

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕН-
НЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНО-
МУ РАЗВИТИЮ»

На правах рукописи

АНФИНОГЕНОВА ЯНА ДЖОНОВНА

**РОЛЬ ИОННОГО ТРАНСПОРТА,
СОПРЯЖЕННОГО С ИЗМЕНЕНИЯМИ КЛЕТОЧНОГО ОБЪЕМА,
В МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ СО-
СУДИСТЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК**

03.00.13 – физиология

03.00.02 – биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научные консультанты:

доктор медицинских наук,

профессор **БАСКАКОВ М. Б.**;

доктор биологических наук,

профессор **ОРЛОВ С. Н.**

ТОМСК – 2005

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АЦ – аденилатциклаза
- БАВ – биологически активные вещества
- ГМК – гладкомышечная клетка
- ГТФ – гуанозинтрифосфат
- ГЦ – гуанилатциклаза
- ДАГ – диацилглицерол
- КЛЦМ – киназа легких цепей миозина
- КМ – кальмодулин
- ЛЦМ – легкие цепи миозина
- МН – механическое напряжение
- МП – мембранный потенциал
- ПД – потенциал действия
- ПК-А – цАМФ-активируемая протеинкиназа
- ПК-Г – цГМФ-активируемая протеинкиназа
- ПК-С – протеинкиназа-С
- ПП – потенциал покоя
- СГМК – сосудистая гладкомышечная клетка
- СГМС – сосудистые гладкомышечные сегменты
- ТЭА – тетраэтиламмония хлорид
- ФЛЦМ – фосфатаза легких цепей миозина
- ФЛ-С – фосфолипаза С
- ФЭ – фенилэфрин
- цАМФ – циклический 3:5-аденозинмонофосфат
- цГМФ – циклический 3:5-гуанозинмонофосфат
- ЭГТА – этиленгликоль-бис-(-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксус-
ная кислота
- $[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация ионов кальция
- $[Ca^{2+}]_o$ – внутриклеточная концентрация ионов кальция
- $[Cl^-]_i$ – внутриклеточная концентрация ионов хлора

DIDS – 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid

$I_{Cl(Ca)}$ – Ca^{2+} -зависимый Cl^- ток

IP_3 – инозитолтрифосфат

$K_{1/2}$ – константа ингибирования

KCC – K^+ , Cl^- котранспорт

$[Na^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация ионов натрия

NKCC – Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ котранспорт

NPPB – 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid

ROCK – протеиновая киназа, ассоциированная с малыми G-белками семейства Rho

RhoA – малые G-белки семейства Rho

RVD – regulatory volume decrease – регуляторное снижение объема

RVI – regulatory volume increase – регуляторное увеличение объема

SITS – 4-acetoamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid

SHR – линия крыс со спонтанной, генетически обусловленной гипертонией

WKY – крысы линии Wistar-Kyoto

WKY-7 – линия сосудистых гладкомышечных клеток, полученная из аорты крыс WKY и обладающая наибольшей экспрессией α -актина, белка SM22 и киназы легких цепей миозина, специфичных для гладких мышц.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Структурно-функциональная характеристика гладких мышц гладкомышечных клеток	15
1.2. Механизмы регуляции объема клеток	40
1.3. Участие НКСС в регуляции функций ГМК	50
1.4. Хлорные каналы	60
1.5. Роль ионов хлора в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток	69
1.6. Роль внутриклеточных ионов Na^+ и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в регуляции функций гладкомышечных клеток	74
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	79
2.1. Объект исследования	79
2.2. Методика исследования	79
2.3. Растворы и реактивы	83
2.4. Приборы и оборудование	84
2.5. Статистическая обработка	84
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	87
3.1. Сократительные реакции гладкомышечных сегментов аорты в моделях изменения объема клеток	87
3.1.1. Сокращение гладкомышечных сегментов аорты в модели гиперосмотической стрикции клеток	87
3.1.2. Сократительные реакции гладкомышечных сегментов аорты в модели изоосмотической стрикции клеток	88
3.1.3. Сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели гипоосмотического набухания клеток	91
3.2. Изменения объема гладкомышечных клеток и активность НКСС	91
3.2.1. Объем клеток WKY-7 в моделях стрикции и набухания	91
3.2.2. Активность НКСС в культуральных клетках линии WKY-7 в моделях гиперосмотической и изоосмотической стрикции	96
3.3. Изучение вовлечения НКСС в сократительные реакции гладкомышечных сегментов аорты крысы в моделях изменения клеточного объема, при аппликации БАВ и гиперкалиевой деполяризации мембраны	98
3.3.1. Роль НКСС в сокращениях гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированных модуляциями клеточного объема	102

3.3.2. Роль НКСС в сокращении гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированном гиперкалиевой деполяризацией мембраны	110
3.3.3. Роль НКСС в сокращениях гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированных аппликацией БАВ	112
3.4. Изучение роли хлорной проводимости мембраны в регуляции сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты крысы	119
3.4.1. Участие Cl^- проводимости мембраны в сокращении гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированном аппликацией гиперкалиевого раствора	119
3.4.2. Участие Cl^- проводимости мембраны в сокращении гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированном аппликацией агониста α -адренорецепторов фенилэфрина	120
3.4.3. Роль хлорной проводимости мембраны в сократительных реакциях гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированных гипоосмотическим набуханием клеток	121
3.4.4. Роль внеклеточных моновалентных ионов в развитии сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели гипоосмотического набухания	126
3.4.5. Роль хлорной проводимости мембраны в сократительных реакциях гладкомышечных сегментов аорты крысы в моделях стрикции клеток	127
3.5. Исследование роли $[Cl^-]_i$ в клетках линии WKY-7 и гладкомышечных сегментах аорты крысы	135
3.6. Кальций-зависимая регуляция сократительных реакций сосудистых ГМК, вызванных изменениями осмолярности среды инкубации	138
3.6.1. Ca^{2+} -зависимые механизмы развития сократительных ответов сосудистых гладкомышечных сегментов при аппликации БАВ, деполяризующем действии гиперкалиевого раствора и в моделях изменения объема клеток	138
3.6.2. Сократительные реакции сосудистых гладкомышечных сегментов, индуцированные гиперкалиевой деполяризацией мембраны, и активацией α_1 -адренергических рецепторов, в моделях стрикции и набухания клеток	147
3.6.3. Потенциал-зависимый вход Ca^{2+} в WKY-7 клетки при модуляциях осмолярности среды инкубации	154
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	164
ВЫВОДЫ	171
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	173

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

В общей структуре заболеваемости населения развитых стран одно из ведущих мест принадлежит патологическим состояниям, связанным с нарушением сократительной функции гладких мышц.

Несмотря на существенный прогресс в изучении механизмов регуляции электрических и сократительных свойств гладкомышечных клеток (ГМК), до настоящего времени остается открытым целый ряд вопросов, касающихся оперирования механизмов сопряжения возбуждения-сокращения в сосудистых ГМК. Это в первую очередь касается роли изменений объема клеток в регуляции ионного транспорта, электрогенеза и сократительной активности ГМК. Нет достаточной ясности и в определении роли внутриклеточных моновалентных ионов в регуляции функций клеток, хотя в последние годы появились данные о наличии в клетках Na^+ - и Cl^- -опосредованной сигнализации [Taurin et al., 2002; 2003; Borin et al., 1993; Liedtke et al., 2002; Muimo et al., 1998; Treharne, 1994].

Многие годы среди исследователей доминировала точка зрения, согласно которой в основе электрогенеза ГМК лежит изменение ионной проницаемости мембраны для ионов Ca^{2+} , K^+ и Na^+ . Однако в последние годы пристальное внимание уделяется возможному участию электронейтрального ионного транспорта в механизмах сопряжения возбуждения-сокращения в ГМК [Chipperfield и Harper, 2000]. Было показано, что, кроме потенциал-зависимых и рецептор-управляемых каналов, важный вклад в регуляцию электрической и сократительной активности ГМК вносят $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ и K^+, Cl^- котранспортеры, основной особенностью которых является чувствительность к изменениям объема клеток, а основной функцией – регуляция их объема и поддержание внутриклеточного гомеостаза моновалентных ионов [Adragna et al, 2000; Akar et al., 1999; 2001; Russell, 2000]. Кроме влияния на ионтранспортирующие системы мембраны, клеточный объем вовлечен в регуляцию разнообразных функций клеток, включая пролиферацию, рост, программируемую гибель и некроз [Van Cruchten and Van Den

Broeck, 2002; Lang et al., 2000; Barros et al., 2001; Okada et al., 2001]. Тонкие механизмы связи объема клеток и регуляции их функциональной активности остаются малоизученными, а большинство экспериментальных данных о роли клеточного объема и объем-чувствительного ионного транспорта в регуляции функций клеток были накоплены при исследовании эпителиальных и эритроидных клеток.

Учитывая важную роль $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ и K^+, Cl^- котранспортеров в поддержании неравновесного электрохимического потенциала ионов хлора, можно полагать, что объем-чувствительный ионный транспорт может быть вовлечен в регуляцию электрической и сократительной активности ГМК, а также реактивности гладких мышц к действию физиологически активных веществ (ФАВ). Так, было показано, что в сосудистых сегментах и культуральных ГМК сосудов $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорт активируется при действии вазоконстрикторов, повышающих внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} . Напротив, ингибирование этого переносчика наблюдается под влиянием вазодилаторов, стимулирующих цАМФ- и цГМФ-опосредованные сигнальные системы [Akar et al, 1999; 2001; Orlov et al, 1992; Owen and Ridge, 1989; Smith and Smith, 1987; Tseng and Berk, 1992]. Противоположная регуляция вазоконстрикторами и вазодилаторами была обнаружена при исследовании Na^+ -независимого K^+, Cl^- котранспорта [Adragna et al, 2000; 2004], другого члена суперсемейства Cl^- -сопряженных котранспортеров, который обеспечивает направленный наружу перенос Cl^- [Adragna et al., 2000; 2004]. Имеются сведения о вовлечении $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта в патогенез гипертонической болезни: генетически модифицированные мыши, имеющие дефектный ген $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспортера, ($\text{NKCC1}^-/\text{knockout mice}$) характеризуются пониженной величиной кровяного давления и снижением тонуса и величины сократительных ответов сегментов сосудистых ГМК при действии α_1 -адреноагониста фенилэфрина [Flagella et al., 1999; Meyer et al., 2002].

Важная роль клеточного объема в регуляции сократительной функции ГМК подтверждается тем, что аппликация биологически активных веществ, ак-

тивирующих цАМФ-зависимую сигнальную систему, ведет к стрикции культуральных ГМК аорты [Orlov et al., 1996]. К сходному результату ведет дезинтеграция актинового цитоскелета, состояние которого, в свою очередь, модулируется активностью ряда протеинкиназ [Burgstaller and Gimona., 2004; Nunes, 2002; Matrougui et al., 2001; Abedi and Zachary, 1998]. Таким образом, несмотря на определенные успехи, достигнутые в изучении механизмов объем-зависимой регуляции функций сосудистых гладких мышц, многие вопросы требуют дополнительного изучения.

В течение длительного времени физиологическая роль Cl^- каналов в висцеральных и сосудистых гладкомышечных клетках обсуждалась в связи с их участием в регуляции клеточного объема. Однако, в последние годы появились данные о важной роли хлорных каналов в механизмах сопряжения возбуждения-сокращения в ГМК [Lamb et al., 2000; Chipperfield and Harper, 2000; Robert et al., 2004]. К настоящему времени в сосудистых ГМК обнаружены объем- и Ca^{2+} -зависимые Cl^- каналы, а также хлорные каналы семейства CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator), которые могут регулировать активность других мембранных протеинов, некоторые типы Na^+ и Cl^- каналов, и принимать участие в трансмембранном переносе H_2O и ионов [Hume et al., 2000]. Роль хлорных каналов и соответствующих ионных токов в обеспечении сократительных реакций ГМК при сжатии и набухании, а также при действии физиологических стимулов изучена недостаточно.

Все вышеизложенное определяет необходимость изучения роли объема клеток, объем-чувствительного $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта, хлорных каналов и внутриклеточной концентрации ионов хлора в регуляции сократительной активности ГМК. Выявление существующих взаимосвязей в объем-зависимой системе регуляции сократительной функции ГМК имеет важное фундаментальное значение и может служить теоретической базой для создания новых подходов при коррекции патологических состояний, связанных с нарушением сократительной функции гладких мышц.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить роль объема клеток и объем-зависимых механизмов в регуляции сократительной активности гладких мышц аорты крысы.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Исследовать динамику механического напряжения гладкомышечных сегментов аорты крысы, объема гладкомышечных клеток линии WKY-7 и активности $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта в моделях изменения объема клеток.
2. Изучить роль $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта в сократительных реакциях сосудистых гладкомышечных сегментов при активации α_1 -адренергических рецепторов, аппликации ангиотензина II, гиперкалиевой деполяризации мембраны и в моделях набухания и стрикции клеток.
3. Исследовать динамику внутриклеточной концентрации ионов хлора при игибировании $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта в интактных и активированных стрикцией ГМК изолированных сегментов аорты.
4. Выявить роль хлорной проводимости мембраны в обеспечении сократительных ответов сосудистых сегментов при активации α_1 -адренергических рецепторов, деполяризации мембраны и изменении объема клеток.
5. Провести сравнительный анализ особенностей оперирования Ca^{2+} -зависимых механизмов регуляции сократительных ответов гладкой мышцы сосудов при активации α_1 -адренергических рецепторов, деполяризации и изменениях объема клеток.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Изменение объема сосудистых гладкомышечных клеток при гипоосмотическом набухании, гипер- и изоосмотической стрикции ведет к развитию сократительных реакций гладких мышц аорты крысы. Основными механизмами объем-зависимой регуляции сократительной активности сосудистых гладких мышц являются 1) активация

$\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта и 2) увеличение внутриклеточной концентрации ионов Cl^- .

2. Ключевую роль в обеспечении сокращений сосудистых гладких мышц при гипоосмотическом набухании, гиперкалиевой деполяризации мембраны и стимуляции α_1 -адренорецепторов играют неравновесное распределение ионов Cl^- , деполяризующие хлорные токи и потенциал-зависимый вход Ca^{2+} .
3. При уменьшении объема клеток снижается потенциал-зависимый вход ^{45}Ca в изолированные ГМК и существенно изменяется оперирование Ca^{2+} -зависимых механизмов регуляции сократительных ответов гладкой мышцы сосудов при деполяризации мембраны и активации α_1 -адренорецепторов. Сократительные ответы, индуцированные гипер- и изоосмотической стрикцией клеток, лишь частично зависят от внеклеточного кальция. Они устойчивы к блокаторам потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов, сохраняются после длительной предобработки ЭГТА-содержащим бескальциевым раствором и обусловлены увеличением внутриклеточной концентрации ионов Cl^- , опосредованным $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспортом.
4. Регуляторное увеличение объема клеток, опосредованное активацией $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта, является одним из механизмов, обеспечивающих транзиторный характер сокращений гладких мышц в модели изоосмотической стрикции клеток.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые показано, что изменение осмолярности инкубационной среды ведет к сокращению сосудистых гладких мышц. При гипоосмотическом набухании и изоосмотической стрикции клеток сокращения имеют транзиторный характер, а в случае гиперосмотического сжатия развивается поддерживаемый сократительный ответ.

Впервые продемонстрирована согласованность динамики изменения механического напряжения сосудистых сегментов и объема клеток в моделях гипоосмотического набухания, гипер- и изоосмотической стрикции.

Впервые представлены данные, характеризующие различия клеточных механизмов индукции и поддержания сократительных ответов ГМ при набухании и стрикции клеток. Показано, что гипоосмотическое набухание клеток ведет к активации входа кальция по Ca^{2+} каналам L-типа. При гипер- и изоосмотической стрикции уменьшается потенциал-зависимый вход ^{45}Ca , а сокращения, индуцированные стрикцией, мало чувствительны к действию антагонистов входа Ca^{2+} и лишь снижаются по величине в бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе.

Впервые исследована роль $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта в сократительных реакциях сосудистых гладких мышц, индуцированных изменениями клеточного объема. Гиперосмотический раствор трехкратно увеличивал активность котранспорта в течение всего времени эксперимента. В отличие от этого при изоосмотической стрикции начальное повышение активности НКСС, сменялось ее снижением до контрольного уровня. Транзиторный характер сокращений гладких мышц в модели *изоосмотической стрикции* клеток обусловлен регуляторным увеличением объема клеток вследствие активации $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта.

Впервые установлено, что при гипер- и изоосмотической стрикции клеток резко уменьшается величина сокращений ГМ, индуцированных гиперкалиевой деполяризацией и α_1 -адреномиметиком фенилэфрином. Напротив, гипоосмотическое набухание клеток, не изменяя реактивности сегментов к ФЭ, ведет к потенцированию сократительных ответов на действие гиперкалиевого раствора.

Представлены новые данные о механизмах регуляции сокращений ГМ при стрикции клеток, оперирующих с участием $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспортера. Установлено, что выключение буметанид-чувствительного $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта снижает внутриклеточную концентрацию ионов хлора как в интактных, так и подвергнутых стрикции сегментах аорты.

Впервые установлено, что выключение буметанид-чувствительного $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта подавляет сократительные ответы сосудистых гладких мышц при умеренной, но не субмаксимальной деполяризации мембраны.

Впервые выявлена роль хлорной проводимости мембраны в сокращениях, вызванных изменением объема клеток. Сократительные ответы на деполяризацию, действие ФАВ и стрикцию подавляются при блокировании Ca^{2+} -активируемых и объем-зависимых хлорных каналов. Это свидетельствует о ключевой роли изменений внутриклеточной концентрации Cl^- и хлорной проводимости в реализации вышеперечисленных воздействий на ГМК.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Результаты исследования являются важным вкладом в развитие фундаментальных знаний о роли объема, ионного транспорта и ионных каналов в регуляции функций сосудистых гладких мышц. Существенно дополнены представления об участии объем-чувствительного ионного транспорта в регуляции сопряжения возбуждения-сокращения сосудистых гладкомышечных клеток. Установлено, что вклад $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта в обеспечение реакций гладких мышц на уменьшение объема клеток реализуется через увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора.

Сокращение в гипоосмотической среде обусловлено оперированием классических кальций-зависимых механизмов и индуцируется Cl^- -зависимой деполяризацией мембраны и открыванием Ca^{2+} -каналов L-типа. Сократительный ответ гладких мышц на стрикцию мало чувствителен к наружному кальцию и действию блокаторов потенциал-зависимого входа ионов кальция.

Полученные данные фундаментального характера открывают новые подходы к объяснению сосудистых реакций при гипертонической болезни и патологических состояниях, сопровождающихся нарушениями водно-солевого обмена или метаболических процессов в организме, а также механизмов действия широко применяемых в клинической практике петлевых диуретиков. Результаты исследования расширяют научную базу для создания новых средств лечения

заболеваний, связанных с дисфункцией сосудов и органов, сформированных гладкими мышцами.

Основные положения работы используются в курсах лекций и практических занятиях, проводимых на кафедре биофизики и функциональной диагностики, на кафедре нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета, на кафедре физиологии человека и животных Томского государственного университета, на кафедре физиологии человека и животных Кемеровского государственного университета и на кафедре нормальной физиологии Омского медицинского университета.

Методические приемы и новые данные используются в научных исследованиях, проводимых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики и нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета, а также на кафедре нормальной физиологии Омского медицинского университета. Области применения полученных данных являются физиология, биофизика, фармакология.

СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 237 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы собственных результатов и их обсуждения и заключения. Библиография включает 676 ссылок, в том числе 27 – на работы отечественных авторов и 649 – зарубежных. Работа иллюстрирована 41 рисунком и включает 16 таблиц.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Основные результаты диссертации обсуждены на всероссийских и международных конгрессах: ● 3 съезд физиологов Сибири и Дальнего Востока, 1997 (Новосибирск). ● VIII Национальный Конгресс по болезням органов дыхания, 22–24 окт., 1998 (Москва). ● IX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания, 31 окт.–3 ноября 1999 (Москва). ● Межрегиональная научная конференция Сибири и Дальнего Востока, посвященная 150-летию со дня рождения академика И.П. Павлова, 25–26 ноября 1999 (Томск). ● Международный кон-

гресс «Научная молодежь на пороге XXI века», 18–19 мая 2000 (Томск). • II Российская конференция молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины», 24–28 апреля 2001 (Москва). • 18 Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова, 2001 (Казань). • IV Съезд физиологов Сибири с международным участием, 2001 (Новосибирск). • The 11th European Meeting on Hypertension, June 13–17, 2001 (Milan, Italy). • III международный конгресс молодых учёных и специалистов «Науки о человеке», 16–17 мая 2002 (Томск). 12 Национальный конгресс по болезням органов дыхания, 11–15 ноября, 2002 (Москва). • The 19th scientific Meeting of the International Society of Hypertension, and 12th European Meeting on Hypertension, June 23–27, 2002 (Prague, Czech Republic). • The 13th European Meeting on Hypertension, June 13–17, 2003 (Milan, Italy). • 20th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, February 15-19, 2004 (São Paulo – SP – Brazil). • X Международный Симпозиум «Биологическая подвижность» посвященный памяти академика Г.М. Франка (1904-1976), 23 мая–1 июня 2004 (г. Пущино, Московская область). • Симпозиум с международным участием «Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц», 28–29 мая, 2004 (г. Томск). • The 14th European Meeting on Hypertension, June 13–17, 2004 (Paris, France). • Canadian Cardiovascular Congress. October 23-27, 2004. Calgary, Canada.

Основные результаты диссертации опубликованы в 53 печатных работах.

ГЛАВА I

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структурно-функциональная характеристика гладких мышц

Основной специализированной функцией сосудистых гладких мышц является их способность к поддержанию базального тонуса и развитию сократительных реакций, что обеспечивает адекватные параметры центрального и местного кровотока. Базальный тонус и сократительные реакции СГМК контролируются большим числом дистантных и локальных медиаторов и гормонов и подвержены гуморальному, нервному и миогенному контролю [Davis and Hill, 1999; Kuriyama et al., 1998].

Обычно гладкие мышцы классифицируют на два основных типа в зависимости от способа объединения отдельных ГМК на уровне ткани. Single-unit мышцы организованы в плотные полосы или слои. Отдельные ГМК расположены примерно параллельно друг другу, но даже при довольно плотной упаковке их взаимное расположение нерегулярно, и близко расположенные порции клеток могут перекрещиваться с другими. Между плазматическими мембранами соседних гладкомышечных волокон обнаруживаются поперечные мостики, которые действуют как пути низкого электрического сопротивления для ускорения распространения электрических сигналов вдоль ткани. Multi-unit гладкомышечные волокна не образуют соединительных мостиков и окружены волокнами соединительной ткани.

ГМК главным образом находятся под контролем автономной нервной системы. Single-unit гладкие мышцы имеют пейсмекерные регионы, которые обеспечивают спонтанную ритмическую генерацию сокращений. При этом ГМК сокращаются в унисон, так как single-unit гладкие мышцы представляют собой синцитий. Волокна multi-unit гладких мышц иннервируются симпатическими и парасимпатическими нервными волокнами и независимо стимулируются соответствующими нервными окончаниями. Стимуляция нервных окончаний вызывает деполяризацию мембраны ГМК. Возбуждение является электрохимическим процессом, протекающим на уровне мембраны клетки и влекущим за собой механический ответ – сокращение.

Передача информации с деполяризованной мембраны к сократительным белками получила название электромеханического сопряжения, ключевым механизмом которого является вход Ca^{2+} в цитоплазму ГМК. Первые данные о связи мембранного потенциала и сократительными ответами ГМК были получены еще 50 лет назад Bülbring [Bülbring, E., 1955]. В настоящее время считается общепринятым, что деполяризация мембраны обеспечивает вход Ca^{2+} по потенциал-зависимым кальциевым каналам, что является основополагающим механизмом электромеханического сопряжения возбуждения и сокращения в ГМК и модулируется большим числом внутриклеточных сигнальных механизмов. Мембранный потенциал покоя СГМК составляет от 40 до 75 мВ [Kuriyama et al., 1998; Nelson et al., 1990], при этом существенные различия в величине могут быть обусловлены отличающимися экспериментальными условиями проведения измерений. ГМК эластических и емкостных сосудов не способны генерировать потенциал действия в физиологических условиях. При этом возбуждение вдоль мышечного слоя сосудов этого типа распространяется посредством транспорта низкомолекулярных молекул через межклеточные контакты (gap junctions) [Kuriyama et al., 1998].

Среди сосудистых ГМК способностью генерировать потенциалы действия у всех экспериментальных животных обладают только СГМК портальной вены. Однако получить спайки с регулярной амплитудой у «молчащих» СГМК можно, обработав их блокатором калиевой проводимости мембраны ТЭА. СГМК брюшных артерий способны генерировать потенциалы действия при электрической стимуляции периферических нервов [Kuriyama et al., 1998].

Число синхронно вовлекаемых в сокращение клеток является важным фактором регуляции сокращения брюшной артерии крысы и спонтанных изменений ее тонуса (vasomotion). Были исследованы эффекты КС1 и фенилэфрина на уровень внутриклеточного кальция, кальциевые осцилляции и сократительные свойства изолированных брюшных артерий крысы, включая спонтанные изменения просвета сосудов. При низких концентрациях вазоконстрикторов отмечались отдельные несинхронные кальциевые осцилляции, не ведущие к местному сокращению. При средних концентрациях в процесс синхронно вовлекались

все клетки, при этом гиперкалиевая стимуляция вела к сокращению полосок, а фенилэфрин индуцировал вазомоторные реакции. Высокие концентрации KCl вели к поддерживаемому не осциллирующему увеличению внутриклеточного кальция и поддерживаемому сокращению, а высокие концентрации фенилэфрина вызывали синхронные кальциевые осцилляции и полноценное сокращение [Lamboley M et al., 2003].

Сократительные протеины

Электронная микроскопия гладких мышц показала, что актиновые филаменты в ГМК упорядочены посредством прикрепления к электронно-плотным образованиям (тельцам), которые содержат α -актинин, протеин, соответствующий белку Z-полосок скелетных мышечных волокон. Соотношение тонких и толстых филаментов в ГМК существенно выше, чем в скелетных мышцах: $\sim 15:1$ и $\sim 6:1$, соответственно. ГМК богаты промежуточными филаментами и содержат два специфических протеина, десмин и виментин.

В целом, ГМК содержат меньше протеинов (~ 110 мг/г), чем скелетные мышцы (~ 200 мг/г), при этом наблюдается существенно более низкое содержание миозина: ~ 20 мг/г в ГМК против ~ 80 мг/г в скелетной мускулатуре. С другой стороны, содержание актина и тропомиозина примерно одинаково во всех типах мышц. В отличие от исчерченных мышечных волокон, ГМК не содержат тропонин, вместо которого имеются два других фибриллярных протеина – кальдесмон и кальпонин.

Аминокислотная последовательность актина гладких мышц сходна с таковой в других типах мышц, причем, вероятно, это сходство распространяется и на трехмерную структуру актина. Актин гладких мышц способен объединяться с миозином, выделенным как из гладкой, так и скелетной мускулатуры. Однако, имеется принципиальное различие в регуляции АТФ-азной активности миозина актином. При этом условием актин-зависимой активации является предварительное фосфорилирование миозина в ГМК.

Размер и форма молекул гладкомышечного миозина сходны с таковыми в скелетных мышцах. Имеется незначительное различие в составе легких цепей. Из четырех легких цепей гладкомышечного миозина две имеют молекулярный

вес 20000 и две – 17000. Легкие цепи массой 20000 могут подвергаться фосфорилированию, в случае чего актин-зависимая активация АТФ-азной активности миозина возрастает в ~50 раз, настолько, что в физиологических условиях в секунду на 1 моль головок миозина гидролизуется 0.16 молей АТФ. Характерной особенностью ГМК является то, что при повышении ионной силы раствора происходит повышение АТФ-азной активности миозина, что может быть одним из модулирующих факторов при пертурбациях объема клеток.

Было описано 4 изоформы тяжелой цепей миозина – SMB, SMA, SM1 и SM2 [Quevillon-Cheruel et al., 1999], отличающиеся небольшим числом аминокислот в области головки или хвостовой части стержня. Отличия в хвостовых участках стержня миозина гладких мышц оказались ответственны за различия в сборке филаментов. Полученные результаты свидетельствовали также, что гомогенные толстые филаменты, содержащие SM1 или SM2, могут выполнять различные функции в ГМК [Rowner et al., 2001; Quevillon-Cheruel et al., 1999].

Несмотря на то, что сборка толстых филаментов очищенного гладкомышечного миозина была описана *in vitro*, регуляция этого процесса в интактной ГМК не выяснена. Электронная микроскопия показала, что плотность толстых филаментов существенно увеличивается (до 144%) при активации ГМК [Herrera et al., 2002]. В покоящихся клетках, в отсутствие Ca^{2+} , плотность толстых филаментов снижается на 35%. Это свидетельствует, что полимеризованный миозин в гладких мышцах существует в равновесии с мономерным миозином; активация клетки способствует полимеризации этого белка.

Kathleen Trybus был первым, кто провел эксперименты по молекулярной инженерии миозина и тяжелого меромиозина гладких мышц [Trybus, 2000]. С использованием методов молекулярной инженерии было показано, что взаимодействие между регуляторными доменами легкой цепи и двумя головками является критическим для регуляции миозина ГМК [Li et al., 2000; Sweeney et al., 2000]; вытянутая, слабо заряженная актин-связывающая петля необходима для зависимой от фосфорилирования регуляции миозина ГМК [Rowner, 1998]; своеобразное «раскручивание» взаимоскрученного соединения головки и стержня

миозина необходимо для оптимального механического функционирования [Lauzon et al., 2001].

In vitro, как кальдесмон, так и кальпонин ингибируют актин-зависимую активацию АТФ-азной активности фосфорилированного миозина гладких мышц. В случае кальпонины, эта ингибирующая активность обращается при связывании Ca^{2+} с кальмодулином (КМ) или при фосфорилировании. Кальпонин – это протеин массой 34-kDa, содержащий сайты связывания для актина, тропомиозина и Са-КМ. Электронная микроскопия и реконструкция трехмерного изображения изолированных тонких филаментов ГМК выявили, что кальпонин и кальдесмон расположены периферически вдоль спирали полимеризованного актина (along the long-pitch actin helix) [Hodgkinson et al., 1997; Lehman et al., 1997].

Физиологическая роль кальдесмона и кальпонины в течении длительного времени была изучена недостаточно. Сейчас получены данные, что уровень этих протеинов в СГМК снижается при вазоспазме мозговых артерий, в то время как уровень их фосфорилирования увеличивается [Tani and Matsumoto, 2004]. Было обнаружено, что экспрессия кальдесмона и кальпонины в СГМК артериол совпадает с устойчивостью к гипероксии [Hughes and Chan-Ling, 2004].

Существует гипотеза, что кальдесмон вовлечен в регуляцию фосфорилирования ЛЦМ в СГМК. Кальдесмон ингибирует АТФ-азную активность миозина. В свою очередь фосфорилирование кальдесмона обращает его ингибирующее действие. Главными кандидатами, которые могут катализировать фосфорилирование кальдесмона, являются p42/p44 ERK MAP киназы [D'Angelo G, Adam LP., 2002; Gorenne I et al, 1998; 2004]. Наряду с каталитическим действием ERK MAP киназ в отношении фосфорилирования кальдесмона, важная роль в этом процессе принадлежит также стауроспорин-чувствительной киназе, что может вносить важный вклад в регуляцию сократительной активности СГМК [Gorenne et al., 2004]. Было показано, что фосфорилирование кальдесмона посредством ERK MAP киназ может модулировать сократительную активность ГМК in vivo, но активация этого пути не обязательна для развития сокращения. В то же время, максимальные амплитудные характеристики сократительной активности мо-

дулируются сигнальным путем, включающим p38 MAP киназу/HSP27 [Yamboliev et al., 2000].

Существует взаимосвязь между экспрессией и функционированием сократительных и регуляторных белков ГМК. В экспериментальной модели мышей с нокаутированным геном миозина SMВ (и заменой его на SMA), а также у мышей дикого типа со сниженной экспрессией этого гена отмечалось снижение скорости укорочения ГМК, повышение силы сокращения ГМК брюшной артерии и аорты. При этом экспрессия кальпонины и митоген-активируемой киназы (МАРК) в ГМК аорты и мочевого пузыря повышалась, а экспрессия кальдесмона снижалась [Babu et al, 2004]. Гончарова Е. А. с соавторами получила данные, что активация p38 МАРК и дальнейшее фосфорилирование немышечного кальдесмона является важным механизмом миграции ГМК, стимулированной урокиназой [Goncharova et al, 2002].

Была предложена модель, согласно которой прикрепление актина к миозину с помощью кальдесмона может играть роль в регуляции сосудистого тонуса. Важным механизмом регуляции считают позиционирование С-терминального домена кальдесмона таким образом, чтобы этот протеин приобретал способность блокировать актомиозиновое взаимодействие [Lee et al, 2000]. В покоящихся СГМК, кальдесмон способен блокировать образование активных поперечных мостиков [Earley et al, 1998].

Кальпонин также играет важную роль в регуляции сокращения ГМК, при этом в тонически активированных ГМК кальпонин может функционировать как сигнальный протеин, облегчающий ERK-зависимую сигнализацию, но не как непосредственный регулятор акто-миозинового взаимодействия на уровне миофиламентов [Je et al., 2001].

Были получены данные, что существует прямая причинно-следственная связь между активацией МАРК и Ca^{2+} -независимым сокращением ГМК, подтверждающая концепцию фосфорилирования кальдесмона как ранее неизвестное звено между этими событиями [Dessy et al., 1998]. Ca^{2+} -независимые изоформы ПК-С также могут играть роль в поддерживаемой фазе сокращения СГМК коронарной артерии через киназный каскад, вовлекающий фосфорилиро-

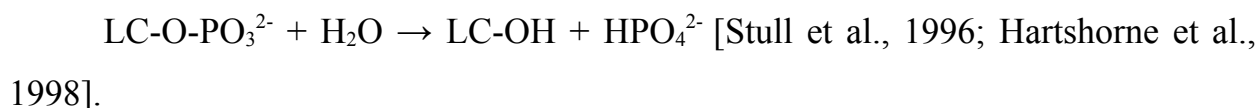
вание кальдесмона и MARCKS (myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate), но не легкие цепи миозина [Throckmorton et al., 1998].

Фосфорилирование и дефосфорилирование 20-kDa легких цепей миозина

Киназа и фосфатаза легких цепей миозина. ГМК содержат киназу легких цепей миозина (КЛЦМ), активируемую комплексом Са-КМ и переносящую терминальную фосфатную группировку АТФ на сериновые (и/или треониновые) гидроксильные группы фосфорилируемой легкой цепи в соответствии со следующей реакцией:



Дефосфорилирование осуществляется фосфатазой легких цепей миозина (ФЛЦМ) ГМК в соответствии с реакцией:



Обычно считают, что соотношение степени фосфорилирования-дефосфорилирования легких цепей контролирует цикл сокращения-расслабления ГМК.

В течение длительного времени исследования были сфокусированы на роли КЛЦМ в регуляции сократительной активности ГМК, однако в последние годы интерес переключился на ФЛЦМ. Важным механизмом сокращения может выступать ингибирование ФЛЦМ [Knapp et al., 2002; Feng et al., 1999; Kaibuchi et al., 1999; Nagumo et al., 2000; Somlyo and Somlyo, 2000; Sward et al., 2000; Ito et al., 2004]. Было установлено, что ФЛЦМ состоит из трех субъединиц: 1) каталитической субъединицы 37-38-kDa фосфатазы 1-го типа, 2) субъединицы 20-kDa с неизвестной функцией, 3) субъединицы 110-130-kDa (МУРТ), мишенью которой является миозин. Было описано семейство МУРТ, включающее МУРТ1, МУРТ2, МУРТ3, MBS85 и TIMAP. Фосфатазная активность каталитической субъединицы низка и значительно повышается в присутствии субъединицы 110-130-kDa (targeting subunit). После фосфорилирования серина и треонина в субъединице 110-130-kDa, ее активирующий эффект в отношении каталитической субъединицы исчезает и, таким образом, осуществляется ингибирование ФЛЦМ [Ito et al., 2004].

В последнее время появились данные, показывающие существование в ГМК Rho-зависимой системы регуляции ФЛЦМ [Feng et al., 1999; Kaibuchi et al., 1999; Nagumo et al., 2000; Somlyo and Somlyo, 2000; Sward et al., 2000; Ito M. et al., 2004]. Rho-ассоциированная киназа является ключевым звеном этой системы. Этот фермент фосфорилирует субъединицу ФЛЦМ 130-kDa, обеспечивающую связь фосфатазы с миозином, и, таким образом, ингибирует активность ФЛЦМ. Благодаря антагонизму между КЛЦМ и ФЛЦМ, результатом ингибирования ФЛЦМ является повышение уровень фосфорилирования легких цепей с последующим повышением механического напряжения ГМК. В этих условиях, субмаксимальный уровень Ca^{2+} достаточен для генерации максимальной силы сокращения, феномена, названного Ca^{2+} -сенситизацией [Somlyo and Somlyo, 1994]. В настоящее время доступны специфические ингибиторы Rho-киназы Y-27632 [Feng et al., 1999; Kaibuchi et al., 1999] и HA-1077 [Nagumo et al., 2000; Sward et al., 2000]. Активность ФЛЦМ может быть также подавлена ингибиторным протеином миозиновой фосфатазы 17-kDa, названным CPI-17 [Kitazawa et al., 2000], который ингибирует каталитическую единицу ФЛЦМ и холоэнзим ФЛЦМ. Фосфорилирование CPI-17 в положении Thr38 повышает его ингибирующее действие в 1000 раз.

Большой круг вторичных посредников регулирует активность ФЛЦМ в физиологических и патофизиологических условиях [Solaro, 2000] посредством фосфорилирования или targeting субъединицы ФЛЦМ или CPI-17. В частности, было показано, что цГМФ-зависимая протеинкиназа фосфорилирует и ингибирует RhoA с последующим ингибированием RhoA/ROCK-индуцированной кальциевой сенситизации СГМК. При этом организация актинового цитоскелета вносит вклад в вазодилатирующее действие NO [Sauzeau et al., 2000].

Гипоосмотическая среда может напрямую активировать Rho. Rho/ROCK-зависимый путь вносит вклад также в гиперосмотическое фосфорилирование ЛЦМ в эпителиоцитах канальцев [Ciano-Oliveira et al., 2003] и мезангиальных клетках [Takeda et al., 1992].

Фосфорилирование легких цепей миозина

Сокращение ГМК коррелирует с фосфорилированием ЛЦМ [обзор Bárány and Bárány, 1996с], центральная роль в котором принадлежит Ca^{2+} . В то время как в скелетных мышцах мишенью для цитоплазматического Ca^{2+} является тропонин-С, в ГМК Ca^{2+} активирует КЛЦМ в виде комплекса Са-КМ. В соответствии с исследованиями *in vitro*, интактные ГМК прекращают сокращение, когда из омывающего раствора удаляют Ca^{2+} или хелатируют его с помощью ЭГТА. Более того, ингибиторы кальмодулина, такие как трифлуоперазин или хлорпромазин также ингибируют сокращение.

В покоящихся ГМК $[\text{Ca}^{2+}]_i \sim 0.1 \mu\text{M}$, а после стимуляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ может увеличиваться в ~ 100 раз, что является одним из ключевых этапов электро- или фармакомеханического сопряжения.

Для исследования изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ непосредственно после стимуляции или в течение фазы плато механической активности обычно используют флуоресцентные зонды. Информация о величине кальциевого сигнала разноречива и свидетельствует о зависимости его параметров от типа ГМК, методики подготовки ткани и используемых реактивов. Однако, исследователи согласны, что для запуска расслабления уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ должен быть возвращен к значению, близком к величине $[\text{Ca}^{2+}]_i$ покоя. В снижении уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ принимают два механизма: 1) Транспортная Ca^{2+} АТФ-аза плазматической мембраны выкачивает Ca^{2+} из цитоплазмы во внеклеточное пространство. 2) Транспортная Ca^{2+} АТФ-аза мембраны саркоплазматического ретикулума закачивает Ca^{2+} в просвет СПР.

Фосфорилирование легкой цепи миозина может происходить не только при электрической или химической стимуляции ГМК, но и при так называемой механохимической активации гладкой мышцы. Растяжение артериальных ГМК индуцирует фосфорилирование в такой же степени, как и при сокращении ГМК при гиперкалиевой деполяризации мембраны или аппликации норэпинефрина [Bárány and Bárány, 1996с]. При растяжении ГМК в 1.6 раз по сравнению с длиной покоя сокращение не развивается, но при устранении натяжения и возвращении к исходной длине происходит сокращение. Важно, что это сокращение развивается спонтанно, показывая, что стреч-индуцированная активация несет всю необходимую информацию для запуска полноценного сокращения. Моби-

лизация Ca^{2+} необходима для реализации стреч-индуцированного фосфорилирования и сокращения. Было показано также, что в ГМК имеются механо-чувствительные рецепторы, опосредующие высвобождение Ca^{2+} из СПР. В то же время имеются свидетельства, что сокращение ГМК и фосфорилирование легких цепей миозина могут разобщаться. Это является подтверждением гипотезы, что фосфорилирование легких цепей миозина играет роль в процессе активации, но не сокращения *per se*. Более того, имеются и другие свидетельства отсутствия сопряжения между степенью фосфорилирования ЛЦМ и сократимостью гладких мышц. Так, при K^+ -индуцированном сокращении ГМК наблюдается поддерживаемое сокращение, несмотря на то, что легкие цепи миозина остаются дефосфорилированными.

Важную роль в сопряжении возбуждения и сокращения играет также фосфорилирование протеинов теплового шока (Heat-Shock proteins) [Bárány and Bárány, 1996c]. Вазорелаксация, опосредуемая циклическими нуклеотидами, ассоциирована с фосфорилированием белка теплового шока массой 20-kDa, названного HSP20 [Beal et al., 1997; Rembold et al., 2000]. Были получены данные, что HSP20 является актин-ассоциированным протеином [Brophy et al., 1999; Rembold et al. 2000], свидетельствуя о возможном участии в расслаблении соединения фосфорилированного HSP20 с актиновыми филаментами.

Трансляция сигналов

Начиная с установления Сазерлендом [Sutherland, 1956] сигнальной роли цАМФ, круг молекул, претендующих на роль вторичных посредников, был расширен весьма небольшим числом молекул, включая цГМФ, инозитол-1,4,5-трифосфат (ИТФ), диацилглицерол и Ca^{2+} .

Связывание агониста с поверхностным рецептором ГМК индуцирует сигнал, который распространяется с наружной к внутренней поверхности мембраны и активирует несколько эффекторов, которые, в конечном счете, инициируют сокращение. Основными компонентами этой системы являются: 1) инозитол-1,4,5-трифосфат, 2) G-белки, 3) фосфоинозитид-специфичная фосфолипаза С (ФЛ-С) и ионы Ca^{2+} .

Инозитольное кольцо содержит шесть гидроксильных сайтов, большинство из которых может быть фосфорилировано специфическими киназами. Инозитол-1-монофосфат – это составляющая фосфатидинозитола, одного из фосфолипидов мембран животных клеток. PI 4-киназа и PI (4) P 5-киназа генерируют PI (4) P and PI (4,5) P₂, соответственно, последовательно фосфорилируя PI. Со внутренней стороны мембраны размещается фосфоинозитид-специфичная ФЛ-С, одним из гидролитических продуктов которой является инозитол 1,4,5-трифосфат.

G-белки. ГТФ-связывающие белки (G-белки) являются гетеротримерами, состоящими из α -, β - and γ -субъединиц. α -субъединицы вариабельны и отвечают за специфическое взаимодействие различных G-белков с их эффекторами. В основном состоянии, α -субъединица содержит связанный ГДФ, а ассоциация α -, β - и γ -субъединиц в высшей степени стабильна, что удерживает G-белок в неактивной форме. Стимуляция G-белка происходит при присоединении G-белком ГТФ. Рецепторы взаимодействуют наиболее эффективно с гетеротримерной формой G-белка и ускоряют его активацию, увеличивая степень диссоциации с ГДФ и ассоциации с ГТФ. Активация сопряженного с рецептором G-белка приводит к диссоциации гетеротримерного G-белка на α -субъединицу и $\beta\gamma$ -димер. Фосфоинозитид-специфичная ФЛ-С. Этот фермент принадлежит к семейству энзимов, специфичных в отношении фосфоинозитидной части молекулы фосфатидинозитола, но различающихся своей специфичностью в зависимости от числа фосфорильных групп инозитольного кольца.

β -, γ - и δ -изоформы фосфоинозитид-специфичной ФЛ-С (ФИ-ФЛ-С) проявляют высокую специфичность в отношении трифосфорилированных фосфолипидов. Имеется два основных механизма, посредством которых агонисты активируют их гидролиз. В случае гормонов, нейромедиаторов и некоторых других агонистов, сигнал переносится к ФИ-ФЛ-С β -изоформы. Другим фундаментальным активирующим механизмом, как, например, в случае ростовых факторов, активация их рецепторов ведет к повышению активности тирозиновой киназы. Во всех случаях активированная ФИ-ФЛ-С гидролизует PIP_2 до ИТФ и

диацилглицерола. ИТФ ведет к высвобождению Ca^{2+} из СПР и таким образом запускает сокращение ГМК. Дацилглицерол активирует ПК-С.

Активация α_1 -адренорецепторов вовлекает многочисленные сигнальные пути, контролирующие взаимодействие актина и миозина. Эти сигнальные пути могут быть классифицированы в зависимости от принадлежности к миозин- или актин-зависимому типу регуляции. Миозин-зависимый путь регуляции охватывает как кальциевую активацию, так и кальциевую сенситизацию, что вовлекает активацию КЛЦМ комплексом Са-КМ и регуляцию активности ФЛЦМ. В отношении кальциевой активации было продемонстрировано существование адренергически-индуцированных транзиторных повышений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в индивидуальных СГМК интактных артерий. При визуализации с высоким разрешением было установлено, что при этом происходит СПР-зависимое распространение асинхронных Ca^{2+} волн, которые при использовании высоких доз адреномиметиков переходят в синхронные осцилляции. Эти волны отличаются от пространственно однородных повышений $[\text{Ca}^{2+}]_i$, как предполагалось раньше.

