального тонуса сосудистых гладких мышц.

Влияние нифлумовой кислоты на изоосмотическую гиперкалиевую контрактуру ГМ аорты крысы можно объяснить значительным вкладом хлорной проводимости в формирование текущего значения мембранного потенциала покоя (МПП). Поскольку, по своему влиянию на МП хлорный ток является деполяризующим [R. Joseph e.a. 2000; H. Kuriyama e.a., 1998], то его блокирование должно вести к гиперполяризации мембраны ГМК, и, как следствие, снижению амплитуды контрактуры, индуцированной калиевой деполяризацией плазматической мембраны этих клеток.

### ***Влияние буметанида на сокращения сосудистых сегментов, вызванные фенилэфрином и ангиотензином-II.***

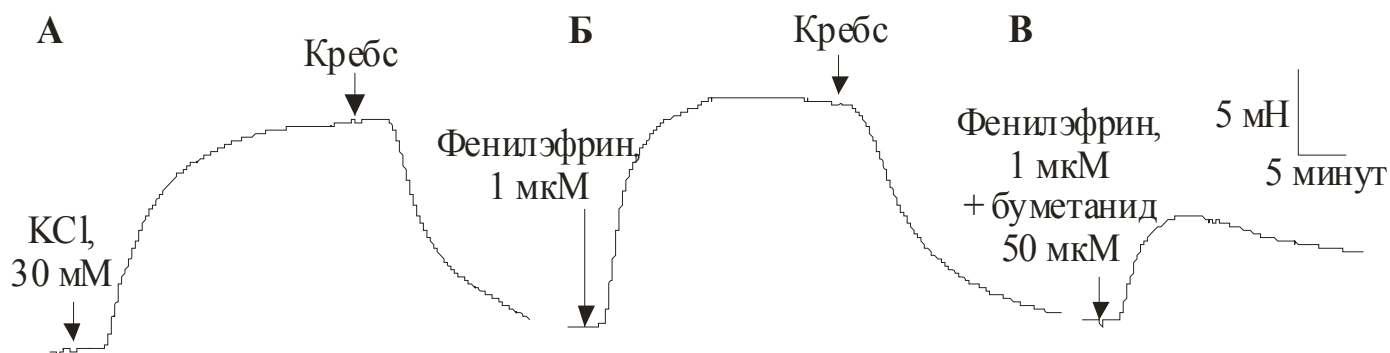
Согласно литературным данным  $\alpha$ -адреномиметики и ангиотензин-II активируют НКСС1, [F. Akar, e.a. 1999].

Раствор, содержащий 1 мкМ фенилэфрина, вызывал поддерживаемые сокращения ГМ аорты крысы амплитудой  $106,1\% \pm 21,6\%$  ( $n=15$ ) от контрольной изоосмотической гиперкалиевой (КС1, 30 мМ) контрактуры. Предобработка гладкомышечного препарата буметанидом (10, 50, 100 мкМ) снижала амплитуду сокращений, вызванных фенилэфрином, до  $57,2\% \pm 8,8\%$  ( $n = 8$ ,  $p_1 < 0,05$ ),  $52,8\% \pm 9,9\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ) и  $53,7\% \pm 3,2\%$  ( $n = 8$ ,  $p_1 < 0,05$ ) соответственно, от

контрольного сокращения гладких мышц в растворе, содержащем 1 мкМ фенилэфрина (рис. 1).

Полученные данные свидетельствуют о том, что NKCC1 участвует в сократительных реакциях, индуцированных стимуляцией  $\alpha$ -адренергических рецепторов.

Следствием активации котранспорта при действии  $\alpha$ 1-адреномиметиков будет повышение электрохимического потенциала ионов хлора, усиление  $Cl^-$  - токов и более выраженная деполяризация мембраны ГМК. Выключение буметанидом этого звена механизмов формирования сократительной реакции сосудистых сегментов на действие фенилэфрина ведет к снижению эффективности его влияния на ГМ аорты крысы. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты с блокатором хлорных каналов нифлумовой кислотой.