Волны асинхронных осцилляций Ca^{2+} при действии фенилэфрина в сосудах ГМК полых вены кролика вызываются высвобождением Ca^{2+} из СПР через ИТФ-чувствительные каналы. При этом пополнение СПР ионами кальция осуществляется Ca^{2+} -АТФазой и требует поддерживаемой генерации повторных волн Ca^{2+} . Блокирование потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов L-типа нифедипином снижает частоту вызванных фенилэфрином Ca^{2+}_i осцилляций, в то время как дополнительное блокирование рецептор-оперируемых и Ca^{2+} -зависимых Ca^{2+} каналов (ROC/SOC) соединением SKF96365 устраняет оставшиеся осцилляции и отменяет тонический компонент фенилэфрин-индуцированного сокращения. Ингибиторы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена 2',4'-дихлорбензамил и KB-R7943 полностью отменяют нифедипин-чувствительный компонент Ca^{2+}_i -осцилляций и резко снижают сокращение. Таким образом, Ca^{2+} волны зависят от начального высвобождения Ca^{2+} из СПР по ИТФ-чувствительным каналам. Вход Na^+ через ROC/SOC облегчает вход Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник, оперирующий в обратном направлении, что ведет к восполнению запасов Ca^{2+} в СПР и способствует поддержанию фенилэфрин-индуцированных Ca^{2+}_i -осцилляций. Вход Ca^{2+} по по-

тенциал-зависимым Ca^{2+} каналам и ROC/SOC служит модулятором частоты активации осцилляций и величины амплитуды сокращения [Lee et al., 2001] .

При адренергической активации происходит динамическая транслокация в мембрану и другие внутриклеточные сайты ряда протеиновых киназ (в частности, Ca^{2+} -активируемых протеинкиназ, ROCK и ПК-C), которые вовлечены в регуляцию ФЛЦМ и обеспечивают кальциевую сенситизацию сокращения. Актин-зависимая регуляция включает возможную дезинтеграцию актин-миозиновых взаимодействий посредством фосфорилирования кальдесмона, возможно, с участием MAPK, которые также транслоцируются при адренергической стимуляции [Wier and Morgan, 2003].

Кальций-зависимая сигнализация в гладкомышечных клетках

Как указывалось выше, тонус сосудистых гладких мышц определяется степенью фосфорилирования легких цепей миозина, зависящей от множества регуляторных воздействий, реализующих свой эффект через системы внутриклеточной сигнализации [11], которые в свою очередь обеспечивают передачу информации от рецепторов плазматической мембраны к исполнительным системам с помощью сигнальных молекул, называемых вторичными посредниками [4,11,84,86-88].

Ионам кальция принадлежит центральная роль в регуляции сопряжения возбуждения и сокращения СГМК. Одним из ключевых условий развития сократительного ответа интактных ГМК является повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле свыше 5–10 мкМ [Шуба, Кочемасова, 1988]. При этом оно может быть достигнуто при деполяризации клеточной мембраны, активации рецепторуправляемого входа Ca^{2+} , либо мобилизации его из внутриклеточных депо. В физиологических условиях внеклеточный кальций необходим для сокращения ГМК [Шуба, 1981]. При использовании блокаторов Ca^{2+} каналов или в бескальциевой среде [Шуба, 1981; Kuriyama et al., 1998] амплитуда сокращения значительно снижается. Нет однозначного мнения о роли внутриклеточных депо Ca^{2+} , так как в ГМК слабо развит саркоплазматический ретикулум. Однако, имеются сообщения, что в клетках стенки сосудов роль внутриклеточного Ca^{2+} достаточно существенна [Бурый с соавт., 1989]. Предполагается возможность

Ca^{2+} -индуцированного высвобождения кальция из депо. Практически одновременно с мобилизацией Ca^{2+} в цитозоль активируются системы его удаления и компартментализации. Они представлены прежде всего Ca^{2+} -АТФ-азами и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменником [Kuriyama et al., 1998].

После снижения концентрации кальция в цитозоле равновесие смещается в сторону дефосфорилирования ЛЦМ, осуществляемого кальциейрин-подобной фосфатазой, что приводит к последующему расслаблению. Данная точка зрения является общепринятой. Однако имеются факты, не объяснимые в рамках данной гипотезы. Например, степень фосфорилирования КЛЦМ не всегда коррелирует с амплитудой сократительного ответа. Вероятно, наряду с миозин-зависимой регуляцией, в ГМК реализуется и путь актин-зависимой регуляции сокращения. В литературных источниках есть указания, по меньшей мере, на два таких механизма. Один связывают с участием тропомиозина, содержание которого в ГМК крайне низко, другой – кальдесмона – актин-ассоциированного белка, способного модулировать актомиозиновое взаимодействие [Kuriyama et al., 1998].

Взаимодействие с рецепторами мембраны биологически активных веществ вызывает открывание Ca^{2+} каналов, получивших название рецептор-управляемых или хемочувствительных [Тепперман, 1989; Ткачук, 1987; Шуба, 1984, 1991; Шуба с соавт., 1988; Somlyo and Somlyo, 1994; Van Breemen et al., 1986]. Входящий Ca^{2+} ток, протекающий по хемочувствительным ионным каналам приводит к деполяризации мембраны СГМК и последующей активации потенциал-зависимых кальциевых каналов [Шуба, 1984, 1991; Шуба с соавт., 1988]. По кинетике активации и инактивации пул потенциал-зависимых кальциевых каналов неоднороден. М.Ф.Шуба выделяет как минимум два типа – быстрые инактивирующиеся и медленные неинактивирующиеся кальциевые каналы, которые отличаются параметрами активации и инактивации, а так же механизмами регуляции [Костерин, 1990; Шуба, 1984, 1991; Шуба с соавт., 1988]. Для них характерны метаболические [Скок, Шуба, 1986] и/или кальций-зависимые механизмы модуляции ионной проницаемости [Шуба, 1991; Barnes, 1993].

В литературе нет единого мнения о взаимодействии хемо- и потенциал-зависимых путей активации кальциевых каналов ГМК. Существуют гипотезы о синергизме, полной независимости и антагонизме в их функционировании [Баскаков с соавт., 1987; Шуба, 1991; Шуба с соавт., 1988; Bialecki et al., 1995; Kuriyama et al., 1998; Noguera et al., 2001]. Не исключается присутствие в мембране ГМК особой группы кальциевых каналов, активность которых характеризуется одновременно хемо- и потенциал-зависимостью [Баскаков с соавт., 1987].

В отличие от потенциал-зависимого, рецепторуправляемый вход Ca^{2+} сопровождается взаимодействием рецепторов-лигандов с ГТФ-связывающими G-белками мембраны [Баскаков с соавт., 1987, Тепперман, 1989; Ткачук, 1987], активирующими фосфолипазу C с последующей активацией метаболизма мембранных фосфоинозитидов [Кочемасова, 1982; Расмуссен, 1989; Berridge, 1984]. Основным ионным током в генерации потенциала действия ГМК является ток ионов кальция через потенциал-оперируемые кальциевые каналы. При этом основным субтипом кальциевых каналов в ГМК являются каналы L-типа, что показано в микроэлектродных экспериментах с использованием кальциевых антагонистов. Потенциал-зависимые кальциевые каналы ГМК классифицируются на каналы L-типа (long-lasting; или high voltage activated, HVA; проводимость 20–28 pS), T-типа (transient; или low voltage activated, LVA; проводимость 7–15 pS) и N-типа (ни L, ни T). Исключительно кальциевые каналы L-типа были идентифицированы в сосудистых ГМК из брюшных артериях человека, крысы и кролика, портальных вен крысы, кролика и морской свинки, ушной артерии кролика, сафенозной вены собаки, коронарных артерий морской свинки и кролика, базилярной артерии кролика [Kuriyama, 1998]. Предполагают, что в аорте крысы могут присутствовать также каналы других типов, включая N- и R-типы каналов [Smirnov and Aaronson, 1992; Bkaily, 1992]. T-тип кальциевых каналов также был обнаружен в некоторых сосудистых объектах [Hughes, 1995].

Кальциевые каналы L-типа активируются при относительно высоких значениях мембранного потенциала, в большей степени проницаемы для Ba^{2+} , чем для Ca^{2+} , блокируются блокаторами Ca^{2+} каналов (дериватам дигидропиридина (ДГП)), инактивируются как деполяризацией мембраны, так и внутриклеточным

кальцием. Т-тип каналов характеризуется активацией при низких значениях потенциала, устойчивостью к дериватам ДГП, быстрой инактивацией [Yoshino et al., 1988; Inoue et al., 1990].

В целом, каналы L-типа представляет основной путь для входа Ca^{2+} в клетку во время генерации потенциала действия, в то время как роль каналов Т-типа или каналов с низковольтным порогом активации остается неопределенной, потому что эти каналы обычно инактивированы при потенциале покоя в ГМК различных тканей. Не так давно прозвучало сообщение о том, что ДГП-чувствительные Ca^{2+} каналы с низким порогом активации и значением тока 10-pS в нейронах дорсальных ганглиев крысы вовсе не способствуют развитию потенциала действия, а вместо этого участвуют в модуляции частоты спайков. Эта идея может быть также протестирована и в тех ГМК, которые обладают Ca^{2+} каналами Т-типа.

В ГМК присутствуют каналы большой и малой проводимости, блокируемые ДГП [Caffrey et al., 1986; Inoue and Isenberg, 1990]. Каналы большой проводимости имеют характеристики подобные таковым для типичных каналов L-типа, в то время как каналы малой проводимости имеют низкий порог активации и при этом малую инактивацию [Caffrey et al., 1986; Inoue et al., 1990].

Полного понимания структуры ДГП -резистентных каналов (Т-тип) или чувствительных к ДГП каналов низкой проводимости нет до настоящего времени.

Имеются многочисленные указания, что ИТФ, обладая высокой способностью к перемещению в цитозоле, дополнительно высвобождает ионы кальция из немитохондриальных депо во всех типах гладких мышц [Кочемасова, 1992; Тепперман, 1989; Ткачук, 1998; Шуба с соавт, 1991; Berridge et al., 1984; Kumar et al., 1997].

Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} до 1 мкМ и выше является пусковым моментом сокращения ГМК [Антипенко, 1991; Баскаков, 1987; Бурый с соавт., 1989; Крутецкая, 1992; Шуба, 1984, 1988, 1991]. По мнению ряда исследователей, поступающие во время деполяризации мембраны в ГМК ионы кальция не участвуют непосредственно в сокращении, а, вероятнее всего,

активируют Ca^{2+} -зависимое высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных запасов [Бурый с соавт., 1989; Расмуссен, 1989; Karaki and Weiss, 1988].

Но существует и другая точка зрения, согласно которой поступившего в момент развития потенциала действия внеклеточного кальция вполне достаточно для сокращения ГМК [Шуба, 1984].

Многочисленные внутриклеточные эффекты Ca^{2+} реализуются благодаря системе Ca^{2+} -кальмодулин (КМ) [Баскаков, 1984, 1987; Курский с соавт., 1981; Орлов, 1987; Hamilton et al., 2000]. Она способна одновременно инициировать механизмы как поступления ионов кальция в клетку, так и выведения его во внеклеточную среду, либо депонирование в саркоплазматическом ретикулуме (СПР) [Баскаков, 1987; Орлов, 1987]. Это, а также другие многочисленные процессы участия ионов кальция в качестве регулятора внутриклеточного метаболизма, позволяет считать, что КМ в процессах электро- и фармако-механического сопряжения ГМК занимает одно из центральных мест [Баскаков, 1987; 1988].

Считается, что при достижении «пороговой» внутриклеточной концентрации ионов кальция выше 1 мкМ происходят конформационные изменения КМ в виде экспонирования гидрофобных областей [Баскаков, 1987; Курский с соавт., 1981; Орлов, 1987; 199]. По этим участкам осуществляется взаимодействие комплекса Ca^{2+} -КМ с эффекторными системами, в том числе с кальций-кальмодулин-зависимыми протеинкиназами (Ca-КМ-ПК), наиболее значимой из которых является КЛЦМ – важный участник сократительного процесса ГМК [Баскаков, 1987; Курский с соавт., 1981; Орлов, 1987; De Alfonso et al., 1996; Hamilton et al., 2000].

После активации Ca-КМ-ПК реализуются и другие, широко представленные в литературе многочисленные процессы, предполагающие участие ионов кальция в качестве регулятора внутриклеточного метаболизма, который осуществляется за счет взаимодействия системы Ca^{2+} -кальмодулин с другими системами вторичных посредников. [Антипенко, 1991; Баскаков, 1987, 1988; Курский с соавт., 1981; Орлов, 1987; 86-88]. Широко обсуждаются кальций-зависимые механизмы регуляции аденилат- и гуанилатциклазной активности, метаболизма мембранных фосфолипидов, циклических нуклеотидов и углеводов и т.д. [Анти-

пенко, 1991; Баскаков, 1987; Кочемасова, 1982; Рекалов, 1985; Ткачук, 1987, 1998]. Разнонаправленность и видоспецифичность внутриклеточной сигнальной организации не позволяет однозначно судить о роли ионов кальция во внутриклеточном метаболизме [Баскаков, 1984, 1987; 64, Рекалов, 1985; Ткачук, 1987, 1998].

Активность Ca^{2+} каналов существенно модулируется агонистами и вторичными посредниками. В 1996 году С.Н. Орлов с соавторами, используя культуральные ГМК из аорты крысы, показал, что увеличение продукции цАМФ (путем аппликации форсколина, изопротеренола, холерного токсина) существенно снижает вход ^{45}Ca , индуцированный деполяризацией мембраны в гиперкалиевой среде. Точно такое же действие на индуцированный деполяризацией вход ^{45}Ca оказала предобработка клеток цитохалазином В, дезинтегратором F-актина. При этом аппликация цитохалазина В не оказывала влияния на продукцию цАМФ, индуцированную форсколином и изопротеренолом. Ингибитор ПК-А Р-89 предотвращал действие цАМФ-повышающих соединений на индуцированный деполяризацией вход ^{45}Ca , но не оказывал влияния на базальное накопление кальция. Действие форсколина и цитохалазина В было неаддитивным, то есть в присутствии цитохалазина В, форсколин не вызывал никакого дальнейшего угнетения Ca^{2+} каналов L-типа. Ингибитор микротрубочек винбластин, напротив, не влияя на вход ^{45}Ca , индуцированный деполяризацией мембраны в гиперкалиевой среде, достоверно увеличивал его базальное накопление [Orlov et al., 1996].

На основании этих данных было сделано предположение, что цАМФ играет ключевую роль в вазорелаксации, запускаемой активацией рецепторов, сопряженных с аденилатциклазой. При этом ингибирующее действие цАМФ на Ca^{2+} каналы L-типа, вероятно, связано с реорганизацией актинового цитоскелета (по всей видимости, цАМФ сдвигает равновесие между F- и G-актином в сторону G-актина) [Orlov et al., 1996].

Активация рецептор-управляемых ионных каналов и модуляция внутриклеточных кальциевых депо, а также прямая и непрямая регуляция потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов агонистами различных рецепторов продолжают интен-

сивно исследоваться. Модуляция каналов агонистами рецепторов может осуществляться по одному из двух различных механизмов, а именно через прямую модуляцию G-белками или непрямую модуляцию вторичными посредниками с последующим фосфорилированием белка канала. С помощью методов молекулярной биологии были получены свидетельства наличия в α_1 - и β -субъединицах различных сайтов, фосфорилируемых протеинкиназами А и С (РКА и РКС) [564]. В аортальных α_1 -субъединицах имеются пять сайтов, фосфорилируемых РКА [Biel et al., 1990; Koch et al., 1990] и локализованных в СООН-терминальном регионе.

В коронарных артериях свиньи как β -адренергическая стимуляция, так и форсколин повышают Ca^{2+} ток через сАМР-зависимые механизмы [Fukumitsu et al., 1990], в то время как в некоторых других тканях увеличение Ca^{2+} тока при активации β -адренорецепторов не вовлекает сАМР-зависимые пути [Muraki et al., 1993; Tajimi et al., 1991]. Получены данные, что коэкспрессия различных типов β -субъединиц может быть ключевым фактором для сАМР-зависимого фосфорилирования Ca^{2+} каналов L-типа в ГМК. Интерлейкин- 1β и фактор некроза опухолей- α также активируют потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы в ГМК хвостовой артерии крысы. Однако этот эффект не модулируется простагландинами, но ингибируется дибутирил-сGMP [Takeshima et al., 1995]. Лежащие в основе этого явления механизмы в сосудистых ГМК все же не выяснены [Xiong and Sperelakis, 1995]. Не связанная с рецептором тирозиновая киназа (pp60c), введенная в ГМК ушной артерии кролика, активировала потенциал-оперируемые кальциевые каналы и, более того, пептид А, тирфостин-23 и генистин (ингибиторы pp60c) ингибировали входящий Ca^{2+} ток [Wijetunge and Hughes, 1995]. Авторы заключили, что эта модуляция потенциал-зависимого Ca^{2+} тока зависела от фосфорилирования тирозина, но не была связана с активацией РКС.

Хорошо известно, что сопряжение различных агонистов рецепторов с Gq протеин-PLC системой обуславливает активацию каналов L-типа в сосудистых ГМК. Считают, что повышение тока происходит из-за активации РКС и/или из-за прямой активации через РТХ-чувствительные и –нечувствительные G протеины, но не через образование $\text{InsP}_3/\text{InsP}_4$ [Ohya et al., 1988; Oike et al., 1992; Vi-

vaudou et al., 1991]. Было показано, что непосредственная аппликация DAG или форболового эфира PDBu вызывала повышение Ca^{2+} тока, при этом Н-7 или ста- уроспорин предотвращали повышение тока, индуцированное PDBu [Loirand et al., 1993; Oike et al., 1992]. Однако Oike с соавторами [Oike et al., 1992] сообщили, что в сосудистых ГМК кролика гистамин-индуцированная активация каналов L-типа не модулировалась этими ингибиторами протеинкиназ, свидетельствуя, что РКС-опосредованная активация тока не является основным процессом, возникающим в ответ на стимуляцию агонистом. Есть основания считать, что имеется несколько согласованных регионов фосфорилирования в α_1 - и β -субъединицах [Hullin et al. 1992; Steenbergen and Fay, 1996]. Были получены результаты, свидетельствующие 1) что фосфорилируемые РКС сайты в β_{1b} -субъединице не играют никакой роли в повышении тока, индуцированном РКС, и 2) что сайты в α_1 -субъединице, фосфорилируемые РКС, не всегда модулируют активность канала. В гладкомышечных клетках, именно присутствие α_{1C} , но не других α_1 -субъединиц, обуславливает повышение тока при стимуляции рецепторов, сопряженных с PLC, и может косвенно вовлекать регуляцию через α_1 - и/или β -субъединицы.

Интересно, что все типы α_1 -субъединиц Ca^{2+} канала обладают EF-рукой в СООН-терминальном регионе; связывание здесь ионов Ca^{2+} могло бы влиять на модуляцию канала [Babitch, 1990]. Исследование первичных структур Ca^{2+} канала L-типа (α_{1C} -, α_{1S} - и α_{1D} -субъединиц) показало, что различие между этими субъединицами касается только одной аминокислоты в 29-ой позиции EF-руки, в то время как различие между L- и другими типами Ca^{2+} каналов заключается уже в 12 аминокислотных остатках. В связи с тем, что Ca^{2+} каналы L-типа проявляют выраженные инактивационные свойства в ответ на экспонирование высокого внутриклеточного Ca^{2+} (Ca^{2+} -индуцированная инактивация Ca^{2+} тока), различия в Ca^{2+} -связывающих аминокислотных последовательностях L- и других типов Ca^{2+} каналов могло бы быть важным для инактивации в ответ на деполаризацию и ионные потоки [Babitch, 1990].

Пути поддержания кальциевого гомеостаза включают вход и выход Ca^{2+} через сарколеммальную мембрану, а также высвобождение и накопление Ca^{2+} во

внутриклеточных кальциевых депо (главным образом, в саркоплазматическом ретикулуме (СПР)).

Впервые внутриклеточная концентрация кальция ($[Ca^{2+}]_i$) была измерена в ГМК желудка *Fau* с соавторами [Fau et al., 1979] при использовании люминесцентного Ca^{2+} -индикатора *aquarogin*, что открыло дорогу многочисленным исследованиям цитозольной концентрации Ca^{2+} в различных объектах. В клетках покоящихся и активных тканей концентрацию Ca^{2+} определяют, главным образом, используя *aquarogin*, *quin 2*, *fura 2*, *fura 2*, *fura 2*, *fluo 3*, *rhod 2*, *indo 1* [Kuriyama, 1998]. Для покоящихся клеток среднее значение $[Ca^{2+}]_i$ составляет 100–150 нМ. Однако это значение находится под влиянием различных факторов (температура, растяжение, цитозольное и внеклеточное ионное микроокружение, экспериментальные условия) и характеризуется видовыми и тканевыми особенностями [Ganitkevich and Isenberg, 1990; 1991]. Согласно оценкам Bukosi с соавторами [Bukosi et al., 1989], в резистивных артериях $[Ca^{2+}]_i$ составляет 79 нМ в состоянии покоя (был использован *fura 2*), в то время как Jensen с соавторами [Jensen et al., 1992], используя тот же *fura 2*, получили значение 114 нМ для ГМК брюшной артерии крыс *Wistar-Kyoto* при мембранном потенциале покоя -61.2 mV. В коронарных артериях свиньи, Ganitkevich и Isenberg [Ganitkevich and Isenberg, 1990; 1991] обнаружили значение $[Ca^{2+}]_i$ 155 нМ, когда значение мембранного потенциала фиксировалось около потенциала покоя. Согласно Itoh с соавторами [Itoh et al., 1992], значение $[Ca^{2+}]_i$ в невозбужденных клетках брюшной артерии кролика составляло ~ 100 нМ. В бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе это значение падало до 70–80 нМ, а добавление соединения, открывающего K^+ каналы, обуславливало его дальнейшее снижение до 50–60 нМ; [Itoh et al., 1991]. В ГМК портальной вены крысы, внеклеточная аппликация АТФ (10 мкМ) повышала значение $[Ca^{2+}]_i$ с 92 нМ (в невозбужденных клетках) до 557 нМ. Однако при предобработке норэпинефрином АТФ-индуцированное повышение $[Ca^{2+}]_i$ составляло лишь 23.6% по сравнению с контролем (только в присутствии АТФ) [Pascud and Loirand, 1995].

Значение $[Ca^{2+}]_i$, необходимое для активации сократительных белков, может быть оценено количественно. Для этого исследуют сокращение, индуциро-

ванное аппликацией Ca^{2+} в гладких мышцах, скенированных сапонином, α -токсином (*Staphylococcus exotoxin*) или β -эпсионом (эфиром сапонины). Сапонин обычно используется для приготовления полностью проницаемых клеток, потому что формирует небольшие поры, пронизывающие плазматическую мембрану, в то время как два других соединения используют для частичной пермеабилзации мембраны [Fussle et al., 1981; Ikigai and Nakaе, 1987]. В соответствии с полученными данными, минимальная концентрация Ca^{2+} , вызывающая сокращение составляет ~ 200 нМ, а максимальное сокращение вызывается $0,8\text{--}1,0$ мкМ. Между этими пределами, величина механического ответа пропорциональна концентрации Ca^{2+} . Таким образом, концентрация Ca^{2+} , необходимая для запуска сокращения в экспериментах на скенированных мышцах, выше, чем цитозольная концентрация покоя. Высказано мнение [Fay et al., 1992], что сократительные ответы на широкий круг физиологических стимулов *in vivo* влекут повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ не более чем до $600\text{--}800$ нМ, так как существующая мощная система регуляции с обратной связью приводит к развитию резистентности к дальнейшему увеличению уровня этого иона [Becker et al., 1989; Tang et al., 1993; Yagi et al., 1988]. Таким образом, различия между $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в состояниях покоя и активности варьируют с $100\text{--}150$ нМ до $600\text{--}800$ нМ.

Важным вопросом о механизмах кальций-зависимой сигнализации является выяснение: насколько однородно распределяется Ca^{2+} ; в течение активного состояния ГМК. В сердечной, скелетной и артериальной мускулатуре транзиторные, пространственно локальные повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ называют кальциевыми осцилляциями (Ca^{2+} sparks). Это явление было обнаружено с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Считают, что Ca^{2+} осцилляции являются элементарными актами высвобождения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума через каналы, рецепторы которых чувствительны к рианодину. Предполагают, что в поперечно-полосатой мускулатуре Ca^{2+} осцилляции являются ключевыми элементами сопряжения возбуждения и сокращения, в то время как относительно артериальных гладкомышечных клеток предполагается, что Ca^{2+} осцилляции препятствуют миогенной вазоконстрикции и влияют на вазорелаксацию [Jaggar et al., 1998; Gollasch et al., 1999]. Глобальное повышение

$[Ca^{2+}]_i$ ведет к поддерживаемому сокращению артериальных ГМК, в то время как Ca^{2+} осцилляции индуцируют расслабление сосуда через локальную активацию Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов. В мозговых артериях глобальная $[Ca^{2+}]_i$ и Ca^{2+} осцилляции частотой $<10^{-2}$ Гц не могут обеспечить активность Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов в достаточной мере, чтобы регулировать мембранный потенциал и миогенный тонус ГМК. Частота Ca^{2+} осцилляций и Ca^{2+} -активируемые K^+ каналов, в свою очередь, регулируются агентами, модулирующими активность РК С и РК А. При этом элементарные акты высвобождения кальция могут представлять новую цель в кардиоваскулярной терапии. [Gollasch et al., 2000; Furstenau, et al, 2000]. Считают, что вход кальция через Ca^{2+} каналы L-типа и рециркуляция Ca^{2+} от СПР к плазмалемме значительно повышает $[Ca^{2+}]$ около Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов и активирует их [Asano et al, 2002].

Существование функциональной связи между СПР и сарколеммой в ГМК дискутируется в основном, чтобы найти объяснение реаккумуляции кальция в СПР из внеклеточного пространства. Было высказано предположение, что существует прямой путь между СПР и сарколеммой [Bourreau et al., 1991; Casteels and Droogmans, 1981] или постоянное направленное высвобождение Ca^{2+} из просвета СПР во внеклеточное пространство [Chen et al., 1992; Chen and Van Breemen, 1993]. Существуют, по крайней мере, два пути, вносящие вклад в реаккумуляцию кальция во внутриклеточных депо: один из них не активируется при деполяризации мембраны или аппликации ацетилхолина, а второй вовлекает прямой контакт с СПР и, таким образом, проводит внеклеточный кальций непосредственно в СПР, минуя цитозоль.

Механизмы сокращения ГМК, независимые от повышения внутриклеточной концентрации кальция

В последние года внимание многих исследователей было направлено на изучение механизмов регуляции сократительной активности, не связанных с повышением внутриклеточной концентрации кальция. Kravtsov et al (2003) продемонстрировал возможность K^+ -индуцированного сокращения аорты крысы в бескальциевой, не содержащей магний среде, не сопровождающееся увеличением внутриклеточной концентрации кальция. При этом K^+ -индуцированное со-

кращение в присутствии Mg^{2+} коррелировало с повышением $[Ca^{2+}]_i$, что было показано с использованием *fluo-2*. В то же время, блокаторы кальциевых каналов, модуляторы Ca^{2+} -связывающих белков и модулятор полимеризации актина ингибировали все типы K^+ -индуцированных сокращений. Повышение K^+ в изотонической среде вызывало увеличение связывания ^{45}Ca с плазмалеммой свежееизолированных ГМК аорты. Хотя Ca^{2+} -зависимые события лежат в основе механизма K^+ -индуцированного сокращения как в присутствии, так и в отсутствие наружного Ca^{2+} , авторы предположили, что K^+ -индуцированная модуляция Mg^{2+} -зависимого связывания Ca^{2+} с кальциевым каналом является пусковым механизмом, запускающим сокращение аорты. В противоположность общепринятой точке зрения о ключевой роли $[Ca^{2+}]_i$ в сопряжении возбуждения и сокращения ГМК, авторы выдвинули гипотезу, что именно Mg^{2+} -зависимое связывание Ca^{2+} с кальциевым каналом может активировать взаимодействие актина и миозина [Kravtsov et al, 2003].

Одним из возможных путей сокращения ГМК может выступать увеличение чувствительности сократительного аппарата клеток к внутриклеточному кальцию, что получило название кальциевой сенситизации и что также может вести к повышению тонуса ГМК без изменения внутриклеточной концентрации этих ионов. Считают, что механизм кальциевой сенситизации вовлекает активацию ПК-С, тирозиновых и rhoA-зависимых серин/треониновых киназ ROCK [Nakao et al., 2003; Damron et al, 2002; Crowley et al, 2002; Shirao et al., 2002; Shirasawa, 2003]. Согласно полученным результатам индуцированное гиперкалиевой средой фосфорилирование ЛЦМ опосредуется не только классической Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой активацией КЛЦМ, но и ROCK-зависимым фосфорилированием ЛЦМ. При этом гиперкалиевая деполяризация мембраны ведет к активации ROCK с последующим ингибированием фосфатазы ЛЦМ, повышением степени фосфорилирования ЛЦМ и сокращением СГМК [Sakamoto et al., 2003] и респираторных ГМК [Janssen et al., 2004]. Участие ROCK рассматривается как главный механизм регуляции кальций-независимой компоненты сокращения аорты морской свинки, индуцированного активацией простаноидного рецептора EP3 [Shum et al., 2003]. Sakurada S. с соавторами сообщили о существо-

вании нераспознанной до сих пор Ca^{2+} -зависимой стимуляции Rho в СГМК, механизмы которой могут быть вовлечены в эффекты возбуждающих рецепторы агонистов, таких как норадреналин и тромбаксан А2 [Sakurada et al, 2003]. Данные Urban с соавторами подтвердили гипотезу, что гиперкалиевая деполяризация мембраны ведет к кальциевой сенситизации СГМК через активацию RhoA-ассоциированной киназы. Был предложен новый механизм, согласно которому активация этой киназы сопряжена с ее транслокацией в область кавеол, зависимой от нифедипин-чувствительного входа Ca^{2+} и вовлекающей активацию кальмодулина [Urban et al., 2003]. Существует сложное взаимодействие RhoA/ROCK-зависимой сигнализации с кальций-зависимыми механизмами. Так, активация норадреналин-индуцированного входа Ca^{2+} , не связанного с потенциал-зависимыми каналами и каналами СПР, вовлекает ROCK [Ghisal et al., 2003].

Главенствующая роль RhoA/ROCKs-зависимой сигнализации была показана в стабилизации параметров циркуляции в системе легочных артерий крысы при системном ацидозе [Hyvelin et al, 2004]. Опубликованы данные, указывающие на то, что ROCKs принимают участие не только в регуляции фосфорилирования ЛЦМ, реорганизации цитоскелета и сократительной активности СГМК, но и участвуют в перестройке сосудистой стенки. Так, было показано, что активация этих киназ вносит существенный вклад в развитие гиперплазии и перестройки поврежденных артерий [Pearce et al., 2004], а также вовлечена также в ангиотензин-II-индуцированную кардиоваскулярную гипертрофию у крыс *in vivo* [Higashi et al., 2003] и принимает участие в вазоактивных эффектах агонистов [Lan et al., 2004]. Есть основания считать, что RhoA-ассоциированная киназа может стать важной мишенью для предотвращения гиперплазии интимы и профилактики операционного рестеноза [Pearce et al., 2004].

Было показано, что ROCK-опосредованная сигнализация испытывает регуляторные влияния со стороны других сигнальных систем. Ранее указывалось, что как ПК-С, так и RhoA-ассоциированная киназа играют важную роль в развитии коронарного спазма в экспериментальной модели у свиньи. Были получены данные, что обе эти киназы сосуществуют в пределах общего сигнального пути,

где ПК-С располагается в начальных этапах сигнального каскада (upstream), и ее изоформа ПК-С-δ вовлечена в регуляцию активности ROCK [Kandabashi. et al., 2003]. Открытие данного механизма позволяет считать более эффективной стратегией ингибирование RhoA-ассоциированной киназы, чем ПК-С, и такой подход может стать более специфичным и полезным при лечении коронареспазма [Kandabashi et al., 2003; Hu and Lee, 2003].

Было показано, что на актиновых филаментах локализован недавно идентифицированный протеин взаимодействия фосфатазы миозина и RhoA, связывающий RhoA-ассоциированную киназу нуклеотид-независимым способом. Этот протеин колокализован с RhoA и MBS и ассоциирован с активностью ROCK [Surks et al., 2003].

Инсулин способен быстро стимулировать фосфатазу легких цепей миозина и одновременно ингибировать RhoA/ROCK сигнальный путь через NO/цГМФ-зависимый механизм. СГМК, изолированные из SHR и диабетических крыс проявляли повышенную активность ROCK, что вело к ингибированию ФЛЦМ [Begum, 2003].

В настоящее время в литературе широко дискутируется вопрос о возможном использовании ингибиторов ROCK в качестве терапевтического средства при лечении сердечно-сосудистой патологии [Asano and Nomura, 2004; Sward et al., 2003; Nakayama et al., 2003; Shimokawa et al., 2003; Kawano et al., 2002].

1.2. Механизмы регуляции объема клеток

Объем клеток является жестко детерминированным параметром, стабильность которого обеспечивается целым рядом регуляторных механизмов. Для своего выживания, клетки вынуждены избегать изменений клеточного объема, которые подвергают опасности внутриклеточный гомеостаз. Нативное функционирование клеточных протеинов особенно чувствительно к их разведению или концентрации [Kinjo and Takada, 2002; Rohwer et al., 1998; Colclasure and Parker, 1992; Burg, 2000; Schaefer et al., 2003]. Однако даже у млекопитающих, несмотря на относительное постоянство их внутренней среды, клеточный объем постоянно изменяется, что обусловлено, в частности, переносом осмотически активных соединений через клеточную мембрану или изменениями внутриклеточной сре-

ды в ходе метаболических процессов [Mongin and Orlov, 2001; O'Neill, 1999; Lang et al., 1998]. Таким образом, для сохранения постоянства клеточного объема требуется непрерывное оперирование механизмов его регуляторного восстановления и/или поддержания, включая специфический ионный транспорт, а также накопление или, напротив, вывод органических осмолитов и метаболитов. С другой стороны, ряд физиологических процессов протекает с неизбежным изменением объема клеток, что касается в первую очередь пролиферации, роста, апоптоза, а также при модуляциях мембранного потенциала, обусловленных массивными потоками ионов.

Механизмы регуляторного восстановления клеточного объема запускаются многочисленными стимулами, включая колебания мембранного потенциала, изменения активности ионных насосов и переносчиков, модуляцию внутриклеточных сигнальных систем и изменения экспрессии генов. Установлено, что изменение клеточного объема и механизмы его регуляции могут играть важную роль в целом ряде клеточных функций, таких как эпителиальный транспорт, внутриклеточный метаболизм, возбуждение клеток, высвобождение гормонов и медиаторов, миграция, клеточный рост, пролиферация и апоптоз. Гормоны и медиаторы также могут использовать для реализации своих эффектов системы регуляторного восстановления клеточного объема. Более того, существует точка зрения, что клеточный объем может являться своего рода информационным звеном гормональной сигнализации [Lang et al., 1998]. Увеличение или уменьшение клеточного объема является частным случаем изменений пространственной геометрии клеток, что всегда сопутствует таким видам клеточной подвижности, как миграция, адгезия и сократительные реакции. Последние являются специализированной функцией гладкомышечных клеток, во многом определяющей физиологический (или патофизиологический) статус сосудов и висцеральных органов.

Чтобы компенсировать аккумуляцию воды, обусловленную присутствием непроникающих органических осмолитов, клетки удаляют из цитоплазмы неорганические ионы, преимущественно Na^+ и Cl^- . Это способствует поддержанию клеточного объема в соответствии с так называемым равновесием Доннана

[Lang et al., 1998; Macknight and Leaf, 1977]. Ключевая роль в этом процессе принадлежит Na^+ , K^+ -насосу, который в большинстве клеток транспортирует 3 Na^+ из клетки в обмен на 2 K^+ .

Даже незначительные отклонения клеточного объема нарушают оптимальные концентрации внутриклеточных ферментов и метаболитов, а также соотношение между площадью поверхности и объемом клетки. Небольшое набухание клеток коррелирует с усилением пролиферации трансформированных клеток, в то время как выраженное набухание ведет к некрозу [Lang et al., 1998; 2000; Okada et al., 2001]. Сжатие клеток, напротив, является одним из сигналов, запускающих гибель клеток различных типов [Lang et al., 1998; Okada et al., 2001; Bortner and Cidlowski, 1996; Orlov et al., 1999], обладающих не идентифицированным пока объем-чувствительным механизмом процесса апоптоза. Для защиты от нарушений своего объема, в процессе эволюции клетки животных приобрели системы быстрой ауторегуляции своего объема. Механизмы быстрой регуляции объема при нестационарных условиях являются чрезвычайно консервативными и принципиально сходны в клетках различных тканей и представителей эволюционно далеких видов [Gilles, 1988; Chamberlin and Strange, 1989; Lang et al., 1998b]. Они включают гипотетический сенсор(ы) клеточного объема, внутриклеточные сигнальные системы, сопряженные с этим сенсором и, наконец, мембранные ионные транспортеры, посредующие высвобождение/накопление осмотически активных соединений для компенсации набухания/сжатия. Высвобождение осмолитов и компенсаторное сжатие клеток в ответ на исходное набухание называют регуляторным уменьшением объема (*Regulatory Volume Decrease, RVD*). Противоположный процесс накопления осмолитов и компенсаторное набухание клеток в ответ на их сжатие называют регуляторным увеличением объема (*Regulatory Volume Increase, RVI*).

В ответ на набухание подавляющее число клеток животных активируют вход K^+ и Cl^- через K^+ и анионные каналы, функционально сопряженные посредством мембранного потенциала [Lang et al., 1998b; Strange et al., 1996; Kirk and Strange, 1998].

Электронейтральный K^+, Cl^- котранспорт (КСС) является альтернативной системой, способствующей RVD в эритроцитах и некоторых типах эпителиальных клеток с относительно высоким содержанием Cl^-_i .

RVD может быть опосредовано параллельной активацией нескольких регуляторных систем, включая КСС, K^+ и Cl^- каналы [Perry and O'Neill, 1993], а также функционально сопряженные Ca^{2+} насос, Na^+/Ca^{2+} обмен или K^+/H^+ и Cl^-/HCO_3^- обменники [Lang, 1998; Lang et al., 1998b; Bursell and Kirk, 1996].

В большинстве типов клеток, RVI опосредовано активацией электронейтрального $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспортера и Na^+/H^+ обмена [Lang, 1998; O'Neill, 1999]. Были клонированы две изоформы $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспортера (NKCC1 и NKCC2) [Gamba et al., 1994; Russel, 2000]. NKCC2 экспрессирован исключительно в апикальной мембране эпителиальных клеток петли Генле и macula densa. Чувствительность к клеточному объему у этой изоформы НКСС не исследовалась. NKCC1 экспрессирован повсеместно и активируется клеточным сжатием. В ряде клеток, включая сосудистые ГМК, гипертоническое сжатие клеток не сопровождается RVI в связи с отсутствием направленного внутрь суммарного градиента Na^+ , K^+ и Cl^- . Действительно, гиперосмотическое сжатие повышает внутриклеточную концентрацию всех транспортируемых ионов, способствуя, таким образом, выходящей моде оперирования этого переносчика [O'Neill, 1999]. Более того, в нескольких типах клеток при базальных условиях НКСС1 оперирует как Na^+ - и Cl^- -зависимый K^+/K^+ обменник, что критическим образом влияет на осмотическую эффективность переносчика [Orlov et al., 1996; Mongin et al., 1997].

Стимуляция Na^+/H^+ обмена имеет результатом защелачивание цитоплазмы и последующую активацию Cl^-/HCO_3^- обмена. Как следствие, клетки аккумулируют Na^+ и Cl^- и удаляют H^+ и HCO_3^- [Lang, 1998, O'Neill, 1999]. До настоящего времени у млекопитающих было клонировано шесть изоформ Na^+/H^+ обменника (NHE-1–6) [Wakabayashi et al, 1997; Orłowski and Grinstein, 1997; Counillon and Pouyssegur, 2000]. Из них все активируются сжатием, за исключением NHE-3, который, напротив, ингибируется при снижении объема клеток [Kapus et al, 1994; Bookstein et al., 1994].

Активация Na^+ каналов – более быстрый и термодинамически эффективный механизм RVI. Однако, в связи с тем, что в клетках животных имеется тенденция избегать быстрой деполяризации мембраны и диссипации Na^+ градиента, этот тип RVI был обнаружен в незначительном числе типов клеток (мастоциты, эпителиальные клетки собирательных почечных канальцев, культуральные гепатоциты) [Lang, 1998; Wehner, 1998; Wehner et al., 2000]. В противоположность Na^+ каналам относительно низкая активность объем-зависимого НКСС и Na^+/H^+ обмена, сопряженная с вторичной активацией Na^+,K^+ -насоса позволяет клеткам частично компенсировать снижение Na^+ градиента.

Относительно природы гипотетического сенсора объема существует несколько гипотез, проливающих свет на механизмы ауторегуляции такого интегрального параметра клетки, как ее объем. Все эти концепции постулируют, что изменения клеточного объема запускают сигнал(ы), ведущие к конформационным изменениям некоего сенсора, что, в свою очередь, генерирует сигналы, сопряженные с активацией ионного транспорта, вовлеченного в регуляторное увеличение или уменьшение объема (RVI или RVD, соответственно). Рассматривают следующие версии сенсора [Mongin and Orlov, 2001]:

- 1) Механическое напряжение цитоплазматической мембраны
- 2) Трехмерная структура цитоскелета
- 3) Двухмерная структура цитоскелета
- 4) Кавеолы
- 5) Внутриклеточная концентрация макромолекул (macromolecular crowding)
- 6) Ионная сила цитоплазмы
- 7) Внутриклеточная концентрация ионов хлора

В соответствии с концепцией механического напряжения цитоплазматической мембраны как сенсора клеточного объема, молекулярная структура ионного транспортера, активирующегося при набухании или стрикции, должна претерпевать конформационные изменения в ответ на механическую деформацию клеточной мембраны, что впоследствии ведет к изменению его проницаемости. Действительно, сосудистые ГМК экспрессируют механочувствительные

ионные каналы, активность которых модулируется растяжением или компрессией клеточной мембраны [Masuda et al., 2004; Kimura et al., 2000; Lee et al., 2000; Remillard et al., 2000; Doughty et al., 1999]. В то же время, растяжение или компрессия мембраны запускают многообразные клеточные ответы, включая пролиферацию, гиперплазию сосудистой стенки, экспрессию протеинов [Iwasaki et al., 2000; Langton et al., 1998; Standley et al., 1999].

Архитектура ядерных клеток поддерживается трехмерной (3D) структурой цитоскелета, сформированного актиновыми микрофиламентами, микротрубочками и промежуточными филаментами [Konev, 1987.; Papakonstanti et al., 2000]. В большинстве типов клеток набухание индуцирует быструю деполимеризацию актинового цитоскелета, что частично обусловлено повышением $[Ca^{2+}]_i$ [Lang et al, 1996; Papakonstanti et al., 2000; Hoffmann, Dunham, 1995]. Баланс полимеризация/деполимеризация актина модулирует активность объем-чувствительных анионных каналов в лимфоцитах и эритроцитах [Levitan et al., 1995; Nilius et al, 1996], K^+ каналов опухолевых клеток [Cantiello et al., 1993] и NKCC котранспортера в гладкомышечных клетках [Orlov et al., 1996]. Деполимеризация актина подавляет объемную регуляцию NKCC1 в клетках асцитной опухоли Эрлиха [Jessen et al., 1993] и NHE-4 (Na/H обменник 4 типа) в нервных клетках [Bookstein et al., 1996].

Структура плазматической мембраны неоднородна и содержит различные специализированные регионы, включая кавеолы. Высока вероятность того, что в качестве сенсора клеточного объема могут выступать именно эти мембранные образования. Кавеолы – это инвагинации плазматической мембраны диаметром около 50 нм. Они организованы четырьмя изоформами специализированных протеинов, кавеолинов, и содержат высокую концентрацию холестерина [Anderson, 1998]. Первоначально считали, что кавеолы вовлечены в формирование мембраны и транспорт. Однако дальнейшие исследования показали, что кавеолы секвестрируют различные сигнальные протеины, включая рецепторы, сопряженные с G-белками, несколько изоформ аденилатциклазы, тирозиновые киназы *src*-семейства и синтазу оксида азота [Okamoto T. et al, 1998]. Было показано, что некоторые типы опухолевых клеток, не экспрессирующих ключевой

scaffolding протеин кавеол кавеолин-1, не способны к объем-чувствительной активации анионных каналов и не способны к регуляции собственного объема. Транзиторная трансфекция этих клеток кавеолином-1 восстанавливала активацию анионных каналов и RVD [Trouet et al., 1999]. Эти данные согласуются со свидетельством, что экспрессия доминантно-негативного кавеолина-1 в эндотелиальных клетках сопровождается выраженным снижением активации объем-чувствительных анионных каналов [Trouet D. et al, 2001].

Было высказано предположение, что кавеолы могут функционировать как клеточный осмометр, в котором важную роль играет экспрессия аквапорина (AQP) 1, колокализованного с кавеолином 1 и потенциал-чувствительными каналами KCNQ1 и KCNQ4 [Kordylewski et al, 1993; Kang et al, 2000; Page et al, 2000; Grunnet et al, 2003].

Относительно роли аквапоринов в гладких мышцах информация в литературе недостаточна. Тем не менее, установлено, что AQP-1 экспрессирован в гладкомышечных клетках человеческих артерий и аорты крысы [Shanahan et al, 1999], а также в висцеральных ГМК [Gannon et al, 2000]. Считают, что лабильная экспрессия аквапоринов может иметь регуляторное значение для быстрого транспорта воды. Гиперосмотическое воздействие индуцирует экспрессию AQP3 в MDKC клетках [Matsuzaki et al, 2001] и в культуральных человеческих кератиноцитах [Sugiyama et al, 2001]. Экспрессия аквапоринов регулируется cAMP-зависимо [Wang et al, 2003; Fasshauer et al, 2003]. Отмечено, что активность аквапоринов в различных типах клеток модулируется вазоактивными пептидами. Стимуляция α -адренорецепторов ведет к транслокации AQP-5 из внутриклеточных мембран в сторону апикальных [Ishikawa et al, 1999]. На активность аквапорина в эпителиальных клетках кишечника человека влияет вазоактивный интестинальный пептид [Itoh et al 2003].

Относительно малые изменения концентраций макромолекул, происходящие при изменении клеточного объема, также могут служить его сенсором, так как ведут к выраженным изменениям активности макромолекул [Kinjo and Takada 2002; Rohwer et al., 1998; Colclasure and Parker, 1992; Burg, 2000; Schaefer et al., 2003].