**Рис. 1. Влияние буметанида на сокращение сосудистого сегмента, вызванное фенилэфрином.**

*А: контрольное сокращение ГМ препарата в изотоническом гиперкалиевом (КСl, 30 мМ) растворе; Б: влияние фенилэфрина на механическое напряжение сосудистого сегмента; В: влияние буметанида на сокращение гладких мышц, вызванное фенилэфрином.*

*Стрелками обозначено добавление соответствующих растворов. Справа – калибровочный сигнал и отметка времени. Остальные обозначения на экспериментальных кривых.*

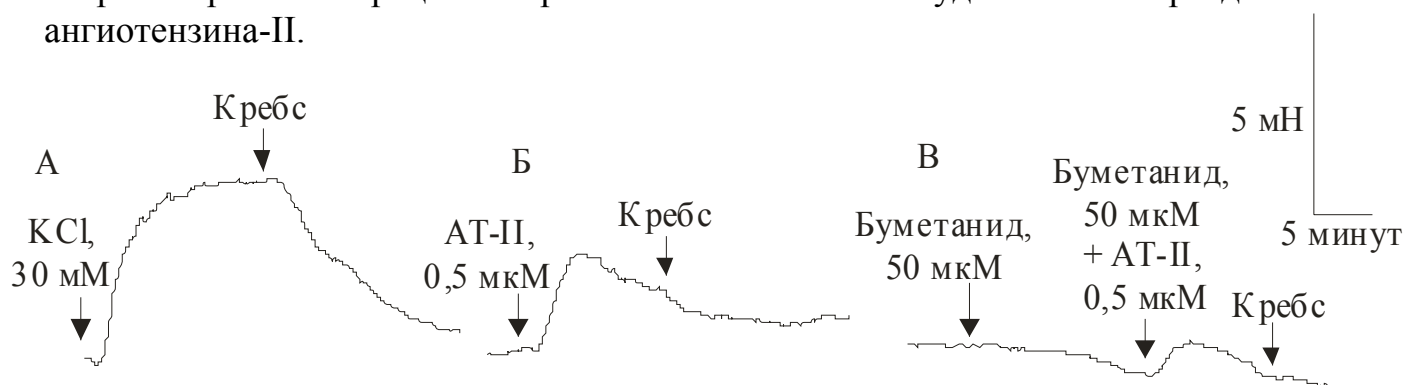
Предобработка сосудистых сегментов нифлумовой кислотой в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ приводила к уменьшению амплитуды сокращений ГМ аорты крысы, вызванных 1 мкМ фенилэфрина до  $69,2\% \pm 10,5\%$  ( $n = 5, p_1 < 0,05$ ),  $67,1\% \pm 42,9\%$  ( $n = 5, p_1 < 0,05$ ), и  $28,1\% \pm 27,5\%$  ( $n = 7, p_1 < 0,05$ ) соответственно. При этом сокращение приобретало транзиторный характер. Эффект нифлумовой кислоты был обратим и устранялся при отмывании гладкомышечного препарата в растворе Кребса.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация хлорных токов является важным звеном в развитии и поддержании сокращения сосудистых гладких мышц при действии фенилэфрина. Вероятно, индуцируемое стимуляцией  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция приводит к открыванию кальций-зависимых хлорных каналов [R. Joseph e.a. 2000], которые в условиях неравновесного распределения ионов хлора, создаваемого NKCC1 [J.M. Russell, 2000], обеспечивают усиление выходящего потока  $Cl^-$  и дополнительную

поддерживаемую деполяризацию клеточной мембраны ГМК. Следствием этого процесса будет усиление потенциал-зависимых входящих потоков  $\text{Ca}^{2+}$ .

Предобработка сосудистых сегментов буметанидом (50 мкМ), в течение 15 минут в значительной степени угнетала сокращения ГМ аорты крысы, вызванные 0,5 мкМ ангиотензина-II (рис 2). Амплитуда сокращений сосудистых сегментов в этих условиях снизилась более чем в двое и составила  $11,6\% \pm 8,7\%$  ( $n=6$ ,  $p_1 < 0,05$ ) от контрольной изоосмотической гиперкалиевой (KCl, 30 мМ) контрактуры.

Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта в генерацию сократительного ответа сосудистых ГМ при действии ангиотензина-II.



**Рис. 2. Влияние буметанида на сокращение сегмента аорты крысы, вызванное ангиотензином II.**

*А:* контрольная изоосмотическая гиперкалиевая (30 мМ KCl) контрактура сосудистого сегмента; *Б:* контрольное сокращение ГМ препарата, вызванное ангиотензином-II; *В:* влияние буметанида на амплитуду сокращения сосудистого сегмента, вызванного ангиотензином-II.

*Стрелками* обозначено добавление соответствующих растворов. *Справа* – калибровочный сигнал и отметка времени. *Остальные обозначения* на экспериментальных кривых.

Предобработка сосудистого сегмента нифлумовой кислотой (100 мкМ) приводила к полному угнетению сокращений ГМ аорты крысы, вызванных 0,5 мкМ ангиотензина-II. Полученные результаты свидетельствуют об участии хлорных токов в генерации сократительного ответа сосудистых ГМ при действии ангиотензина II.