Среди систем внутриклеточной сигнализации, связанных с регуляцией клеточного объема, дискутируется роль внутриклеточного кальция, кальмодулина, G-протеинов, серин-треониновых киназ, тирозин-киназных сигнальных каскадов, арахидоновой кислоты и ее метаболитов [Mongin and Orlov, 2001; Wang et al., 2004; Masuda et al., 2004]. Гипоосмотическое набухание СГМК легочной артерии собаки ведет к запуску каскада, включающего активацию фосфатидил-инозитол-3 киназу (PI3k), которая, в свою очередь, активирует объем-чувствительную серин-треониновую протеинкиназу SGK, но не ПК-C-ε. Эффекторным звеном каскада является активация объем-чувствительных анионных каналов (volume-sensitive osmolyte and anion channels (VSOACs)) [Wang et al., 2004].

В таблицах 1 и 2 приведены данные о внутриклеточных системах, активирующихся при стрикции и набухании клеток.

Таблица 1. Внутриклеточные сигнальные системы, модулируемые при стрикции клеток

Тип клеток	Система	Ссылка
ГМК аорты крысы	Запуск Ca(2+)/Pyk2/JNK сигнальный каскада с последующей экспрессией гена HB-EGF	Koh et al., 2001
Эритроциты крысы	ПК-C, ПК-A, ПК-G	Shnyrov et al., 1990
	Активация фосфоинозитидного обмена (PI, PIP, PIP ₂ x10)	Orlov et al., 1989, 1990
	Продукция лактата (x5)	Levko et al., 1995
Ehrlich ascites cells	ЦГМФ, цАМФ	Grummt and Grummt, 1977
	ROCK- и p38-опосредованная реорганизация миозина II из цитозоля в примембранные слои	Pedersen and Hoffmann, 2002
	Полимеризация актина, сменяющаяся ПК-C- и КЛЦМ-зависимой деполимеризацией	Pedersen et al., 1999; Pedersen and Hoffmann, 2002
Shark rectal glands	Фосфорилирование NKCC1	Darman and Forbush, 2002

Утиные эритроциты	Фосфорилирование NKCC1	Lytle and McManus, 2002; Lytle, 1997; 1998
Эритроциты индейки	Фосфорилирование NKCC1	Muzyamba et al., 1999
Эритроциты барана	Фосфорилирование NKCC1	Lytle, 1997; Palfrey and Pewitt, 1993
Эритроциты хорька	Фосфорилирование NKCC1	Mairbaur and Herth, 1996
Эндотелиоциты быка	Фосфорилирование ЛЦМ	Klein and O'Neill, 1995
	Фосфорилирование NKCC1	Klein and O'Neill, 1995, 1993
	Активация MAPK; экспрессия p38, ERK-1/2 и JNK	Duzgun et al., 2000
Эндотелиоциты	JNK-опосредованное фосфорилирование NKCC1	Klein et al., 1999
	Фосфорилирование гистон-подобного белка	Santell et al., 1993
Эндотелиоциты крысы	Фосфорилирование NKCC	O'Donnell et al., 1995
Эпителий почечных канальцев	Зависимое от ROCK фосфорилирование ЛЦМ	Ciano-Oliveira et al., 2003
	Активация NKCC	
Астроциты крысы	Фосфорилирование ЛЦМ	Shrode et al., 1997
Дрожжи <i>S. cerevisiae</i>	Потеря актиновых микрофиламентов	Adames and Cooper, 2000
MTAL (medullary thick ascending limb)	Полимеризация актина	Bustamante et al., 2003
	Фосфорилирование ERK и p38 киназы	Roger et al., 1999

Таблица 2. Внутриклеточные сигнальные системы, модулируемые при набухании клеток

Тип клеток	Система	Ссылка
Культуральные ГМК легочной артерии собаки	Активация фосфатидил-инозитол 3-зависимой протеинкиназы (PI3Ks), мишенями которой являются Akt/PKB и SGK, фосфорилирующие белки объем-чувствительных хлорных каналов	Wang et al., 2004
Ehrlich ascites cells	Усиление синтеза лейкотриенов	Lambert, 2004; Lambert et al., 1987
	Высвобождение арахидоновой кислоты, транслокация и активация ФЛ-А в ядро	Lambert, 2004; Pedersen and Hoffmann, 2002; Thoroed et al., 1997
	Транзиторная перестройка цитоскелета	Pedersen et al., 1999, 2001; Pedersen and Hoffmann, 2002
Интестинальные клетки 407	Транзиторное увеличение содержания F-актина и реорганизация цитоскелета	Tilly et al., 1996
Эритроциты	Активация тирозиновых киназ p72 ^{syk} и p56 ^{lyn}	Minetti et al., 1998
Эндотелиоциты быка	Зависимое от тирозиновых киназ фосфорилирование Cl- каналов, активируемых набуханием	Voets et al., 1998

Классическим подходом, позволяющим изучить роль клеточного объема в регуляции клеточных функций является изменение осмолярности среды инкубации [Lang et al., 1998; Mongin and Orlov, 2001]. Использование подобной модели управления объемом клеток остается широко востребованным, несмотря на то, что осмолярность внеклеточной среды у млекопитающих строго фиксирована за исключением дистального отдела нефрона. Объем клеток находится под влиянием многочисленных факторов, приводящих к изменению внутриклеточного

содержания моновалентных ионов и органических осмолитов. В физиологических условиях возможны как плавные (в результате ката- и анаболических процессов и гормональной регуляции Na/K-АТФазы и других систем мембранного транспорта), так и чрезвычайно быстрые модуляции примембранных концентраций осмотически активных соединений. Это, в частности, наблюдается при генерации потенциалов действия, связанных с массивным переносом ионов через мембрану электровозбудимых клеток [Lang et al., 1998; Lytle, 1997]. Очевидно, что ионные потоки в этом случае индуцируют осмотически обусловленное поступление воды в примембранные слои клетки и изменение, пусть даже локальное, пространственных и физико-химических характеристик клетки. Изучения последствий осмотически-обусловленных изменений клеточного объема имеет большое значение при разработке методов криоконсервации клеток и тканей, что обычно связано с использованием высоких концентраций криопротекторов [Ebertz and McGann, 2004; Zhao et al., 2004; Rutllant et al., 2003].

1.3. Участие НКСС в регуляции функций ГМК

К настоящему моменту с использованием библиотек кодирующей ДНК (сDNA) позвоночных были клонированы две изоформы $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ ко-транспортера. Повсеместно представленная изоформа НКСС1 была обнаружена во всех типах клеток, изученных до настоящего времени, в то время как экспрессия нефроспецифичной изоформы НКСС2 ограничена апикальной мембраной эпителиальных клеток восходящей петли Генле (the thick ascending limb) и macula densa [Mount et al., 1999; Russell, 2000].

Вслед за первыми работами об увеличенной проницаемости мембраны для одновалентных ионов в клетках крови [Postnov et al., 1976; 1977] и ГМК сосудов [Jones et al., 1973] при первичной гипертензии, рядом исследователей были представлены данные о том, что эти изменения, по крайней мере частично связаны с активацией НКСС [Orlov, 2003; Orlov et al., 1999]. Было показано, что важный вклад в регуляцию сопряжения возбуждения и сокращения СГМК вносит работа электронейтральных ионных переносчиков, таких как НКСС и K^+, Cl^-

котранспортер, активность которых зависит от степени фосфорилирования их молекул и реципрокно модулируется вазоконстрикторами и вазодилаторами [Adragna et al, 2000; Akar et al., 1999; 2001].

Ингибирование НКСС буметанидом снижает амплитуду сокращений СГМС аорты крысы и мочеточника морской свинки, индуцированные аппликациями фенилэфрина, деполяризующего гиперкалиевого раствора и электростимуляцией [Akar et al., 1999; Kovalev et al., 2003]. Необходимо отметить, что Akar не удалось обнаружить ингибирующее влияние буметанида на сокращение, индуцированное гиперкалиевой деполяризацией и высокими (>0.1 мкМ) концентрациями фенилэфрина, в то время как в случае концентрации фенилэфрина 0.01 мкМ буметанид блокировал сокращение практически полностью [Akar et al., 1999].

Brown с соавторами был первым, кто предположил возможность вклада НКСС в поддержание сосудистого тонуса посредством регулирования трансмембранного градиента Cl^- [Brown et al, 1999]. Действительно, буметанид снижает $[Cl^-]_i$ [Kreye et al., 1981; Davis et al, 1993], вызывает гиперполяризацию мембраны СГМК [Davis et al, 1993] и устраняет различия в этих параметрах между нормотензивными и гипертензивными крысами в модели DOCA-индуцированной гипертонии (DOCA-salt-hypertensive rats) [Brown et al., 1999].

Подобно регуляции вазоактивными соединениями, активность НКСС и КСС также реципрокно модулируется изменениями клеточного объема. Действительно, индуцированная уменьшением объема клетки активация НКСС, Na^+/H^+ обмена и Na^+ -сопряженного транспорта органических осмолитов посредством направленных внутрь клетки ионных потоков способствует регуляторному увеличению объема (regulatory volume increase, RVI), в то время как индуцированные набуханием клеток и направленные наружу потоки ионов через КСС, K^+ и анионные каналы обеспечивают регуляторное уменьшение объема (regulatory volume decrease, RVD) [Hoffmann and Simonsen, 1989; Lang et al., 1998; Mongin and Orlov, 2001]. Важно подчеркнуть, что сжатие клеток активирует

НКСС1 во всех типах ядерных клеток, изученных к настоящему времени [O'Neill, 1999]. Таким образом, накопленный экспериментальный материал позволяет предполагать существование новой ветви регуляции функций СГМК со стороны объем-чувствительного катион-сопряженного транспорта хлора.

Еще в 1981 году Kreye et al. опубликовал сообщение, что при ингибировании «активного хлорного транспорта» фуросемидом наблюдается снижение $[Cl^-]_i$, что, в свою очередь, обуславливает гиперполяризацию мембраны СГМК и расслабление аорты кролика. В том же году было показано, что в культуральных СГМК мозговых артерий (линия ВС₃H1) присутствует фуросемид-чувствительный вход K^+ , косвенно свидетельствующий об экспрессии НКСС [Aiton et al., 1981]. Однако более убедительные данные о наличии НКСС были получены [Owen, 1984] на культуральных клетках А7r5 аорты крысиных эмбрионов при исследовании буметанид-чувствительного входа ^{86}Rb , что в настоящее время считается обычной процедурой для оценки активности НКСС [O'Donnell and Owen, 1994]. Было установлено, что убаин- и буметанид-чувствительные потоки ^{86}Rb независимы, и буметанид-зависимый компонент полностью зависит от Na^+ и Cl^- . Более того, в отсутствие Na^+ и Cl^- эффект буметанида не проявлялся, равно как не проявлялся эффект ингибиторов Na/H обмена и Cl^-/HCO_3^- .

Основные данные о функционально-структурной организации НКСС были получены с использованием негладкомышечных клеток. Так, было обнаружено, что существуют три уникальные функциональные характеристики НКСС: 1) для нормального оперирования котранспортера необходимо присутствие всех трех ионов (Na^+ , K^+ и Cl^-) с одной стороны мембраны; 2) буметанид и его аналоги (петлевые диуретики – производные 5-сульфамил бензойной кислоты) связываются с белком котранспортером и ингибируют перенос всех трех ионов; 3) в нормальных условиях транспорт всех трех ионов является электрически нейтральным процессом в большинстве клеток со стехиометрией переноса: $1Na^+ : 1K^+ : 2Cl^-$; реже: $2Na^+ : 1K^+ : 3Cl^-$ [Alvarez-Leefmans et al., 1988; Alvarez-

Leefmans, 1990; 1997; Haas et al., 1982; Hannafin et al., 1985; Kracke et al., 1987; Mcroberts et al., 1982].

Были получены данные, что действие фуросемида возможно связано с конкуренцией молекул этого диуретика с ионами хлора за транспортирующие сайты на апикальной мембране клеток восходящей петли Генле. Немного позже, Ludens [Ludens J.H., 1982] на клетках роговицы жабы показал, что способность фуросемида блокировать кратковременные токи, которые зависели от NKCC1 апикальной мембраны, снижались по мере увеличения концентрации ионов хлора в окружающем растворе. При этом K_m для хлора в отсутствие фуросемида составляла 53 мМ, а в присутствии фуросемида (22 мкМ) K_m для ионов хлора составляла 145 мМ.

Haas и McManus [Haas and McManus, 1983], измеряя стимулированное норадреналином накопление ^{86}Rb и Li^+ как функцию от внешних ионов хлора, показали, что увеличение концентрации ионов хлора в окружающем растворе снижает чувствительность к буметаниду. Аналогичные результаты, демонстрирующие конкурентное взаимодействие между ионами хлора и петлевыми диуретиками были получены и описаны другими авторами [Frelin et al., 1986; Kinne et al., 1985]. Математическое описание результатов показало, что процесс ингибирования котранспортера петлевыми диуретиками не подчинялся уравнению Михаэлиса-Ментон. Однако, выражая степень ингибирования котранспортера в процентах и соотнося эти цифры с концентрацией петлевых диуретиков (буметанид, фуросемид) было получено соответствие уравнению Хилла. Это позволяет предположить, что взаимодействие между молекулой буметанида и белком котранспортера носит кооперативный характер.

Palfrey и др. [Palfrey et al., 1980] исследуя эффекты снижения внеклеточной концентрации ионов калия и натрия на цАМФ-индуцированный вход $^{86}\text{Rb}^+$ в эритроциты индюка, показали, что уменьшение концентрации катионов приводило к смещению кривой доза-эффект буметанида вправо, что указывает на снижение чувствительности к ингибитору. Kracke и др. [Kracke et al., 1983] показа-

ли зависимость между уровнем ингибирования NKCC1 фуросемидом и внеклеточной концентрацией ионов калия. Полученные результаты указывают на то, что транспортируемые ионы необходимы для проявления ингибирующего влияния петлевых диуретиков и возможно для связывания диуретиков с NKCC1.

Тот факт, что высокая концентрация ионов хлора снижает чувствительность к буметаниду, тогда как Na^+ и K^+ ее увеличивают, подтверждает точку зрения о том, что буметанид конкурирует за второй хлорсвязывающий сайт котранспортера, обладающий более низким сродством к ионам хлора и более низкой селективностью к анионам. Связывание буметанида с этим участком NKCC1 приводит к ингибированию котранспорта.

Культуральные клетки часто используются для определения сродства NKCC к Na^+ , K^+ и Cl^- . Так же как и афинность к петлевым диуретикам, афинность NKCC к Na^+ , K^+ и Cl^- варьирует в зависимости от типа исследуемых клеток. Тем не менее, общей является наибольшее сродство для K^+ и наименьшее для Cl^- [Chipperfield, 1986]. Полумаксимальная активация NKCC ионами K^+ наблюдается при концентрации этих ионов в пределах 1-10 мМ, ионами Na^+ – при 10-20 мМ и Cl^- – при 60-80 мМ. Приведенные характеристики, в целом, типичны и для ГМК. Активация NKCC ионами Na^+ и K^+ носит гиперболический характер. Активация ионами Cl^- при стехиометрии 1:1:2 носит S-образный характер. В то же время, концентрации всех трех ионов влияют на сродство NKCC для двух других, как в случае с петлевыми диуретиками, афинность для которых зависит от Na^+ , K^+ и Cl^- [Chipperfield, 1986; Russel, 2000]. Более того, в негладкомышечных клетках сродство и форма кривой активации для Cl^- (выпуклая, линейная или S-образная) строго зависит от природы замещающего аниона [Owen and Prastein, 1985; Chipperfield, 1986] и, вероятно, это является справедливым и для ГМК.

Rhoden and Douglas (1995) сделали подобные наблюдения на ГМК воздухоносных путей (трахеи и бронхов морских свинок) и существенно обогатили представление о NKCC в ГМК. Во-первых, были определены константы инги-

бирования ($K_{1/2}$) для буметанида и фуросемида в ГМК, составившие 0.18 и 5.6 мкМ, соответственно. $K_{1/2}$ буметанида обычно находится в пределах 0.05-0.5 мкМ [Haas, 1989] и его сродство в ~ 30 раз выше, чем у фуросемида. В целом, сродство НКСС для петлевых диуретиков существенно варьирует в зависимости от объекта исследования [Haas, 1989; Russel, 2000], включая различные типы ГМК. Тем не менее, 30-кратное различие аффинностей буметанида и фуросемида остается постоянной величиной в ряду аффинностей буметанид>пиретанид>фуросемид [Cabantchik and Greger, 1992]. Во-вторых, Rhoden и Douglas измерили вход Cl^- и определили соотношение $\text{K}:\text{Cl}$ 1:1.75, что соответствует обычной стехиометрии НКСС 1:1:2 во всех исследованных клетках, за исключением гигантского аксона кальмара (2:1:3) и эритроцитов хорька (2:1:3) [Russel, 2000].

Aickin and Brading проводили эксперименты в бесхлорной среде и наблюдали реаккумуляцию Cl^- , в то время как другие исследовательские группы сначала помещали клетки в хлоридсодержащую среду, а потом подавляли вход хлора ингибиторами [Davis, 1992; Koncz and Daugiras, 1994; Davis et al., 2000]. Было показано, что фуросемид снижает как $[\text{Cl}^-]_i$, так и вход и выход Cl^- в культуральных СГМК аорты [Koncz and Daugiras, 1994] и в аорте кролика [Gersheimer et al., 1987]. Подобно этому, Davis (1992), используя хлор-чувствительные микроэлектроды, обнаружил, что $[\text{Cl}^-]_i$ снижается в СГМК бедренной артерии крысы с 44 до 34 мМ при добавлении 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) или буметанида, и снижается еще сильнее в присутствии обоих соединений, но все же не до уровня электрохимического равновесия [Davis et al., 2000].

НКСС в СГМК модулируется рядом гормонов и вторичных посредников, а также изменением клеточного объема и внутриклеточной концентрации ионов Cl^- [O'Donnell and Owen, 1994; Mongin and Orlov, 2001; Lang, 1998; Russell, 2000; Owen, 1984]. [Owen, 1984] впервые измеряла буметанид-чувствительный вход K^+ по входу ^{86}Rb в культуральных клетках. Были выдвинуты аргументы, что

культуральные клетки не отражают реальное функционирование НКСС на уровне ткани. Во-первых, в одной из линий культуральных СГМК были обнаружены буметанид-чувствительные потоки калия, не связанные с обычными характеристиками функционирования НКСС [Orlov et al., 1996]. Во-вторых, были получены данные, что мРНК для НКСС не обнаруживается в свежеизолированных сосудистых ГМК аорты крысы, но появляется в тех же клетках при их культивировании [Raat et al., 1996], что предостерегает от экстраполяции данных, полученных на клетках, на тканевые особенности функционирования НКСС. Однако, в гладких мышцах бедренных артерий крысы было обнаружено увеличение $[Cl^-]_i$ после стимуляции норадреналином, и это увеличение частично блокировалось буметанидом, что было интерпретировано как присутствие НКСС в СГМК [Davis et al., 1997]. В аорте крысы была обнаружена подобная стимуляция транспорта фенилэфрином, которая ассоциировалась с фосфорилированием молекул котранспортера [Akar et al., 1999].

По всей видимости, эффекты мессенджеров, клеточного объема и $[Cl^-]_i$ конвергируют к одной киназе, которая фосфорилируя переносчик, активирует НКСС. Все эти пути, за исключением $[Cl^-]_i$, влияют на активность НКСС сходным образом, в то время как $[Cl^-]_i$ -зависимая регуляция НКСС зависит от вида воздействия. В целом, повышение $[Cl^-]_i$ снижает активность НКСС [Russel, 2000]. В эндотелиальных клетках активация НКСС на действие Ca^{2+} -мобилизующих агонистов является результатом сжатия клеток вследствие выходящих потоков K^+ по Ca^{2+} -зависимым K^+ каналам или потери Cl^- при открывании Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов [O'Neill and Steinberg, 1995]. В большинстве типов клеток повышение $[Cl^-]_i$ ингибирует НКСС [Haas and Forbush, 1998; Russel, 2000], однако данные, полученные на аорте и артериях [Davis et al., 1997; Akar et al., 1999], свидетельствуют, что $[Cl^-]_i$ не участвует в подобной регуляции НКСС в сосудистых гладких мышцах [Akar et al., 1999]. Высокая внеклеточная концентрация KCl предотвращает сжатие клеток, которое могло бы иметь место при активации Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов, и предотвращает потерю Cl^- через Cl^- кана-

лы [O'Neill and Steinberg, 1995]. Тем не менее активация НКСС, измеренная как поток ^{86}Rb , все же происходит [Akar et al., 1999]. Более того, внутриклеточная концентрация Cl^- в ГМК артерий крыс не только не снижается, но, напротив, повышается в присутствии фенилэфрина [Davis et al., 1997]. Было высказано предположение, что стимуляция НКСС в сосудистых ГМК при действии вазоконстрикторов является скорее прямым эффектом увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, чем вторичным ответом на снижение $[\text{Cl}^-]_i$ или клеточного объема.

Активность НКСС зависит от состояния цитоскелета и при разрушении актиновых филаментов цитохалазинами в большинстве типов клеток происходит ингибирование этого переносчика [Orlov et al., 1996; Haas and Forbush, 1998; Russel, 2000]. В частности, в культуральных ГМК из аорты крысы цитохалазин или не оказывает влияния на активность НКСС [Smith and Smith, 1987], или ингибирует его на ~70% [Orlov et al., 1995]. Однако имеются также сообщения о том, что деполимеризация актинового цитоскелета ассоциирована с активацией НКСС в клетках Ehrlich ascites tumor cells [Jessen et al., 1992] и клетках T84 [Mathews et al., 1997]. Таким образом, в настоящее время неясно, полимеризация или деполимеризация является физиологически уместным механизмом стимуляции НКСС. Тем не менее, многообещающие результаты в плане выяснения регуляции НКСС могут быть получены при исследовании взаимодействия $[\text{Cl}^-]_i$ и белков цитоскелета, так как имеются данные, указывающие на $[\text{Cl}^-]_i$ -опосредованное фосфорилирование актина [Russell, 2000].

Как указывалось в предыдущем разделе, клетки многих типов способны восстанавливать свой объем при стрикции, индуцированной гиперосмотическим воздействием [Hoffmann and Simonsen, 1989; Russel, 2000]. Первое предположение о ключевой роли НКСС в развитии RVI в сосудистых ГМК было представлено Chipperfield et al. и основывалось на данных о блокируемом петлевыми диуретиками повышении выхода ^{86}Rb в артериях крыс при гиперосмотическом воздействии [Chipperfield et al., 1991]. Существует мнение, что этот поток нужно классифицировать как объем-чувствительный, нежели как объем-регулируе-

мый [Russel, 2000]. В гиперосмотических условиях в культуральных ГМК, полученных из аорты крысы, был обнаружен RVI, при этом буметанид-чувствительный вход и выход ^{86}Rb увеличивался в 8, а активность N^+/H^+ обмена в 6 раз [Orlov et al., 1992a,b]. Однако позднее были представлены данные, что основным механизмом RVI в культуральных СГМК является Na_o -зависимый $(\text{K}+\text{Cl})$ -котранспорт [Orlov et al., 1996], но не NKCC. Тем не менее, учитывая, что NKCC-опосредованное RVI было установлен в большом количестве клеточных линий, имеет смысл предполагать, что и в сосудистых ГМК активация NKCC вовлекается в реализацию RVI [Chipperfield AR, Harper AA, 2000].

Было высказано предположение, что если активация NKCC участвует в RVI, то при наличии базальной активности этого переносчика его ингибирование, напротив, будет индуцировать сжатие клеток [Russel, 2000]. Несмотря на явный недостаток информации, касающейся участия NKCC в поддержании объема интактных клеток, в литературе все же представлены данные, что ингибирование NKCC в кардиомиоцитах желудочков, в которых не было RVI, ведет к снижению их объема на ~13% [Drewnowska and Baumgarten, 1991]. Напротив, буметанид не оказывает влияния на объем культуральных СГМК аорты крысы [Orlov et al., 1992a,b], но это не исключает возможности участия NKCC в поддержании объема интактных клеток.

Существуют эндогенные вещества, модулирующие активность NKCC. Так, в моче крыс был обнаружен фактор, ингибирующий котранспорт (cotransport inhibitory factor, CIF, $\text{EC}_{50}=16-24$ мкМ) [Garay et al., 1993; Alda et al., 1995]. Считают, что основным компонентом CIF является соединение стероидной природы эквол (equol, эстроген-подобный изофлавоноид, молекулярная масса 242 Da), который ингибирует NKCC в эритроцитах человека и культуральных клетках почки собаки (MDKC) [Alvarez-Guerra et al., 1997]. До настоящего времени основными объектами исследований были задняя доля гипофиза, секретирующая CIF, а также его эффекты на почки и вовлечение в гипертонию. Equol является умеренным натрийуретическим и сосудорасширяющим агентом [Giminez

et al., 1997], однако его физиологическое влияние на функции СГМК еще предстоит исследовать.

В последние годы появились данные об идентификации еще одного эндогенного вещества, модулирующего активность НКСС. Речь идет о так называемом катион-хлорид-взаимодействующем протеине (cation-Cl interacting protein, CIP), который является мембранно-связанным белком, имеющим 25% гомологию с НКСС [Caron et al., 2000]. Механизм действия CIP заключается в образовании надмолекулярных комплексов с транспортирующими протеинами суперсемейства катион-хлорид транспортеров, что ведет к ингибированию транспорта. Выраженная экспрессия CIP была обнаружена в сердечных и скелетных миоцитах, однако его вовлечение в регуляцию НКСС в СГМК остается неизвестной.

Гипотеза о вовлечении объем-чувствительного НКСС1 в патогенез гипертонии базируется на следующих наблюдениях. Во-первых, в эритроцитах F₂ гибридов SHR и нормотензивных крыс, активность НКСС положительно коррелирует с величиной кровяного давления [Bianchi et al., 1985; Kotelevtsev et al., 1987]. В экспериментах по трансплантации костного мозга F₁ гибридам нормотензивных крыс и SHR, Bianchi с соавторами показал, что повышение активности НКСС в этой экспериментальной модели гипертонии скорее генетически детерминировано, нежели является следствием гипертензивной среды [Bianchi et al., 1985]. Во-вторых, генетически модифицированные мыши, имеющие нокаутированный ген НКСС1, (НКСС1^{-/-} knockout mice) характеризуются пониженной величиной кровяного давления и снижением тонуса и величины сократительных ответов сегментов СГМК при действии α -адреноагониста фенилэфрина [Flagella et al., 1999; Meyer et al., 2002].

Ряд исследователей обнаружили повышение активности НКСС в клетках СГМС грызунов со вторичной гипертензией [Davis et al., 1993; Jiang et al., 2003] и повышенное содержание эндогенного ингибитора НКСС в плазме крови крыс, чувствительных к солевой диете (Dahl salt-sensitive rats) [Alvarez-Guerra et al.,

1998]. Данные находки свидетельствуют о том, что котранспортер подвержен тканеспецифичной регуляции со стороны разнообразных стимулов. Действительно, не было обнаружено однозначного вовлечения Ca^{2+} , cAMP и cGMP в регуляцию НКСС в эритроцитах человека и крысы [Garaay, 1982], в то время как в СГМС происходит активация этого переносчика при действии вазоконстрикторов, повышающих Ca^{2+} , включая фенилэфрин и ангиотензин II. С другой стороны, наблюдается ингибирование НКСС при аппликации вазодилататоров, стимулирующих цАМФ- и цГМФ-зависимые сигнальные системы [Akar et al, 1999; 2001; Orlov et al, 1992; Owen and Ridge, 1989; Smith and Smith, 1987; Tseng and Berk, 1992]. Полностью противоположная регуляция вазоконстрикторами и вазодилататорами была обнаружена при исследовании Na^+ -независимого K^+, Cl^- котранспорта (КСС) [Adragna et al., 2000; 2004], другого члена суперсемейства катион- Cl^- -сопряженных котранспортеров, способствующего выходящему транспорту Cl^- [Adragna et al., 2000; 2004].

1.4. Хлорные каналы

Согласно одной из классификаций выделяют шесть типов хлорных токов, которые в свою очередь опосредуются соответствующими хлорными каналами.

- Хлорные токи, регулируемые клеточным объемом ($I_{Cl.vol}$);
- Хлорные токи, регулируемые цитоплазматическими ионами кальция ($I_{Cl.Ca}$);
- Хлорные токи, регулируемые связыванием пуринаргических рецепторов с агонистами ($I_{Cl.ATP}$);
- Хлорные токи, регулируемые цАМФ зависимой протеинкиназой ($I_{Cl.PKA}$)
- Хлорные токи, регулируемые протеинкиназой C ($I_{Cl.PKC}$);
- Базальный хлорный ток ($I_{Cl.b}$).

Объем-чувствительные анионные каналы, опосредующие $I_{Cl.vol}$

К основным характеристикам ионных каналов, регулируемых клеточным объемом, относится:

1. способность активироваться, при набухании клеток в гипоосмотической среде;

2. чувствительность потенциала реверсии к изменению градиента ионов хлора;
3. выпрямляющие свойства при несимметричном распределении ионов хлора и линейная вольт-амперная характеристика при симметричном распределении Cl^- ;
4. чувствительность к блокаторам хлорных токов SITS, DIDS, NPPB, и в высоких концентрациях 9-AC;
5. проницаемость к анионам в следующей последовательности: $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$;
6. проводимость этих каналов составляет 30 – 60 pS [Clemo et al., 1999; Duan et al., 1992; Duan et al., 1995, 1997a, 1997b, 1999; Hagiwara et al., 1992; Higgins et al.; Kawasaki et al., 1994, 1995; Sorota, 1992, 1998; Tseng, 1992; Vandenberg et al., 1994].

В СГМК легочной артерии и кардиомиоцитах морской свинки с использованием специфических антител была обнаружено присутствие объем-чувствительных каналов, проницаемых для анионов и органических осмолитов класса ClC-3 [Wang et al., 2003]. Роль объем-чувствительных анионных каналов заключается в регуляции клеточного объема [Hume et al., 2000] и участии в RVD [Zhang and Lieberman, 1993, 1996].

Как было показано в работах [Nilius et al., 1996; Okada, 1997; Strange et al., 1996], активация $I_{\text{Cl.vol}}$ в большинстве клеток не требует фосфорилирования объем-чувствительных хлорных каналов, эти каналы активируются и в отсутствии ионов магния в цитоплазме и в присутствии негидролизуемых аналогов АТФ. Тем не менее, протеинкиназы могут модулировать активность этих каналов или каких-либо вспомогательных белков, которые, в свою очередь, регулируют активность каналов [Hume et al., 2000].

Другой ключевой механизм регуляции $I_{\text{Cl.vol}}$ представлен тирозиновыми киназами [Nilius et al., 1996; Okada, 1997]. Данные, подтверждающие участие тирозиновых киназ в регуляции объем-зависимого хлорного тока были получе-

ны на кишечных клетках человека [Tilly et al., 1993] и бычьим эндотелии [Voets et al., 1998]. Однако на данный момент не понятно, что является субстратом для этих протеинкиназ: сам ионный канал или какой-то регуляторный белок. Возможно, регуляция $I_{Cl,vol}$ тирозиновыми киназами связана с оперированием Rho киназ [Nilius et al., 1999; Tilly et al., 1996].

В связи с тем, что молекулярные свойства протеина, опосредующего $I_{Cl,swell}$ не известны, фармакологическая характеристика этого тока обычно проводится с использованием нативных клеток. В связи с тем, что блокаторы могут влиять и на другие молекулы, включая те сигнальные протеины, которые ведут к активации тока, специфическое взаимодействие между препаратом и каналом трудно установить. Более того, сходные объем-активируемые токи могут быть опосредованы молекулярно (и фармакологически) различными ионными каналами. Тем не менее, каналы, активируемые набуханием, в различных тканях и организмах проявляют сходные ответы на фармакологические агенты, особенно те, которые блокируют открытый канал. Наиболее эффективными блокаторами $I_{Cl,vol}$ являются DIDS, ариламинобензоат NPPB, DNDS и тамоксфен, который первоначально разрабатывался как антагонист эстрогеновых рецепторов, но позднее был определен как селективный ингибитор объем-активируемых хлорных токов [Boese et al., 2000; Dick et al., 1999; Von Weikersthal et al., 1999; Ehring et al., 1994; Valverde et al., 1993; Duan et al., 1992; Hagiwara et al., 1992; Sorota, 1992, 1994; Tseng, 1992; Vandenberg et al., 1994]. Менее выражено ингибирующее действие у производных карбоновой кислоты 9-AC (1 мМ) и DPC [Jentsch et al., 2002; Clemo and Baumgarten, 1997; Hagiwara et al., 1992; Sorota, 1994; Vandenberg et al., 1994; Zhang et al., 1993]. Нифлумовая кислота (100 мкМ) и NPPB (10 – 40 мкМ) индолилуксусная кислота (100 мкМ) способны полностью ингибировать $I_{Cl,vol}$. Блокатор калиевых АТФ-чувствительных каналов – глибенкламид – также ингибирует $I_{Cl,vol}$ и CFTR Cl^- каналы кардиомиоцитов [Tominaga et al., 1995; Sakaguchi et al., 1997]. Кроме того, $I_{Cl,vol}$ блокируется цАМФ и АТФ [Nilius et al., 1996; Strange et al., 1996].

Основная физиологическая роль $I_{Cl.vol}$ – это участие в поддержании постоянства клеточного объема посредством инициации RVD [Garber et al., 1997; Lang et al., 1998]. Кроме того, в кардиомиоцитах $I_{Cl.vol}$ оказывает незначительное деполяризующее влияние на величину потенциала покоя и реполяризующее влияние в течение потенциала действия [Herzig et al., 1993]. Набухание клетки усиливает влияние $I_{Cl.vol}$ на мембранный потенциал. Укорочение потенциала действия и дополнительная деполяризация мембраны в покое в результате активации $I_{Cl.vol}$ способствуют развитию аритмий [Hiraoka et al., 1998].

Кальций-зависимый хлорный ток ($I_{Cl.Ca}$).

$I_{Cl.Ca}$ первоначально был выделен как компонент кратковременного выходящего тока, активирующегося при деполяризации мембраны кардиомиоцитов [Hiraoka and Kawano, 1989; Kenyon and Gibbons, 1979a, 1979b; Kuriyama et al., 1998; Zygmunt, 1991, 1992, 1994]. Активация этого Cl- тока происходила при активации Ca^{2+} тока, блокирование которого низолдипином или замещением ионов кальция Cd^{2+} предотвращало иницирование хлорного тока. Необходимым условием для активации $I_{Cl.Ca}$ в кардиомиоцитах является высвобождение ионов кальция из саркоплазматического ретикулума, поступления внеклеточных ионов кальция по кальциевым каналам недостаточно для активации $I_{Cl.Ca}$ [Sipido et al., 1993; Zygmunt, 1994].

Хлорные Ca^{2+} -зависимые каналы обладают линейной вольт-амперной характеристикой при симметричном распределении ионов хлора и пропускают анионы в следующей последовательности $SCN > I > Br > Cl^-$ [Kawano et al., 1995]. Проводимость этих каналов составляет от 1 до 3 pS в гладкомышечных клетках [Klockner, 1993; Van and Lazdunski, 1993] и культуральных клетках линии А6 [Marunaka and Eaton, 1990]. Как и другие типы хлорных каналов, $I_{Cl.Ca}$ могут обеспечивать как входящий, так и выходящий токи, в зависимости от соотношения мембранного потенциала и равновесного хлорного потенциала E_{Cl} [Hume et al., 2000].

$I_{Cl, Ca}$ блокируется SITS и DIDS в концентрациях от 100 мкМ до 2 мМ [Kawano et al., 1995; Kokubin and Irisawa, 1984; Zygmunt, 1991, 1994], нифлумовой кислотой (50 мкМ) [Collier et al., 1996; White et al., 1990], флуфенамовой кислотой [White et al., 1990], 9-АС, DPC и ариламинобензоатом NPPB. Индолилукусная кислота ингибируют $I_{Cl, Ca}$ в гладкомышечных клетках [Large and Wang, 1996]. Другие блокаторы могут ингибировать Ca^{2+} -активируемую хлорную проводимость, однако между различными объектами наблюдаются существенная разница, как например, для глибенкламида в кардиомиоцитах [Yamazaki et al., 1997] и клетках протоков поджелудочной железы [Winpenny et al., 1998]. Хотя чувствительность к нифлумовой кислоте и DIDS является свойством всех Ca^{2+} -активируемых хлорных каналов, самый первый клонированный протеин, претендующий на роль каналов этого типа, bCLCA1, был нечувствителен к нифлумовой кислоте и лишь незначительно ингибировался DIDS [Cunningham et al., 1995]. Другой гомологичный протеин, bCLCA1, тем не менее, опосредовал токи, чувствительные к обоим соединениям [Gandhi et al., 1998]. В экспериментах с применением методики patch-clamp было показано наличие Ca^{2+} -зависимого Cl^- тока в ГМК портальной вены [Hogg et al., 1993; Wang et al., 1992; Wang and Large, 1993] и толстого кишечника кролика [Sun et al., 1992], тонкого кишечника крысы [Ohta and Ito, 1993], трахеи свиньи [Liu and Farley, 1996], а также в культуральных ГМК аорты крысы линии A10 [Holevinsky et al., 1994].

В ГМК коронарных артерий активность Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов повышается при дефосфорилировании канала или ассоциированного с ним регуляторного протеина. Активность Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов зависит от баланса регуляторных влияний со стороны Ca^{2+} -зависимой фосфатазы кальцинейрина, CaM -зависимой киназы II и уровня $[Ca^{2+}]_i$ [Ledoux et al., 2003].

Модель активации Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов в свежеизолированных СГМК легочной артерии кролика была предложена [Piper and Large, 2003]. В соответствии с этой моделью каналы имели две области проницаемости (3.5 и 1.8

pS), открывающиеся либо спонтанно, либо в ответ на повышение $[Ca^{2+}]_i$. В бескальциевой среде каналы неактивны при значениях МП от -100 мВ до $+100$ мВ. При низких концентрациях $[Ca^{2+}]_i$ (10-250 нМ) проявляются потенциал-зависимые свойства каналов, которые исчезают при более высоких концентрациях кальция. Повышение внутриклеточной концентрации кальция ведет к увеличению вероятности открывания каналов. Распределение времен открытого состояния каналов описывается двумя экспонентами (5 и 30 мс), которые не зависят ни от мембранного потенциала, ни от Ca^{2+} . Замещение наружного Cl^- на I^- переключает потенциал реверсии на 30 мВ и удлиняет времена открытых состояний каналов, не влияя на кинетические параметры.

Хлорные токи, регулируемые цАМФ-зависимой протеинкиназой ($I_{Cl,PKA}$)

Чувствительность $I_{Cl,PKA}$ сердечных клеток к различным антагонистам хлорных каналов в некоторой степени сходна с чувствительностью $I_{Cl,PKA}$ эпителиальных клеток [Gadsby et al., 1995; Schultz et al., 1999]. Было показано, что $I_{Cl,PKA}$ относительно не чувствителен к стильбеновым производным дисульфоновой кислоты таким как SITS, DIDS, DNDS, но блокируется производными карбоновой кислоты, такими как 9-АС, DPC, феноламинобензоатами, такими как NPPB, аналогами клофибриновой кислоты, глибенгламидом [Bahinski et al., 1989; Harvey, 1993; Harvey et al., 1990; Shida et al., 1992; Tanaka et al., 1996; Tomimaga et al., 1995; Walsh and Wang, 1996; J. Yamazaki and Hume 1997].

Хлорные токи, регулируемые протеинкиназой C ($I_{Cl,PKC}$)

Доказательства, указывающие на вовлечение протеинкиназы C в регуляцию хлорного тока были, получены в целом ряде работ [Conte-Camerino et al., 1988; Overholt et al., 1993; Shuba et al., 1996; Walsh, 1991; Walsh and Long, 1994; Valverde et al., 1993]. Было показано, что эти токи активируются форболовыми эфирами, обладают селективностью к ионам хлора, блокируются 9-АС, но не DIDS [Berger et al., 1993; Collier and Hume, 1995; Jia et al., 1997; Middleton and Harvey, 1998; Walsh, 1991; Yamazaki et al., 1999; Valverde et al., 1993]. Вольт-амперная характеристика при условии, что $[Cl^-]_i = [Cl^-]_o$ носит линейный характер, а

при условии несимметричного распределения ионов хлора ($[Cl^-]_i < [Cl^-]_o$) эти каналы проявляют выпрямляющие свойства, проводимость каналов составляет 7 – 13 pS. Так как свойства этих хлорных каналов близки к свойствам хлорных каналов, регулируемым протеинкиназой А, возникло предположение о том, что это один и тоже ионный канал [194, Valverde et al., 1993]. Структурно, хлорный канал, регулируемый протеинкиназой С представляет собой cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) [Berger et al., 1993; Tabcharani et al., 1991]. Активация РКС-зависимого пути регуляции CFTR хлорных каналов, по видимому, осуществляется посредством активации пуриnergических и/или ангиотензиновых рецепторов [Bescond et al., 1994; Morita et al., 1995], но не α -адренергических рецепторов [Hool et al., 1997; Iyadomi et al., 1995; Oleksa et al., 1996].

Хлорный ток, регулируемый пуриnergическими рецепторами ($I_{Cl,ATP}$).

$I_{Cl,ATP}$ способен активироваться внеклеточным АТФ, АДФ и АТР γ S, но не АМФ и аденозином, что указывает на вовлечение P_2 -пуриnergических рецепторов [Kaneda et al., 1994]. По данным [Duan et al., 1997b] активация $I_{Cl,ATP}$ может быть связан с пуриnergической активацией CFTR Cl^- канала посредством протеинкиназ А и С. Активация P_2 -пуриnergических рецепторов инициирует метаболизм мембранных фосфоинозитидов с последующей активацией протеинкиназы С [Leung et al., 1994; Yamada et al., 1992], а так же влечет за собой возрастание внутриклеточной концентрации цАМФ [Puceat et al., 1998].

Недавно были получены свидетельства, указывающие на то, что $I_{Cl,ATP}$, $I_{Cl,PKA}$, $I_{Cl,PKC}$ могут регулироваться так называемым регулятором трансмембранной проводимости муковисцедоза, что позволяет объединить их в отдельную группу [Hume et al., 2000]. Сокращенное международное название этого регулятора трансмембранной проводимости – CFTR (epithelial cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Свое название CFTR получил потому, что этот мембраносвязанный белок является продуктом гена, рецессивная мутация которого обуславливает развитие у гомозигот тяжелого наследственного заболевания –

муковисцедоза. CFTR – это политопный интегральный мембранный гликопротеин (M~160000), который формирует АТФ-зависимый хлорный канал в апикальной мембране эпителиальных клеток. CFTR регулирует также активность других мембранных протеинов, включая некоторые типы Na⁺ и Cl⁻ каналов, и играет важную роль в трансмембранном переносе воды и ионов.

Учитывая важную патофизиологическую роль CFTR, были предприняты попытки найти активаторы и ингибиторы этих каналов в надежде на их терапевтическое использование при лечении муковисцедоза [Hwang and Sheppard, 1999; Schultz et al., 1999]. CFTR блокируется ариламинобензоатами, подобными NPPB, глибенкламидом [Sheppard et al., 1992], 9-АС и клофибриновой кислотой (clofibric acid) [Jentsch et al., 2002]. Дисульфоновые стильбены тоже блокируют эти каналы, но только при их внутриклеточном применении [Jentsch et al., 2002]. Наиболее специфичным и сильным блокатором является сурамин [Bachmann et al., 1999], хорошо известный своими антагонистическими свойствами в отношении пуринаргических рецепторов. Однако, это соединение проявляет эффективность также только при его внутриклеточном применении. В последние годы, были охарактеризованы CTRF-активирующие соединения, которые напрямую взаимодействуют с протеином самого канала. Они включают ксантины и флавоноиды, среди которых изофлаваноид генистеин (genistein) является наиболее сильным активатором. Однако, замещенные ксантины, такие как 3-изобутил-1-метилксантин, модулируют активность CTRF не прямым образом, а за счет ингибирования фосфодиэстераз. Генистеин, который известен как ингибитор тирозиновых киназ, проявляет двойственный эффект на канал. Он увеличивает время открытого состояния канала при низких концентрациях, но увеличивает время его закрытого состояния при высоких концентрациях [Wang et al., 1998].

В сосудистых ГМК аорты крысы присутствуют хлорные каналы – CFTR, которые активируются типичными активаторами подобных каналов в эпителиальных клетках линий MPB-07 и MPB-91 и ингибируются глибенкламин-2-карбоксильной кислотой. Были получены данные, что активаторы CFTR вызывали

зависимое от концентрации расслабление сегментов аорты, предсокращенных гиперкалиевым раствором или норэпинефрином, что свидетельствует о фундаментальной роли CFTR в гормональной и местной регуляции СГМК [Robert et al., 2004].

Блокирование Cl⁻ каналов различными препаратами вызывало гиперполяризацию мембраны гладкомышечных клеток [Kuriyama et al., 1998]. В скелетных мышцах блокирование ClC-1 хлорных каналов приводило к развитию тонического сокращения, что указывает на важную роль этих каналов в мышечном расслаблении [Kuriyama et al., 1998]. Sun и др. [Sun et al., 1993], показал, что Cl⁻ каналы, связанные с G-белками, в ГМК толстой кишки кролика активировались субстанцией Р (агонист нейрокинин-1 рецепторов (NK-1)). Автор предположил, что активация этих хлорных каналов при стимуляции NK-1 может приводить к первоначальной деполяризации мембраны и таким образом открывать потенциал-зависимые кальциевые каналы. Физиологическая роль Cl⁻ каналов в висцеральных и сосудистых гладкомышечных клетках, как и в других типах клеток, связана с регуляцией клеточного объема и является важным механизмом модуляции сократительных реакций [Criddle et al., 2002; Yamakage et al., 2002; Burdyga et al., 2002; Salvail et al., 2002; Curtis et al., 2001; Koh et al., 2001; Bae et al., 2001; Yamazaki and Kitamura, 2001; Dai and Zhang, 2001; Jury et al., 2001; Jackson, 2000; Remillard et al., 2000; Lamb et al., 2000; Welsh et al., 2000; Graves et al., 2000; Chipperfield and Harper, 2000; Zhang et al., 2000; Kuriyama et al., 1998; Sun et al., 1993].