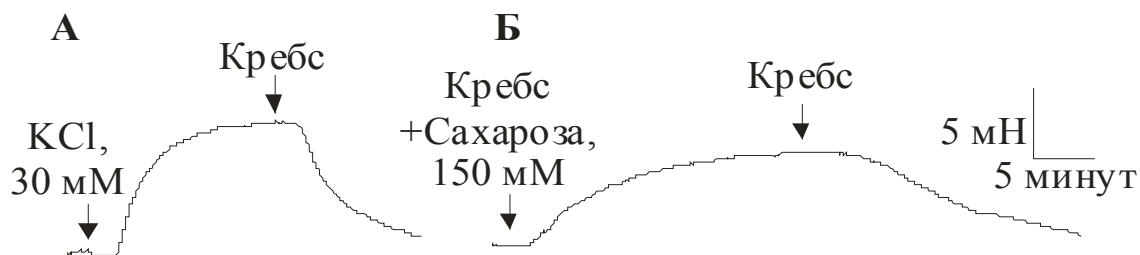
### **Сократительные реакции гладких мышц аорты крысы в гетероосмотических растворах.**

Одним из способов модуляции НКСС1 является изменение осмотического давления окружающей среды [F. Akar, e.a. 1999; M.E. O'Donnell, e.a. 1995; Russel, 2000]. Известно, что при повышении осмотичности раствора активность котранспортера возрастает, и, наоборот, при уменьшении – снижается.

#### ***Влияние гиперосмотического раствора на механическое напряжение гладких мышц аорты крысы.***

Увеличение осмотического давления среды добавлением в раствор Кребса 150 мМ сахарозы (ГР) вызывало стойкое, воспроизводимое повышение механического напряжения (МН) сосудистых сегментов (“гиперосмотическое

сокращение”). Прирост МН гладких мышц составил  $55,4\% \pm 22,4\%$  ( $n = 22$ ) от контрольной изоосмотической гиперкалиевой (KCl, 30 мМ) контрактуры в нормальном растворе Кребса (рис. 3).



**Рис. 3. Влияние гиперосмотического раствора на механическое напряжение ГМ аорты крысы**

*А: контрольная изоосмотическая гиперкалиевая (30 мМ KCl) контрактура ГМ аорты; Б: гиперосмотическое сокращение сосудистых сегментов, вызванное добавлением сахарозы в перфузионный раствор.*

*Стрелками обозначено добавление соответствующих растворов. Справа – калибровочный сигнал и отметка времени. Остальные обозначения на экспериментальных кривых.*

Для оценки возможного эффекта пассивной стрикции ткани в ответ на повышение осмотического давления окружающей среды была проведена серия экспериментов с бескальциевым раствором и блокатором кальциевых каналов – верапамиллом.

После предобработки сосудистого сегмента верапамиллом (10 мкМ), добавление которого в перфузионный раствор предотвращало развитие контрольной изоосмотической гиперкалиевой контрактуры, амплитуда гиперосмотического сокращения изменялась недостоверно ( $p > 0,05$ ) с  $55,4\% \pm 22,4\%$  ( $n = 22$ ) до  $46,1\% \pm 17,2\%$  ( $n = 5$ ), относительно контрольной изоосмотической гиперкалиевой (KCl, 30 мМ) контрактуры.

Когда проводилось удаление ионов кальция из омывающего раствора и внесение в раствор ЭГТА (0,5 мМ), то наблюдалось обратимое достоверное снижение амплитуды гиперосмотического сокращения с  $55,4\% \pm 22,4$  ( $n = 22$ ) до  $23,7\% \pm 9,4\%$  ( $n = 7$ ,  $p_1 < 0,05$ ) от контрольной изоосмотической гиперкалиевой (KCl, 30 мМ) контрактуры сосудистых ГМ.

Следует отметить, что уменьшение амплитуды гиперосмотического сокращения сосудистых сегментов в бескальциевом растворе достоверно ( $p < 0,05$ ) отличалось и от величины гиперосмотического сокращения гладких мышц аорты, полученного на фоне верапамила. Отсутствие значимого эффекта верапамила может указывать на то, что в генерации гиперосмотического сокращения сосудистых сегментов участвуют нечувствительные к верапамилу кальциевые каналы мембраны ГМК.

Данные результаты свидетельствуют о том, что гиперосмотическое сокращение в ответ на повышение осмотического давления среды является активной сократительной реакцией гладкомышечного препарата и в значительной степени реализуется за счет поступления ионов кальция из внеклеточной среды по верапамил – нечувствительным  $Ca^{2+}$ -каналам ГМК.

Тот факт, что сократительная реакция ГМ частично сохраняется и в бескальциевом растворе, может указывать на участие в гиперосмотическом сокращении ионов кальция, депонированных в саркоплазматическом ретикулуме, и/или о вовлечении механизмов, изменяющих чувствительность сократительного аппарата ГМК к ионам кальция при действии гиперосмотического раствора.

Вместе с тем, опираясь на общепринятую точку зрения о главенствующей роли внеклеточного кальция в регуляции сокращения ГМ, эти данные не позволяют полностью исключить и того, что повышение МН сосудистых сегментов частично реализуется за счет пассивной стрикции изучаемого гладкомышечного препарата в гиперосмотическом растворе.

Для выяснения роли НКСС1 в генерации гиперосмотического сокращения сосудистые сегменты обрабатывали буметанидом в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ. Это приводило к снижению амплитуды гиперосмотической контрактуры до  $82\% \pm 9,7\%$  ( $n = 5$ ;  $p_1 < 0,05$ ),  $68,6\% \pm 10,1\%$  ( $n = 6$ ,  $p_1 < 0,05$ ) и  $64,8\% \pm 8,1\%$  ( $n = 6$ ,  $p_1 < 0,05$ ) соответственно, от контрольной гиперосмотической контрактуры сосудистых сегментов. Полученные результаты свидетельствуют об участии  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  – котранспорта в сократительных реакциях сосудистых ГМ при действии гиперосмотического раствора.

Повышение МН сосудистых ГМ в гиперосмотическом растворе, по-видимому, обусловлено активацией этого транспортера в гипертонической среде. Так как, это может привести к усилению деполяризующих мембрану ГМК хлорных токов, в дальнейшем исследовалось влияние их блокатора – нифлумовой кислоты.

Нифлумовая кислота в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ вызывала дозозависимое снижение амплитуды гиперосмотической контрактуры до  $63,7\% \pm 13,7\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ),  $32,6\% \pm 17,9\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ),  $7,9\% \pm 6,3\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ) соответственно, от контрольного гиперосмотического сокращения сосудистых сегментов.

Выраженный эффект нифлумовой кислоты в этих условиях указывает на то, что гиперосмотическая контрактура в значительной степени обусловлена усилением хлорных токов в ГМК. Можно полагать, что возрастание хлорных токов связано с активацией НКСС1 и увеличением электрохимического потенциала этих ионов.

В литературе имеются указания на ингибирующее влияние доноров оксида азота, в частности нитропрусида натрия (НП), на активность НКСС1 [F. Akar, e.a. 1999].

Добавление 1 мкМ НП в перфузионный раствор не влияло на исходное механическое напряжение сосудистых сегментов.

Исходное гиперосмотическое сокращение сосудистых гладких мышц составляло  $47,5\% \pm 0,2\%$  ( $n = 5$ ) от контрольной изоосмотической гиперкалиевой контрактуры (KCl, 30 мМ).

После предобработка сегментов аорты НП (1 мкМ) его амплитуда уменьшилась до  $29,8\% \pm 6,2\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ) от контрольной изоосмотической гиперкалиевой контрактуры (KCl, 30 мМ). При удалении НП из раствора амплитуда гиперосмотического сокращения восстанавливалась не полностью.

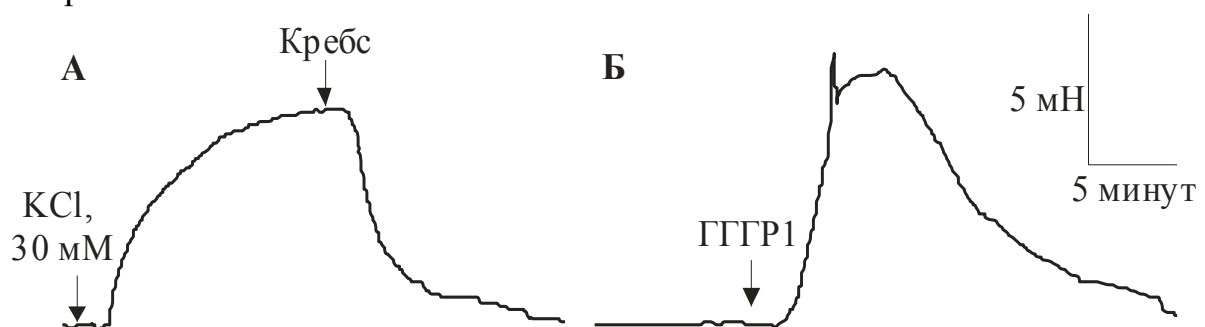
Таким образом, оксид азота угнетал сократительные реакции ГМ на действие гиперосмотических растворов.

***Влияние гипоосмотического гипонатриевого гипохлорного раствора на механическое напряжение гладких мышц аорты крысы.***

При аппликации гипоосмотического гипонатриевого гипохлорного раствора (ГГГР1), наблюдалось транзиторное (в течение 20 – 25 минут) повышение МН сосудистых сегментов, величина которого составила  $96,6\% \pm 22,6\%$  ( $n = 6$ ) от контрольной изоосмотической гиперкалиевой (KCl, 30 мМ) контрактуры (рис. 4).