Известно, что Cl⁻ каналы присутствуют не только в цитоплазматической мембране, но и в мембранах внутриклеточных органелл. На гладкомышечных клетках было показано, что вход Cl⁻ в саркоплазматический ретикулум (СПР) играет важную роль при компенсации заряда мембраны СПР, в отличие от возможного выхода K⁺. Мембрана СПР проницаема для Cl⁻, и вход Cl⁻ в СПР должен предотвращать развитие электрического потенциала, который мог бы быть следствием реаккумуляции ионов Ca²⁺ [Pollock et al., 1998]. Два блокатора Cl⁻

каналов ингибировали накопление Ca^{2+} в СПР на 90% ($K_{1/2}=10$ мкМ для NPPВ и 46 мкМ для индолилуксусная кислота) [Pollock et al., 1998]. Два других блокатора, нифлумовая кислота и DNDS, не оказывали влияния на накопление Ca^{2+} . В целом, в сравнении с катионными каналами, для которых были получены высокоспецифические блокаторы, фармакология Cl^- каналов довольно ограничена. За некоторым исключением, блокаторы Cl^- каналов неспецифичны и имеют низкое сродство, при этом эффективные концентрации являются микро- или даже миллимолярными. Низкая специфичность для индивидуальных ионных каналов ведет к развитию побочных эффектов этих соединений, главным образом, на ионные другие транспортеры и сигнальные пути.

1.5. Роль ионов хлора в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток

Кроме НКСС существуют еще две ионтранспортирующие системы, обеспечивающие противогradientный перенос хлорид-ионов внутрь клетки – $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменник и насос III. Vannister et al. (1999) сообщали, что любые манипуляции, которые снижают влияние Cl^-_i на мембранный потенциал, обуславливают расслабление бедренных артерий крыс, предсокращенных фенилэфрином. Эти манипуляции включали ингибирование НКСС или/и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменник, насос III и хлорные каналы. Последние блокировали с помощью блокатора хлорных каналов NPPВ. Была обнаружена сильная линейная корреляция между степенью расслабления и снижением $[\text{Cl}^-]_i$ ($r=0.96$) и деполяризацией E_m ($r=0.86$).

Lamb and Barna (1998a) измеряли механическое напряжение, генерируемое сегментами аорты в ответ на стимуляцию норадреналином с последующим ингибированием НКСС буметанидом, выключением $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменника путем удаления HCO_3^- и ингибированием насоса III этакриновой кислотой [Davis, 1992, 1996]. Сокращения снижались при блокировании НКСС и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменника, однако ингибирование насоса III оказывало лишь пограничный эф-

фekt, свидетельствуя о его несущественной роли в регуляции сократительной активности ГМК аорты крысы.

В этих экспериментах [Lamb and Barna, 1998a] был использован DIDS в высокой концентрации (1 мМ) с целью выявления прежде всего его действия на хлорные каналы, нежели на $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменник. Концентрация DIDS, необходимая для этой цели обычно выше, чем это требуется для блокирования $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменника (обычно <100 мкМ). Однако это не абсолютное правило: в миоцитах портальной вены крысы DIDS блокировал хлорный ток с $K_{1/2}=5$ мкМ [Greenwood and Large, 1998]. По всей видимости, DIDS может блокировать по крайней мере 3 из девяти типов хлорных каналов, перечисленных Alexander and Peters (2000). Остальные блокаторы также характеризуются подобным отсутствием специфичности. Тем не менее, предполагается, что DIDS должен обладать способностью гиперполяризовать мембрану при блокировании $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменника и/или хлорных каналов.

Lamb et al. (2000) исследовал влияние DIDS на давление крови и региональный кровоток у анестезированных крыс после введения норадреналина. При использовании низких доз норадреналина, DIDS обуславливал снижение кровотока и расслабление сосудов дистальнее брюшной аорты. Эти результаты согласуются с концепцией блокирования хлорных каналов, что обуславливает гиперполяризацию мембраны и последующее расслабление. При более высоких дозах норадреналина DIDS не оказывал существенного влияния на исследуемые параметры, что согласуется с данными Akar et al. (1999) о том, что Cl^- не вовлекается в сократительную регуляцию при высоких концентрациях фенилэфрина [Akar et al., 1999].

В изолированных сегментах аорты крысы блокатор хлорных каналов нифлумовая кислота ингибировала сокращение, индуцированное норадреналином, при низких концентрациях, ранее использованных при блокировании Ca^{2+} -зависимых Cl^- токов ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) [Criddle et al., 1996]. Блокатор кальциевых каналов нифедипин блокировал сокращение сходным образом, но эффект двух блокаторов

был неаддитивным. В противоположность этому, нифлумовая кислота не влияла на норадреналин-индуцированное сокращение в бескальциевой среде и на сокращения, индуцированные деполяризацией в гиперкалиевом (25 мМ) растворе. По мнению авторов, деполяризация мембраны в этих случаях могла реализоваться и без участия хлорных каналов. Akar et al. (1999) таким же образом интерпретировал данные об отсутствии влияния буметанида на гиперкалиевое сокращение аорты крысы.

Относительно роли хлорных каналов в регуляции сократительного действия норадреналина, Criddle et al. (1996) рассматривал такую последовательность событий:

- норадреналин-индуцированное высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо
- открывание Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов
- деполяризация мембраны
- открывание потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов
- сокращение.

Данное утверждение было основано на исследованиях $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ [Large and Wang, 1996] и Criddle et al. (1996). С другой стороны, Criddle et al. (1996) был первым, кто показал и явно обосновал последовательность предложенных выше событий и сделал подобные наблюдения на брюшных артериях крыс [Criddle et al., 1997].

Lamb and Barna (1998a) исследовали Cl^- каналы с помощью других методических подходов. Они исследовали сократительные реакции аорты крысы в бесхлорных и обогащенных хлором средах. Снижение $[\text{Cl}^-]_o$ и замещение его непроникающим через мембрану соединением метансульфонатом, в свою очередь, должно было изменить хлорный градиент, повысить хлорный ток и вызвать деполяризацию мембраны, изменив ее потенциал с -30 до $+44$ мВ [Lamb and Barna, 1998a]. Подобные манипуляции приводили к усилению сокращений, индуцированных фенилэфрином и серотонином, а также вызывали транзиторное сокра-

щение, развивавшееся раньше, чем обычное поддерживаемое сокращение. В противоположность этому, манипуляции, связанные с уменьшением $[Cl^-]_o$, не проявлялись в условиях, когда деполяризация мембраны и сокращение индуцировали повышением KCl до 18 мМ, что предположительно не вело к активации Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов.

Как известно, хлорные токи могут быть модифицированы при использованием различных внеклеточных анионов и блокаторов Cl^- каналов. Действительно, DIDS, 9-аминоакридин и нифлумовая кислота снижали как транзиторные, так и поддерживаемые сокращения [Lamb and Barna, 1998a]. При замещении Cl^- ионами Br^- или I^- , амплитуда пикового компонента сокращения снижалась. Предполагается, что ряд селективности Cl^- каналов соответствует $I^- > Br^- > Cl^- \gg methanesulfonate^-$, что согласуется с характеристиками Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов [Large and Wang, 1996; Alexander and Peters, 2000].

[Nelson et al., 1997] показал, что в миогенные ответы мозговых артерий крысы вовлекаются различные типы хлорных каналов. Тонус артерий снижался при использовании таких блокаторов хлорных каналов как индолилуксусная кислота (indanyloxyacetic acid-94) и DIDS, $K_{1/2}$ которых составили 26 и 69 мкМ, соответственно. Использование указанных блокаторов сопровождалось развитием гиперполяризации мембраны (на 17 и 14 мВ, соответственно). Более того, при снижении внеклеточной концентрации Cl^- до 60 мМ и замещении его непроницающими анионами миогенные реакции усиливались. В исследованиях Nelson et al. нифлумовая кислота, тем не менее, не оказывала подавляющего эффекта, что позволило опровергнуть гипотезу о вовлечении Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов в регуляцию тонуса ГМК мозговых артерий крысы.

[Gould and Hill, 1996] исследовали вовлечение Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов в сократительную регуляцию гладких мышц артерий радужной оболочки крысы. Они показали, что Ca^{2+} активирует как хлорные каналы, так и сокращение, при этом каналы оказались более чувствительными к ионам кальция, нежели сократительный аппарат. В ГМК почечных артериол кролика, замещение Cl^- не-

проникающими анионами снижало сокращения, индуцированные KCl, и предотвращали сократительное действие ангиотензина II [Jensen et al., 1997]. Замещение Cl⁻ глюконатом оказывало незначительное действие на МП интактных и стимулированных норадреналином брюшных артерий крысы [Nilsson et al., 1998]. Индолилуксусная кислота вызывала гиперполяризацию мембраны на 20 мВ и ингибировала ответы на норадреналин, но не гиперкалиевый раствор [Nilsson et al., 1998]. Роль Cl⁻ в сокращении артериол радужной оболочки и почек и мелких брюшных артерий [Jensen et al., 1997; Nilsson et al., 1998] отличается от таковой в других сосудистых ГМК. Этот вывод подтверждается данными об отличающихся эффектах DIDS на почечные и брюшные артерии [Lamb et al., 2000]. В СГМК, полученных из брюшных артерий крысы, был идентифицирован новый цГМФ-зависимый Ca²⁺-активируемый Cl⁻ ток, который активировался при высвобождении кальция из внутриклеточных депо и имел характеристики, отличающие его от других кальций-активируемых токов [Matchkov et al., 2004]. [Jiang et al., 2003] продемонстрировал вовлечение хлорных каналов в сократительные ответы СГМК аорты крысы при воздействии простагландина F2α с использованием таких антагонистов Cl⁻ каналов, как NPPВ, индолилуксусная кислота and DIDS. [Moffatt and Cocks, 2004] показали, что тоническое сокращение при активации тромбаксановых рецепторов обусловлено высвобождением кальция из IP3-зависимых внутриклеточных депо, последующим открыванием Ca²⁺-зависимых Cl⁻ каналов и затем входом Ca²⁺ по потенциал-зависимым кальциевым каналам L типа.

1.6. Роль внутриклеточных ионов Na⁺ и Na⁺/Ca²⁺ обмена в регуляции функций гладкомышечных клеток

Концентрация Na⁺ в цитозоле много меньше, чем во внеклеточной жидкости [Skou, 1998]. Ионы натрия активно транспортируются из цитозоля Na⁺- и K⁺-зависимой трифосфотазой (Na,K-АТФаза или Na/K насос), которая перемещает Na⁺ во внеклеточное пространство [Skou, 1998]. Особенности компартиментализации внутриклеточного Na⁺ слабо освещены в литературе и относительно этого

вопроса имеются лишь фрагментарные сведения. В культуральных СГМК Na^+ однородно распределен в цитоплазме и ядре (Na^+_n) [Blaustein, 1993]. Ингибирование Na/K насоса и активация культуральных СГМК линии A7r5 вызывает однородные изменения $[\text{Na}^+]$ в цитоплазме и нуклеоплазме клеток [Borin et al., 1993]. В течение длительного времени, внутриклеточная концентрация Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$) в различных типах клеток исследовалась в основном в связи с непосредственным вовлечением Na^+ в формирование потенциала покоя и потенциала действия, трансэпителиального переноса солей и осмотических потоков воды, поддержания внутриклеточной ионной силы и клеточного объема. Последние данные представляют свидетельства, что Na^+_i в сосудистых ГМК обладает некоторыми чертами сигнальной молекулы. Эта гипотеза подтверждается данными, что (1) Na^+_i играет ключевую роль в регуляции разнообразных клеточных функциях, (2) имеются хорошо контролируемые пути генерации и ограничения Na^+_i -опосредуемых сигналов и (3) внутриклеточные мишени Na^+_i включают специфические протеины и фактор(ы) транскрипции.

В соответствие с этой гипотезой, генерация Na^+ -сигнала в цитозоле опосредуется через снижение натриевого градиента, которое может быть обусловлено такими событиями, как ингибирование Na/K насоса различными эндогенными соединениями или активацией Na^+ каналов или Na^+ -сопряженного ионного транспорта. Последний включает Na^+/H^+ и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен, НКСС и котранспорт Na^+ с аминокислотами, глюкозой и фосфатом. Na/K насос является известной мишенью действия гормонов [Borin et al., 1993] и убаин- и маринобуфадженин-подобных факторов [Fridman et al., 2002; Lopatin et al., 1999; Fedorova et al., 1998; De Angelis and Hauptert, 1998; Ferrandi et al., 1997]. В свою очередь, модуляция Na^+ каналов и Na^+ -сопряженного транспорта индуцируется различными гормонами, агонистами и физическими стимулами, такими как МП и изменения клеточного объема. Таким образом, налицо универсальность процессов, запускающих Na^+ -сигнал. Необходимо отметить, что все ионные транспортеры, во-

влеченные в Na^+ -сопряженный ионный транспорт, участвуют в сопряжении возбуждения-сокращения сосудистых ГМК.

В сосудистых ГМК с их чрезвычайно низкой экспрессией Na^+ каналов [Wermelskirchen et al., 1992; Yuan et al., 1993; Arnon et al., 2000], основным источником Na^+ -сигнала в цитозоле могут быть Ca^{2+} каналы, регулируемые выходом ионов Ca^{2+} из СПР (“store-operated” Ca^{2+} channels (SOC)) [Arnon et al., 2000] и относительно неселективные катионные каналы [Albert et al., 2003; Kiselyov et al., 1998; Zitt et al., 1996]. Было показано, что разгрузка кальциевых депо при применении кофеина или циклопиазоновой кислоты, являющихся ингибиторами Ca^{2+} насоса СПР, вызывала повышение $[\text{Na}^+]_i$, зависимое от внеклеточной концентрации Na^+ ($[\text{Na}^+]_o$). Одним компонентом этого повышения $[\text{Na}^+]_i$, вероятно, является $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен, а вторым компонентом – SOC [Arnon et al., 2000], которые у млекопитающих проницаемы как для Na^+ , так и для Ca^{2+} [Kerschbaum and Cahalan, 1998; Philipp et al., 1996; Zhu and Birnbaumer, 1998] с отношением проницаемостей ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$) порядка 10:1 при физиологических условиях [Philipp et al., 1996; Zhu and Birnbaumer, 1998]. Учитывая, что $[\text{Na}^+]_o$ значительно превышает $[\text{Ca}^{2+}]_o$, большее количество Na^+ жмет входить в клетки через SOC. Таким образом, гормоны и нейротрансмиттеры могут вызывать массивный вход Na^+ [Borin et al., 1993; Brock et al., 1982], временные и пространственные характеристики которого могли бы быть подобными SOC-опосредуемому входу Ca^{2+} .

До настоящего времени, главной гипотезой вовлечения Na^+ в трансляцию сигналов являлось его участие в регуляции кальциевой ветви внутриклеточной сигнализации. Действительно, существует тесная структурная и функциональная связь между SOC, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменником и Na/K насосом. SOC [Jaconi et al., 1997; Kiselyov et al., 1998] и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник [Juhaszova et al., 1994; Moore et al., 1993], вероятно, образуют молекулярные кластеры с Na/K насосом в тех же самых микродоменах плазмалеммы. А. Arnon с соавторами продемонстрировал, что сопряженный вход Na^+ и Ca^{2+} через SOC кардинально влияет на Ca^{2+} сигнализацию в артериальных ГМК. В покоящихся клетках, некоторое количество

Na^+ входит через SOC. Мобилизация Ca^{2+} из СПР открывает эти каналы и существенно увеличивает вход Na^+ . В свою очередь, вход Na^+ влияет на депонирование и высвобождение Ca^{2+} и, таким образом, играет важную роль в модуляции клеточной сигнализации. Величина этого эффекта определяется количеством вошедшего Na^+ , активностью Na/K насоса и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника, колокализированных с SOC в определенных регионах плазмалеммы [Arnon et al., 2000]. Даже без повышения общей концентрации $[\text{Na}^+]_i$ во всем цитозоле, локальное повышение $[\text{Na}^+]_i$ является достаточным условием, чтобы повлиять на внутриклеточную сигнализацию. Данные Головиной В.А. с соавторами свидетельствуют, что селективное снижение активности α_2 -субъединицы Na/K насоса может увеличивать локальное значение $[\text{Na}^+]_i$ и, через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в микрообъемах цитозоля между плазмалеммой и СПР. Это, в свою очередь, повышает Ca^{2+} -зависимое высвобождение Ca^{2+} из СПР и, таким образом, усиливает Ca^{2+} -опосредуемую сигнализацию [Golovina et al., 2003]. Вход Na^+ через SOC влияет на активность Na/K насоса и явно увеличивает Ca^{2+} на уровне целой клетки из-за снижения выведения Ca^{2+} из клетки. Этот эффект особенно выражен, когда активность Na/K насоса подавлена [Arnon et al., 2000].

Функциональная связь $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена и $[\text{Na}^+]_i$ является важным механизмом Na^+ -чувствительной регуляции сопряжения возбуждения-сокращения в мышечных клетках. Согласно недавно полученным данным о роли $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в регуляции гладких мышц, повышенный выход Ca^{2+} в сосудистых ГМК крыс линии SHR, по крайней мере частично, обусловлен повышением функциональной активности $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, связанным с усиленной экспрессией генов и фосфорилированием тирозина [Taniguchi et al., 2004]. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен вовлечен в изопреналин-индуцированное снижение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и расслабление ГМК коронарных артерий свиньи [Yamanaka et al., 2003], α -адренергическую регуляцию Ca^{2+}_i осцилляций и сокращений [Lee et al., 2001], а также влияет на прегломерулярные СГМК и почечный кровоток [Schweda et al., 2001]. Предполагается, что в ГМК существует функциональная связь между митохондриями и СПР, которая

обеспечивается пространственной ассоциацией по крайней мере половины митохондрий с поверхностью СПР. При этом этими органеллы функционально связаны с внеклеточным пространством посредством $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена [Szado et al., 2003].

Кроме этого, взаимодействие между $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменом и $[\text{Na}^+]_i$ модулирует активность Ca^{2+}/KM -зависимой протеинкиназы, фосфорилирование (Ca^{2+} -цАМФ)-чувствительного фактора транскрипции и экспрессию генов. В этом случае, ингибирование Na/K насоса запускает Ca^{2+} -зависимую экспрессию гена *c-Fos*, принадлежащего к семейству *early response genes* (гены раннего ответа) [Wellman et al., 2001; Crabtree, 2001; Taurin et al., 2003]. Вторым важным примером сигнальной роли Na^+_i является недавно открытый механизм Na^+_i -чувствительной Ca^{2+} -независимой экспрессии генов, предотвращающих апоптоз сосудистых ГМК при увеличении соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ [Orlov et al., 2004; Taurin et al., 2002].

Несмотря на некоторый прогресс в исследовании Na^+_i -чувствительных механизмов регуляции, в отношении внутриклеточных сенсоров $[\text{Na}^+]_i$ остается много открытых вопросов. Подобно Na/K насосу, каждый член Na^+ -сопряженных транспортеров обладает Na^+ -чувствительными сайтами связывания. Однако их трехмерная структура формируется прерванной аминокислотной последовательностью, что затрудняет идентификацию генов, кодирующих гомологичные Na^+ -чувствительные протеины.

По всей видимости, Na^+ -чувствительная регуляция не ограничивается экспрессией генов и связыванием Na^+ с транспортерами. Так, в нейронах коры крыс было показано, что регуляция GABA_A рецепторов осуществляется с участием Na^+ -зависимой фосфатазы [Lanius et al., 1993]. Повышение $[\text{Na}^+]_i$ является достаточным, чтобы активировать гетеротримерные G-протеины через ГТФ-независимый механизм диссоциации их α - и $\beta\gamma$ -субъединиц [Rishal et al., 2003]. Повышение $[\text{Na}^+]_i$ модулирует активность рецепторов NMDA, K^+ и Ca^{2+} каналов по-

средством G-белок-зависимых и независимых механизмов [Rishal et al., 2003; Yu and Salter, 1998; Blumenstein et al., 2004].

Исследование $[Na^+]_i$ -чувствительных механизмов регуляции функций сосудистых ГМК имеет значение и в связи с данными, что повышенная продукция эндогенных кардиотонических стероидов, блокирующих Na/K насос, способствует патологии ионного транспорта при первичной гипертензии [Orlov et al., 1999; Orlov, 2003].

ГЛАВА II

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

Объектами исследования служили 1) изолированные деэндотелизированные гладкомышечные сегменты (СГМС) аорты белых крыс и 2) культуральные сосудистые гладкомышечные клетки, полученные из аорты крыс линии Wistar-Kyoto (WKY). Линия клеток WKY-7 была создана в соответствии с выраженным сократительным фенотипом этих клеток, что подтверждалось высокой экспрессией специфичных для гладких мышц α -актина, белка SM22 и КЛЦМ. Линия WKY-7 обладала наибольшей чувствительностью к ангиотензину II и эндотелину-1, измеренной по уровню митоген-активированного фосфорилирования протеинкиназы ERK1/2 [Davis et al., 2003]

2.2. Методики исследования

Подготовка гладкомышечных сегментов аорты крысы для исследования сократительной активности

Для исследования сократительной активности использовали изолированные гладкомышечные сегменты аорты белых крыс в возрасте 11-13 недель. После внутриперитонеальной анестезии нембуталом (70мг/кг) проводили декаптацию, выделяли аорту, помещали ее в физиологически сбалансированный солевой раствор, с помощью хирургических ножниц отпрепаровывали жировую и соединительную ткань и выделяли сегменты шириной 2-3 мм. Эндотелий удаляли механически, вращением деревянного шпателя в просвете сегмента в течение 1 минуты непосредственно перед выполнением эксперимента. Отпрепарированные деэндотелизированные сегменты использовали немедленно, оставшуюся часть отпрепарированной аорты сохраняли в холодильнике при 4°C. В предварительных экспериментах было показано, что 24-часовое хранение аорты при 4°C не влияет на сократительные свойства гладких мышц.

Исследование сократительной активности СГМС

Для исследования сократительной активности гладкомышечные сегменты фиксировали с помощью стальных крючков в камере объемом 1 мл, изготовленной из органического стекла. Камеру заполняли физиологическим раствором и термостатировали при 37°C в условиях проточной перфузии (1мл/мин).

Гладкомышечные сегменты, закрепленные в перфузионной камере, предварительно растягивали нагрузкой 500-1000 мг, после чего с помощью шелковой нити фиксировали на штоке электромеханического преобразователя (механотрон МХ2Б, Москва). Сегменты отмывали физиологическим раствором в течение 40-50 минут при РН=7.4 (37°C), после чего дважды вызывали гиперкалиевое сокращение путем эквимолярного замещения NaCl на KCl, 30 мМ. Далее в зависимости от целей эксперимента использовали модифицированный физиологический раствор с измененным ионным составом или содержащий физиологически или осмотически-активные вещества в отсутствие или присутствие тестируемых соединений. В качестве непроникающего биологически неактивного осмолита использовали сахарозу (50-300 мМ) или холинхлорид (75 мМ).

Аппликацию 150 мМ сахарозы использовали для моделирования гиперосмотической стрикции СГМС.

Изоосмотическую стрикцию вызывали восстановлением ионного состава раствора после 60-минутной инкубации сегментов в гипоосмотической среде, содержащей 40 мМ NaCl.

Для исследования сократительной активности сегментов в модели гипоосмотического набухания сегменты помещали в раствор с концентрацией NaCl равной 40-70 мМ

Амплитуда сократительных ответов гладкомышечных сегментов рассчитывалось в процентах от амплитуды гиперкалиевого (эквимолярное замещение 30 мМ NaCl на KCl) или контрольного сокращения иной природы в зависимости от целей эксперимента.

В ряде экспериментов для оценки динамики гиперосмотически-индуцированного сокращения проводили математическое моделирование параметров изменения МН с использованием программного пакета Microsoft Excel. При этом оцифровывали экспериментально полученные механограммы и аппроксимировали их экспонентой $y(t)=A(\exp(-1/\alpha t))$, где y – амплитуда сокращения в момент времени t ; A – максимальная амплитуда, α – показатель динамики (характеризует динамику сокращения по признаку «пологость/крутизна» нарастания МН).

Изменения механического напряжения регистрировали с помощью ХУ рекодера (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Культивирование сосудистых гладкомышечных клеток

Точное измерение клеточного объема и входящих ионных потоков в гладкомышечных сегментах затруднено в связи с существованием относительно большого внеклеточного пространства, присутствием фибробластов и гетерогенностью СГМК в ткани. С другой стороны, в культуральных СГМК быстро снижается экспрессия ряда специфических генов, которые определяют их сократительный фенотип *in vivo*. Учитывая это, была использована стратегия low-density seeding для СГМК, полученных из аорты крыс линии Wistar-Kyoto (WKY), с целью выделить линию клеток, обладающих наиболее высокой экспрессией специфического для гладких мышц α -актина, белка SM22 и КЛЦМ. Эта линия клеток, WKY-7, также обладала наибольшей чувствительностью к ангиотензину II и эндотелину-1, измеренной по уровню митоген-активированного фосфорилирования протеинкиназы ERK1/2. Получение культуры, культивирование

Клетки линии WKY-7 росли в течение 48-72 часов в среде DMEM, содержащей эмбриональную сыворотку и сыворотку новорожденных телят (10% каждой), глутамин (2 мМ), пенициллин (100 Ед/мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Для синхронизации культуры и прекращения пролиферативной активности, перед экспериментами клетки инкубировали в течение 48 часов в присутствии 0.2% телячьей сыворотки.

Измерение активности НКСС

Активность НКСС измеряли как буметанид-чувствительный компонент входа ^{86}Rb . Клетки WKY-7, осажденные в 24-ячейстые планшеты, дважды промывали аликвотированными 2-мл порциями физиологического раствора. После аспирации среды, добавляли 0.25 мл физиологический раствор, содержащий 1 мкCi/мл ^{86}Rb и 1 mM убаина в присутствии или в отсутствие буметанида. После 5-минутной инкубации при 37°C, накопление изотопа останавливали добавлением 2 мл ледяной среды W, содержащей 100 mM MgCl_2 и 10 mM HEPES-TRIS буфер (pH 7.4). Радиоактивность инкубационной среды и лизата клеток были измерены с помощью жидкого сцинтиляционного анализатора, а значение входа ^{86}Rb (V , нМ/мл протеина·5мин) было рассчитано как $v=A/am$, где A – радиоактивность образцов (срм), a – специфическая радиоактивность K^+ (^{86}Rb) в среде (срм/нМ), m – содержание протеинов, измеренное модифицированным методом Lowry [Orlov et al., 1996].

Измерение объема WKY-7 клеток

Объем внутриклеточной воды измеряли как пространство, доступное для [^{14}C]-меченой мочевины [Orlov et al., 1996], рассчитанное как $V=A_c/A_m m$, где A_c – радиоактивность клеток после 30-минутной инкубации с мочевиной, [^{14}C]-меченой 2 мкCi/мл (dpm), A_m – радиоактивность инкубационной среды (dpm/мл), m – содержание протеинов в лизате клеток (мг).

Измерение внутриклеточного Cl^- в WKY-7 клетках

Содержание внутриклеточного Cl^- в WKY-7 измерялось как поддерживаемое распределение ^{36}Cl по методу [Orlov et al., 1996]. Для расчета $[\text{Cl}^-]_i$, объем внутриклеточной воды оценивался в параллельных экспериментах по протоколу, приведенному выше. Чтобы измерить содержание Cl^- в СГМС, сегменты предварительно инкубировали в физиологическом растворе, содержащем 2 мкCi/мл ^{36}Cl . В ряде экспериментов, буметанид и сахароза добавлялись в последние 30 мин инкубации. Затем СГМС омывали 3×50 мл аликвотами ледяного

физиологического раствора и солюбилизировали в сцинтиляционной смеси, содержащей Triton X100:toluene 1:2, 4 г/л 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазол (РРО) и 0.1 г/л 1,4-бис[5-фенил-2-оксазоллил]-бензен; 2-2'-з-фенилен-бис[5-фенилоксазол] (РОРОР). Внутриклеточное содержание Cl^- (нМ/мг) рассчитывалось как $[\text{Cl}^-]_i = A/am$, где A – радиоактивность образцов (срм), a – специфическая радиоактивность Cl^- в среде (срм/нМ), m – влажный вес СГМС (мг), измеренный перед инкубацией.

Измерение активности потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов в WKY-7 клетках

Активность потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов оценивалась как верапамил- или нифедипин-чувствительный компонент входа ^{45}Ca . Клетки WKY-7, посеянные в 24-ячеистые планшеты, преинкубировали в течение 30 мин в физиологическом растворе. Затем среду аспирировали и добавляли физиологический раствор, содержащий 0.1 мМ CaCl_2 в присутствии или отсутствии нифедипина и верапамила. Накопление изотопа инициировали добавлением 0.25 мл физиологического раствора такого же состава, содержащего 3 мкCi/мл ^{45}Ca , и прекращали через 5 мин, как описано выше. Чтобы индуцировать деполяризацию, увеличивали содержание KCl до 60 мМ, эквимолярно заменяя NaCl .

Исследование радиоактивности сред инкубации и лизата клеток проводилось с помощью сцинтиляционного анализатора.

2.3. Растворы и реактивы

Физиологический раствор содержал (мМ): 120.4 NaCl , 5.9 KCl , 2.5 CaCl_2 , 1.2 MgCl_2 , 5.5 глюкоза, 15 $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$ [tris(oxymethyl)-aminometan] (pH 7.4; 316.4 мосМ). Бескальциевый раствор содержал 0.5 мМ ЭГТА и 3.6 мМ MgCl_2 . С целью избежать влияния $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обмена на внутриклеточную концентрацию Cl^- , физиологический раствор готовили без бикарбонат анионов во всех экспериментах. pH корректировали добавлением 0.1 N HCl . Осмолярность среды повышали добавлением 50 – 300 мМ сахарозы, как непроникающего осмолита (366.4 – 466.4 мосМ). Гипоосмотический раствор готовили, снижая концентрацию NaCl

(40.4 – 70.4 вместо 12.4 мМ NaCl, 156.4 – 216.4 мОсм). При исследовании потоков ^{86}Rb в WKY-7 в бесхлорном физиологическом растворе, KCl, NaCl и MgCl₂ заменяли глюконатом Na, глюконатом K и MgSO₄, соответственно, в то время как CaCl₂ не добавляли. Предварительно было показано, что отсутствие Ca²⁺ не влияло на объем-зависимую регуляцию убаин-резистентных потоков ^{86}Rb в СГМК [Orlov et al., 1992]. При исследовании влияния селективной нормализации ионного состава раствора (Na⁺, Cl⁻) на сократительные реакции СГМС использовали холинхлорид и глутамат Na.

Используемые реактивы: Реактивы были получены из SIGMA (St. Louis, Mo., USA) за исключением ЭГТА, POPOP, PPO (Serva, Heidelberg, Germany), верапамила (Orion, Helsinki, Finland), доцетаксела (United Kingdom) и клеточных сред (Gibco BRL, Gaithersburg, Mo., USA). Радиоактивные реагенты были получены от New England Nuclear (Boston, Mass.) и Amersham (Mississauga, Ont.). Маточные растворы готовили в DMSO, нифедипин растворяли в 70% этаноле. Ни DMSO, ни этанол в максимальной концентрации 0.1% не влияли на исследуемые параметры.

2.4. Приборы и оборудование

Механографическая установка изготовлена из органического стекла и представляет собой платформу с теплообменником, в верхней части которого находится кювета объемом 1 мл. В стене кюветы закреплен крючок, выполненный из медицинской стали. В кювете постоянно перфузируется термостатируемый (37°C) физиологический раствор со скоростью 1мл/мин. Блок – схема установки приведена на рис. 1. Сигнал с анодных цепей механотрона подавался на предварительный усилитель, собранный на базе микросхем K140УД12 (принципиальная схема представлена на рис. 2, сигнал, поступающий с усилителя, регистрировался на самописце «XY Recorder Endim 620.02».

2.5. Статистическая обработка

Результаты представлены как среднее арифметическое \pm среднеквадратичное отклонение (σ) и обработаны с помощью программного пакета Statistika

с использованием непараметрического критерия Мана-Уитни или t-теста для зависимых образцов (t-test for dependent samples). Для оценки согласованности изменений ряда параметров в моделях стрижки клеток с помощью программного пакета Statistika рассчитывались корреляционные коэффициенты для пар 1) объем WKY-7 клеток — активность НКСС; 2) активность НКСС — механическое напряжение сегментов; 3) объем WKY-7 клеток — механическое напряжение. Достоверными считали различия при значении $p < 0.05$.

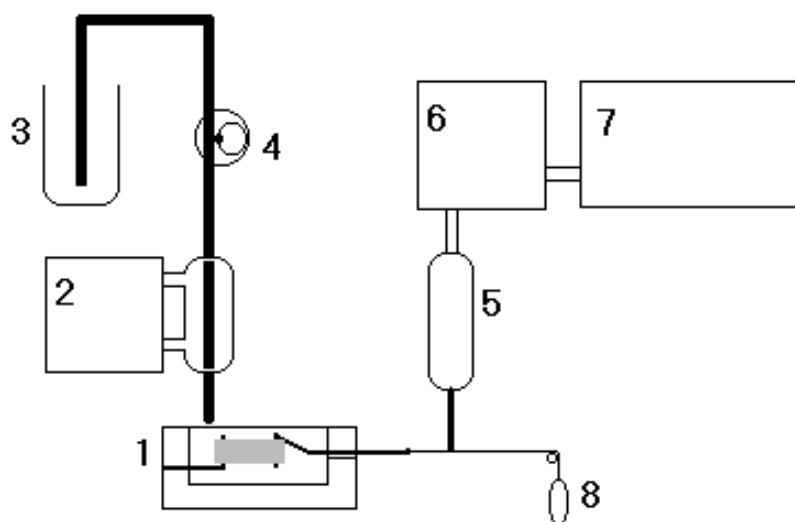


Рисунок 1. Схема установки:

1 – кювета с гладкомышечным препаратом; 2 – термостат; 3 – емкость с раствором; 4 – перистальтический насос; 5 – механотрон; 6 – усилитель; 7 – регистрирующее устройство; 8 – груз.

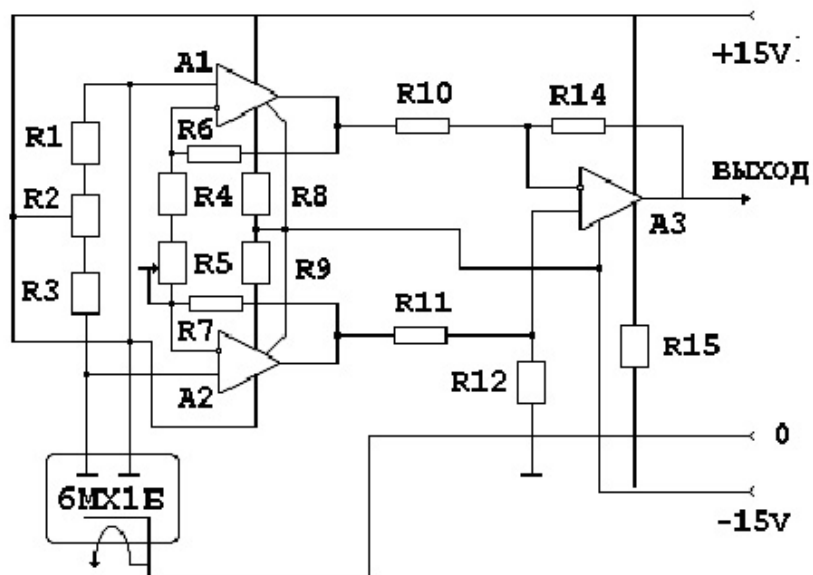


Рисунок 2. Электрическая схема установки для изучения механической активности изолированных гладкомышечных полосок

A1-A3 — микросхема К140УД12

R1, R3 — резистор МЛТ-0.125-3K ±10%

R2 — резистор ППЗ-40-1.5K

R4 — резистор МЛТ-0.125-5.1K ±10%

R5 — резистор ППЗ-40-470K

R6, R7 — резистор МЛТ-0.125-510K ±10%

R8, R9, R15 — резистор МЛТ-0.125-1M ±10%

R10-R14 — резистор МЛТ-0.125-22K ±10%

ГЛАВА III

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Сократительные реакции гладкомышечных сегментов аорты в моделях изменения объема клеток

Изменение осмолярности среды инкубации является перспективным методическим подходом для активации объем-чувствительного ионного транспорта и выяснения роли систем поддержания клеточного объема в регуляции клеточных функций. Это позволяет модулировать активность $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ ко-транспорта и других объем-чувствительных ионтранспортирующих систем клетки без дополнительного воздействия какими-либо биологически активными соединениями. Участие объем-чувствительных механизмов в регуляции сократительной активности изолированных сегментов аорты крысы было изучено при моделировании гиперосмотического и изоосмотического сжатия и гипоосмотического набухания СГМК.

3.1.1. Сокращение гладкомышечных сегментов аорты в модели гиперосмотической стрижки клеток

С целью установить влияние гиперосмотически индуцированного снижения объема клеток на механическое напряжение (МН) сосудистых сегментов (СГМС), был исследован эффект аппликации модифицированного физиологического раствора, содержащего 50–300 мМ сахарозы в качестве непроникающего осмолита (25–600 мосМ). Повышение осмолярности раствора приводило к развитию воспроизводимого сокращения, амплитуда которого поддерживалась, по крайней мере, в течение 45 мин от начала аппликации. В качестве основного исследуемого параметра во всех последующих экспериментах была выбрана амплитуда сокращения СГМС при аппликации 150 мМ сахарозы, при которой наблюдалось субмаксимальное повышение тонуса. Амплитудные и скоростные параметры сокращения оставались стабильными, по крайней мере, при трехкратном повторении аппликации 150 мМ сахарозы с последующим отмыванием в течение 30 минут между ними (рис. 3, 4). Амплитуда сокращения на 20 минуте

действия 150 мМ сахарозы составляла $51.8 \pm 9.0\%$ ($n=78$) по сравнению с величиной контрольного гиперкалиевого сокращения.

Для исключения специфического действия сахарозы на механическое напряжение сегментов был исследован сократительный эффект химически несходного с ней и также биологически инертного осмолита холинхлорида (75 мМ, 150 мосМ). Добавление холинхлорида также приводило к развитию близкого по амплитуде сокращения, величина которого составила $63.5 \pm 8.1\%$ по сравнению с величиной гиперкалиевого сокращения.

3.1.2. Сократительные реакции гладкомышечных сегментов аорты в модели изоосмотической стрикции клеток

Согласно литературным данным, как гипер-, так и изоосмотическая стрикция вызывает существенную активацию НКСС, однако при гиперосмотическом воздействии активация НКСС носит постоянный характер, а в случае изоосмотической – транзиторный [Mongin and Orlov, 2001]. Кроме того, изоосмотическая стрикция, в отличие от гиперосмотической, сопровождается RVI, что также представляет значительный интерес при сравнении результатов, полученных в этих двух моделях. С целью изучить влияние альтернативного способа снижения объема СГМК на их сократительную активность, был исследован эффект изоосмотической стрикции клеток, которая индуцировалась восстановлением осмолярности среды инкубации после длительного гипоосмотического воздействия.

Клетки экспонировали в гипоосмотической среде в течение 60 минут, что должно было привести к потере внутриклеточных осмолитов, и затем возвращали их в осмоосмотический раствор. В этой модели восстановление ионного состава раствора должно приводить к резкой транзиторной активации НКСС, что является одним из основных механизмов регуляторного увеличения объема СГМК [Mongin and Orlov, 2001]. Это было продемонстрировано с использованием WKY-7 клеток (рис. 8) при запуске изоосмотической стрикции с помощью манипуляций, аналогичных использованным при исследовании сократительной активности сегментов аорты.

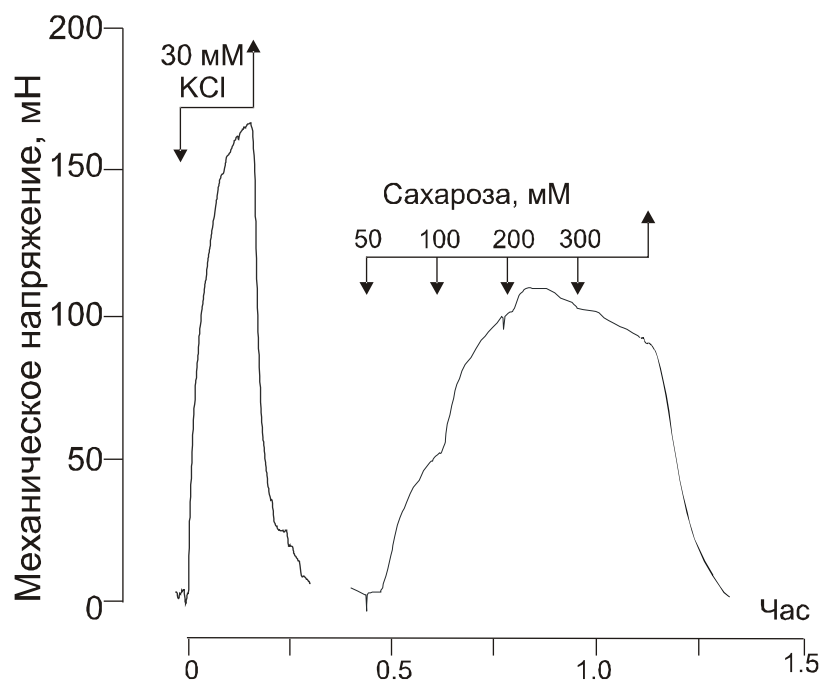


Рисунок 3. Влияние гипертонического раствора (50, 100, 200 и 300 мМ сахарозы) на механическое напряжения сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

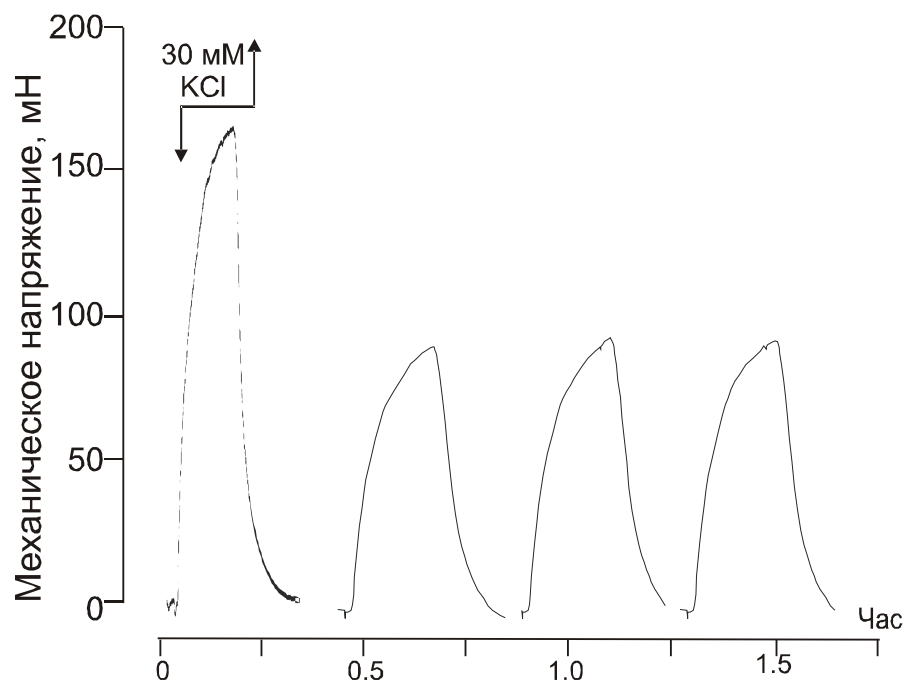


Рисунок 4. Воспроизводимость гиперосмотически-вызванного сокращения СГМС аорты крысы при трехкратном воздействии гиперосмотического раствора (150 мМ сахарозы).

По оси ординат – механическое напряжение (МН), по оси абсцисс – время (час).

Длительная преинкубация клеток в гипоосмотическом растворе должна снижать внутриклеточную концентрацию Cl^- вследствие 1) уменьшения внеклеточной концентрации ионов Cl^- из-за снижения его внеклеточной концентрации, 2) ингибирования NKCC [Russel, 2000] и 3) активации K^+, Cl^- котранспорта [Mongin and Orlov, 2001].

Восстановление осмолярности раствора до 120 мМ NaCl после 60-минутной инкубации в гипоосмотическом растворе, содержащем 40 мМ NaCl, во всех случаях приводило к развитию транзиторного сокращения, длительность которого составляла 38.8 ± 1.6 мин, а амплитуда – $21.6 \pm 8.7\%$ по сравнению с величиной гиперкалиевой контрактуры ($n=8$) (рис. 5).

3.1.3. Сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели гипоосмотического набухания клеток

Снижение осмотического давления физиологического раствора при уменьшении содержания в нем NaCl до 70.4 и 40.4 мМ вело к быстрому развитию транзиторного сокращения сегментов аорты крысы (рис. 6). Амплитуда транзитного сокращения составила $59.8\% \pm 12.3\%$ ($n=20$) и $75.7 \pm 8.9\%$ ($n=18$) по сравнению с величиной гиперкалиевого сокращения, а длительность – 25.7 ± 3.5 мин и 40 ± 4.8 мин, соответственно.

3.2. Изменения объема гладкомышечных клеток и активность NKCC

3.2.1. Объем клеток WKY-7 в моделях стрикции и набухания

С целью изучить модуляции объема клеток в условиях, соответствующих моделированию стрикции на изолированных сегментах аорты, было использовано косвенное определение содержания внутриклеточной воды, являющейся главным маркером объема клеток. Для этого использовали культуру гладкомышечных клеток аорты WKY-7, характеризующуюся максимальной экспрессией таких сократительных и регуляторных белков, как α -актин, белок SM22 и КЛЦМ, играющих важную роль в сопряжении возбуждения-сокращения. Эта линия клеток, WKY-7, также обладала наибольшей чувствительностью к ангиотензину II и эндотелину-1, измеренной по уровню митоген-активированного фосфорилирования протеинкиназы ERK1/2.

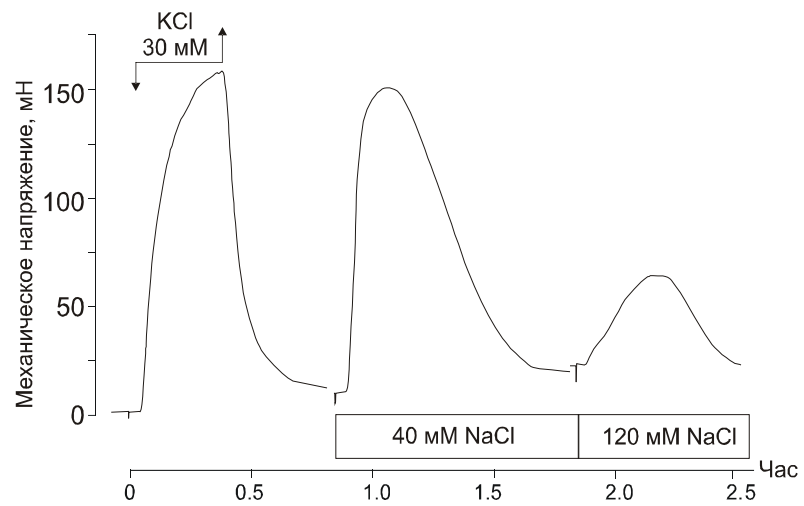


Рисунок 5. Динамика механического напряжения сегментов аорты крысы в модели изоосмотической стрикции (пояснения в тексте).

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

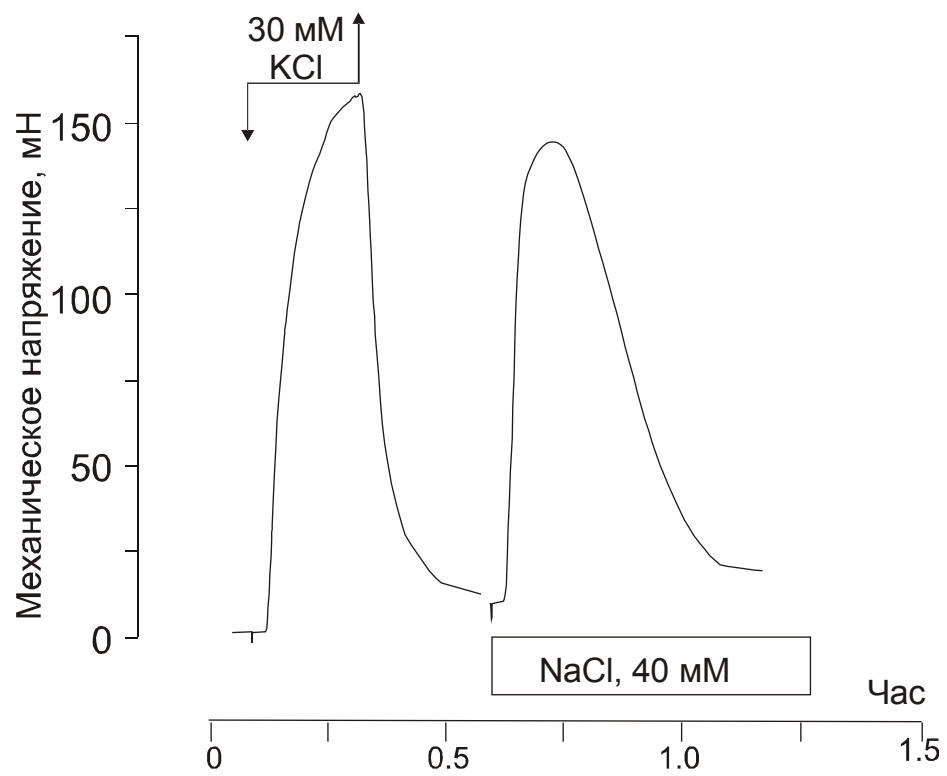


Рисунок 6. Влияние гипоосмотического раствора на механическое напряжение сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (МН), по оси абсцисс – время (час).

10-минутная инкубация клеток линии WKY-7 была достаточна для установления равновесного распределения [^{14}C]-меченой мочевины между внутриклеточной средой и средой инкубации (рис. 7А, кривая 1), что согласуется с данными о быстрой кинетике аккумуляции [^{14}C]-меченой мочевины, полученными в работах [Orlov et al., 1996-2000].

Перенос клеток в гиперосмотическую среду, содержащую 150 мМ сахарозы быстро снижал объем WKY-7 клеток на ~20%. Данное снижение объема оставалось поддерживаемым и не претерпевало существенных изменений в течение последующих 40 минут (рис. 7А, кривая 2). Рисунок Б показывает зависимость модуляции клеточного объема от осмолярности среды инкубации, изменения которой были обусловлены увеличением концентрации сахарозы с 50 до 150 мМ.

Для исследования изменения объема WKY-7 клеток в модели изоосмотического сжатия, был применен протокол, обычно используемый для подобных исследований [Orlov et al., 1992; 1996; 2004] и соответствующий схеме экспериментов, выполненных на гладкомышечных сегментах аорты (гл. 3.1.2.). Для этого клетки предварительно инкубировали в условиях глубокого гипоосмоса (40.4 мМ NaCl) в течение 60 минут, а затем осмолярность и состав раствора восстанавливали до контрольных значений (120.4 мМ NaCl). Во время предобработки в гипоосмотическом растворе запускалась потеря клетками внутриклеточных осмолитов, что при восстановлении осмолярности раствора приводило к осмотически-обусловленному выходу воды, снижению клеточного объема и активации механизмов RVI. Действительно, было обнаружено, что в данной модели стрикции объем WKY-7 клеток транзиторно снижался и через ~30 минут после переноса в изоосмотическую среду восстанавливался до исходных значений (рис. 7В).

Динамика изменения объема клеток WKY-7 и развития сократительных ответов сегментов аорты в соответствующих моделях стрикции проявляли существенное сходство (рис. 9, 10). Кривая механического напряжения сегментов была незначительно смещена вправо по сравнению с модуляциями объема клеток, что, очевидно, обусловлено меньшей скоростью диффузии растворов с измененным составом в пределах стенки сосудистых сегментов по сравнению с скоростью диффузии в культуральной среде.

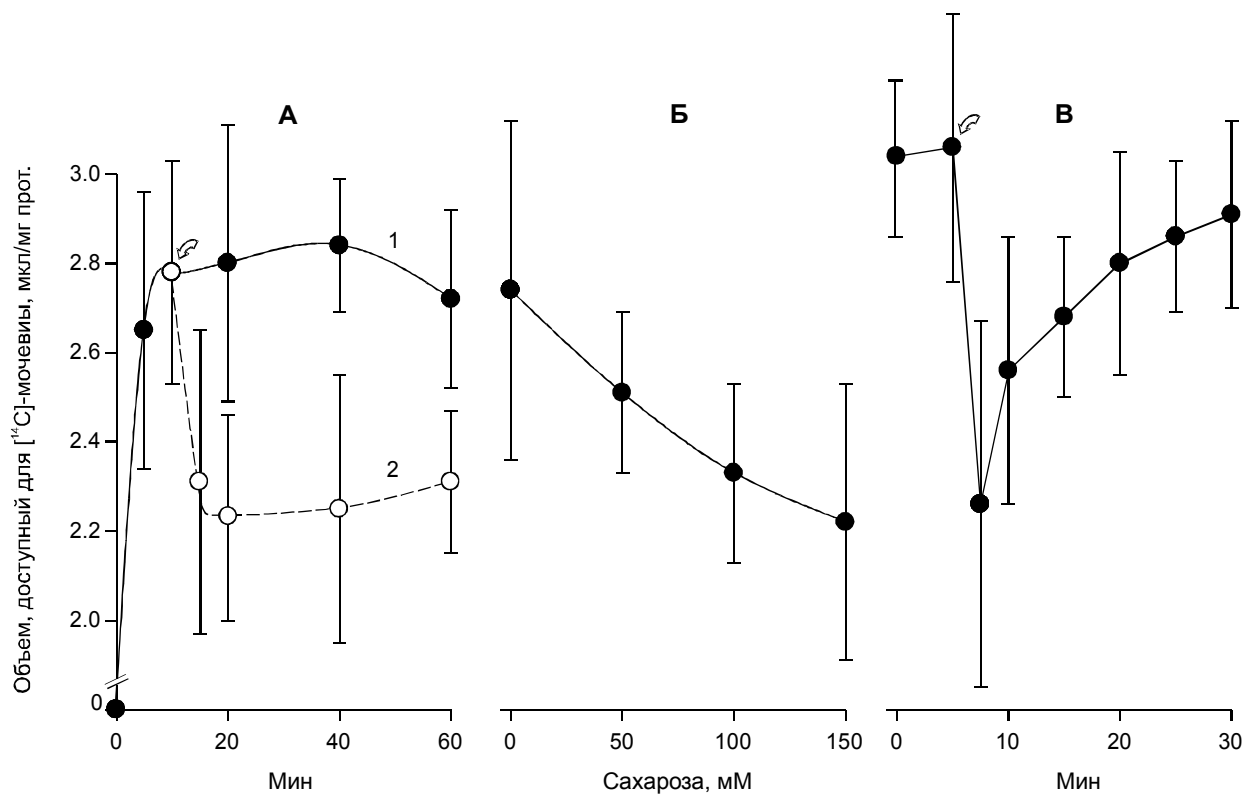


Рисунок 7. Модуляции клеточного объема при гиперосмотическом (А, Б) и изоосмотическом (В) сжатии клеток линии WKY-7. А. Кинетика модуляции объема клеток в гипертонической среде. В момент времени, указанный стрелкой, было добавлено 0.5 мл контрольного (кривая 1) или гиперосмотического (150 мМ сахарозы) (кривая 2) раствора. Б. Зависимость клеточного объема от осмолярности среды инкубации. В. Кинетика модуляции объема клеток при

изоосмотическом сжатии. В момент времени, указанный стрелкой, среда инкубации была аспирирована, и был добавлен изоосмотический раствор (120.4 mM NaCl), содержащий [¹⁴C]-меченую мочевины.

3.2.2. Активность НКСС в культуральных клетках линии WKY-7 в моделях гиперосмотической и изоосмотической стрикции

Как известно, одним из ключевых механизмов стабилизации объема клеток при стрикции, вызванной абсолютным или относительным увеличением осмотического давления среды, является активация НКСС [Mongin and Orlov, 2001; Lang, 2000; Russel, 2000]. Несмотря на то, что резкая активация НКСС характерна как для гипер-, так и для изоосмотической стрикции, особенностью СГМК по сравнению с другими типами клеток является то, что НКСС опосредует RVI только в случае изоосмотической, но не гиперосмотической, стрикции. Более того, при гиперосмотическом сжатии сосудистых ГМК RVI не наблюдается вообще. Для оценки возможного вклада НКСС в сократительные реакции СГМС в моделях стрикции, была исследована динамика изменения активности этого котранспортера в клетках WKY-7 с учетом схем экспериментов, использованных в работе с сегментами аорты. Активность НКСС оценивалась как буметанид-чувствительный компонент накопления ^{86}Rb , транспорт которого через цитоплазматическую мембрану характеризуется существенным сходством с переносом ионов K^+ .

В присутствии ингибитора Na^+, K^+ -АТФазы убаина добавление 10 мкМ буметанида снижало значение накопления K^+ (^{86}Rb) в ~ 3 раза (рис. 8А, линия 2). Дальнейшее повышение концентрации этого соединения до 100 мкМ незначительно влияло на вход K^+ (^{86}Rb) (рис. 8А, линия 3). Эти данные согласуются со значением K_i для этого соединения в пределах от 0.2 до 2 мкМ [Russel, 2000]. Повышение осмолярности среды при добавлении 150 мкМ сахарозы вело к ~ 3 -кратной активации НКСС (рис. 8Б, кривая 1). Дальнейшее повышение осмолярности среды ингибировало активность НКСС. Угнетение НКСС, вероятно, обусловлено рекипрокным ингибированием котранспортера внутриклеточным Cl^- [Russel, 2000]. Кроме того, повышение осмолярности среды снижало (убаин+буметанид)-резистентный вход K^+ (^{86}Rb) с ~ 7 до 2 нМ·(мг протеина) $^{-1}$ ·5 мин $^{-1}$ (рис. 8Б, кривая 2). Этот эффект полностью исчезал в отсутствие Cl^- , что

указывает на подавление базальной активности К-Сl котранспорта в гиперосмотической среде (рис. 8Б, кривая 3). Несмотря на то, что активность К-Сl котранспорта также подавляется петлевыми диуретиками, константа ингибирования ($K_{1/2}$) К-Сl котранспорта буметанидом имеет более высокие значения, чем для НКСС. Так, в эпителии почек кролика $K_{1/2}$ составляет ~60 мкМ [Gillen et al., 1996] и ~190 мкМ в гипоосмотически-активированных клетках почечного эпителия человека линии HEK-293 [Gillen and Forbush, 1999].

Повышение активности НКСС сохранялось до 30-ой минуты инкубации клеток в гиперосмотическом растворе (рис. 8В, кривая 2). В противоположность этому, изоосмотическое сжатие вело к транзиторной активации этого переносчика, которая полностью исчезала к 30-ой минуте после переноса клеток из гипоосмотической в изоосмотическую среду (рис. 8В, кривая 3).

Полученные сведения о динамике изменения объема и активности НКСС клеток линии WKY-7 согласуются с данными об изменениях механического напряжения СГМС в соответствующих моделях стрикции клеток (рис. 9, 10). Коэффициенты корреляции для пар: 1) объем WKY-7 клеток — активность НКСС, 2) объем WKY-7 клеток — амплитуда сокращения СГМС и 3) активность НКСС — амплитуда сокращения СГМС составляли 0.94, 0.94, 0.90 в случае гиперосмотической стрикции и 0.94, 0.61, 0.65 при изоосмотической стрикции, соответственно ($p < 0.05$).

Особую роль НКСС играет в регуляции сокращения СГМС в модели изоосмотической стрикции. Блокатор НКСС буметанид (10 мкМ), ингибировал НКСС, подавлял RVI и пролонгировал сокращение СГМС (гл. 3.3.1.). Этот факт свидетельствует о первичной роли снижения объема клеток в развитии сокращения СГМС в модели изоосмотической стрикции.

Механизмы функциональной связи клеточного объема, активности НКСС и сократительной активности СГМК, по всей видимости, включают следующие этапы:

1. индуцированную стрикцией активацию сенсора клеточного объема не установленной природы,
2. изменение активности объем-чувствительной киназы [Waldegger et al., 1997], которой наиболее вероятно является серин-треониновая киназа(ы) hsgk, препятствующая осмотической стрикции клеток [Wagner et al., 2000],
3. опосредованную объем-чувствительной киназой hsgk активацию НКСС [Lang et al., 2002], сопряженную с фосфорилированием молекулы ко-транспортера [Russel, 2000],
4. НКСС-опосредованное увеличение $[Cl^-]_i$,
5. развитие сокращения СГМК или в результате Cl^- -опосредованной деполяризации мембраны (происходящей в случае активации Cl^- каналов), или в результате запуска внутриклеточных Cl^- -зависимых регуляторных процессов. Последнее предположение подтверждается идентификацией Cl^- -чувствительных каскадов, вовлекающих Cl^- -зависимые протеиновые киназы, однако их роль была подтверждена пока только в процессах регуляции активности ряда мембранных протеинов респираторного эпителия [Treharne KJ et al., 1994; Muimo R et al., 1998] и GABA_A рецепторов нейронов коры головного мозга [Lanius RA et al., 1993].

3.3. Изучение вовлечения НКСС в сократительные реакции гладкомышечных сегментов аорты крысы в моделях изменения клеточного объема, при аппликации БАВ и гиперкалиевой деполяризации мембраны

С целью выяснить, вовлекается ли НКСС в сократительные ответы, развивающиеся при моделировании набухания и стрикции СГМК и при их активации с помощью БАВ и гиперкалиевого раствора, было исследовано влияние селективного блокатора НКСС буметанида на развитие сокращений изолированных сегментов аорты крысы при действии контрактильных стимулов различной природы.

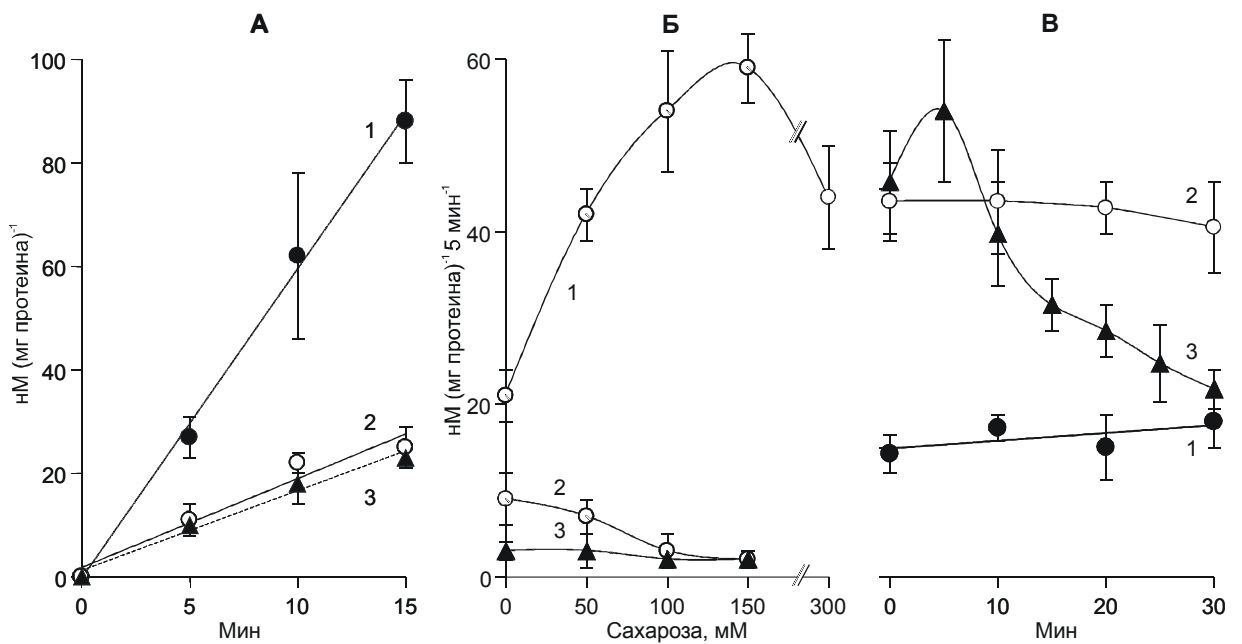


Рисунок 8. Объем-зависимая модуляция НКСС в сосудистых ГМК. **А.** Влияние буметанида на вход K^+ (^{86}Rb). **Б.** Зависимость активности НКСС (кривая 1) и буметанид-резистентного компонента входа ^{86}Rb (кривые 2 и 3) от осмолярности среды инкубации. **В.** Кинетика модуляции активности НКСС при

*гиперосмотическом (2) и изоосмотическом (3) сжатии клеток. * $p < 0.001$ при сравнении со значениями кривой 3.*

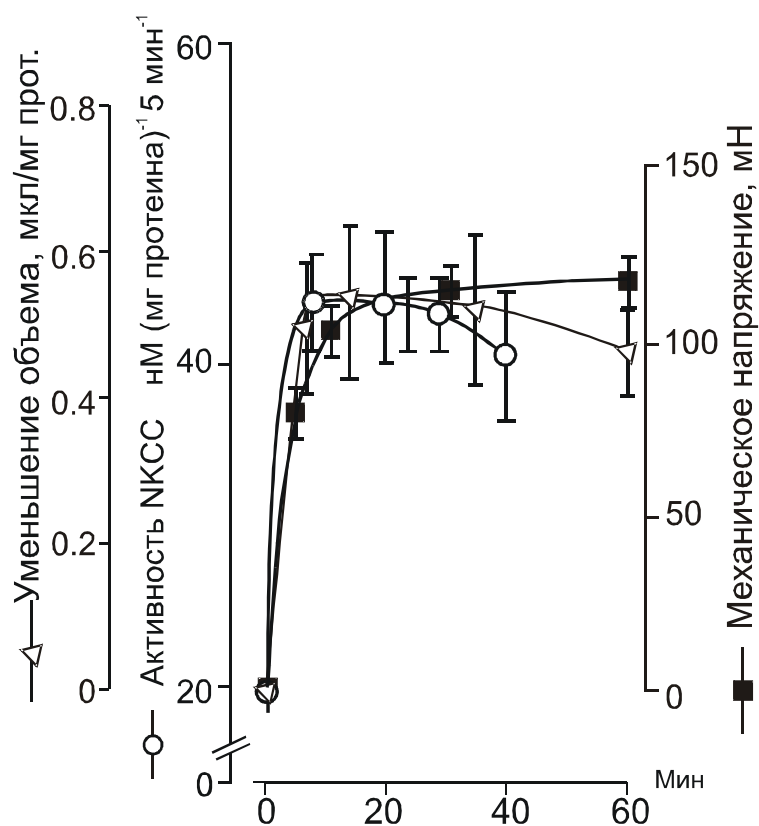


Рисунок 9. Зависимость амплитуды сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы, активности НКСС и уменьшения объема WKY-7 клеток от времени инкубирования в гиперосмотической среде, содержащей 150 мМ сахарозы. Уменьшение объема клеток рассчитывалось как разность между объемами контрольных клеток и клеток, экспонированных в гиперосмотическом растворе, в соответствующие моменты времени.

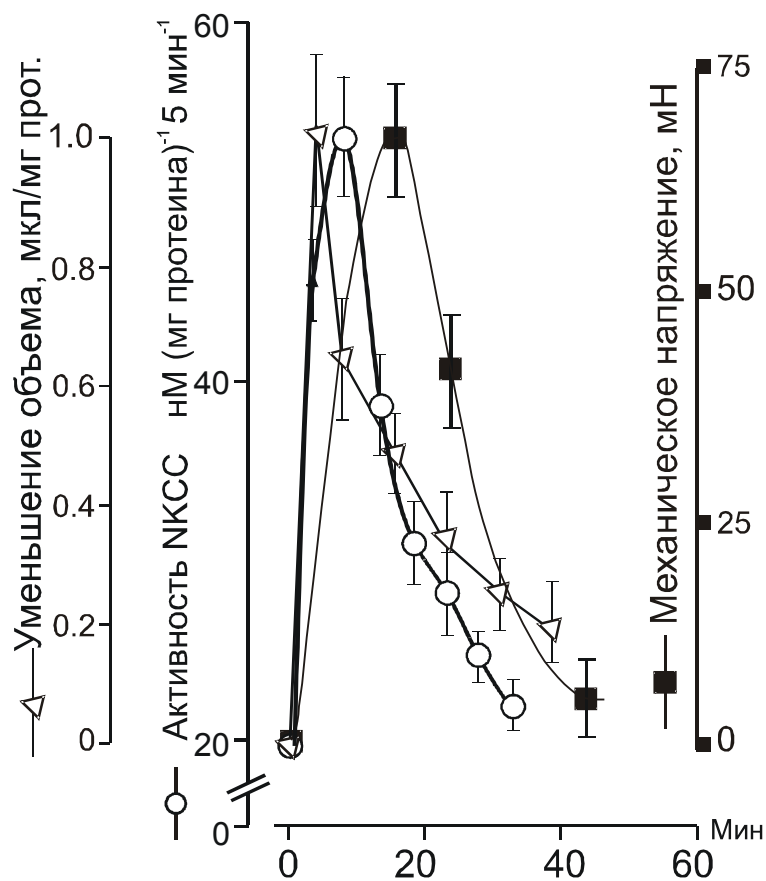


Рисунок 10. Зависимость амплитуды сокращения сегментов, активности НКСС и уменьшения объема гладкомышечных клеток WKY-7 в модели изоосмотической стрижки клеток от времени со старта изоосмотической стрижки клеток. Уменьшение объема клеток рассчитывалось как разность между

объемами контрольных клеток и клеток в модели изоосмотического сжатия в соответствующие моменты времени.

3.3.1. Роль НКСС в сокращениях гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированных модуляциями клеточного объема

3.3.1.1. Роль НКСС в развитии гиперосмотически-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы

Согласно данным Орлова С.Н. [Orlov et al., 1992], гиперосмотическое воздействие ведет к стрикции клеток, сопровождающейся поддерживаемой активацией НКСС. Предобработка сегментов в течение 5, 15, 30 или 60 минут селективным ингибитором этого переносчика буметанидом в концентрации 10–100 мкМ снижала амплитуду сокращения, индуцированного гиперосмотическим воздействием. Степень ингибирующего действия буметанида зависела от времени предобработки и достигала максимальных значений после 30 мин инкубации (рис. 11, табл. 3).

Таблица 3. Влияние буметанида на амплитуду сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированного гиперосмотическим раствором (150 мМ сахарозы).

Буметанид, мкМ	Время предобработки,		Амплитуда сокращения, %
	мин		
Контроль	-		100
	5		88.2±5.8** (n=7)
	15		91.3±9.3 (n=5)
	30		82.5±9.0* (n=6)
10	60		66.8±5.1** (n=6)
	15		80.8±12.1* (n=7)
	30		63.8±7.7** (n=7)
	60		65.5±10.0* (n=6)
50	15		94.5±6.6 (n=6)
	30		64.8±7.6** (n=6)
	60		62.5±10.9** (n=5)
100	15		94.5±6.6 (n=6)
	30		64.8±7.6** (n=6)
	60		62.5±10.9** (n=5)

*, **p<0.05 и 0.005, соответственно.

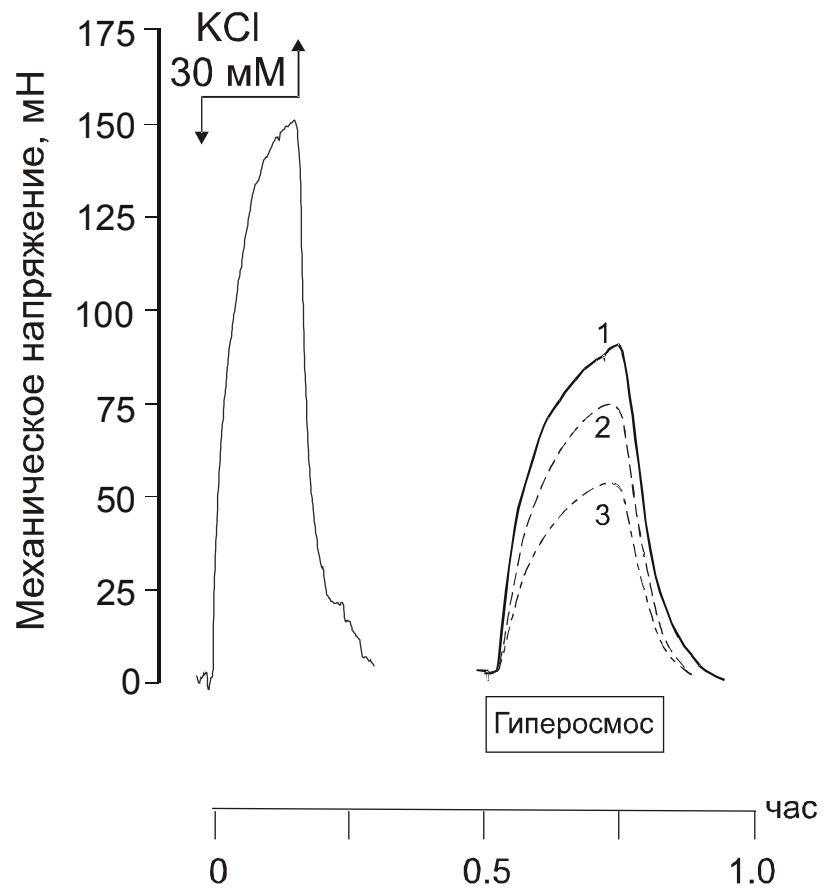


Рисунок 11. Сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели гиперосмотической стрижки клеток в отсутствии (кривая 1, сплошная

линия) и присутствии 10-мкМ (кривая 2, пунктир) или 100-мкМ буметанида (кривая 3, пунктир).

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

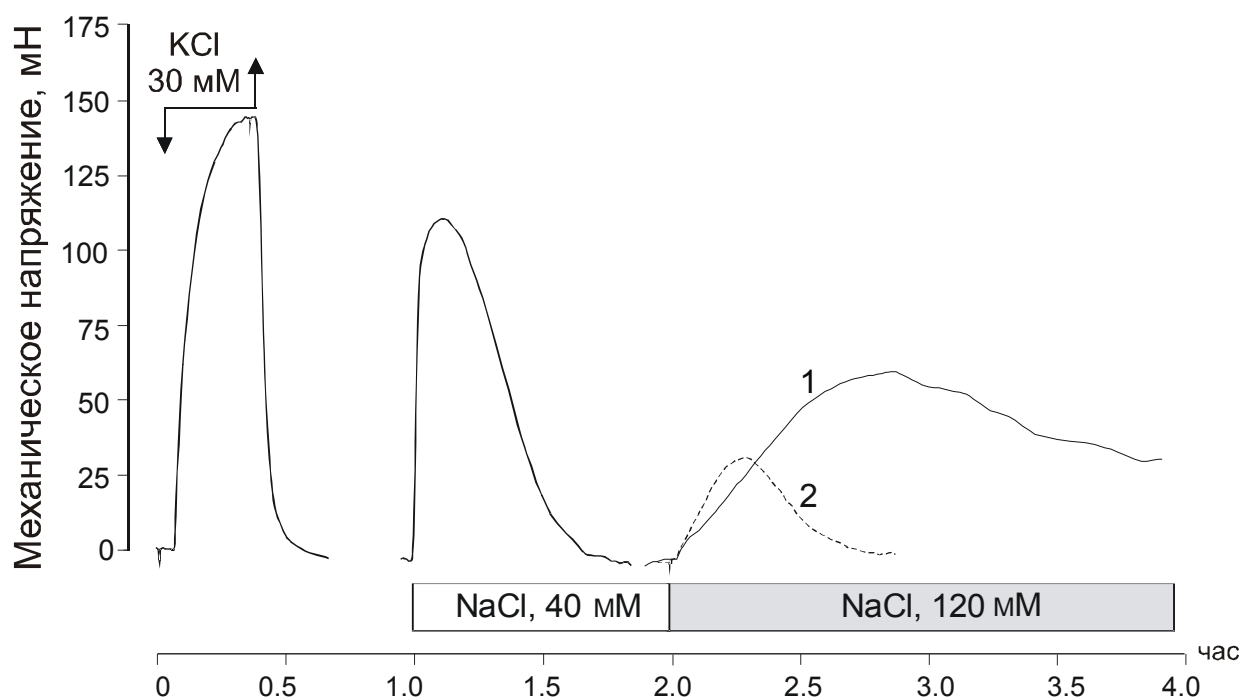


Рисунок 12. Сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели изоосмотической стрижки клеток в отсутствии (кривая 1, сплошная линия) и присутствии 10-мкМ буметанида (кривая 2, пунктир).

Буметанид добавлялся за 5 минут до восстановления ионного состава раствора.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

Одной из наиболее вероятных гипотез подавляющего действия буметанида и вовлечения НКСС в регуляцию гиперосмотически индуцированного сокращения является НКСС-опосредованный контроль $[Cl^-]_i$. В свою очередь, $[Cl^-]_i$ может участвовать в сопряжении возбуждения и сокращения, обеспечивая деполяризацию мембраны при открывании или активации хлорных каналов. Это предположение основано на том, что в СГМК экспрессированы хлорные каналы, по крайней мере, трех субтипов [Chipperfield and Harper, 2000]. Эти каналы могут обеспечивать выход хлора и появление деполяризующего хлорного тока. В то же время, нельзя исключить и другие $[Cl^-]_i$ -зависимые механизмы регуляции сократительной активности СГМК, так как в не мышечных клетках были описаны Cl^- -чувствительные регуляторные каскады, включающие Cl^- -зависимые протеинкиназы [Treharne et al., 1994; Muimo et al., 1998; Lanius et al., 1993], однако это предположение требует дальнейшего исследования.

3.3.1.2. Роль НКСС в развитии сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели изоосмотической стрикции клеток

Транзиторная активация НКСС является основным механизмом RVI при изоосмотической стрикции СГМК [Mongin and Orlov, 2001; Lang, 2000; Russel, 2000]. Для выявления вклада этого переносчика в развитие транзиторного сокращения, развивающегося в модели изоосмотического снижения объема, был исследован эффект селективного блокатора НКСС буметанида. 5 – 60-минутная предобработка буметанидом (10 мкМ) существенно удлиняла сокращение СГМС ($p < 0.005$, табл. 4) независимо от времени предобработки. При этом имелась тенденция к увеличению амплитуды сокращения.

Полученные данные указывают на важную роль клеточного объема в развитии сокращения СГМС при изоосмотической стрикции. По всей видимости, буметанид, блокируя НКСС и отменяя, таким образом, RVI, препятствует нормализации механического напряжения СГМС. Участие клеточного объема в сократительной регуляции механического напряжения гладких мышц может быть обусловлено целым рядом механизмов.

Таблица 4. Влияние 5-минутной предобработки буметанидом на амплитуду и длительность сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели изоосмотической стрижки (% гиперкалиевого сокращения (30 мМ KCl)).

	Максимальная амплитуда сокращения СГМС, % гиперкалиевого сокращения (30 мМ KCl)	Длительность сокращения, мин
Контроль	21.6±8.7 (n=8)	38.8±1.6 (n=8)
Буметанид, 10 μМ	39.5±14.7 (n=6)	143.8±8.5* (n=5)

* $p < 0.005$

Одним из наиболее вероятных механизмов вовлечения клеточного объема в регуляцию функций клеток является молекулярная трансформация мембраны кавеол. Это сопровождается транслокацией специфических протеинов и протеинкиназ в область кавеол, а также изменение функционирования локализованных в области кавеол ионных транспортеров и сопряженных с ними внутриклеточных регуляторных каскадов [Anderson, 1998; Okamoto et al, 1998; Trouet et al., 1999; 2001; Kang et al, 2000]. Было показано, что состояние кавеол имеет важное значение для сопряжении возбуждения и сокращения СГМК [Urban et al., 2003]. Действительно, кавеолы играют ключевую роль в кальций-опосредованной сигнализации и могут вести себя как универсальный клеточный осмометр [Page et al, 2000; Kordylewski et al, 1993], пространственная организация которого модулируется изменениями осмолярности среды и функционирование которого поддерживается высокой экспрессией в кавеолах аквапорина [Kordylewski et al, 1993; Grunnet et al, 2003].

Кроме того, изменения объема клеток могут вести к изменению активности биомакромолекул из-за их концентрирования или делюции [Burg, 2000; Cuneo et al., 1992]. Роль общей концентрации макромолекул (macromolecular crowding) была показана в регуляции активности эритроцитарного K-Cl ко-транспорта [Colclasure and Parker, 1992] и ряда других молекул [Rohwer et al., 1998; Minton, 1993; Kinjo and Takada, 2002; Madden and Herzfeld, 1993], что позволило даже высказать предположение о том, что суммарная концентрация макромолекул может играть роль сенсора клеточного объема [Burg, 2000].

3.3.1.3. Роль НКСС в развитии гипоосмотически-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы

Предобработка СГМС блокатором НКСС буметанидом (10 мкМ) существенно снижала величину гипоосмотически индуцированного сокращения, вызванного снижением наружной концентрации NaCl до 70.4 мМ. Подавляющее действие 10-мкМ буметанида усиливалось при увеличении времени инкубации с 10 до 30 мин. В последнем случае происходило полное подавление гипоосмотически индуцированного сокращения, так же как и в случае 15-мин предобработки 100-мкМ буметанидом (рис. 13, 14). Полученные данные свидетельствуют о вовлечении НКСС в обеспечении сократительной активности СГМС при гипоосмотическом набухании клеток.

По всей видимости, основным НКСС-опосредованным механизмом, участвующим в гипоосмотически индуцированном сокращении, является предварительное создание неравновесного электрохимического потенциала Cl⁻, снижение которого может происходить при гипоосмотической активации объем-чувствительных хлорных каналов, ведя к деполяризации мембраны и активации потенциал-зависимых Ca²⁺ каналов с последующим развитием классического кальций-зависимого сокращения. В связи с предложенной гипотезой, транзиторный характер сокращения может быть обусловлен несколькими факторами: 1) ингибированием НКСС в гипоосмотической среде [Russel, 2000], 2) снижением электрохимического градиента хлора в результате активации K-Cl котранспорта [Adragna et al., 2000] и выхода Cl⁻ через объем-активированные хлорные каналы и 3) инактивацией или закрыванием объем-чувствительных Cl⁻ каналов за счет развивающегося RVI [Mongin and Orlov, 2001; Lang, 2000]. Основным механизмом последнего в СГМК является выход K⁺ по харибдотоксин-чувствительным Ca²⁺-активируемым K⁺ каналам [Anfinogenova et al., 2001], что само по себе может также вызывать реполяризацию мембраны СГМК и вносить вклад в расслабление.

EMBED CorelDRAW.Graphic.12

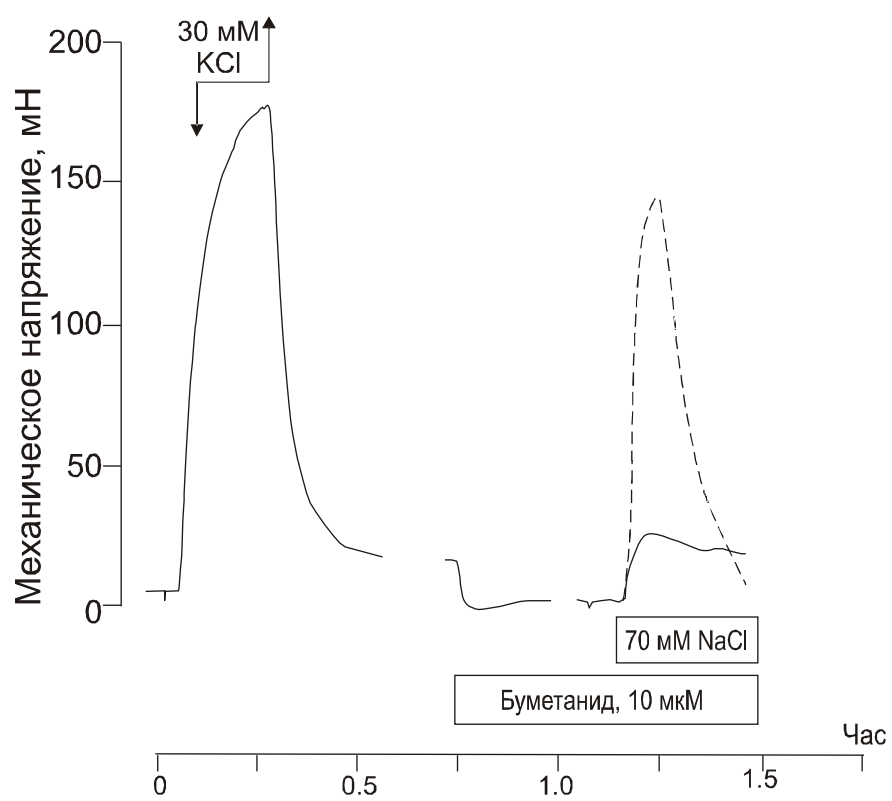


Рисунок 13. Влияние предобработки буметанидом (10 мкМ) на развитие гипоосмотически-индуцированного сокращения.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

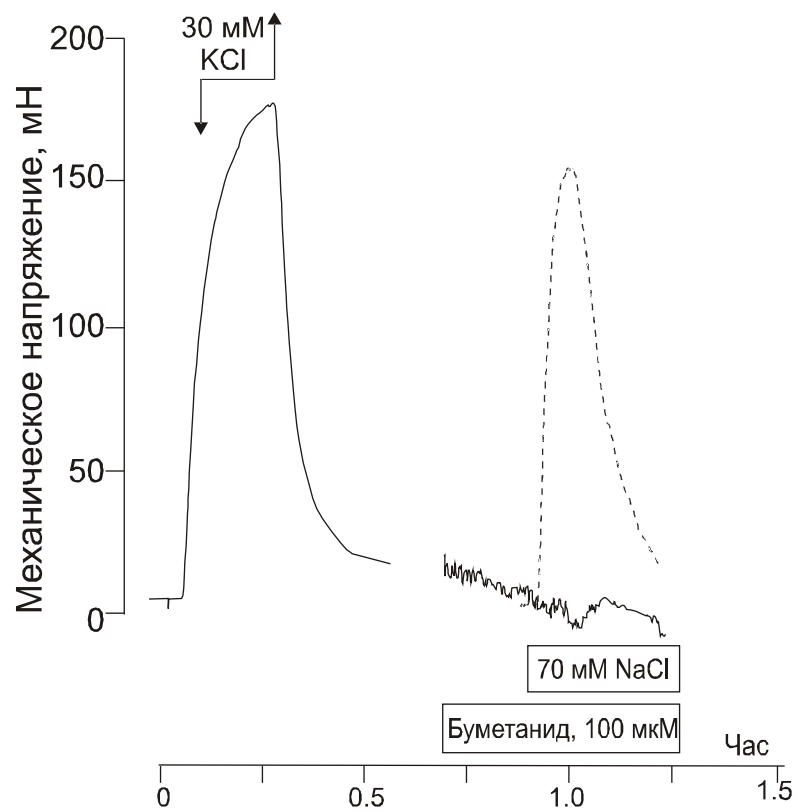


Рисунок 14. Влияние предобработки буметанидом (100 мкМ) на гипосмотически-индуцированное сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (МН), по оси абсцисс – время (час).

3.3.2. Роль НКСС в сокращении гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированном гиперкалиевой деполяризацией мембраны

Одним из предполагаемых механизмов действия селективного блокатора НКСС буметанида является его способность вызывать гиперполяризацию мембраны СГМК за счет снижения НКСС-опосредованного Cl^- градиента и, таким образом, подавления хлорных токов. Данная гипотеза основана на прямых свидетельствах о гиперполяризующем действии этого соединения на мембрану СГМК [Davis et al, 1993], а также на данных, согласно которым НКСС участвует в создании неравновесного градиента анионов хлора [Davis, 1992; Koncz and Daugiras, 1994; Davis et al., 2000], являющегося причиной деполяризующего хлорного тока при активации хлорных каналов плазмалеммы. Эта гипотеза позволила предположить, что буметанид должен оказывать ингибирующее действие на развитие сокращения, индуцированного умеренной гиперкалиевой деполяризацией СГМК. Действительно, предобработка СГМС буметанидом (10, 50, 100 мкМ) в течение 5, 15, или 30 минут снижала максимальную амплитуду гиперкалиевого (KCl, 30 мМ) сокращения (табл. 5). При этом 30-минутная предобработка (50, 100 мкМ буметанид) вела к двукратному подавлению амплитуды сокращения.

Таблица 5. Влияние буметанида на амплитуду гиперкалиевого сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы. * $P < 0.05$; ** $P < 0.002$; *** $P < 0.0005$

Буметанид, мкМ	Время предобработки, мин	Амплитуда гиперкалиевого (30 мМ KCl) сокращения, %
-	-	100
10	5	87.4±6.3* (n=5)
	15	66.4±9.1*** (n=8)
	30	65.0±12.4** (n=7)
50	5	79.5±4.9** (n=6)
	15	72.8±5.5*** (n=7)
	30	49.3±20.1** (n=4)

100	5	63.8±10.8** (n=5)
	15	66.2±12.6** (n=6)
	30	48.9±9.1** (n=5)

На основе гипотезы о гиперполяризующем действии буметанида было сформулировано предположение, что действие этого соединения должно проявляться в большей степени в случае сокращения, индуцированного слабой или умеренной деполяризацией мембраны, в то время как при сильной деполяризации мембраны влияние буметанида на амплитуду сократительного ответа должен относительно снижаться. Для проверки данного предположения было исследовано влияние буметанида на амплитуду сокращения, индуцированного эквивалентным замещением 60 мМ NaCl на KCl. Данная концентрация KCl была выбрана в связи с тем, что вызывала субмаксимальное по амплитуде повышение МН и, в то же время, снижение концентрации NaCl до 60.4 мМ в данном случае не должно было оказывать существенного влияния на активность NKCC, $K_{1/2}$ которого равна ~25 мМ NaCl [Russel, 2000].

Действительно, амплитуда сокращения, индуцированного сильной деполяризацией мембраны (60 мМ KCl) после 30-минутной предобработки сегментов 100 мкМ буметанида практически не изменялась (~97±4% по сравнению с контролем, n=7, p>0.5) (рис. 15А,Б). Полученные результаты свидетельствуют в пользу вышеприведенной гипотезы. Эти данные указывают также на отсутствие значимого побочного влияния буметанида на основные звенья сопряжения возбуждения-сокращения в СГМК при гиперкалиевой деполяризации.

Полученные данные могут служить свидетельствовать о вовлечении NKCC в поддержание мембранного потенциала покоя сосудистых ГМК. Вместе с тем, полученные результаты противоречит данным Akar et al. (1999) о неэффективности буметанида в отношении подавления амплитуды гиперкалиевого сокращения. Указанное противоречие частично может быть объяснено генетическими различиями экспериментальных животных. Так, Akar использовал в качестве объекта аорту крыс линии Sprague-Dawley и придерживался другого протокола проведения эксперимента, в котором ограничивался 20-минутной предобработкой 10-мкМ буметанидом, в то время как в представляемой работе макси-

мальный эффект буметанида наблюдался при 100-мкМ концентрации и 30-минутной предобработке.

Несмотря на то, что полное блокирование НКСС при аппликации 10-мкМ буметанида в культуральных клетках наступает быстро, можно предположить существование сложных пространственно-временных характеристик его распределения на тканевом уровне в стенке сосуда. Однако даже при быстром ингибировании котранспортера буметанидом, может требоваться значительное время для уменьшения хлорного градиента в не стимулированных клетках. Это предположение вносит ясность в тот факт, что при различных типах стимуляции гладких мышц (например, при изоосмотической стрижки и гиперкалиевой деполяризации мембраны) максимальный эффект буметанида наблюдается при различно времени предобработки.

3.3.3. Роль НКСС в сокращениях гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированных аппликацией БАВ

С целью установить вовлечение НКСС в механизмы сократительного действия вазоактивных соединений, было исследовано действие селективного блокатора НКСС буметанида на развитие фенилэфрин(ФЭ)- и ангиотензин(АТ II)-индуцированного сокращения СГМС аорты крысы. Данные агонисты были выбраны в силу важной их физиологической роли в регуляции тонуса сосудов.

Предобработка СГМС буметанидом (10, 50, 100 мкМ) в течение 5, 15, или 30 минут достоверно снижала максимальную амплитуду ФЭ(1 мкМ)-индуцированного сокращения (табл. 6). Максимальный эффект 10-мкМ буметанида достигался уже после 5 минут преинкубации и практически не изменялся при удлинении времени предобработки. Полученные данные согласуются с данными, полученными на клетках линии WKY-7, что буметанид в концентрации 10 мкМ вызывает быстрое и полное ингибирование убаин-резистентного входа K^+ (^{86}Rb). Тем не менее, увеличение концентрации буметанида до 100 мкМ значительно усиливало ингибирующий эффект буметанида при 30-минутной предобработке. При этом максимальная амплитуда ФЭ-индуцированного сокращения снижалась до 11.7 ± 4.5 ($n=9$, $p<0.0001$) (рис. 17, табл. 6) по сравнению с контролем. Ингибирующее действие 100-мкМ буметанида сохранялось после устране-

ния этого соединения из раствора, по крайней мере, в течение последующих 40 минут.