Транзиторный характер сокращения ГМ аорты крысы при действии ГГГР1 свидетельствует о преходящем повышении внутриклеточной концентрации ионов кальция в ГМК.

Резкое увеличение электрохимического потенциала в ГГГР для ионов хлора в результате снижения наружной их концентрации, на первом этапе приводит к возрастанию хлорного тока, деполяризации мембраны ГМК и сокращению. Однако, его кратковременный характер может быть связан с последующим ингибированием НКСС1 в гипоосмотическом растворе [J.M. Russell, 2000]. В результате уменьшения внутриклеточной концентрации Cl<sup>-</sup> и снижения электрохимического потенциала для этих ионов, уменьшается выходящий поток ионов хлора (входящий хлорный ток) развивается реполяризация мембраны ГМК и их расслабление.



***Рис. 4. Влияние гипоосмотического гипонатриевого гипохлорного раствора (ГГГР1) на механическое напряжение гладких мышц аорты крысы.***

*А: контрольная изоосмотическая гиперкалиевая контрактура (KCl, 30 мМ); Б: влияние замещения 80 мМ хлорида натрия на 60 мМ сахарозы (ГГГР1).*

*Стрелками обозначено добавление соответствующих растворов. Внизу справа – калибровочный сигнал и отметка времени. Остальные обозначения на экспериментальных кривых.*

Для выяснения роли НКСС1 в сокращении ГМ аорты крысы при действии гипоосмотического гипонатриевого гипохлорного раствора (ГГГР1) были проведены эксперименты с буметанидом.

Предобработка сосудистых сегментов буметанидом в концентрации 10, 50 и 100 мкМ приводила к снижению амплитуды транзиторного сокращения до  $42,6\% \pm 0,5\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ),  $21\% \pm 1,4\%$  ( $n=5$   $p_1 < 0,05$ ) и  $9,8\% \pm 14,6\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ) от контрольной изоосмотической гиперкалиевой (KCl, 30 мМ) контрактуры.

Угнетение буметанидом сокращения ГМ аорты крысы, индуцированного ГГГР1, указывает на участие НКСС1 в генерации сокращения в этих условиях.

Вместе с тем известно, что в гипоосмотической среде происходит угнетение котранспорта ионов натрия, калия и хлора. По-видимому, роль НКСС1 состоит в поддержании исходного неравновесного распределения хлора. Значительное уменьшение концентрации ионов хлора в ГГГР1 растворе ведет к транзиторному увеличению электрохимического потенциала этих ионов и кратковременному, вследствие последующего ингибирования НКСС1 гипоосмотическим раствором, повышению направленного наружу потока ионов хлора.

Предобработка сосудистых сегментов нифлумовой кислотой в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ существенно снижала амплитуду транзиторного сокращения ГМ аорты крысы. Амплитуда сокращений составляла  $8,6\% \pm 4,8\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ),  $12,6\% \pm 16,1$  ( $n=6$ ,  $p_1 < 0,05$ ), и  $-5,7\% \pm 0,9\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ) соответственно, от контрольной гиперкалиевой (30 мМ КСl) контрактуры. Полученные результаты свидетельствуют о значительном вкладе хлорных токов в развитие транзиторного повышения механического напряжения сосудистых сегментов ГГГР1.

Добавление нитропрусида натрия (1 мкМ) в перфузионный раствор не влияло на исходное МН сосудистых сегментов. Контрольное транзиторное сокращение ГМК в гипоосмотическом растворе составило  $59,2\% \pm 17,8\%$  ( $n = 5$ ), от контрольной (30 мМ КСl) гиперкалиевой контрактуры. Предварительная обработка ГМ препарата раствором, содержащем НП (1 мкМ) практически полностью устраняла транзиторное сокращение ГМ в гипоосмотической среде. Добавление 1 мкМ НП на фоне предобработки сосудистых сегментов метиленовым синим (10 мкМ) приводило к значительному уменьшению механического напряжения гладких мышц аорты и частичному восстановлению амплитуды транзиторного сокращения сосудистых гладких мышц в ГГГР1 растворе.