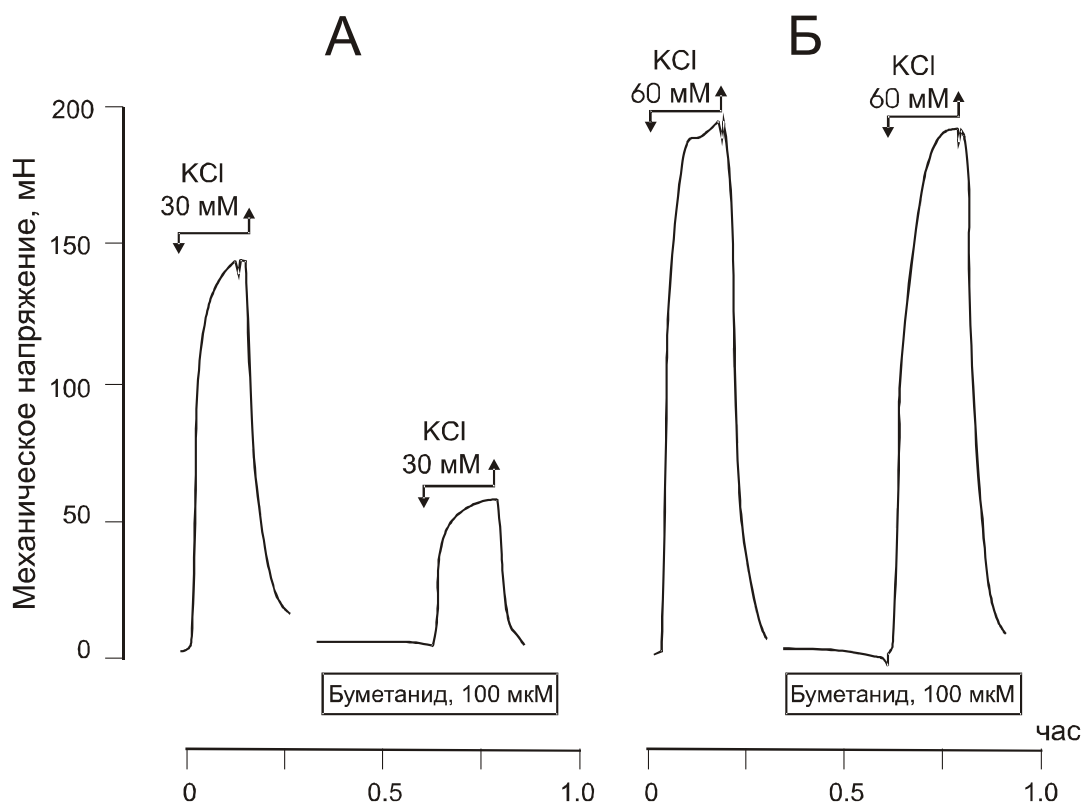


Рисунок 15. Влияние буметанида на сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированное слабой (А) и сильной (Б) деполяризацией мембраны в растворе, дополнительно содержащем 30 и 60 мМ КСl.

По оси ординат – механическое напряжение (МН), по оси абсцисс – время (час).

Полученные в этой экспериментальной серии результаты отличаются от ранее опубликованных данных [Akar et al., 1999], согласно которым 20-минутная предобработка 10 мкМ-буметанидом незначительно снижала ФЭ(1 мкМ)-индуцированное сокращение. Согласно данным Akar et al., существенное ингибирующее действие буметанида проявлялось только в отношении сокращения, индуцированного аппликацией 10–30 нМ ФЭ, то есть при использовании концентрации ФЭ на полтора-два порядка более низкой. Противоречивость данных, касающихся ингибирующего действия буметанида может быть объяснена как различием экспериментальных животных, использованных в данном исследовании и в работе Akar et al., так и применение различных концентраций буметанида. Различия в линиях использованных животных как причина различного действия буметанида вполне может заслуживать внимание в связи с тем, что в нашем исследовании не только ФЭ-, но KCl(30 мМ)-индуцированное сокращение отличалось большей чувствительностью к буметаниду.

Таблица 6. Влияние буметанида на амплитуду ФЭ(1 мкМ)-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы.

Буметанид, μМ	Время предобработки, мин	Амплитуда ФЭ-индуцированного сокращения, %
Контроль	-	100
10	5	63.3±10.8 (n=7, p<0.0002)
	15	63.1±12.6 (n=6, p<0.001)
	30	55.3±9.8 (n=7, p<0.01)
50	5	77.3±8.7 (n=7, p<0.01)
	15	49.9±29.1 (n=6, p<0.01)
	30	49.9±9.8 (n=6, p<0.01)
100	5	48.8±11.1 (n=7, p<0.005)
	15	57.9±12.9 (n=7, p<0.01)
	30	11.3±4.3 (n=9, p<0.0000001)

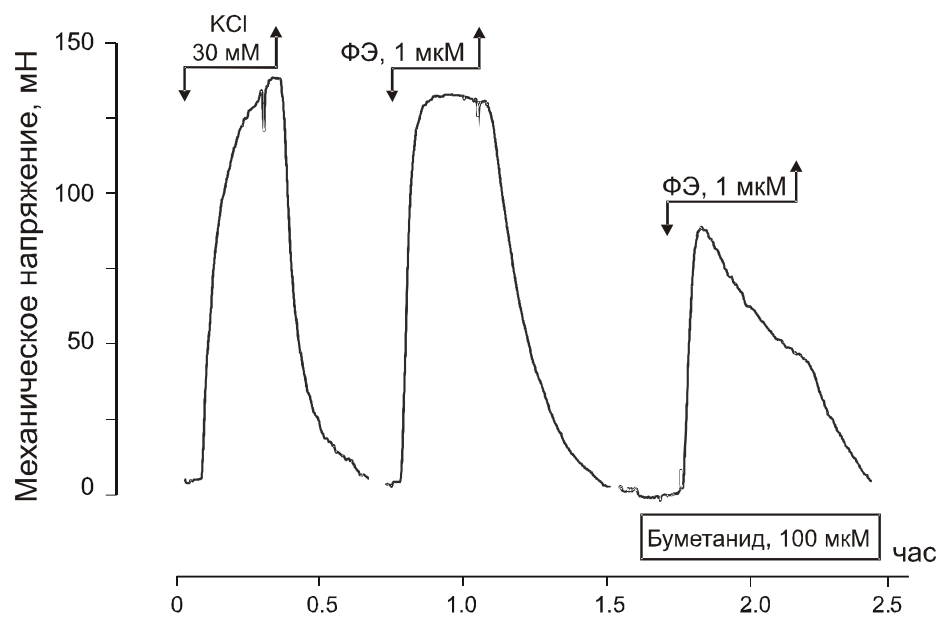


Рисунок 16. Влияние 10-минутной предобработки буметанидом (100 мкМ) на развитие ФЭ-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

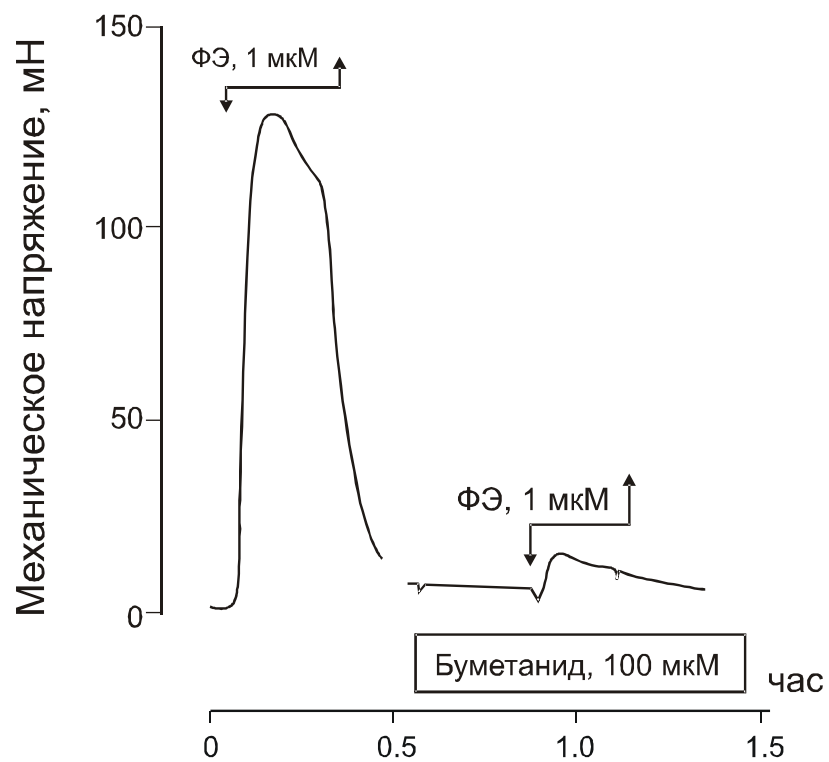


Рисунок 17. Влияние 30-минутной предобработки буметанидом (100 мкМ) на развитие ФЭ-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

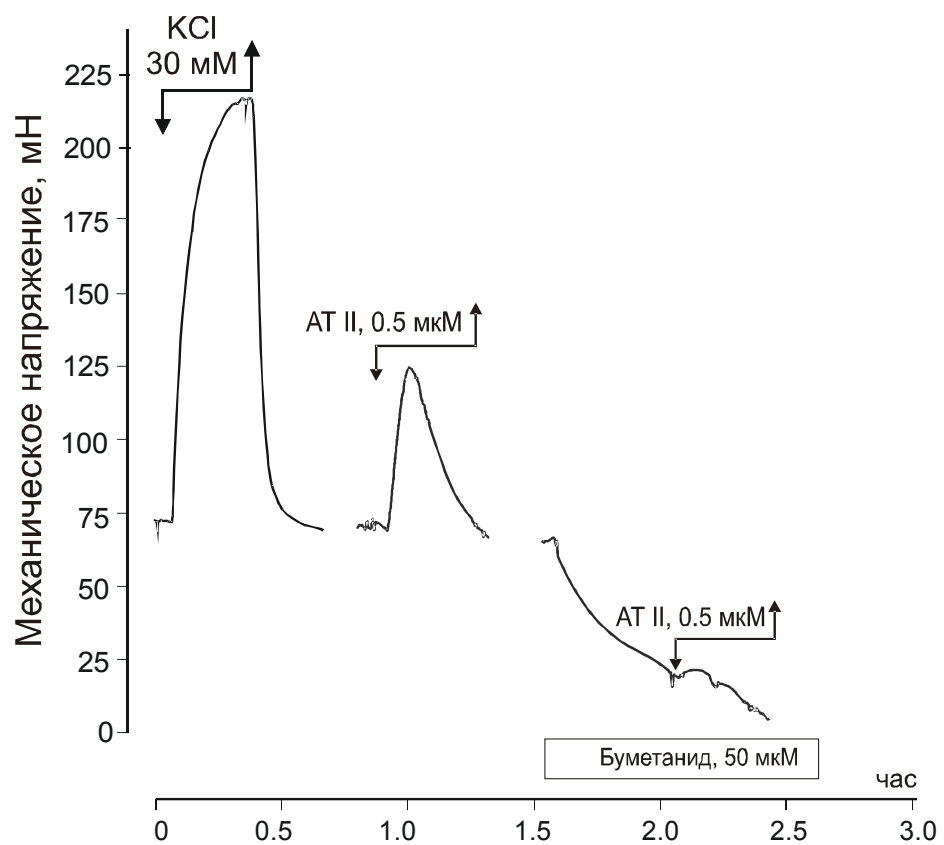


Рисунок 18. Влияние 15-минутной предобработки буметанидом (50 мкМ) на развитие АТ II-индуцированного сокращения сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

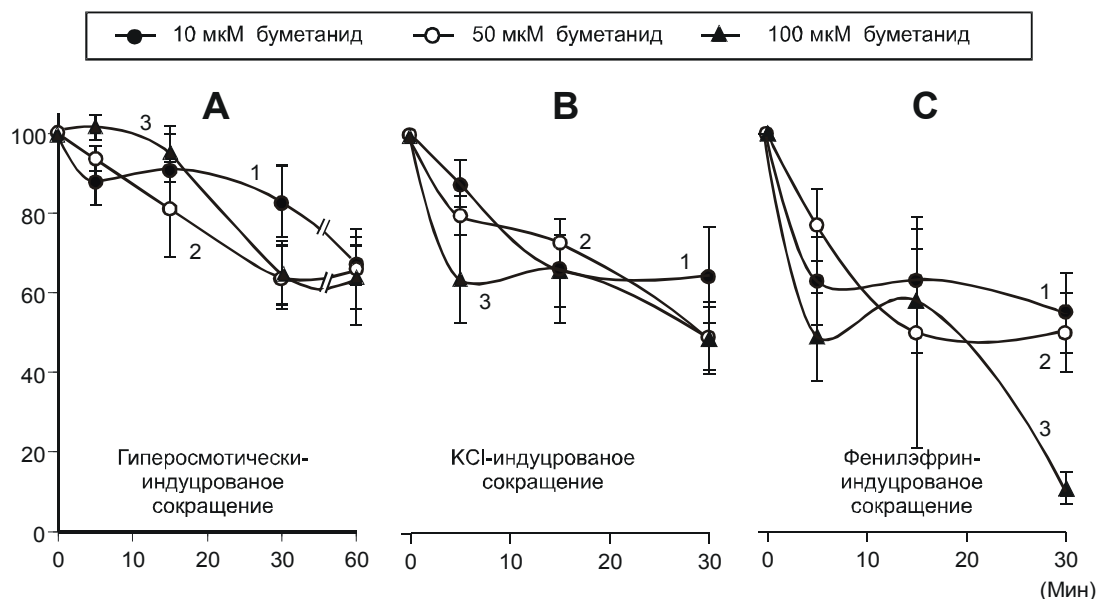


Рисунок 19. Зависимость амплитуды сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы от времени предобработки буметанидом (10, 50 и 100 мкМ).

По оси ординат - амплитуда сокращения сегментов, вызванного гиперосмотическим раствором (А), гиперкалиевой деполяризацией мембраны (В) и действием фенилэфрина (С). По оси абсцисс – время предобработки буметанидом. За 100% принимали амплитуду сокращения сегментов в отсутствии буметанида.

Добавление в раствор ангиотензина II (АТ-II) (0.5 мкМ) приводило к развитию неподдерживаемого воспроизводимого сокращения СГМС аорты крысы, максимальная амплитуда которого составляла $27.7 \pm 4.9\%$ по сравнению с величиной гиперкалиевого (30 мМ КСl) сокращения. 15-минутная предобработка буметанидом (50 мкМ) снижала максимальную амплитуду сокращения до $34.8 \pm 10.6\%$ по сравнению с контрольным АТ-II-индуцированным сокращением ($n=5$, $p < 0.05$) (рис. 18). Полученные данные указывают на участие НКСС в сократительных реакциях сосудистых гладких мышц на действии БАВ.

3.4. Изучение роли хлорной проводимости мембраны в регуляции сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты крысы

В связи с установлением влияния селективного блокатора НКСС буметанида на сократительные реакции СГМС, и предположением, что одним из ключевых механизмов этого явления является снижение НКСС-опосредованного неравновесного градиента Cl^- , было исследовано действие модуляторов хлорной проницаемости мембраны на развитие сокращений СГМС.

3.4.1. Участие Cl^- проводимости мембраны в сокращении гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированном аппликацией гиперкалиевого раствора

Предобработка сегментов блокатором Ca^{2+} -активируемых Cl^- каналов нифлумовой кислотой (50, 100 мкМ) существенно снижала амплитуду гиперкалиевого сокращения СГМС (рис. 20). Эффект нифлумовой кислоты был обратим, и после отмывания сегментов наблюдалось постепенное восстановление амплитуды гиперкалиевого сокращения. Необходимо отметить, что добавление нифлумовой кислоты вызывало снижение базального тонуса сегментов.

15-минутная предобработка SITS, но не DIDS, также частично подавляла развитие гиперкалиевого сокращения (табл. 7). Это, вероятно, объясняется ингибирующим действием SITS в отношении Cl^- каналов, в то время как DIDS является, прежде всего, блокатором Cl^-/HCO_3^- обменника [Chipperfield and Harper, 2000], функционирование которого невозможно в среде, не содержащей бикарбонат ионы.

Таблица 7. Влияние блокаторов хлорной проводимости мембраны на амплитуду гиперкалиевого (30 мМ KCl) сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы.

Вещество	Концентрация, мкМ	Время предобработки, мин	Амплитуда сокращения, %
Контроль		-	100
Нифлумовая кислота	100	15	28.7±3.9* (n=6)
SITS	100	15	43.2±5.6* (n=6)
DIDS	300	15	85.4±14.0 (n=6)

* $P < 0.001$

3.4.2. Участие Cl⁻ проводимости мембраны в сокращении гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированном активацией α -адренорецепторов

Механизмы активации Cl⁻ каналов при действии БАВ могут включать агонист-индуцированное открывание низкоселективных рецептор-управляемых катионных каналов, при котором происходит увеличение внутриклеточной концентрации кальция. Посутупивший в примембранные слои кальций может активировать Ca²⁺-активируемые Cl⁻ каналы и K⁺ каналы [Greenwood et al., 2004; Ma et al., 2004; Steendahl et al., 2004; Ellershaw et al., 2002; Xiao et al., 2002; Curtis and Scholfield, 2000; Curtis et al., 2000; Neylon, 1999; Kamouchi et al., 1998; Criddle et al., 1996]. Кроме того, открывание Cl⁻ каналов может происходить и при активации G-белков, что подтверждается данными, полученными при исследовании Cl⁻-зависимой деполяризации мембраны мезангиальных клеток [Kremer SG et al., 1992]. В последнем случае было показано существование, по крайней мере, трех отдельных сигнальных путей, ответственных за активацию хлорных каналов, включая Ca²⁺- и ПК-С-независимые механизмы опосредованной G-белками Cl⁻-зависимой деполяризации мембраны.

В связи с кальций-мобилизующим действием БАВ и возможной модуляцией Ca²⁺-активируемой хлорной проводимости мембраны, было исследовано действие блокатора Cl⁻ каналов этого типа нифлумовой кислоты на развитие ФЭ(1 мкМ)-индуцированного сокращения СГМС. Нифлумовая кислота вызывала снижение амплитуды ФЭ-индуцированного сокращения. При этом 5-минут-

ная предобработка 100 мкМ нифлумовой кислоты отменяла поддерживаемый компонент сокращения (n=7) (рис. 21), а 15-минутная предобработка полностью предотвращала развитие ФЭ-индуцированного сокращения СГМС во всех экспериментах серии (n=8) (рис. 22).

3.4.3. Роль хлорной проводимости мембраны в сократительных реакциях гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированных гипоосмотическим набуханием клеток

Как указывалось выше, 30-минутная предобработка 10-мкМ буметанидом предотвращала сокращение сегментов при гипоосмотическом набухании (гл. 3.3.1.). Одним из предполагаемых механизмов вовлечения НКСС в регуляцию сократительной активности СГМК является увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора и формирование неравновесного электрохимического хлорного потенциала. Снижение наружной концентрации ионов хлора ведет к увеличению величины электрохимического потенциала хлора, а снижение осмотического давления среды к активации объем-чувствительных хлорных каналов, что обуславливает появление деполяризующего хлорного тока

15-минутная предобработка сегментов нифлумовой кислотой (100 мкМ) предотвращала развитие гипоосмотически (70.4 мМ NaCl) индуцированного сокращения (n=8). 15-минутная предобработка блокаторами анионной проводимости SITS (100 мкМ) и DIDS (200 мкМ) также полностью подавляла развитие сокращения при аппликации гипоосмотического (70.4 мМ NaCl) раствора (n=5 в каждой серии). Принимая во внимание отсутствие в физиологическом растворе бикарбонат ионов, предотвращающее функционирование Cl⁻/HCO₃⁻ обменника, полученный результат свидетельствует об объем-индуцированной активации DIDS-чувствительных Cl⁻ каналов, вовлекаемых в сократительный ответ. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что основным механизмом участия НКСС в регуляции сократительной активности гладких мышц является генерация неравновесного хлорного потенциала.

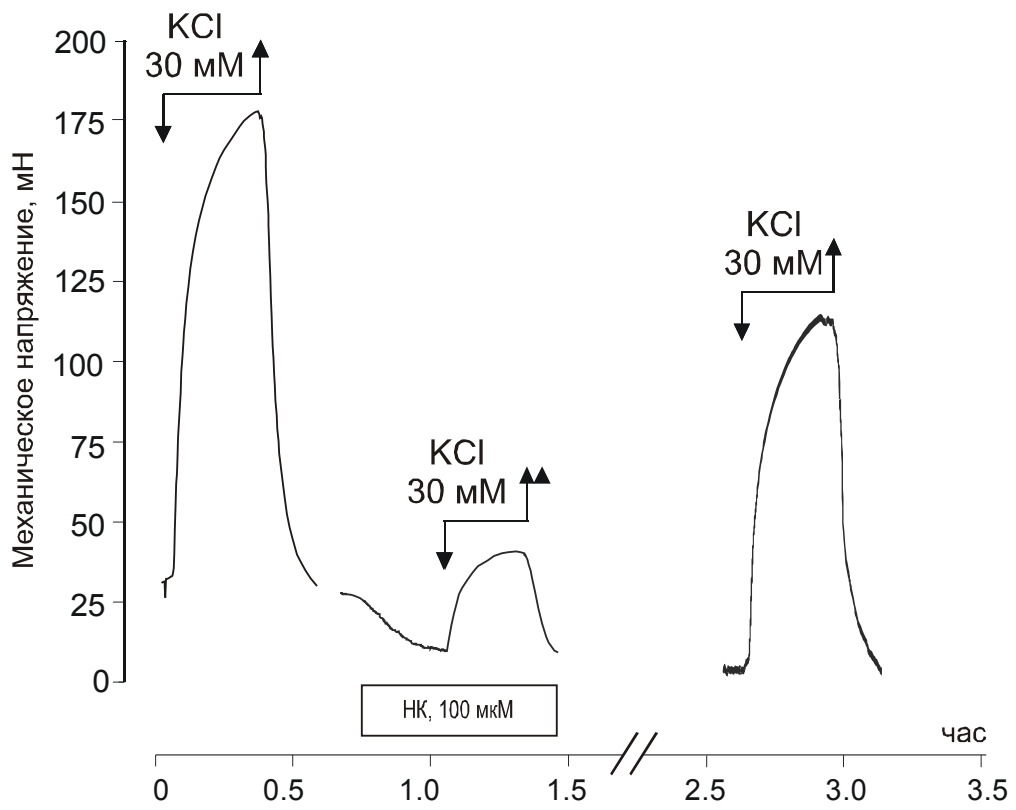


Рисунок 20. Влияние нифлумовой кислоты на гиперкалиевое сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

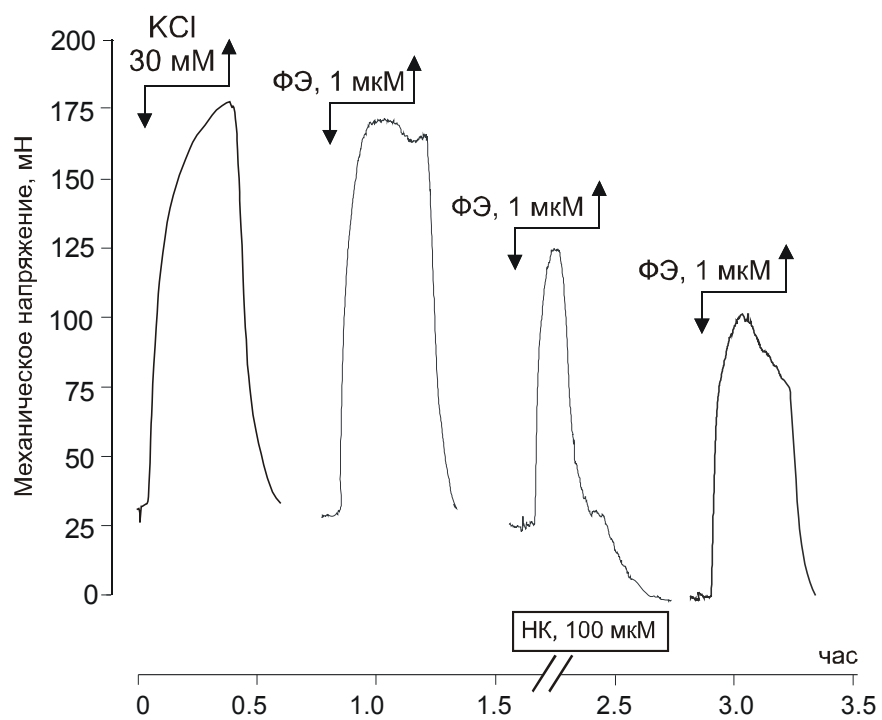


Рисунок 21. Влияние 5-минутной предобработки нифлумовой кислотой (НК), 100 мкМ, на ФЭ-индуцированное сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

EMBED CorelDRAW.Graphic.12

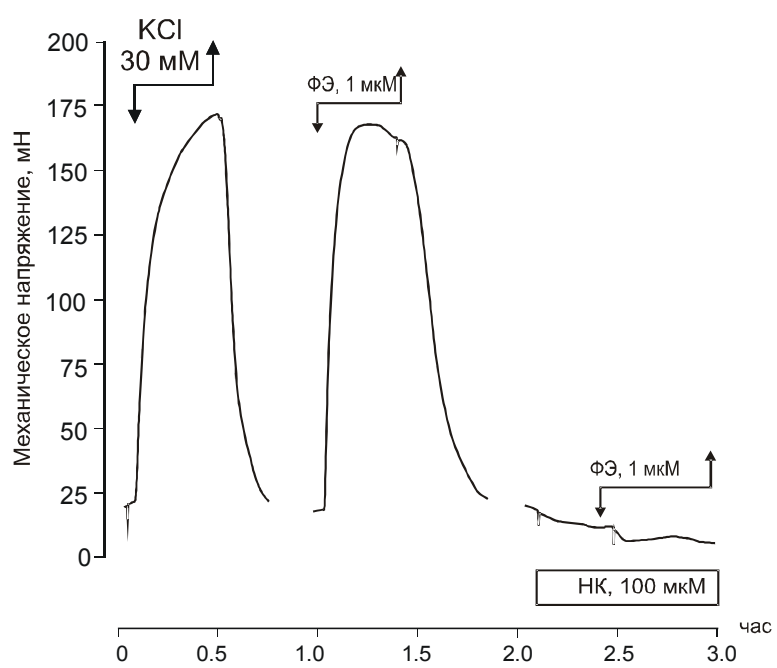


Рисунок 22. Влияние 15-минутной предобработки нифлумовой кислотой (НК), 100 мкМ, на ФЭ-индуцированное сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

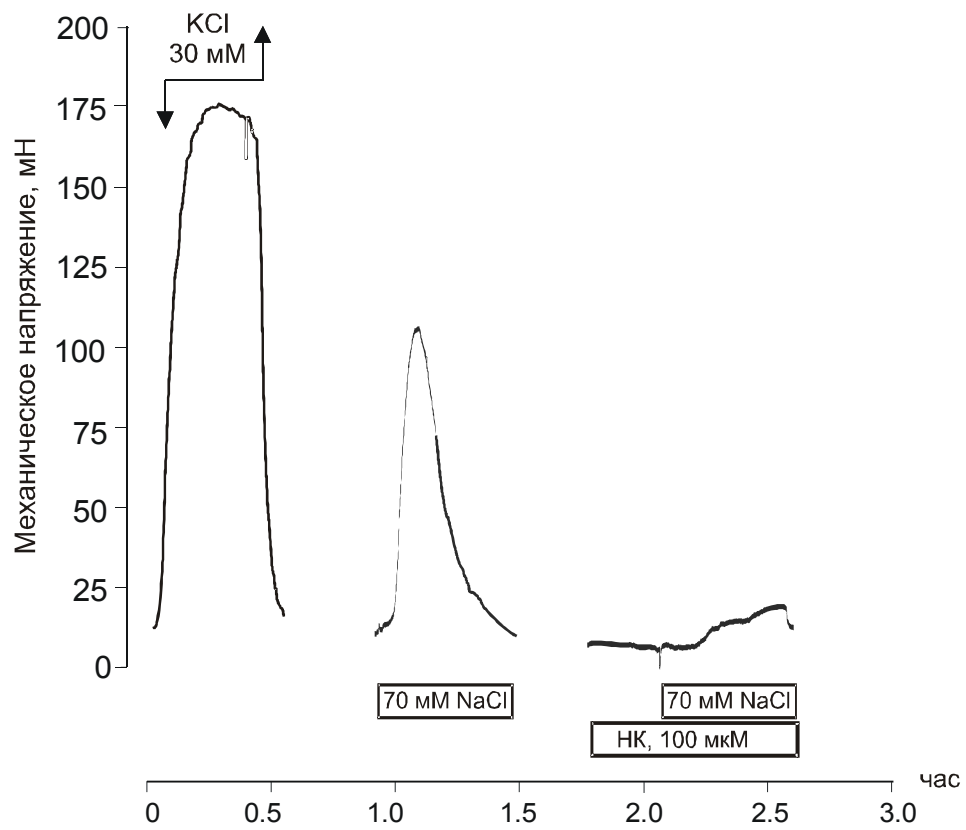


Рисунок 23. Влияние нифлумовой кислоты (100 мкМ) на гипоосмотически-индуцированное сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

3.4.4. Роль внеклеточных моновалентных ионов в развитии сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели гипоосмотического набухания

Как указывалось выше, снижение осмотического давления физиологического раствора путем уменьшения концентрации NaCl запускает транзиторное сокращение (гл. 3.1.3.). Однако, при уменьшении осмолярности среды инкубации происходит изменение концентрации ионов Na^+ и Cl^- , каждый из которых имеет значение для оперирования НКСС. Для оценки вклада этих факторов были исследованы эффекты селективной нормализации внеклеточной концентрации ионов Na^+ и Cl^- и осмотического давления раствора.

Нормализация осмотического давления раствора посредством добавления сахарозы (160 мМ) во всех экспериментах изменяла характер гипоосмотического сокращения. Сокращение становилось поддерживаемым (рис. 24). Изменение характера сокращения при нормализации осмотического давления омывающего раствора, вероятно, обусловлено тем, что в отличие от гипоосмотических условий, в данном случае не происходило активации K^+, Cl^- котранспорта. Это сокращение оставалось чувствительным к буметаниду и нифлумовой кислоте ($P < 0.05$), свидетельствуя о важной роли НКСС-опосредованного градиента Cl^- в развитии данного сократительного ответа.

Так, одновременная нормализация осмотического давления и внеклеточной концентрации ионов Na^+ посредством эквимолярного добавления глутамата натрия предотвращала развитие транзиторного сокращения, не изменяя при этом реактивность СГМС к действию KCl, 30 мМ (рис. 25). Полученный в этой серии результат свидетельствует о ключевой роли ионов Na^+ в развитие сократительного ответа и возможном вовлечении в механизмы развития гипоосмотически-индуцированного сокращения $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника.

Замена сахарозы глутаматом натрия 80 мМ на фоне поддерживаемой контрактуры вызывала расслабление гладкомышечных сегментов до исходного уровня (рис. 26), что хорошо согласуется с результатами эксперимента, представленного ранее на рис. 25.

Эквиволярное замещение ионов Na^+ анионами холина для нормализации осмотического давления и внеклеточного Cl^- также оказывало подавляющее действие на амплитуду гипоосмотического сокращения, однако полное ингибирование сокращения наблюдалось только в трети экспериментов.

Учитывая данные литературы и полученные результаты, можно утверждать, что механизмы сокращения при гипоосмотическом набухании предполагают 1) наличие НКСС-опосредованного неравновесного градиента Cl^- ; 2) открывание объем-чувствительных Cl^- каналов, приводящую к возникновению деполяризующих хлорных токов; 3) повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} за счет активации потенциал-зависимого входа этих ионов и ингибирования $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника в результате снижения внеклеточной концентрации Na^+ ; 4) открывание Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов.

3.4.5. Роль хлорной проводимости мембраны в сократительных реакциях гладкомышечных сегментов аорты крысы в моделях стрикции клеток

Само по себе уменьшение объема миоцитов при гиперосмотическом воздействии ведет к согласованному пассивному увеличению концентрации внутриклеточных осмолитов, что может изменять электрохимические ионные потенциалы. Кроме того, стрикция клеток ведет к резкой активации НКСС. Важную роль в сократительной регуляции в этом случае может играть хлорная проводимость мембраны. До настоящего времени вклад хлорной проводимости мембраны в развитие гиперосмотически-индуцированного сокращения СГМК оставался неизученным. В связи с этим было исследовано действие блокаторов хлорной проводимости мембраны на развитие гиперосмотически индуцированного сокращения СГМС.

15-ти минутная предобработка сегментов блокатором Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов нифлумовой кислотой (10–100 мкМ) [Greenwood and Large, 1995] дозозависимо угнетала амплитуду гиперосмотически индуцированного сокращения, снижая амплитуду механического ответа более чем десятикратно при концентрации 100 мкМ (рис. 19, табл. 8).

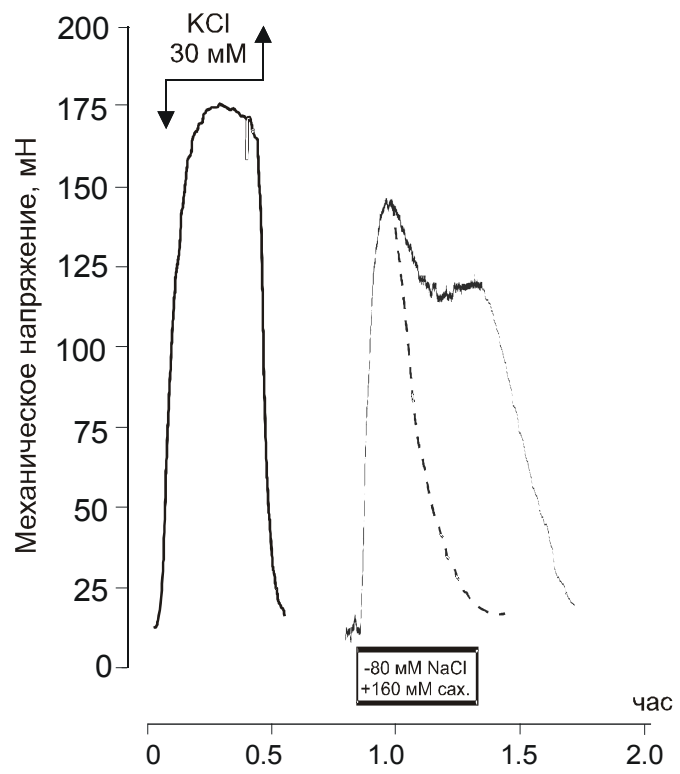


Рисунок 24. Влияние восстановления осмотического давления среды (160 мМ сахарозы) на развитие транзиторного гипоосмотически-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы (пунктир).

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

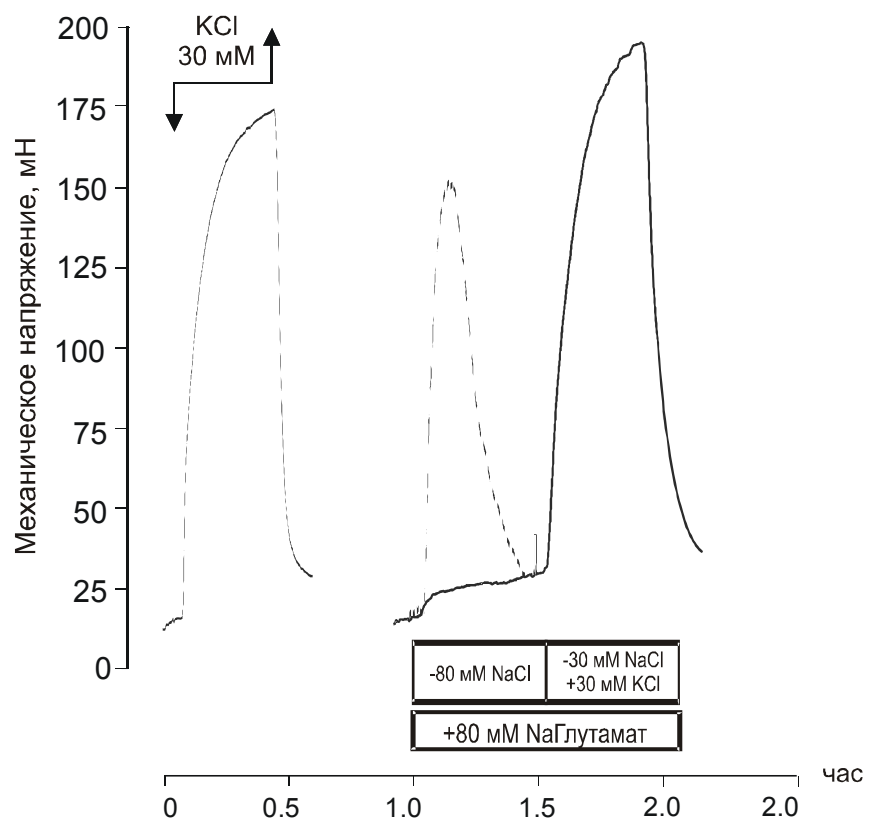


Рисунок 25. Влияние восстановления концентрации ионов Na^+ на развитие транзиторного гипоосмотически-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы (пунктир).

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

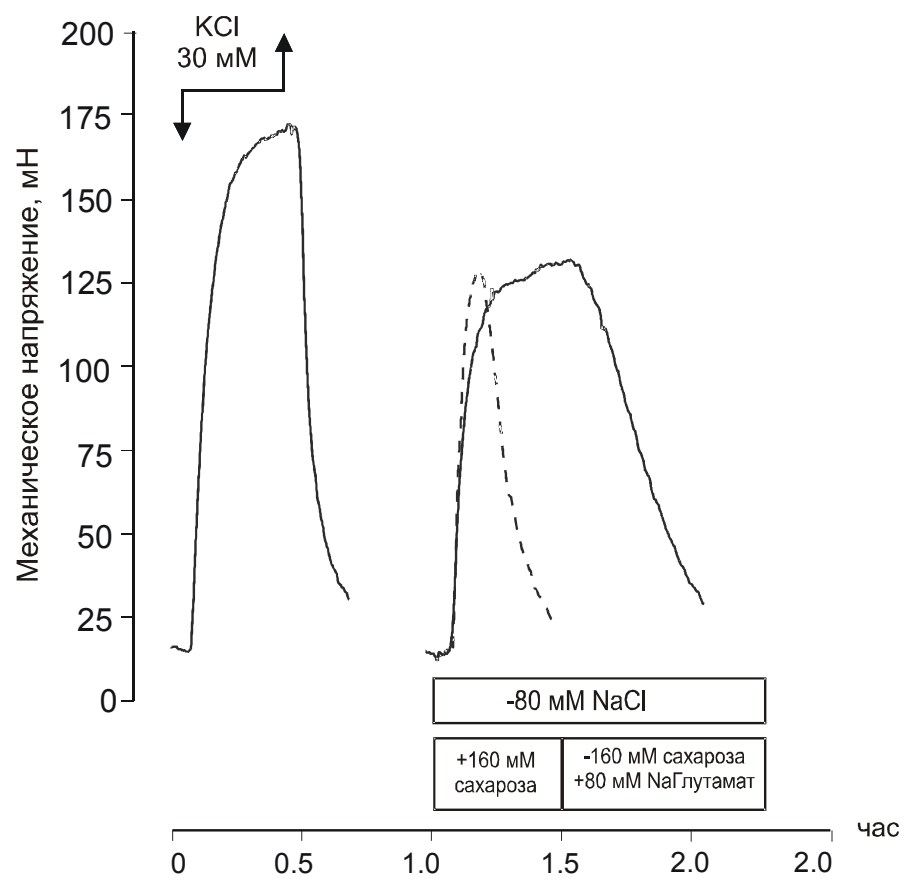


Рисунок 26. Влияние восстановления концентрации ионов Na^+ на развитие транзиторного гипоосмотически-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы (пунктир).

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

На гладкомышечных клетках портальной вены кролика были получены данные [Greenwood IA and Large, 1995; 1998], что нифлумовая кислота может не только блокировать Ca^{2+} -зависимые Cl^- токи, но и активировать калиевую проводимость мембраны СГМК, что также могло бы способствовать расслабляющему действию этого соединения. Однако в наших экспериментах блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЭА, 10 мМ) не влиял на ингибирующий эффект нифлумовой кислоты (табл. 8).

15-минутная предобработка СГМС SITS (50-500 мкМ), являющимся неселективным блокатором хлорной проводимости мембраны, включая Ca^{2+} -активируемые Cl^- каналы [Fuller and Venos, 2000], дозозависимо угнетала сокращение сегментов в гипертоническом растворе, в то время как блокатор анионных каналов и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменника DIDS (300 мкМ) не оказывал угнетающего эффекта (табл. 8).

Нечувствительность гиперосмотически-индуцированного сокращения к DIDS может быть объяснена особенностями фармакологии хлорных каналов в СГМК. Действительно, было показано, что Ca^{2+} -активируемые хлорные каналы в СГМК легочной артерии кролика не чувствительны к DIDS [Piper et al., 2002]. В то же время, в гл. 3.4.3. были представлены данные, что DIDS полностью подавляет сокращение гладкомышечных сегментов аорты при гипоосмотическом набухании. По всей видимости, при стрикции и набухании задействованы различные типы хлорных каналов. Это предположение подтверждается данными, полученными на негладкомышечных клетках. Так, хлорные токи, вызванные повышением осмотического давления среды, были чувствительны к блокатору Ca^{2+} -активируемых хлорных каналов нифлумовой кислоте и нечувствительны к DIDS в клетках ранних эмбрионов мыши. Однако в тех же клетках DIDS подавлял хлорные токи, активируемые набуханием [Sonoda et al., 2003].

Таким образом, полученные результаты предполагают существование в СГМК, по крайней мере, двух различных типов хлорных каналов, различаю-

щихся по своей чувствительности к блокаторам и активирующихся набуханием или стрижией клеток, соответственно.

Таблица 8. Влияние блокаторов хлорной проводимости мембраны на амплитуду сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированного гиперосмотическим воздействием (150 мМ сахарозы).

Название	Блокатор		Амплитуда гиперосмотического сокращения, %
	Концентрация, мкМ	Время предобработки, мин	
Контроль	-	-	100
Нифлумовая кислота	10	15	59.1±12.6* (n=7)
	50		31.8±12.0* (n=7)
	100		7.6±5.2* (n=7)
Нифлумовая кислота, 100мкМ + ТЭА, 10мМ		15	10.1±5.5* (n=7)
SITS	50	15	74±7.1* (n=7)
	100		65.9±12.5* (n=7)
	500		45.4±5.7* (n=7)
DIDS	300	15	112.7±9.2 (n=6)

* $p < 0.01$ по сравнению с контролем

С целью исследовать вовлечение хлорной проводимости мембраны в сокращении СГМК в альтернативной модели стрижии клеток было исследовано влияние предобработки нифлумовой кислотой, SITS и DIDS на развитие транзиторного повышения тонуса СГМС при изоосмотической стрижии клеток.

Нифлумовая кислота снижала амплитуду сокращения при изоосмотической стрижии до $6.2 \pm 1.4\%$ от амплитуды гиперкалиевого сокращения по сравнению с $21.6 \pm 8.7\%$ в ее отсутствии ($p < 0.05$; $n=7$) (рис. 27).

15-минутная предобработка SITS (100 мкМ) не изменяла максимальную амплитуду сокращения, но задерживала нормализацию механического напряжения подобно буметаниду ($P < 0.05$), что, вероятно, связано с тем, что SITS может вызывать ингибирование NKCC. Предобработка сегментов DIDS не влияла на развитие сокращения.

Таблица 9. Влияние блокаторов анионной проводимости мембраны на амплитуду и длительность сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированного восстановлением состава физиологического раствора после 60-минутной инкубации в условиях глубокого (40 мМ NaCl) гипоосмоса (модель изоосмотической стрикции клеток).

Вещество	Максимальная амплитуда сокращения СГМС, % от гиперкалиевого сокращения (30 мМ KCl)
Контроль	21.6±8.7 (n=7)
Нифлумовая кислота, 100 мкМ	6.2±1.4* (n=7, p<0.05)
SITS, 100 мкМ	16.6±10.4 (n=6, p>0.05)
DIDS, 300 мкМ	14.0±4.4 (n=6, p>0.05)

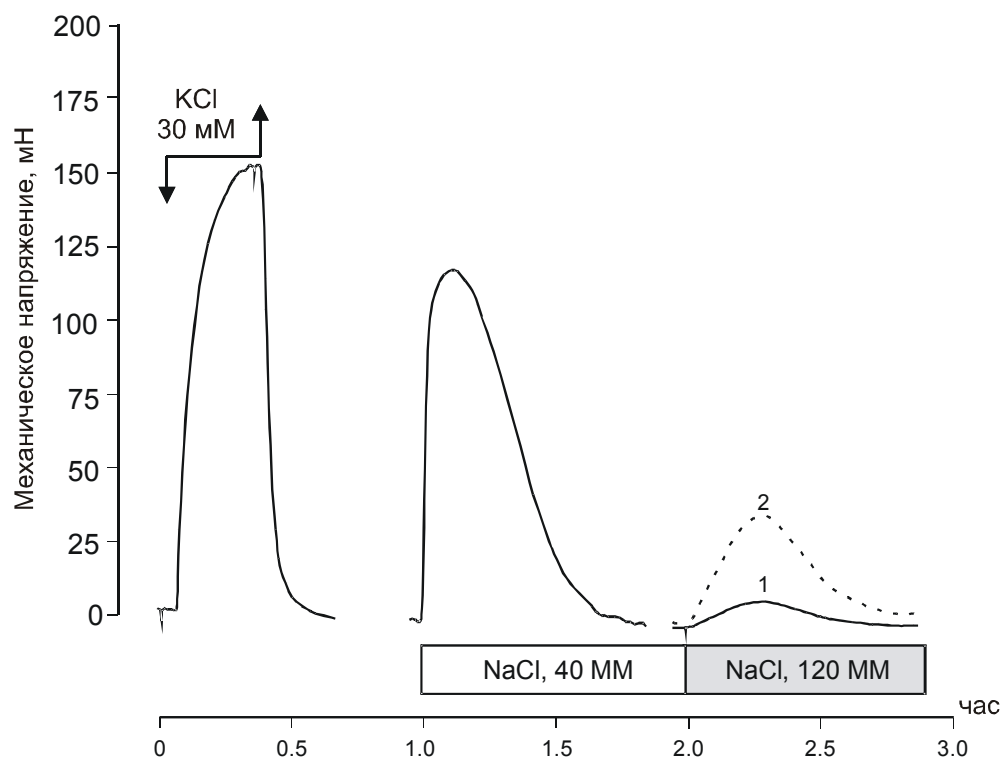


Рисунок 27. Влияние нифлумовой кислоты (100 мкМ) на сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели изоосмотической стрижки (кривая 1) по сравнению с контролем в ее отсутствии (кривая 2).