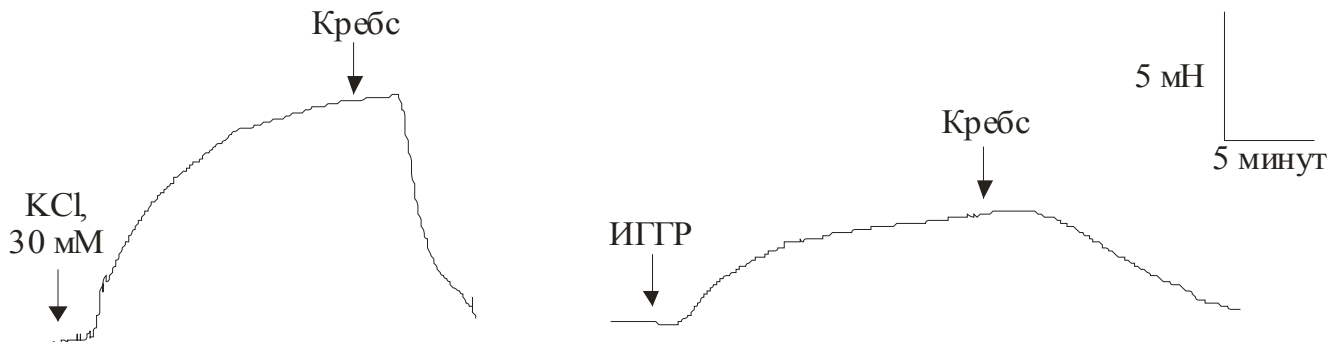
Полное угнетение транзиторного сокращения сосудистых сегментов нитропрусидом натрия, а так же значительное ослабление его влияния в присутствии метиленового синего свидетельствуют о том, что эффекты оксида азота опосредованы активацией растворимой фракции гуанилатциклазы ГМК.

Так как в гипоосмотических условиях неизбежно снижается внеклеточная концентрация ионов натрия, нельзя исключить возможного участия  $Na^+/Ca^{2+}$  обмена в генерации гладкой мышцей транзиторного сокращения.

Тем не менее, в экспериментах где проводилась замена нормального раствора Кребса на изоосмотический, гипонатриевый, гипохлорный раствор (ИГГР), регистрировалось достоверное повышение механического напряжения до  $63,4\% \pm 25,1\%$  ( $n = 32$ ) от контрольной гиперкалиевой (КСl, 30 мМ) контрактуры (рис. 5). Более того, характер сокращения изменялся и становился, в отличие от ГГГР1 (рис.4), поддерживаемым и воспроизводимым.

Этот эффект может быть обусловлен увеличением электрохимического потенциала для ионов хлора и усилением деполяризующего хлорного тока. Кроме того, при снижении внеклеточной концентрации ионов натрия происходит реверсия направления обмена ионов кальция и натрия, что ведет к повышению концентрации ионов кальция в цитоплазме гладкомышечных клеток и сокращению.

Возможна и комбинация этих процессов. Сокращение, вызванное входом в клетку  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмен может усиливаться деполяризацией мембраны, вызванной активацией кальций-зависимого хлорного тока в условиях повышенного электрохимического потенциала для ионов хлора. Для выяснения влияния НКСС1 и ионов хлора на механическое напряжение сосудистых ГМ в ИГГР растворе использовались буметанид и нифлумовая кислота.



**Рис. 5. Влияние изоосмотического гипонатриевого гипохлорного раствора (ИГГР) на механического напряжения сосудистого сегмента.**

Слева направо: контрольная изоосмотическая гиперкалиевая ( $\text{KCl}$ , 30 мМ) контрактура; влияние ИГГР на механическое напряжение ГМ аорты крысы.

Стрелками обозначено добавление соответствующих растворов. Справа – калибровочный сигнал и отметка времени. Остальные обозначения на экспериментальных кривых.

Предобработка сосудистых сегментов буметанидом в концентрации 50 мкМ достоверно уменьшала величину сокращений сосудистых сегментов, вызванных ИГГР. Амплитуда последних составила  $5,4\% \pm 7,6\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ) от контрольной гиперкалиевой ( $\text{KCl}$ , 30 мМ) контрактуры. Полученные данные свидетельствуют об участии  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  – котранспорта в сокращении, вызванном изоосмотическим гипонатриевым гипохлорным раствором.

Нифлумовая кислота (100 мкМ) вызывала резкое снижение амплитуды сократительной реакции сосудистых гладких мышц на действие ИГГР до  $7,6\% \pm 6,1\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ), от контрольной изоосмотической гиперкалиевой ( $\text{KCl}$ , 30 мМ) контрактуры. Результаты этой серии экспериментов свидетельствуют в пользу гипотезы о вовлечении хлорных токов мембраны в сократительную реакцию сосудистых гладких мышц на действие ИГГР.

Возвращение ионов натрия, но не хлора в раствор замещением сахарозы глютаминатом натрия (80 мМ) на фоне развившегося сокращения сосудистого сегмента в ИГГР, вызывало прогрессирующее снижение величины механического напряжения практически до исходной величины в нормальном растворе Кребса: с  $63,4\% \pm 25,1\%$  ( $n = 32$ ) в ИГГР до  $7,6\% \pm 5,3\%$  ( $n = 5$ ,  $p_1 < 0,05$ ) от контрольной изоосмотической гиперкалиевой ( $\text{KCl}$ , 30 мМ) контрактуры. Полученные данные указывают на то, что повышение механического напряжения гладких мышц аорты в ИГГР обусловлено реверсией  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  – обмена, ведущей к повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция.

Возвращение ионов хлора, но не натрия замещением сахарозы холинхлоридом (80 мМ) на фоне сокращения сосудистых сегментов в ИГГР,



приводило к статистически достоверному падению механического напряжения с  $63,4\% \pm 25,1\%$  ( $n = 32$ ) до  $39,7\% \pm 23,5\%$  ( $n = 7$ ,  $p_1 < 0,05$ ), по сравнению с контрольной гиперкалиевой контрактурой.

Таким образом, повышение концентрации ионов хлора во внешнем растворе так же приводит к уменьшению механического напряжения сосудистого сегмента, предсокращенного ИГР, как и в случае с глютаминатом натрия, но в меньшей степени. Механизм уменьшения МН напряжения сосудистых сегментов в этом случае, видимо, связан с уменьшением электрохимического потенциала для ионов хлора, и ослаблением деполяризующего мембрану ГМК действия хлорного тока.

Удаление из раствора Кребса 80 мМ хлорида натрия и внесение в раствор 80 мМ холинхлорида не оказывало значимого эффекта на величину механического напряжения сосудистых сегментов несмотря на значительное уменьшение концентрации ионов натрия. Полученные результаты согласуются с теоретическими и экспериментальными данными о роли мембранного потенциала в оперировании натрий – кальциевого обменника. То есть, направление переноса и активность данной ионтранспортирующей системы определяются отношением  $Na^+_e/Na^+_i$  и величиной мембранного потенциала [М.Е. О'Donnel, 1994].

Действительно, в этих условиях концентрация ионов хлора в перфузионном растворе остается неизменной и нет предпосылок для деполяризации мембраны ГМК.

### Заключение

Изучение механизмов регуляции электрических и сократительных свойств гладких мышц внутренних органов, кровеносных и лимфатических сосудов, выяснение механизмов развития заболеваний, связанных с нарушением двигательной функции гладкомышечных органов, и разработка способов их коррекции является актуальной проблемой современной физиологии и медицины.

Угнетение буметанидом сокращений сосудистых гладких мышц, вызванных гетероосмотическими растворами и биологически активными веществами, указывает на вовлечение котранспорта натрия, калия и хлора в регуляцию механического напряжения гладких мышц. Однако операционные характеристики этого переносчика исключают его прямое влияние на внутриклеточную концентрацию ионов кальция или мембранный потенциал.

Эффекторным механизмом, обеспечивающим изменение механического напряжения сосудистых гладких мышц при активации котранспортера являются хлорные токи. В экспериментах с использованием блокатора кальций-зависимых и объем-чувствительных хлорных токов нифлумовой кислоты показано, что сокращения гладких мышц, вызванные гетероосмотическими растворами или добавлением биологически активных веществ опосредованы активацией хлорных токов мембраны ГМК. Вероятнее всего, сопряжение между  $Na^+/K^+/2Cl^-$  котранспортом и хлорными токами осуществляется через изменение концентрации ионов хлора в этих клетках.

Известно, что активация  $Na^+/K^+/2Cl^-$  котранспортера приводит к увеличению внутриклеточной концентрации ионов хлора. Следствием этого будет усиление хлорных токов и деполяризация мембраны гладкомышечных клеток. В ряде

случаев, например при действии биологически активных веществ, повышение хлорного тока может быть первичным, за счет активации кальций-зависимой компоненты хлорного тока, а возрастание активности котранспортера происходит вследствие снижения внутриклеточной концентрации ионов хлора [N. Whisenant, 1993; C. M. Gillen, 1999].

Деполаризация мембраны в результате усиления хлорного тока увеличивает вероятность открывания верапамил-нечувствительных потенциал-зависимых кальциевых каналов ГМК и/или индуцирует освобождение ионов кальция из депо.

Другой путь повышения хлорных токов, и по-видимому основной, может быть связан с первичной активацией котранспортера непосредственно через g-белки или опосредованно через активацию киназных систем клетки [P.C. Levesque, 1993]. Причиной повышения хлорных токов ГМК в этом случае является увеличение внутриклеточной концентрации хлора и, следовательно, их электрохимического потенциала.

Резюмируя изложенное, можно заключить, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорт, обеспечивая неравновесное распределение ионов хлора в гладкомышечных клетках, является необходимым звеном в обеспечении сократительных ответов гладких мышц при действии биологически активных веществ и гетероосмотических растворов.