По оси ординат – механическое напряжение (МН), по оси абсцисс – время (час).

3.5. Исследование роли $[Cl^-]_i$ в клетках линии WKY-7 и гладкомышечных сегментах аорты крысы

Как указывалось выше, НКСС участвует в регуляции сосудистого тонуса через поддержание $[Cl^-]_i$. Было показано, что эффект блокатора НКСС буметанида на сокращения, индуцированные активацией α -адренорецепторов, умеренной деполяризацией мембраны (30 мМ KCl), гипоосмотическим набуханием и гиперосмотической стрижией, зависел от времени предобработки и концентрации этого соединения. Максимальные эффекты буметанида наблюдались после 30-минутной предобработки и при концентрации 100 мкМ, что на порядок превышает концентрацию, необходимую для быстрого и полного ингибирования котранспорта в культуральных клетках. В то же время, влияние буметанида на сокращение при изоосмотической стрижии клеток наблюдался уже при 5-минутной предобработке и концентрации 10 мкМ. Можно предложить два объяснения противоречивости данных, касающихся дозовой и концентрационной зависимости действия буметанида. Во-первых, полное и быстрое ингибирование НКСС, обнаруженное в культуральных СГМК в присутствии 10 мкМ не означает, что эта концентрация ведет к быстрому снижению $[Cl^-]_i$ и гиперполяризации мембран СГМК на тканевом уровне. Кроме того, снижение электрохимического потенциала Cl^- при блокировании НКСС в не активированных клетках, возможно, происходит лишь при длительном времени предобработки буметанидом, достаточном для того, чтобы произошел выход хлора через не стимулированные каналы.

Данные, полученные при исследовании накопления $[^{14}C]$ как маркера объема внутриклеточной воды в контроле, показали, что буметанид незначительно влиял на изменение клеточного объема в модели гиперосмотического сжатия клеток, но подавлял регуляторное увеличение объема, определяемое в клетках, подвергнутых изоосмотическому сжатию (табл. 10). Сравнение эффекта сахарозы на клеточный объем и Cl^-_i показывают, что повышение $[Cl^-]_i$ на ~40% при гиперосмотической стрижии, в основном, обусловлено снижением клеточного объема, нежели активацией НКСС. Напротив, в изоосмотически

сжатых клетках, преинкубированных в гипоосмотической среде с низким содержанием Cl^- , увеличение $[Cl^-]_i$ является следствием активации НКСС и резко уменьшается в присутствии буметанида. Действительно, ингибирование НКСС буметанидом снижало 40%-ое повышение $[Cl^-]_i$ лишь на 10-15% в гиперосмотических условиях, в то время как на 15 минуте изоосмотического сжатия буметанид уменьшал внутриклеточную концентрацию хлора в 2,5 раза (табл. 10).

Таблица 10. Влияние гипо- и изоосмотического сжатия на внутриклеточное содержание воды и Cl^- в культуральных гладкомышечных клетках линии WKY-7.

Тип стрижки и время после его инициации	Внутриклеточная H_2O , мкл/мг протеина		Внутриклеточный Cl^- , мМ/л внутриклеточной воды	
	контроль	буметанид	контроль	буметанид
Контроль	2.71±0.14	2.63±0.07	46±4	43±4
Гиперосмос, 5 мин	2.33±0.19	2.30±0.12	59±6	53±3
Гиперосмос, 15 мин	2.24±0.11	2.27±0.23	63±3	56±4
Контроль	2.87±0.18	2.78±0.09	28±4	ND
Изоосмос, 5 мин	2.30±0.10	2.21±0.14	39±4	31±3
Изоосмос, 15 мин	2.71±0.13	2.38±0.09	49±7	36±5

Таблица 11. Влияние буметанида и сахарозы на содержание внутриклеточного Cl^- в гладкомышечных сегментах аорты крысы. Буметанид добавляли за 5 или 30 мин перед контрольным измерением или добавлением сахарозы.

Присутствие буметанида (концентрация/время преинкубации)	Присутствие сахарозы (время)	Внутриклеточный Cl^- (нМ/мг влажного веса)
Нет	Нет	22.8±2.7
10 мкМ/5 мин	Нет	20.0±4.0
10 мкМ/30 мин	Нет	18.7±1.9
100 мкМ/30 мин	Нет	14.1±1.3*
Нет	150 мМ/20 мин	31.4±2.2*
100 мкМ/30 мин	150 мМ/20 мин	19.1±3.7

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Длительное культивирование клеток влияет на различные клеточные функции, включая активность ионных транспортеров [Berk et al., 1989; Raat et al., 1994]. В культуральных СГМК, которые претерпели более десяти митозов в отсутствие каких-либо стимулов, подобных увеличению осмолярности, могут наблюдаться особенности оперирования ион-транспортирующих систем. В связи с этим было исследовано действие буметанида на $[Cl^-]_i$ на тканевом уровне – в сегментах аорты, обработанных в соответствии с моделью гиперосмотического сжатия, и в контрольных не стимулированных сегментах.

Таблица 11 показывает, что 30-минутная преинкубация с 100-мкМ буметанидом вызывала достоверное ~40% снижение содержания Cl^-_i в контрольных не стимулированных сегментах аорты и полностью отменяла увеличение $[Cl^-]_i$, обусловленное 20-минутным гиперосмотическим сжатием клеток в присутствии 150 мМ сахарозы.

Совокупность полученных данных свидетельствуют о том, что существует два пути вовлечения НКСС в регуляцию сократительной активности СГМК. Первый связан с предварительным (базальным) созданием неравновесного электрохимического хлорного потенциала, который при открывании/активации Cl^- каналов будет обуславливать хлорный ток. Для подавления буметанидом этого типа НКСС-опосредованного компонента сокращения СГМК требуется длительная (30 мин) предобработка. В данном случае основным триггерным механизмом сокращения можно считать не столько повышение активности НКСС, сколько открытие (или активацию) хлорных каналов и снижение НКСС-опосредованного электрохимического потенциала хлора. По всей видимости, данный тип НКСС-зависимой регуляции является ведущим для сокращений, индуцированных активацией α -адренорецепторов, умеренной деполяризацией мембраны (30 мМ KCl) и гипоосмотическим набуханием.

Второй тип НКСС-опосредованной регуляции сокращений характеризуется тем, что стимуляция клеток будет вести к мощной поддерживаемой активации НКСС. В этом случае главную роль в сокращении будет играть поддерживаемый электрохимический хлорный потенциал. В этом случае максимальный эффект буметанида должен проявляться при минимальном времени предобра-

ботки этим соединением. Действительно, 5-минутная предобработка буметанидом (10 мкМ) была достаточной для изменения характера сокращения СГМС в модели изоосмотической стрикции. Дальнейшее увеличение времени предобработки (до 60 мин) и концентрации буметанида (до 100 мкМ) не изменяли действие этого препарата на сокращение СГМС в модели изоосмотической стрикции.

3.6. Кальций-зависимая регуляция сократительных реакций сосудистых ГМК, вызванных изменениями осмолярности среды инкубации

3.6.1. Ca^{2+} -зависимые механизмы развития сократительных ответов сосудистых гладкомышечных сегментов при аппликации БАВ, деполяризующем действии гиперкалиевого раствора и в моделях изменения объема клеток

Для изучения роли ионов Ca^{2+} в сократительной регуляции сегментов аорты, были использованы блокаторы потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов верапамил и нифедипин, а также бескальциевый ЭГТА-содержащий раствор.

Таблица 12. Влияние блокаторов кальциевых каналов L типа на амплитуду сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы.

Блокатор, мкМ	Гиперкалиевое сокращение ¹⁾ , %	ФЭ-вызванное сокращение ²⁾ , %	Гипоосмотич. сокращение ⁴⁾ , %	Сокращение в модели гиперосмотич. стрикции ³⁾ , %	Сокращение в модели изоосмотич. стрикции ⁵⁾ , %
Нет (контроль)	100	92.1±10.6 (n=52)	75.7±8.9 (n=18)	51.9±8.8 (n=78)	21.6±8.7 (n=7)
Нифедипин, 3	5.6±2.2** (n=7)	–	4.5±2.3** (n=6)	46.1±3.4* (n=7)	18.4±6.1 (n=6)
Верапамил, 10	4.6±1.6** (n=6)	25.8±7.3* (n=5)	3.8±1.1** (n=6)	48.3±2.7 (n=6)	–

¹⁾ сокращение запускалось аппликацией раствора, содержащего 36 мМ КСl и 90 мМ NaCl. ²⁾ Фенилэфрин добавляли в концентрации 1 мкМ. ³⁾ Гиперосмотическая среда содержала 150 мМ сахарозы. ⁴⁾ Гипоосмотический раствор содержал 40 мМ NaCl. ⁵⁾ Изоосмотическая стрикция достигалась при использовании протокола, показанного на рис. 5. Блокаторы кальциевых каналов добавлялись за 15 мин до аппликации сократительных стимулов.

*, ** $p < 0.05$ and < 0.00005 в сравнении с контролем, соответственно.

Несмотря на то, что предобработка сегментов верапамилом (10 мкМ) резко подавляла развитие сокращения, вызываемого гиперкалиевым раствором (30 мМ КСl) и фенилэфрином (1 мкМ), она не оказывала влияния на амплитуду гиперосмотически-индуцированного сокращения (150 мМ сахарозы). Амплитуда сокращения на фоне верапамила составила $96.7 \pm 10.2\%$ по сравнению с величиной сокращения в его отсутствии ($p > 0.5$).

Предобработка СГМС нифедипином (3 мкМ) аналогичным образом подавляла гиперкалиевое сокращение, но также не влияла на амплитуду сокращения ($p > 0.2$) в гиперосмотическом растворе (табл. 12, рис. 28).

В связи с тем, что не было обнаружено достоверного влияния нифедипина на амплитуду гиперосмотически индуцированного сокращения сегментов, но отмечалось изменение динамики сокращения, для количественной оценки динамических характеристик было проведено математическое моделирование с использованием программного пакета Microsoft Excel. При этом экспериментально полученные механограммы аппроксимировали экспонентой $y(t) = A(\exp(-1/\alpha t))$, где y – амплитуда сокращения в момент времени t ; A – максимальная амплитуда, α – показатель динамики, характеризующий динамику сокращения по признаку «пологость/крутизна» нарастания МН.

В результате математической обработки аппроксимированных кривых было установлено, что предобработка нифедипином не оказывала существенного влияния на амплитуду ответа, но снижала его динамику ($p < 0,004$). По всей видимости, активация потенциал-зависимых кальциевых каналов может иметь место на начальных этапах развитии гиперосмотически индуцированного сокращения, но не является необходимым механизмом его развития.

Так же, как и при гиперосмотическом воздействии, сокращение СГМС в модели изоосмотической стрикции было нечувствительно к нифедипину (табл. 12, рис. 29). Это свидетельствует о том, что механизмы сократительных реакций при моделировании стрикции клеток не связаны с активацией потенциал-зависимых кальциевых каналов.

Таблица 13. Экспериментальные и аппроксимированные параметры гиперосмотически-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы в контроле и после предобработки блокатором потенциал-зависимых кальциевых каналов нифедипином, $n=5$.

Амплитуда гиперосмотически-индуцированного сокращения (экспериментальные данные), %		Параметры гиперосмотически индуцированного сокращения (аппроксимированные данные), %			
		Максимальная амплитуда, А		Показатель динамики, α	
Контроль	Нифедипин, 3 мкМ	Контроль	Нифедипин, 3 мкМ	Контроль	Нифедипин, 3 мкМ
100	92,5±12,9	100	115,0±30,1	100	58,7±15,4
	$p>0,26$		$p>0,32$		$p<0,004$

С целью дальнейшего изучения роли кальция в развитии гиперосмотического сокращения СГМС, была проведена серия экспериментов с использованием бескальциевого раствора, содержащего хелатор ионов кальция ЭГТА. Инкубация СГМС в бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе (500 мкМ ЭГТА) полностью подавляла изоосмотическое гиперкалиевое сокращение (30 мМ КСl). Тем не менее, амплитуда гиперосмотически-индуцированного сокращения после инкубации в бескальциевом растворе в течение 1 часа снижалась лишь до ~40% от контроля ($n=12$) (рис. 30, табл. 14), несмотря на то, что при 60-минутной преинкубации в бескальциевой среде должна уменьшаться концентрация внутриклеточного кальция в [Sato et al., 1992; Bruschi et al., 1988]. Восстановление концентрации ионов Ca^{2+} в омывающем растворе до первоначального уровня приводило к постепенному восстановлению амплитуды гиперосмотической контрактуры до значений, близких к исходным.

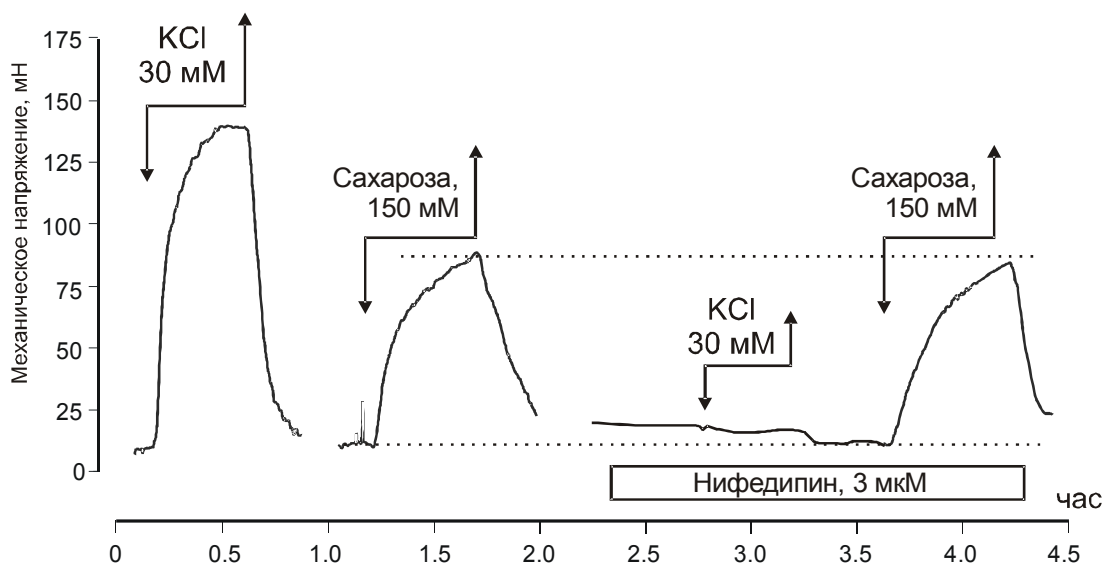


Рисунок 28. Влияние предобработки блокатором потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов нифедипином на развитие гиперкалиевого и гиперосмотически-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

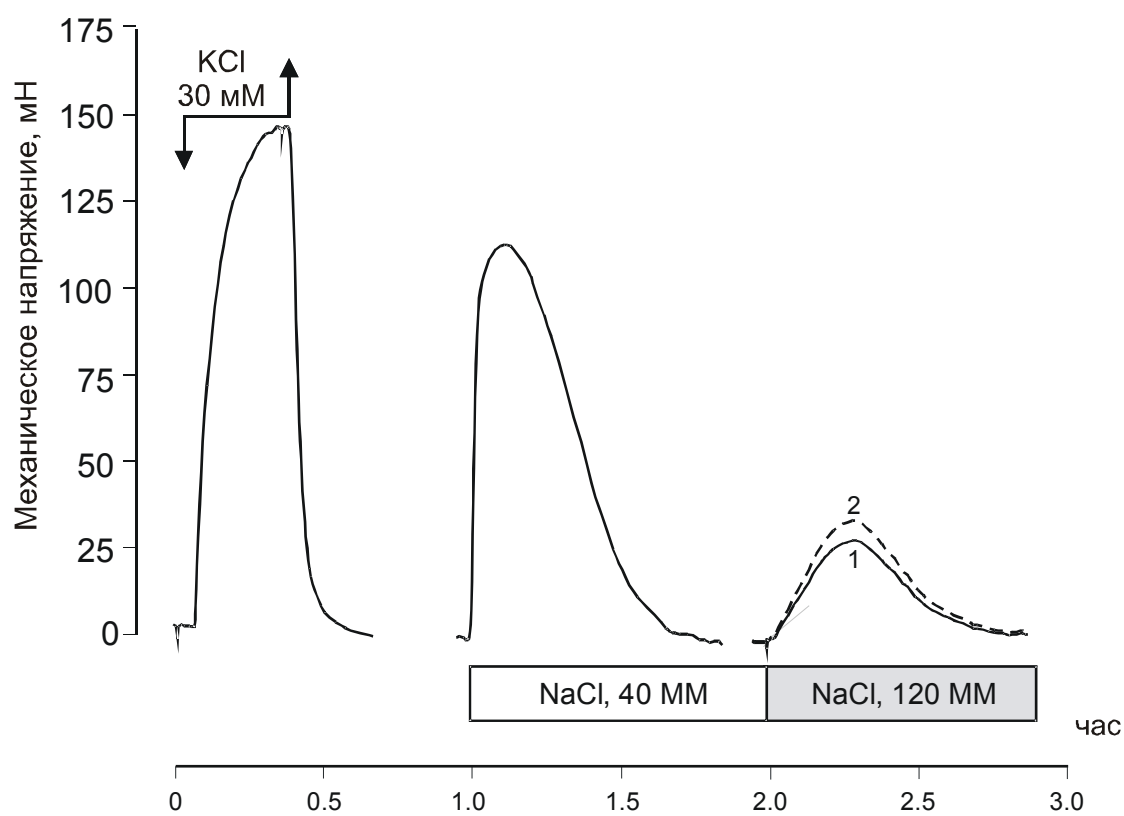


Рисунок 29. Влияние 15-минутной предобработки блокатором потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов нифедипином на развитие сокращения гладкомы-

*шечных сегментов аорты крысы при изоосмотической стрижии (кривая 2, сплошная линия). Пунктирной линией показано контрольное сокращение в от-
сутствии нифедипина (кривая 2).*

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

Таблица 14. Влияние внеклеточного Ca^{2+} на максимальную амплитуду сокращений гладкомышечных сегментов аорты крысы. Сегменты были предварительно инкубированы в бескальциевом растворе, содержащем 0.5 мМ ЭГТА в течение 60 или 15^(#) мин перед тем, как была проведена аппликация контрактильных стимулов. За 100% принимали амплитуду гиперкалиевого сокращения.

Среда инкубации	Сокращение, индуцированное деполаризацией мембраны, %	ФЭ-индуцированное сокращение, %	Гипоосмотическое сокращение ⁴⁾ , %	Гиперосмотически индуцированное сокращение, %	Сокращение в модели изоосмотической стрикции клеток, %
Контроль	100	92.1±10.6 (n=52)	75.7±8.9 (n=18)	51.9±8.8 (n=78)	21.6±8.7 (n=7)
-Ca ²⁺ , 500 мкМ ЭГТА	1.7±2.1** (n=9)	6.6±2.0* ^(#) (n=6)	1.0±2.5** (n=6)	25.6±7.8** (n=12)	14.0±3.7* (n=8)

*, ** $p < 0.05$ and $p < 0.00005$, соответственно, по сравнению с контролем.

С целью исследовать роль внеклеточного кальция в развитии сокращения в модели изоосмотической стрикции, был исследован эффект ЭГТА-содержащего бескальциевого раствора. 60-минутная инкубация в бескальциевом растворе (500 мкМ ЭГТА) резко подавляли развитие гиперкалиевой (30 мМ KCl) контрактуры, но не оказывали существенного влияния на развитие сокращения при изоосмотической модели стрикции (рис. 31, табл. 14).

Напротив, Ca^{2+} -зависимый характер сокращения при гипоосмотическом набухании, был подтвержден его ингибированием при использовании блокаторов потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов верапамила (10 мкМ), нифедипина (3 мкМ) и бескальциевого ЭГТА(500 мкМ)-содержащего раствора (табл. 12, 14).

Таким образом, несмотря на то, что как стрикция, так и набухание клеток сопровождаются повышением механического напряжения сегментов, природа этих сократительных реакций носит различный характер.

Гипоосмотически-индуцированное сокращение опосредовано кальций-зависимыми механизмами и, прежде всего, активацией потенциал-зависимых Ca^{2+}

каналов. Необходимая для этого пороговая деполяризация первоначально развивается при активации объем-чувствительных Cl⁻ каналов, открывающихся при набухании клетки. Поступление ионов Ca²⁺, в свою очередь, вызывает активацию Ca²⁺-активируемых Cl⁻ каналов, которые поддерживают деполяризацию.

Что касается Ca²⁺-независимого компонента сокращения при моделировании стрикции клеток, то его механизмы могут включать увеличение чувствительности сократительного аппарата ГМК к внутриклеточному Ca²⁺, что получило название кальциевой сенситизации [Somlyo and Somlyo, 1994]. Это может вести к повышению тонуса СГМК без изменения внутриклеточной концентрации этих ионов. Ключевым механизмом кальциевой сенситизации является активация ПК-С, MAPK и ROCK [Nakao et al., 2003; Damron et al., 2002; Crowley et al., 2002; Shirao S. et al., 2002; Shirasawa, 2003; Feng et al., 1999; Kaibuchi et al., 1999; Nagumo et al., 2000; Somlyo and Somlyo, 2000; Sward et al., 2000; Ito M. et al., 2004], при этом ПК-С и ROCK вовлекаются в общий регуляторный каскад, в котором ROCK находится в дистальной части (downstream) сигнального пути. Мишенями этих киназ служат киназа ЛЦМ, или, в случае ROCK, фосфатаза ЛЦМ, активация которых существенно модулирует степень фосфорилирования ЛЦМ и, таким образом, сокращение [Feng et al., 1999; Kaibuchi et al., 1999; Nagumo et al., 2000; Somlyo and Somlyo, 2000; Sward et al., 2000; Ito M. et al., 2004]. Кроме того, известно, что сама по себе гиперосмотическая стрикция ведет к увеличению степени фосфорилирования ЛЦМ в эпителиальных клетках канальцев [Ciano-Oliveira et al., 2003] и мезангиальных клетках почек [Takeda et al., 1993], при этом основным механизмом фосфорилирования ЛЦМ является активация Rho/ROCK-зависимого сигнального пути [Ciano-Oliveira et al., 2003].

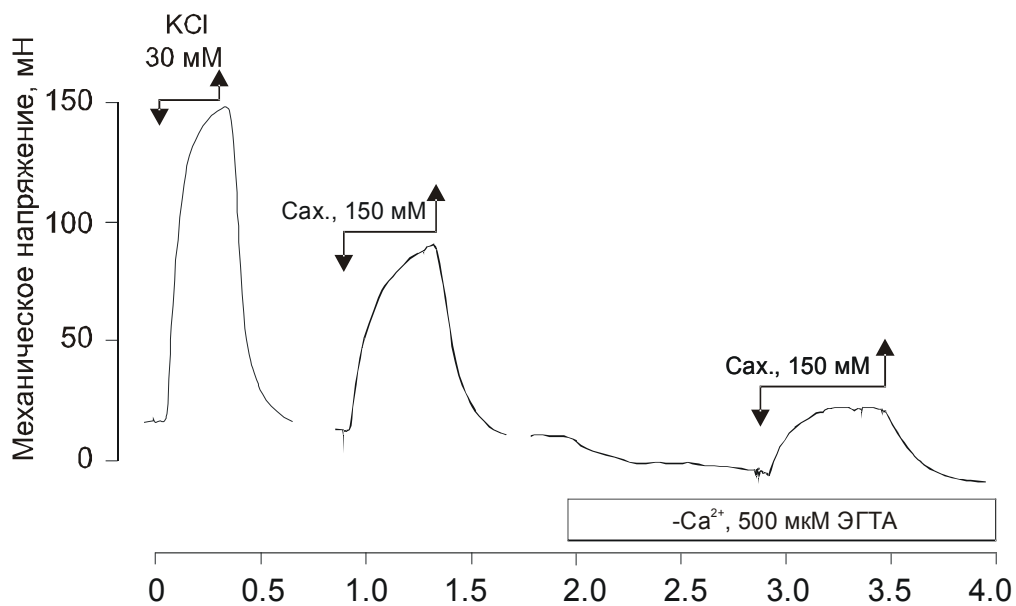


Рисунок 30. Влияние бескальциевого ЭГТА-содержащего раствора на гиперосмотически индуцированное сокращение сегментов аорты.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

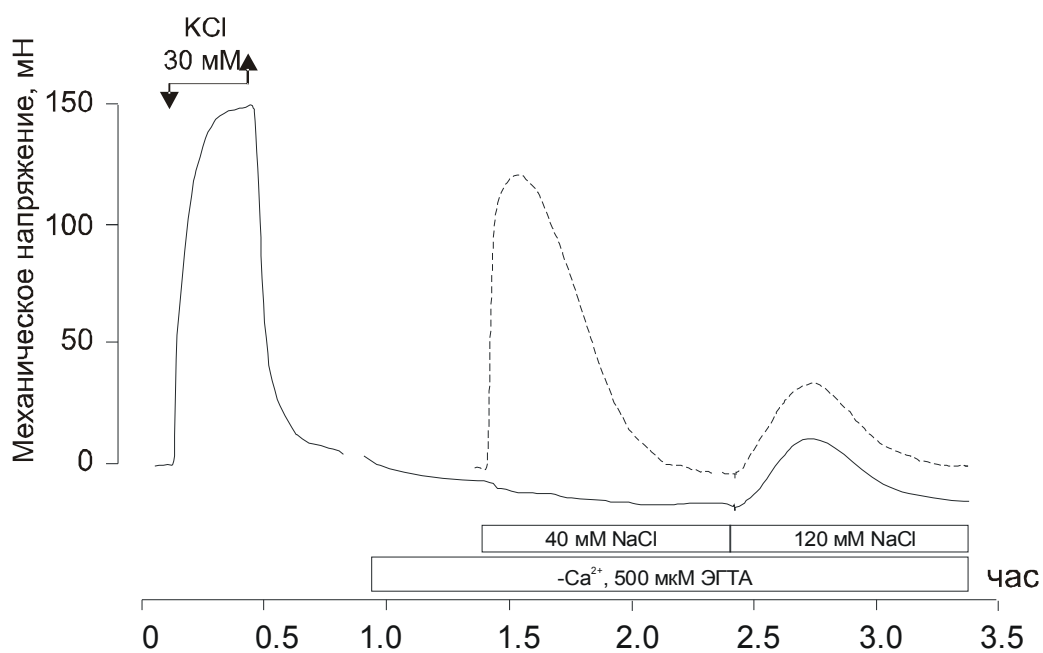


Рисунок 31. Влияние бескальциевого ЭГТА-содержащего раствора на сокращение сегментов аорты в модели изоосмотической стрижки. Пунктирной линией показана динамика механического напряжения в контрольных условиях.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

3.6.2. Сократительные реакции сосудистых гладкомышечных сегментов, индуцированные гиперкалиевой деполяризацией мембраны и активацией α_1 -адренергических рецепторов, в моделях стрикции и набухания клеток

Одним из возможных механизмов сокращения СГМК в отсутствии внешнего Ca^{2+} можно считать изменение чувствительности клеток к этим ионам. С целью оценить чувствительность гладкомышечных сегментов аорты крысы к внеклеточным ионам Ca^{2+} в моделях гиперосмотической и изоосмотической стрикции клеток, определяли амплитуду сократительных ответов, индуцированных аппликацией 1, 5 и 10 мМ CaCl_2 на фоне ЭГТА-содержащего бескальциевого раствора в контрольных условиях и в соответствующих моделях уменьшения клеточного объема. Аппликацию CaCl_2 во всех случаях осуществляли на фоне деполяризации мембраны СГМК гиперкалиевым раствором (KCl, 60 мМ) с целью активировать потенциал-зависимый вход кальция внутрь клеток. Вопреки первоначальному предположению о развитии кальциевой сенсibilизации СГМК, в моделях стрикции клеток не было обнаружено повышение чувствительности сегментов к наружному кальцию. Напротив, в отличие от контрольных условий, сократительных ответов не наблюдалось вовсе, что свидетельствует о резком снижении чувствительности сегментов к внеклеточному кальцию при сжатии СГМК (рис. 31, 32). После отмывания сегментов в ЭГТА-содержащем бескальциевом растворе с нормализованной осмолярностью наблюдалась тенденция к восстановлению чувствительности сегментов к сократительному действию аппликации CaCl_2 .

Более того, гиперосмотическая и изоосмотическая стрикция СГМК в присутствии наружного кальция также приводила к существенному подавлению сократительного действия фенилэфрина (1 мкМ) и гиперкалиевого раствора (30 мМ KCl) (рис. 33, 34).

Можно предположить следующие механизмы подавляющего действия стрикции клеток в отношении KCl- и ФЭ-индуцированного сокращения:

- 1) Возможно, что при стрикции клеток происходит подавление потенциал-зависимого входа Ca^{2+} , который играет важную роль в развитии KCl- и ФЭ-

индуцированного сокращения, но не участвует в развитии сокращения СГМС в обеих моделях стрикции (табл. 12, 14). Это предположение связано с тем, что стрикция клеток может изменять модулировать архитектуру мембраны и изменять белок-липидные взаимодействия в мембране за счет изменения физико-химических свойств примембранных слоев внутри и снаружи клетки, что влечет за собой модуляцию функционального состояния ион-транспортирующих молекул, включая кальциевые каналы.

2) Не исключено, что стрикция клеток может разобщать механизмы возбуждения и сокращения на более дистальных этапах Ca^{2+} -зависимой сигнализации, включая передачу Ca^{2+} сигнала от мембраны кавеол к регуляторным белкам и снижение чувствительности сократительного аппарата клетки к кальцию.

3) Стрикция может повышать чувствительность к кальцию, и конечная концентрация свободного Ca^{2+} , которая будет в данном ЭГТА –буфере уже будет насыщающей. Однако учитывая, что максимальная амплитуда Ca^{2+} -индуцированного сокращения превышает величину гиперосмотически-индуцированного в несколько раз, данное предположение кажется маловероятным.

Ранее, участие ROCK рассматривалось как главный механизм регуляции кальций-независимых компонентов сокращения СГМК при активации ряда рецепторов [Shum et al., 2003; Nakao et al., 2003; Damron et al., 2002; Crowley et al., 2002; Shirao et al., 2002; Shirasawa, 2003]. Однако, Sakurada S. с соавторами открыли в СГМК существование нераспознанной до сих пор Ca^{2+} -зависимой стимуляции Rho, механизмы которой могут быть вовлечены в эффекты возбуждающих рецепторы агонистов [Sakurada et al., 2003]. Активация норадреналин-индуцированного входа Ca^{2+} , не связанного с потенциал-зависимыми каналами и каналами СПР, также вовлекает ROCK [Ghisal et al., 2003]. Таким образом, существует сложное взаимодействие RhoA/ROCK-зависимой сигнализации с кальций-зависимыми механизмами.

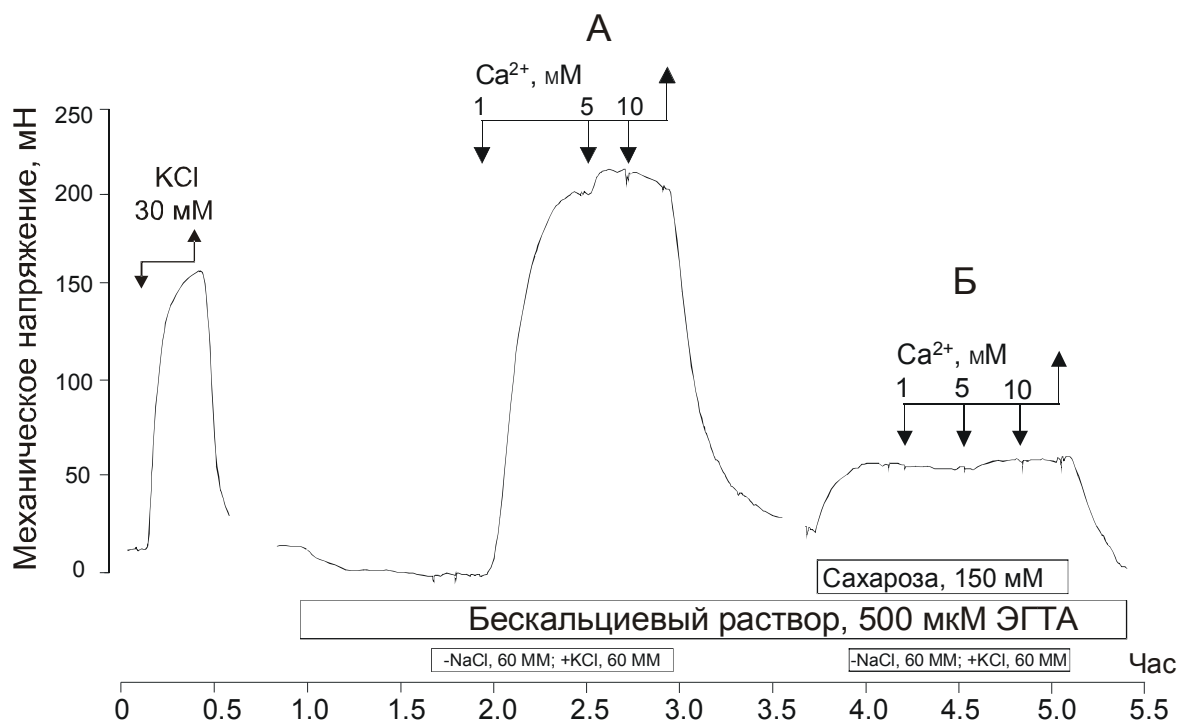


Рисунок 31. Влияние гиперосмотической стрижки на Ca²⁺-зависимое гиперкалиевое сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (МН), по оси абсцисс – время (час).

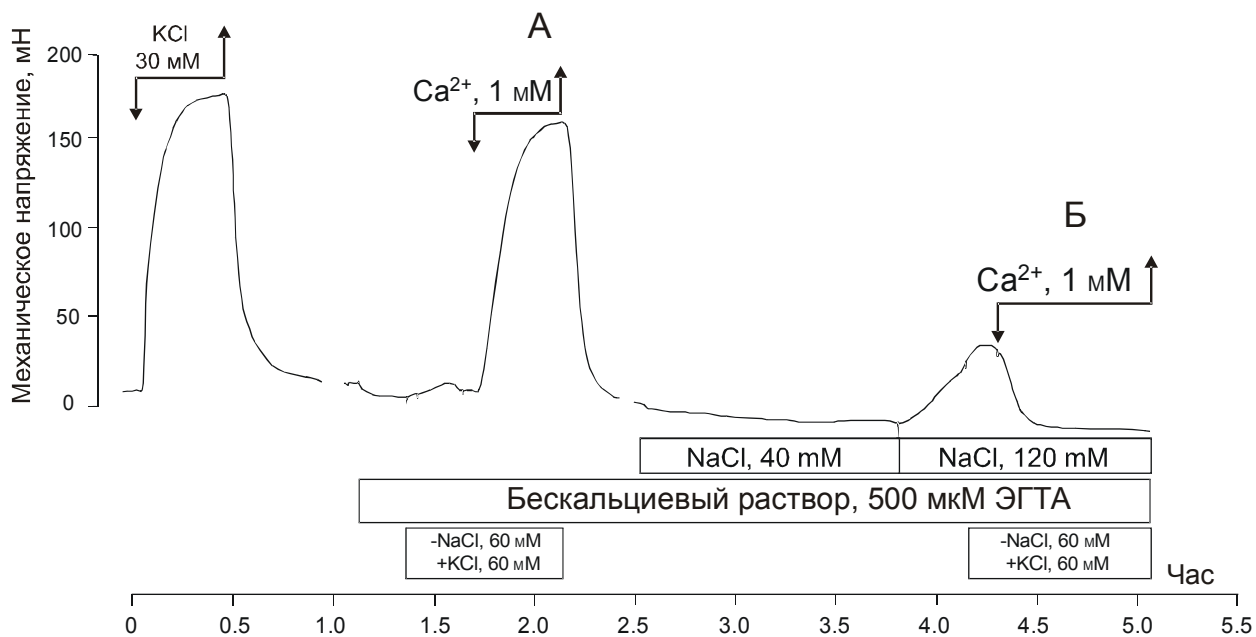


Рисунок 32. Влияние изоосмотической стрижки на Ca^{2+} -зависимое гиперкальциевое сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

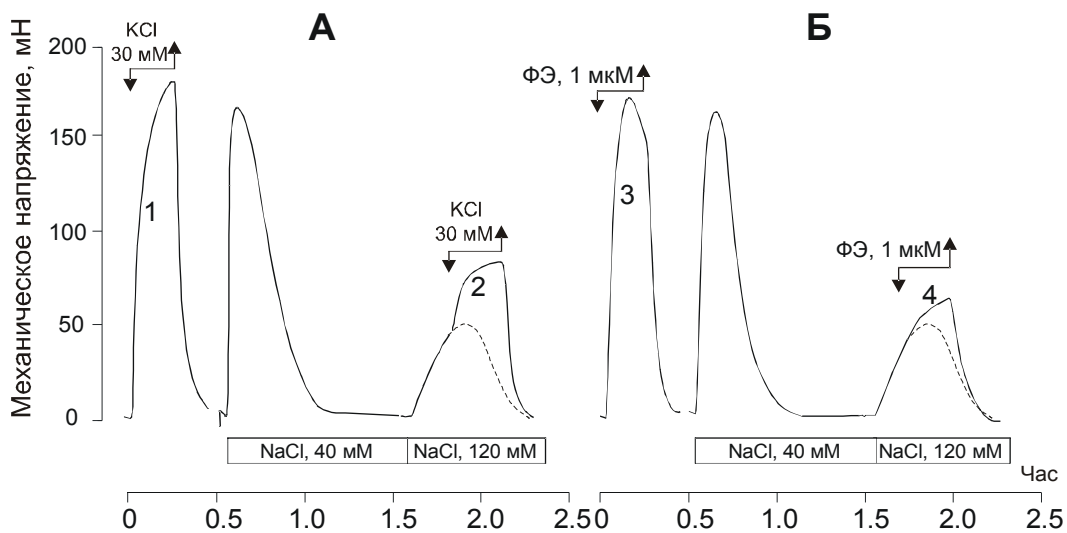


Рисунок 33. Влияние гиперкалиевого раствора (А) и фенилэфрина (Б) на механическое напряжение сегментов аорты крысы в контроле (кривые 1, 3) и в модели изоосмотической стрикции клеток (кривые 2, 4).

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

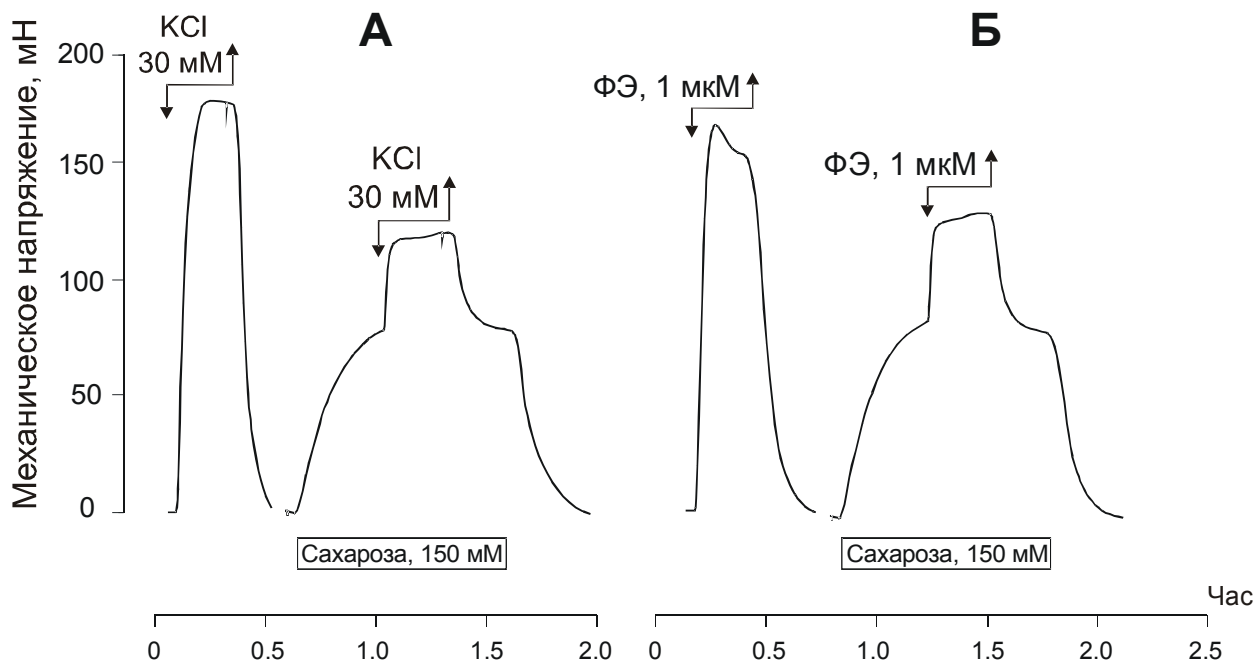


Рисунок 34. Влияние гиперкалиевого раствора (А) и фенилэфрина (Б) на механическое напряжение сегментов аорты крысы в контроле и в модели гиперосмотической стрижки клеток.

По оси ординат – механическое напряжение (МН), по оси абсцисс – время (час).

Гиперкалиевая деполяризация мембраны также может вести к кальциевой сенситизации сосудистых [Sakamoto et al., 2003] и респираторных ГМК [Janssen et al., 2004]. Был предложен новый механизм, согласно которому активация ROCK сопряжена с ее транслокацией в область кавеол, зависимой от нифедипин-чувствительного входа Ca^{2+} и вовлекает активацию кальмодулина [Urban et al., 2003].

Что касается возможного снижения чувствительности сократительного аппарата к Ca^{2+} -опосредованной сигнализации при аппликации KCl и ФЭ в моделях стрикции клеток, то это может быть связано с увеличением общей концентрации макромолекул (macromolecular crowding), роль которой была показана в регуляции элементов цитоскелета и ряде других белков [Burg, 2000; Cuneo et al., 1992; Rohwer et al., 1998; Minton, 1993; Kinjo and Takada, 2002; Madden and Herzfeld, 1993;].

С целью установить, изменяется ли чувствительность клеток к констрикторам во время гипоосмотического набухания, были проведены контрольные исследования сократительного действия фенилэфрина (1 мкМ) и гиперкалиевого раствора (30 мМ KCl) в гипоосмотической среде. Было установлено, что 30-минутная инкубация сегментов в гипоосмотическом растворе 1) не влияла на амплитуду ФЭ-индуцированного сокращения (100.0 ± 14.4 , $n=6$) и 2) приводила к увеличению амплитуды гиперкалиевого сокращения до $148.2 \pm 28.7\%$ ($n=9$, $p < 0.05$) по сравнению с контролем (рис. 35).

Блокатор НКСС буметанид модулировал реактивность СГМС к гиперкалиевому раствору в гипоосмотической среде. Предобработка 10-мкМ буметанидом угнетала гиперкалиевое сокращение в гипоосмотической среде, при этом его амплитуда составила $64,7 \pm 1,78\%$ по сравнению с осмоотическим контролем и $52.7 \pm 12.0\%$ по сравнению с таковой в гипоосмотическом растворе без предобработки буметанидом ($p < 0.03$) (рис. 36). Напротив, увеличение концентрации буметанида до 100 мкМ потенцировало амплитуду гиперкалиевого сокращения, развивающегося в гипоосмотических условиях (рис. 37), что, по

всей видимости, связано с подавляющим действием буметанида на K-Cl ко-транспорт, активация которого происходит при гипоосмотическом набухании клеток [Mongin and Orlov, 2001] и важная роль которого в сократительной регуляции СГМК была показана N. Adragna et al. (2000). При этом амплитуда сокращения составила $183,82 \pm 46.4\%$ по сравнению с осмоотическим контролем и $289 \pm 46.4\%$ по сравнению с таковой в гипоосмотическом растворе в присутствии 10 мкМ буметанида ($p < 0.05$). В отличие от гипоосмотических условий, в контрольном растворе буметанид оказывал однонаправленное подавляющее действие на амплитуду гиперкалиевого сокращения во всем диапазоне концентраций (10, 100 мкМ) (табл. 5, гл. 3.3.2.; рис. 38).

3.6.3. Потенциал-зависимый вход Ca^{2+} в WKY-7 клетки при модуляциях осмолярности среды инкубации

При исследовании сократительной активности сегментов аорты было обнаружено, что в моделях стрикции клеток сокращения СГМС осуществлялось в бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе и было резистентным к блокаторам потенциал-зависимых кальциевых каналов (гл. 3.6.1., 3.6.2.). В связи с этим было изучено потенциал-зависимое накопление ^{45}Ca в культуральных клетках аорты крысы линии WKY-7, обладающих выраженным контрактильным фенотипом.

В клетках WKY-7, гиперкалиевая деполяризация вела к 2-3-кратному увеличению входа ^{45}Ca . Ни нифедипин, ни верапамил существенно не влияли на базальное накопление Ca^{2+} , однако полностью устраняли индуцированный деполяризацией вход Ca^{2+} с $K_i \sim 0.01$ и 1 мкМ, соответственно (рис. 39). Эти значения согласуются с данными, полученными при анализе действия этих соединений на активность Ca^{2+} каналов L-типа в экспериментах с использованием метода patch-clamp [McDonald et al., 1994]. Сжатие клеток, обусловленное добавлением 150 мМ сахарозы, снижало индуцированный деполяризацией вход Ca^{2+} на $\sim 40\%$ и не влияло на базальное накопление Ca^{2+} (рис. 40).