Наличие и выраженность сократительных реакций гладких мышц аорты при изменении осмотичности окружающей среды и участие в них  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта и хлорных токов свидетельствует о том, что объем-чувствительные ионные механизмы являются важным фактором регуляции тонуса сосудистых гладких мышц.

Основным эффектором, используемым сосудистыми гладкомышечными клетками с участием  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта, являются хлорные токи мембраны гладкомышечных клеток.

### Выводы

1. Модуляция  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта является необходимым звеном в механизмах генерации сократительных ответов гладких мышц аорты крысы при действии фенилэфрина и ангиотензина-II.
2. Увеличение механического напряжения гладких мышц аорты крысы при действии фенилэфрина и ангиотензина-II опосредовано активацией хлорных токов мембраны гладкомышечных клеток.
3. Изменения осмотического давления окружающей среды индуцируют сокращения гладких мышц аорты крысы: в гиперосмотическом растворе развивается поддерживаемая контрактура, в гипоосмотическом – транзиторный сократительный ответ.
4. Увеличение механического напряжения гладких мышц аорты крысы в гиперосмотической среде обусловлено изменением активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта и хлорных токов и в большой степени реализуется за счет поступления внеклеточных ионов кальция в гладкомышечные клетки по верапамил-нечувствительным кальциевым каналам.

5. Сократительный ответ гладких мышц аорты крысы в гипоосмотической среде сопряжен с модуляцией активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспорта,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмена и хлорных токов мембраны гладкомышечных клеток.
6. Оксид азота угнетает сократительные реакции ГМ на действие гетероосмотических растворов.

### Список опубликованных работ

1. Участие цГМФ-зависимых процессов в электромеханическом сопряжении гладких мышц.// «Науки о человеке» - Сб. статей молодых ученых и специалистов. По мат. межд. конгр. «Научная молодежь на пороге XXI века» 18-19 мая 2000г., Томск, СГМУ, с.88-89.(Соавт. А.Г. Попов, А.А. Панов, Ю.Л. Бородин, Я.Д. Анфиногорова, А.В. Носарев)
2. Циклический гуанозинмонофосфат – модулятор миогенных реакций гладкомышечных клеток.// «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» - мат. II Росс. конф. мол уч. С межд уч-ем. (Москва,24-28 апреля 2001) – Т2. – с.301 (Соавт. А.А. Панов, И.Л. Миноченко)
3. Изучение механизмов толерантности гладких мышц аорты крыс к нитроглицерину.// «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» - мат. II Росс. конф. мол уч. С межд уч-ем. (Москва,24-28 апреля 2001) – Т2. – с.300. (Соавт И.Л. Миноченко)
4. Миогенные реакции гладкомышечных клеток при модуляции внутриклеточного уровня циклического гуанозинмонофосфата.// «Актуальные проблемы экспериментальной, профессиональной и клинической медицины» Тезисы докладов 2-ой Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием г. Владивосток 26 апреля 2001. (Соавт. А.Г Попов, Ю.Л Бородин, И.Л Миноченко)
5. Исследование роли  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{2Cl}^-$  котранспорта в регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки.// Материалы третьего международного конгресса молодых учёных и специалистов - «НАУКИ О ЧЕЛОВЕКЕ». Томск, 16-17 мая 2002, С. 159. (Соавт. Ю.Л. Бородин, Я.Д. Анфиногорова, И.Л. Миноченко, А.Г. Попов).
6. Механизмы влияния осмотического давления среды на сократительную активность сосудистых гладких мышц.// Материалы третьего международного конгресса молодых учёных и специалистов - «НАУКИ О ЧЕЛОВЕКЕ». Томск, 16-17 мая 2002, С. 171. (Соавт. Я.Д. Анфиногорова, Ю.Л. Бородин, И.Л. Миноченко).
7. Влияние ингибиторов фосфодиэстераз циклических нуклеотидов на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток.// Бюлл. exper. биол. и мед.-2002.-Т.133,N3.-С.254-256. (Соавт. М. Б. Баскаков, И. Л. Миноченко, Я. Д. Анфиногорова, Л. В. Капилевич, М. А. Медведев).
8. Inhibition of  $\text{Na}^+,\text{K}^+,\text{Cl}^-$  cotransport prevents vascular smooth muscle contraction in  $\text{Na}^+$ - and  $\text{Cl}^-$ -depleted media.// Journal of Hypertension Volume 20 (Suppl. 4), June 2002, page S280. (Y. Anfinogenova, M. Baskhakov, I. Kovalev, S. Orlov)

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ

Подписано к печати 17.05.03.

Заказ №162

Тираж 100 экземпляров