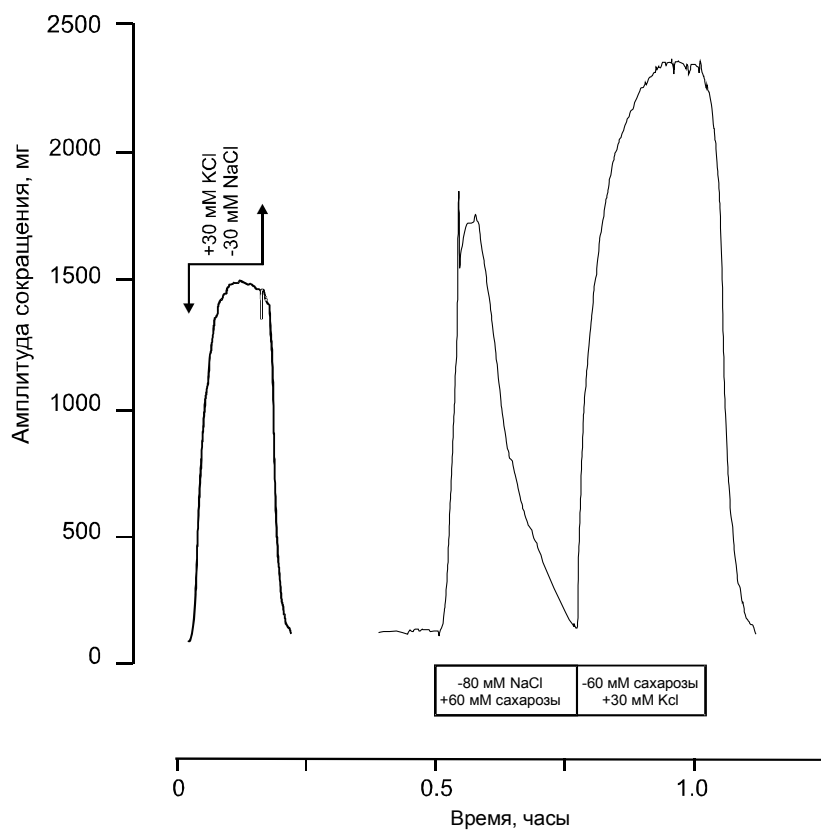


Рисунок 35. Влияние гипоосмотического раствора на механическое напряжение и гиперкалиевое сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

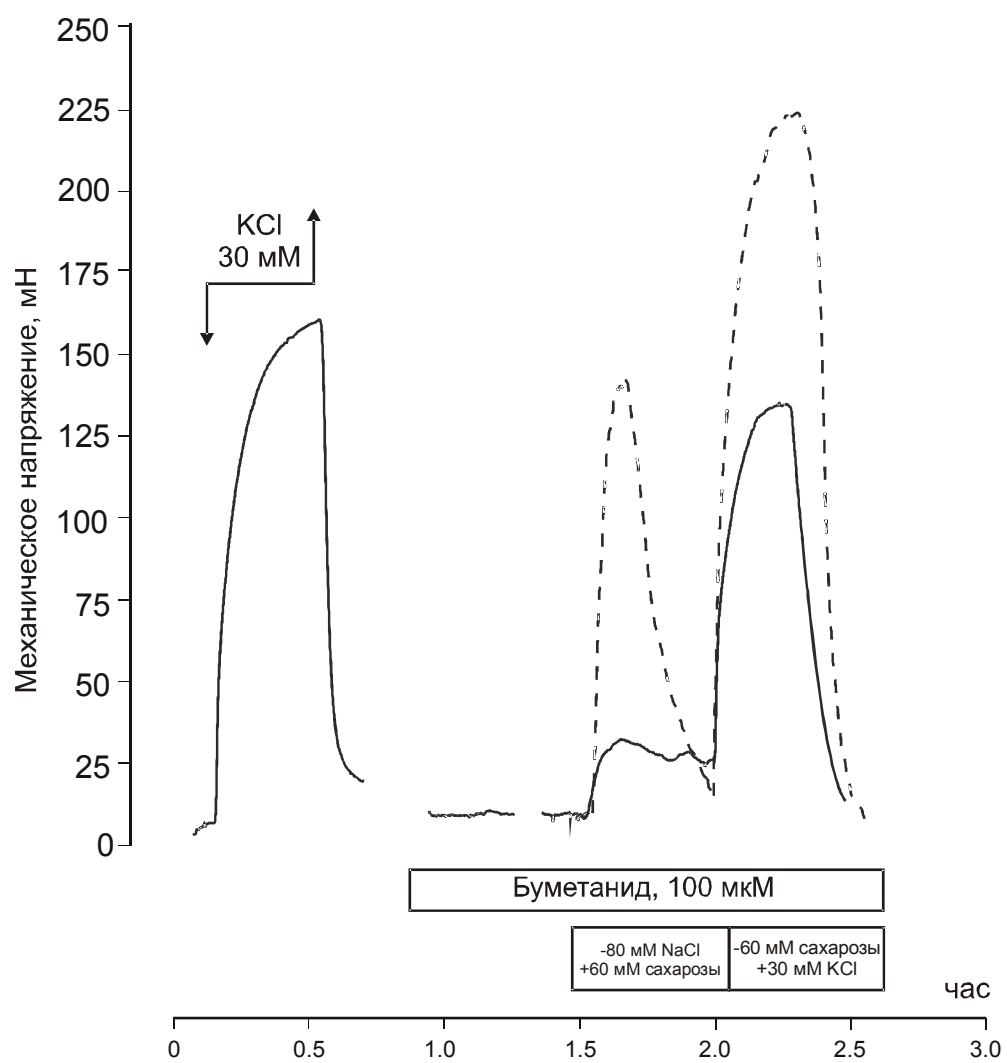


Рисунок 36. Влияние буметанида (10 мкМ) на механическое напряжение и гиперкалиевое сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы в гипоосмотическом растворе. Пунктиром показано механическое напряжение сегментов в отсутствии буметанида.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

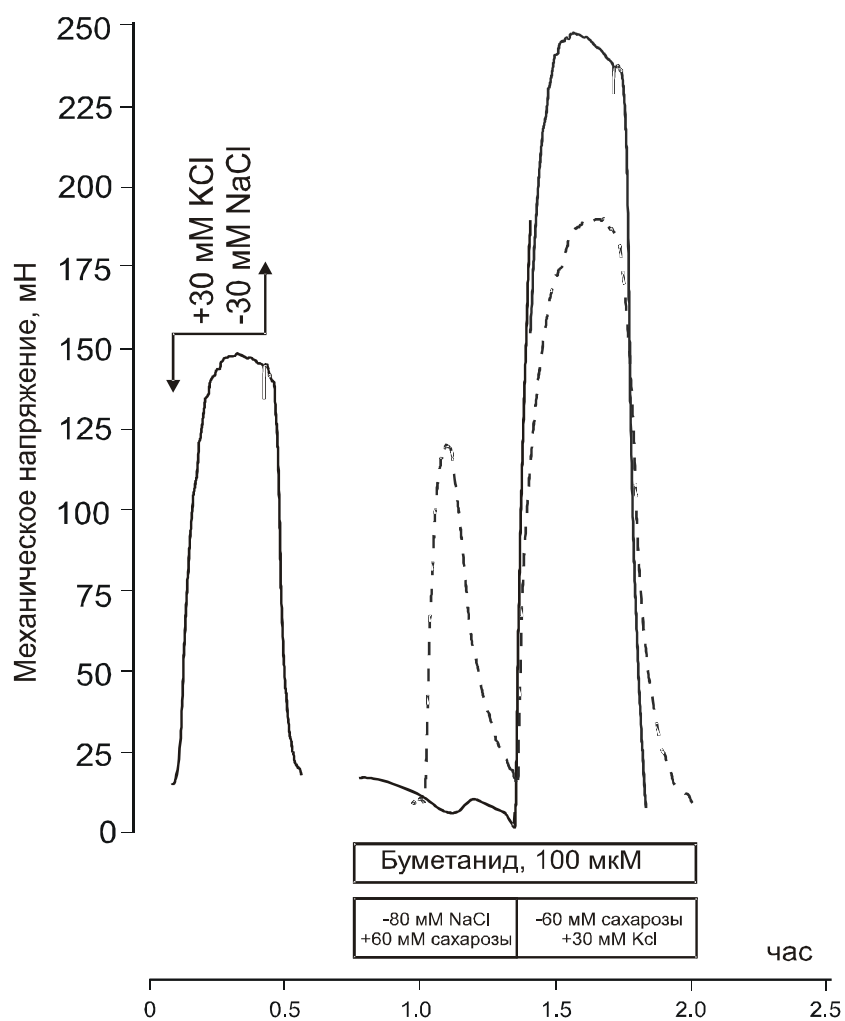
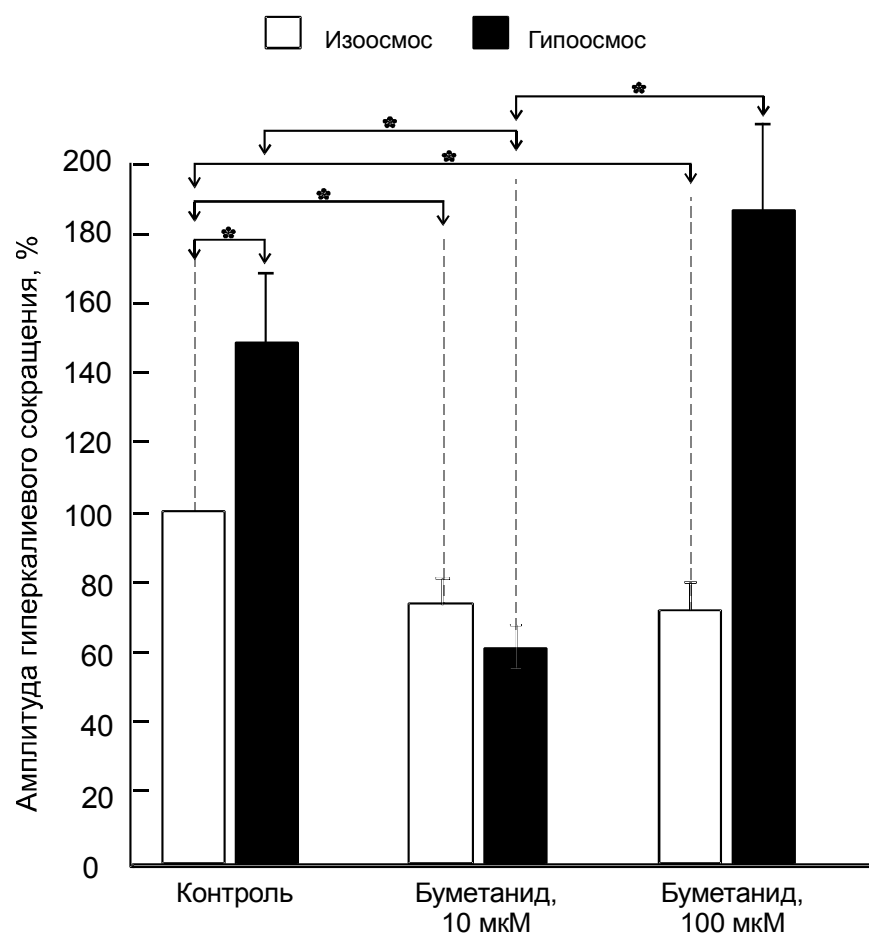


Рисунок 37. Влияние буметанида (100 мкМ) на механическое напряжение и гиперкалиевое сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы в гипоос-

мотическом растворе. Пунктиром показано механическое напряжение сегментов в отсутствии буметанида.

По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).



*Рисунок 38. Амплитуда гиперкалиевого сокращения (30 мМ KCl) в отсутствии или присутствии 10- или 100-мкМ буметанида в нормоосмотических и гипоосмотических условиях. * $p < 0.05$.*

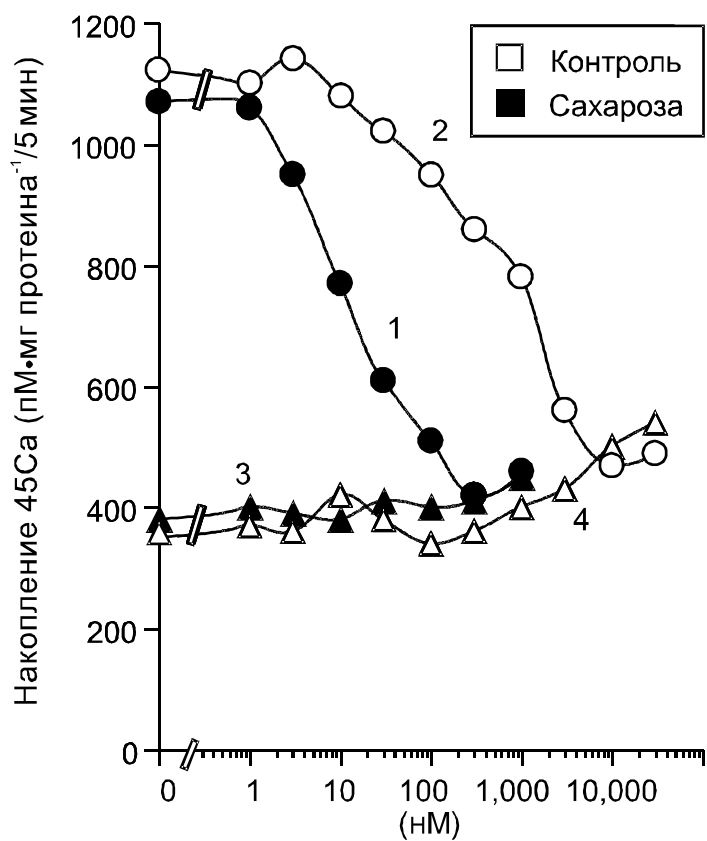


Рисунок 39. Вход Ca^{2+} в клетки WKY-7 в базальных условиях и на фоне деполяризации. Дозовая зависимость входа Ca^{2+} концентрации нифедипина (кривые 1 и 3) и верапамила (кривые 2 и 4).

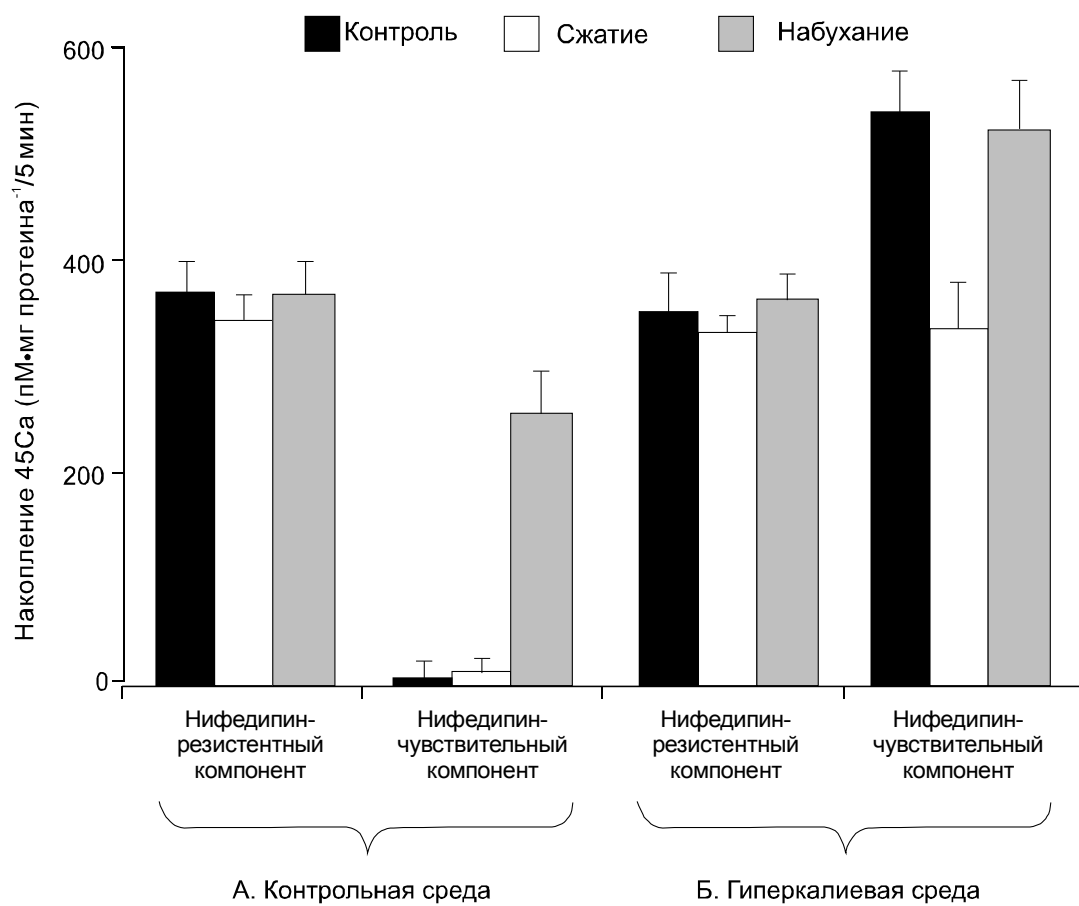


Рисунок 40. Влияние гиперосмотического сжатия и гипоосмотического набухания на базальное (А) и индуцированную гиперкалиевой деполяризацией

мембраны (Б) накопление ^{45}Ca клетками линии WKY-7. Для запуска гиперосмотического сжатия в раствор добавляли 150 мМ сахарозы. Для запуска набухания клеток снижали концентрацию NaCl до 60 мМ

В связи с обнаружением различий в действии буметанида на сокращение СГМС, индуцированное умеренной (30 мМ КСl) и сильной (60 мМ КСl) деполяризацией (гл. 3.3.2., рис. 15), было исследовано накопление ^{45}Ca при трех разных концентрациях K^+ . 30-минутная предобработка 10 мкМ-буметанидом не влияла на накопление ^{45}Ca при $[\text{K}^+]_o=6$ and 60 мМ, в то время как при умеренной деполяризации мембраны ($[\text{K}^+]_o = 30$ мМ) нифедипин-чувствительный компонент накопление ^{45}Ca снижался в обработанных буметанидом клетках ~2-кратно (табл. 15).

Таблица 15. Влияние буметанида на накопление ^{45}Ca в культуральных гладкомышечных клетках линии WKY-7. Клетки преинкубировали в течение 30 минут в 0.25 мл физиологического раствора, содержащего 0.2 мМ CaCl_2 в присутствие или отсутствие 10 мкМ буметанида. Затем были добавлены аликвотированные количества бескальциевого раствора, содержащие 3-4 мкCi/мл ^{45}Ca в присутствие или отсутствие 2-мкМ нифедипина и КСl в концентрации, указанной в левой колонке таблицы.

Концентрация моновалентных катионов в физиологическом растворе (мМ)	Присутствие буметанида	Накопление ^{45}Ca		
		пМ·(мг протеина) $^{-1}$ ·5 мин $^{-1}$		
		1. в отсутствие нифедипина	2. в присутствии нифедипина	3. нифедипин-чувствительный компонент ($\Delta_{1,2}$)
Na – 120; K- 6	нет	387±33	392±51	-
	10 мкМ	391±44	388±22	3
Na – 96; K - 30	нет	972±70	368±40	604
	10 мкМ	689±51*	411±44	278
Na – 66; K - 60	нет	1188±88	354±29	834
	10 мкМ	1117±71	361±47	756

* $p < 0.02$ сравнительно со значениями, полученными в отсутствие буметанида.

Таблица 16. Влияние гипоосмотического набухания на накопление ^{45}Ca клетками линии WKY-7. Клетки инкубировали в течение 5 мин в 0.25 мл физиологического раствора, содержащего 120 мМ NaCl (контроль) или 40 мМ NaCl

(клетки при гипоосмотическом набухании) в присутствии или отсутствии нифедипина. Затем, 0.25 мл той же среды с содержанием ^{45}Ca (4 мкCi/мл) были добавлены в течение последующих 5 мин. Во всех случаях, среда содержала 0.1 мМ CaCl_2 .

Блокатор, мкМ	Накопление ^{45}Ca , пМ (мг протеина) $^{-1}$ 5 мин $^{-1}$	
	Контрольные клетки	Клетки при гипоосмотическом набухании
1. нет (контроль)	378±43	621±48*
2. Нифедипин, 1	370±29	364±40
3. Нифедипин-чувствительный компонент ($\Delta_{1,2}$)	8	257

* $p < 0.01$ по сравнению с контрольными клетками.

Таким образом, стрикция клеток не влияет на базальное накопление ^{45}Ca и существенно подавляет потенциал-зависимый вход кальция в WKY-7 клетки, в то время как гипоосмотическое набухание, напротив, ведет к индукции потенциал-зависимого входа ^{45}Ca . Эти результаты согласуются с данными, полученными на сегментах аорты в экспериментах с использованием нифедипина и верапамила на сокращения в соответствующих моделях изменения объема клеток.

Изменение проводимости Ca^{2+} каналов может быть обусловлено изменением физико-химических свойств внеклеточных и внутриклеточных примембранных слоев при активном осмотически обусловленном выходе из клетки воды. Осмотически обусловленные выходящие потоки воды при стрикции будут вести к концентрированию неорганических и органических осмолитов в примембранных слоях цитоплазмы, в то время как в тонком слое среды с наружной стороны мембраны, напротив, будет происходить их разведение (делюция). В таком случае размеры гидратных оболочек ионов Ca^{2+} теряют соответствие с размерами водной поры канала, и поток Ca^{2+} даже при потенциал-зависимой активации канала уменьшится.

Важную роль в этом процессе может играть общая концентрация макромолекул, увеличивающаяся в примембранных слоях цитоплазмы и снижающаяся в тонком слое с наружной стороны мембраны. Кроме того, состав среды и сам по себе может изменять размеры гидратных оболочек ионов, что также могло бы изменить функционирование ионных транспортеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе проведен системный анализ роли НКСС, Cl⁻ каналов, внутриклеточного Cl⁻, внеклеточного Ca²⁺ и объема клеток в регуляции сократительной активности сосудистых ГМК. Обобщенная схема объем-зависимой ветви регуляции сократительной активности сосудистых гладкомышечных клеток представлена на рисунке 41.

Модуляции объема клеток достаточны, чтобы индуцировать сокращение СГМК

Полученные данные показывают, что переносы сегментов в гипер- или гипотонические растворы ведут к развитию сокращения СГМС.

Несколько свидетельств указывают на то, что это сокращение запускается модуляцией клеточного объема, нежели изменившейся осмолярностью среды инкубации. *Во-первых*, величина сокращения СГМС, запускаемого сахарозой в концентрациях 50-150 мМ коррелирует со снижением объема клеток (рис. 9). *Во-вторых*, объем WKY-7 СГМК при гипоосмотическом набухании быстро нормализуется механизмами регуляторного снижения объема через активацию K⁺ и Cl⁻ каналов [Anfinogenova et al., 2001]. Эти данные согласуются с результатами, показывающими транзиторный характер сокращения СГМС в гипоосмотической среде (рис. 6) и лишь незначительное повышение объема клеток после 45 минут инкубации СГМК в гипоосмотической среде (3.03±0.16 против 2.85±0.18 мкл/мг протеина в контроле). *В-третьих*, наблюдается соответствие поддерживаемого характера сокращения при аппликации сахарозы (рис. 9) и транзиторного сокращения (рис. 10) при изоосмотическом сжатии и динамики поддерживаемого и транзиторного снижения объема клеток в этих моделях стрикции. *В-четвертых*, транзиторная кинетика снижения объема при изоосмотическом сжатии СГМК обусловлена НКСС-опосредованным RVI [Orlov et al., 1996]. *В-пятых*, как снижение объема клеток, так и развитие сокращения при изоосмотическом сжатии пролонгируется при ингибировании НКСС буметанидом (табл. 4, рис. 12).

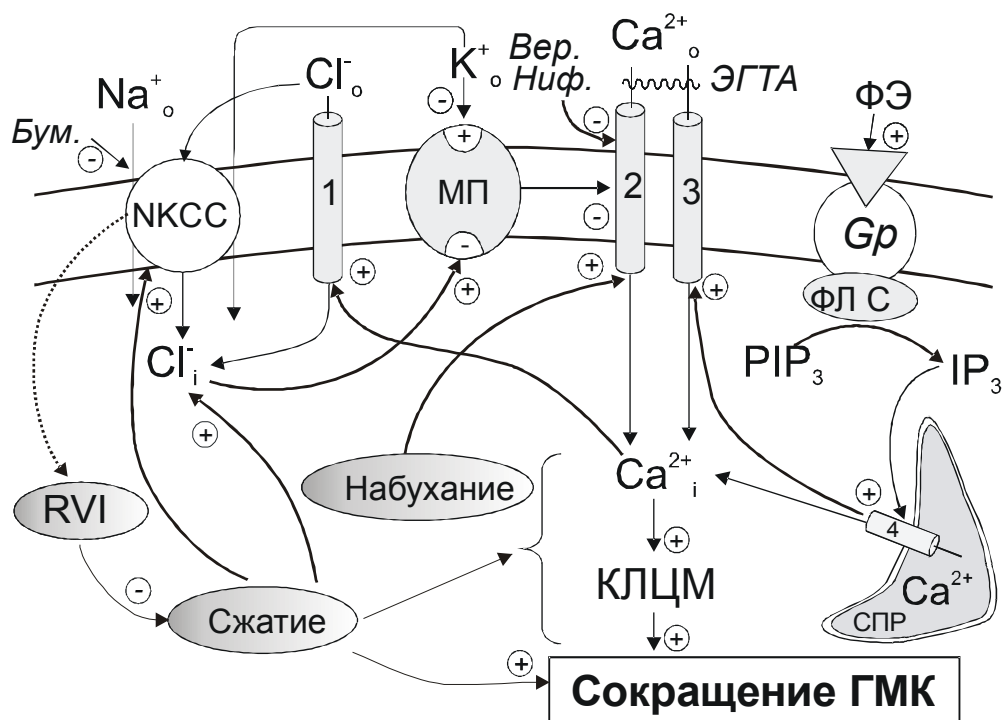


Рис. 41. Схема объем-зависимой регуляции сократительной активности сосудистых ГМК. 1 – Ca^{2+} -активируемые хлорные каналы; 2, 3 – Ca^{2+} каналы; МП – мембранный потенциал; NKCC – $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорт; 4 – Ca^{2+} -АТ-

Фаза саркоплазматического ретикулума; RVI – регуляторное увеличение объема; СПР- саркоплазматический ретикулум; ФЛ С – фосфолипаза С; Gr – ГТФ-связывающий белок; ФЭ - фенилэфрин; КЛЦМ – киназа легких цепей миозина..

Сокращение СГМС при сжатии и набухании клеток: различия в Ca^{2+} -опосредуемой сигнализации

Несмотря на однонаправленное действие в отношении механического напряжения СГМС, клеточные механизмы, лежащие в основе сократительных ответов СГМС при сжатии и набухании клеток существенно различаются. Действительно, подобно K^+ -индуцированной деполяризации мембраны, гипоосмотическое набухание СГМК повышает вход ^{45}Ca , ингибируемый нифедипином. Более того, как нифедипин, так и верапамил подавляют сокращение СГМС при набухании клеток (табл. 12). Эти результаты однозначно свидетельствуют, что индуцированное набуханием сокращение СГМС опосредовано активацией Ca^{2+} каналов L-типа. В противоположность этому, сокращение, индуцируемое гипер- и изоосмотическим сжатием, устойчиво к присутствию блокаторов потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов (табл. 12). Сокращение СГМС при сжатии клеток сохраняется также в отсутствие Ca^{2+} и истощении внутриклеточных депо Ca^{2+} при длительной инкубации в бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе, то есть в условиях, отменяющих K^+ - и фенилэфрин-индуцированные сокращения (табл. 14).

При дальнейшем исследовании Ca^{2+} -зависимой регуляции сокращения СГМС в моделях изменения объема клеток было обнаружено, что стрикция резко подавляет сократительные ответы на гиперкалиевый раствор и аппликацию фенилэфрина (рис. 31-34). Эти результаты согласуются с данными, обнаруженными в СГМС на фоне сжатия клеток в присутствии 100-мМ мочевины [Wagner et al., 2000]. Напротив, 30-минутная преинкубация в гипоосмотическом растворе, предшествующая изоосмотическому сжатию, повышала амплитуду K^+ -индуцированного сокращения (148.2 ± 28.7 по сравнению с 100% контроле, $n=9$, $p < 0.05$) и не влияла на амплитуду сокращения, индуцированного фенилэфрином ($100 \pm 14.4\%$, $n=6$). Учитывая всю совокупность полученных данных, эти результаты демонстрируют различные механизмы сократительных ответов, запускаемых клеточным сжатием, набуханием и физиологическими стимулами.

Несколько заслуживающих внимания гипотез можно предложить для объяснения Ca^{2+} -независимого механизма сопряжения возбуждения-сокращения

при стрикции СГМК. Так, Кравцов с соавторами продемонстрировал возможность сокращения аорты крысы при гиперкалиевой деполяризацией мембраны без увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в безмагниевой среде. Механизм этого сокращения отличался от K^+ -индуцированного сокращения в присутствии дивалентных катионов, амплитуда которого коррелировала с повышением $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Повышение K^+ в изотонической среде вызывало увеличение связывания ^{45}Ca с плазмалеммой ГМК аорты. В противоположность общепринятой точке зрения о ключевой роли $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в сопряжении возбуждения и сокращения ГМК, авторы выдвинули гипотезу, что взаимодействие актина и миозина может активироваться Mg^{2+} -зависимым связыванием Ca^{2+} с кальциевым каналом [Kravtsov GM et al, 2003]. Тем не менее, необходимо подчеркнуть, что в противоположность сокращению СГМС в моделях стрикции (гл. 3.6.1.), K^+ -индуцированное сокращение в без- Mg^{2+} растворе подавлялось блокаторами Ca^{2+} каналов L-типа [Kravtsov et al., 2003]. Кроме того, несколько исследовательских групп сообщали о фосфорилировании легких цепей миозина и Rho-зависимой транслокации миозина II при гиперосмотической стрикции клеток [Klein and O'Neill, 1993, 1995; Pedersen et al., 2002; Shrode et al., 1995; Takeda et al., 1993].

При исследовании механизмов подавляющего действия стрикции клеток на КСI- и ФЭ-вызванные сокращения было установлено, что стрикция ингибирует потенциал-зависимый входа Ca^{2+} (рис. 40). Тем не менее, нужно подчеркнуть, что снижение потенциал-зависимого входа при стрикции составляло лишь ~40%, а базальное накопление ^{45}Ca не изменялось вообще. Возможно, механизмы подавляющего действия стрикции на реактивность сосудистых ГМК не ограничиваются подавлением потенциал-зависимого входа Ca^{2+} . Это предположение основано на том, что ФЭ- и КСI-индуцированное фосфорилирование легких цепей миозина (ЛЦМ) опосредуется не только классической Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой активацией КЛЦМ, но и вовлекает различные сигнальные пути, модулируемые при изменении объема клеток. Так, активация α_1 -адренорецепторов ведет к запуску многочисленных сигналов, контролирующее взаимодействие актина и миозина. Эти сигнальные пути могут быть классифицированы в зависимости от принадлежности к миозин- или актин-зависимому типу регуляции.

Миозин-зависимый путь регуляции охватывает как кальциевую активацию, так и кальциевую сенситизацию. При адренергической активации происходит динамическая транслокация в мембрану и другие внутриклеточные сайты ряда протеиновых киназ (в частности, Ca^{2+} -активируемых протеинкиназ, Rho-ассоциированных киназ и ПК-С), которые вовлечены в регуляцию фосфатазы ЛЦМ и обеспечивают кальциевую сенситизацию сокращения. Актин-зависимая регуляция включает возможную дезинтеграцию актин-миозиновых взаимодействий посредством фосфорилирования кальдесмона с участием MAP-киназ, которые также транслоцируются в цитоплазме при адренергической стимуляции [Wier and Morgan, 2003]. Ранее участие Rho-ассоциированных киназ рассматривалось как главный механизм регуляции *кальций-независимых* компонентов сокращения сосудистых ГМК при активации ряда рецепторов [Shum et al., 2003; Nakao et al., 2003; Damron et al., 2002; Crowley et al., 2002; Shirao et al., 2002; Shirasawa, 2003]. Однако, в сосудистых ГМК существует и *Ca²⁺-зависимая* стимуляция Rho [Sakurada et al., 2003; Ghisdal et al., 2003]. При этом наблюдается сложное взаимодействие RhoA/ROCK-зависимой сигнализации с кальций-зависимыми механизмами.

Еще одним механизмом снижения чувствительности СГМС при аппликации КС1 и ФЭ в моделях стрикции клеток может выступать увеличение общей концентрации макромолекул (macromolecular crowding) [], роль которой была установлена в регуляции элементов цитоскелета [Cuneo et al., 1992; Madden and Herzfeld, 1993] и объем-чувствительного мембранного транспорта [Colclasure et al., 1992; Dunham et al., 1995].

Роль НКСС и внутриклеточного Cl⁻

Основной гипотезой вовлечения $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта в сократительную регуляцию СГМК является создание неравновесного электрохимического градиента для ионов Cl^- . В это случае, сокращение СГМС может запускаться при деполяризации сарколеммы, вызванной увеличением $[Cl^-]_i$ и/или P_{Cl} . Эта гипотеза согласуется со следующими результатами: 1) Блокаторы Cl^- каналов нифлумовая кислота и SITS подавляют сокращения СГМС при гиперкалиевой деполяризации мембраны СГМК и аппликации фенилэфрина и гипоосмотического

растворов. 2) Селективный ингибитор НКСС буметанид вызывает снижение амплитуды сокращений СГМС, вызванных аппликацией фенилэфрина, КС1 (30 мМ), а также гипо- и гиперосмотического растворов. 3) Ингибирование НКСС буметанидом ведет к гиперполяризации мембраны СГМК [Davis et al., 1993] и снижению $[Cl^-]_i$ в как в интактных, так и в стимулированных аппликацией сахарозой сегментах аорты (гл. 3.5., табл. 11). 4) Буметанид подавляет сокращение СГМС при слабой, но не сильной, деполяризации мембраны (гл. 3.3.2., рис. 15). Последнее наблюдение можно было бы связать с подавлением активности НКСС, обусловленном снижением концентрации Na^+ , со 120 мМ до 60 мМ. Однако высокая афинность НКСС для Na^+ ($K_{1/2} \sim 25$ мМ) [Orlov et al., 1996] противоречит этому предположению.

Были получены данные, что длительная (30 мин) предобработка буметанидом почти полностью подавляют сокращение, индуцированное аппликацией фенилэфрина (гл. 3.3.3., рис. 17). Этот результат отличается от ранее опубликованных данных [Akar et al., 1999], согласно которым 20-минутная предобработка 10 мкМ-буметанидом снижала ФЭ(1 мкМ)-индуцированное сокращение лишь на 5-10%. Противоречивость этих результатов может быть объяснена как различием экспериментальных животных, использованных в данном исследовании и в работе Akar et al., так и различными протоколами исследования.

По всей видимости, в модели гиперосмотической стрикции быстрое повышение $[Cl^-]_i$ в СГМК является следствием сжатия клеток, в то время как при изоосмотической стрикции $[Cl^-]_i$ увеличивается как за счет снижения объема, так и за счет активации НКСС. Это подтверждается тем, что буметанид отменяет увеличение $[Cl^-]_i$ в модели изоосмотического, но гиперосмотического сжатия клеток (табл. 10). Вероятно, НКСС вовлечен в сократительную регуляцию СГМК при стрикции как модулятор $[Cl^-]_i$, но независимо от Cl^- -индуцированной деполяризации мембраны. Последнее предположение основано на том, что при моделировании гиперосмотической и изоосмотической стрикции выявлены НКСС-опосредованные механизмы сократительной регуляции, независимые от потенциал-зависимого входа кальция, который должен быть главным следствием деполяризации мембраны. Исключая классические Ca^{2+} -зависимые механиз-

мы сокращения, запускаемые при активации деполяризующих хлорных токов, Cl^-_i может участвовать в сопряжении возбуждения и сокращения 1) вызывая Cl^- -зависимую деполяризацию мембраны СГМК с последующим сокращением, независимым от повышения внутриклеточного кальция и не требующим входа наружного кальция или 2) запуская не идентифицированный до настоящего времени в СГМК Cl^-_i -чувствительный регуляторный каскад.

Первая гипотеза основана на данных Kravtsov et al (2003), согласно которым Mg^{2+} -зависимое связывание Ca^{2+} с кальциевым каналом может активировать взаимодействие актина и миозина при гиперкалиевой деполяризации мембраны [Kravtsov GM et al, 2003].

Что касается второй гипотезы, то она основана на том, что рядом исследователей были идентифицированы Cl^-_i -чувствительные каскады, вовлекающие Cl^-_i -зависимые протеиновые киназы в ряде негладкомышечных клеток [Treharne KJ et al., 1994; Muimo R et al., 1998; Lanius RA et al., 1993]. Тем не менее, модуляция $[Cl^-]_i$ вполне может влиять на активность внутриклеточных протеинов, вовлеченных в функционирование сократительного аппарата независимо от входа кальция.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании особой ветви регуляции сократительной активности сосудистых ГМК, включающей специфический объем-зависимый ионный транспорт. Изменение объема клеток является своеобразным сигнальным механизмом, который может запускать сокращение гладкомышечных клеток и модулировать сократительное действие физиологически активных соединений и деполяризации мембраны.

ВЫВОДЫ

1. Варьирование осмолярности инкубационной среды сопровождается изменениями объема сосудистых гладкомышечных клеток. Как набухание, так и стрикция клеток ведут к развитию сокращений, динамика которых согласуется с изменениями объема клеток.
2. Изоосмотическая стрикция вызывает преходящую стимуляцию $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта и регуляторное увеличение объема, в то время как гиперосмотическая стрикция ведет к поддерживаемой активации этого транспорта, не сопровождающейся регуляторным увеличением объема клеток.
3. Транзиторный характер сокращения при изоосмотической стрикции обусловлен восстановлением объема клеток, опосредованным активацией $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта. Выключение $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта буметанидом пролонгирует как уменьшение объема клеток, так и сокращения сосудистых сегментов.
4. Уменьшение объема клеток увеличивают внутриклеточное содержание ионов хлора в изолированных ГМК аорты крысы. Ингибитор $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта буметанид подавляет накопление ионов хлора как в интактных, так и в активированных гиперосмотической стрикцией сегментах аорты крысы.
5. Одним из ключевых механизмов, используемых гладкомышечными клетками с участием $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта в регуляции сокращений гладких мышц, является поддержание неравновесного электрохимического потенциала ионов Cl^- .
6. Сокращения сегментов аорты крысы в моделях гиперосмотической и изоосмотической стрикции лишь частично зависят от внеклеточных ионов Ca^{2+} и устойчивы к действию блокаторов потенциал-зависимых кальциевых каналов.

7. Сокращение сегментов аорты, индуцированное гипоосмотическим воздействием обусловлено: 1) наличием неравновесного электрохимического хлорного потенциала, 2) открыванием объем-чувствительных и Ca^{2+} -активируемых Cl^- каналов 3) входом Ca^{2+} по потенциал-зависимым кальциевым каналам, 4) угнетением $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена.
8. Гетероосмотические растворы ведут к значительным изменениям оперирования кальциевой сигнальной системы. Стрикция подавляет потенциал-зависимый вход наружного кальция по Ca^{2+} каналам L-типа и угнетает сокращения, индуцированные гиперкалиевой деполяризацией мембраны и стимуляцией α_1 -адренергических рецепторов. Набухание клеток в гипоосмотическом растворе усиливает эффекты гиперкалиевого раствора, не оказывая существенного влияния на величину сокращений, вызванных стимуляцией α_1 -адренергических рецепторов.
9. Активация объем- и Ca^{2+} -зависимых хлорных каналов является важным механизмом запуска сокращения сосудистых гладкомышечных клеток при активации α_1 -адренергических рецепторов и гиперкалиевой деполяризации мембраны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипенко, А.Е. Вторичные посредники в клетках сердца и гладких мышц сосудов / А.Е. Антипенко // Биохимия. - 1991. - Т. 56, вып. 4. - С.589-620.
2. Баскаков, М.Б. Кальмодулин в механизмах регуляции сократительной функции гладкой мускулатуры / М.Б. Баскаков, М.А. Медведев // Бюлл. СО АМН СССР - 1984. - N4. - С.83-88.
3. Баскаков, М.Б. Механизмы регуляции вторичными посредниками электрической и сократительной активности гладких мышц / М.Б. Баскаков: Дис.с.д.м.н. - Томск, 1988. - 367 с.
4. Баскаков, М.Б. Роль протеинкиназы С в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц: эффект форболового эфира / М.Б. Баскаков, В.Б. Студницкий, М.А. Медведев, Б.И. Ходоров // Бюлл. эксперим. биол. мед.- 1987. - N7.-С.8-11.
5. Бурый, В.А. Роль внутриклеточного кальция в активации сокращения гладких мышц легочных артерий / В.А. Бурый, А.В. Гурковская, Н.И. Гокина, М.Ф. Шуба // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. - 1989. - Т.105,N9. - С.261-264.
6. Бурый, В.А. Роль внутриклеточного кальция в активации сокращения гладких мышц легочных артерий / В.А/ Бурый, А.В. Гурковская, Н.И. Гокина, М.Ф. Шуба // Бюлл. эксперим. биол. и медицины – 1989. – т. 105, N9. – С.261-264.
7. Веренинов А.А. Транспорт ионов у клеток в культуре / А.А. Веренинов, И.И. Марахова. - Ленинград. – Наука. – 1986. – 290 с.
8. Есипова, И.К. Очерки по гемодинамической перестройке сосудистой стенки // И.К. Есипова, О.Я. Кауфман, Г.С. Крючкова, В.А. Шахламов, И.М. Яровая – 1971. – 312 с.
9. Костерин, С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах / С.А. Костерин. - Киев: Наукова думка, 1990. - 216 с.
10. Кочемасова, Н.Г. Роль ионов кальция в формировании плато потенциала действия гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки в безнатриевых растворах / Н.Г. Кочемасова // Физиол. ж. - 1982. - Т.28,N2. - С.206-214.

11. Кочемасова, Н.Г. Роль ионов кальция в формировании плато потенциала действия гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки в безнатриевых растворах / Н.Г. Кочемасова // Физиол. ж. - 1982. - Т.28,N2. - С.206-214.
12. Кочемасова, Н.Г. Роль ионов кальция в формировании плато потенциала действия гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки в безнатриевых растворах / Н.Г. Кочемасова // Физиол. ж. - 1982. - Т.28,N2. - С.206-214.
13. Крутецкая, З.И. Метаболизм фосфоинозитидов и формирование кальциевого сигнала в клетках / З.И. Крутецкая, О.Е. Лебедев // Цитология. - 1992. - Т.34,N10. - С.26-44.
14. Курский, М.Д., Транспорт кальция и функции гладких мышц / М.Д. Курский, Е.Т. Михайленко, А.Н. Федоров.- Киев: Наукова думка, 1981. - 127 с.
15. Орлов, С.Н. Кальмодулин / С.Н. Орлов. М: Итоги науки и тех. - 1987. - 209 с.
16. Орлов, С.Н. Са-насос плазматической мембраны // Кальций - регулятор метаболизма. - Томск, 1987. - С.74-96.
17. Расмуссен, Г. Циркуляция кальция и внутриклеточная передача сигнала / Г. Расмуссен // В мире науки. - 1989.-N12. - С.36-43.
18. Рекалов, В.В. Кальциевый ток и сокращение гладкомышечной клетки / В.В. Рекалов, В.В. Тараненко, М.Ф. Шуба // Докл. АН СССР. - 1985. - Т.281,N2. - С.462-466.
19. Скок, В.И. Нервно-мышечная физиология / В.И. Скок, М.Ф. Шуба. Киев: Вища школа. - 1986.- 224 с.
20. Тепперман, Дж. Физиология обмена веществ и эндокринной системы / Дж. Тепперман, Х. Тепперман: Пер. с англ.М.: Мир. - 1989. - 656 с.
21. Ткачук, В.А. Гормональная регуляция транспорта Ca^{2+} в клетках крови и сосудов / В.А.Ткачук // Рос. Физиол. ж. им. И.М.Сеченова. - 1998. - Т.84,N10. - С.1006-1018.
22. Ткачук, В.А. Регуляция кальцием аденилатциклазной системы сердца / В.А. Ткачук // в сб. Кальций - регулятор метаболизма. - Томск, 1987. - С.25-37.

23. Шуба, М.Ф. Мембранные механизмы возбуждения гладкомышечных клеток / М.Ф. Шуба., В.А Бурый // Физиол. ж. –1984. - Т.30, N5. - С.545-559.
24. Шуба, М.Ф. Механизмы возбуждения и сокращения гладких мышц мозговых сосудов / М.Ф. Шуба., Н.И. Гокина. -Киев: Наукова думка. - 1991. - 129 с.
25. Шуба, М.Ф. Пути и механизмы трансмембранного входа в гладкомышечные клетки ионов кальция, участвующих в активации сокращения // Физиологический журнал. – 1981. – т.27,N4. – С. 533-541.
26. Шуба, М.Ф. Физиология сосудистых гладких мышц / М.Ф. Шуба, Н.Г Кочемасова. - Киев: Наукова думка, 1988. - 250с.
27. Шуба, М.Ф. Физиология сосудистых гладких мышц / М.Ф. Шуба, Н.Г. Кочемасова. - Киев: Наукова думка, 1988. – 250 с.
28. Hedges J. Phosphorylation of caldesmon by ERK MAP kinases in smooth muscle. / J. Hedges, B. Oxhorn, M. Carty, et all. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*-2000.-V.278.-C718–C726.
29. Abedi, H. Cytochalasin D stimulation of tyrosine phosphorylation and phosphotyrosine-associated kinase activity in vascular smooth muscle cells / H. Abedi, I. Zachary // *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Apr 28;245(3):646-50.
30. Acher, R. [Water homeostasis in the living: molecular organization, osmoregulatory reflexes and evolution] / R. Acher // *Ann Endocrinol (Paris)*. 2002 Jun; 63(3): 197-218. Laboratoire de Chimie Biologique, Universite de Paris VI, 96, boulevard Raspail, 75006 Paris, France.
31. Adames, N.R. Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae* / N.R. Adames, J.A. Cooper // *J Cell Biol.* 2000/ - 149(4). - P863-74.
32. Adragna, N / N. Adragna, M. Di Fulvio, P.K. Lauf // Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes. *J.Membr.Biol.* – 2004. - (in press).
33. Adragna, N.C. K-Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: possible implication in vasodilation / N.C. Adragna, R.E. White, S.N. Orlov, P.K. Lauf // *Am J Physiol*/ - 2000, - 278. - C381-C390.
34. Aiton, J.F. Occurrence of passive furosemide-sensitive transmembrane potassium transport in cultured cells / J.F. Aiton, A.R. Chipperfield, J.F. Lamb, P. Ogden, N.L. Simmons // *Biochim. Biophys.* - 1981. - Acta 646, P.389-398.

35. Akar, F. Contractile regulation of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in vascular smooth muscle / F. Akar, G. Jiang, R.J. Paul, W.C. O'Neill // *Am J Physiol Cell Physiol* (United States). – 2001. – 281. – P.C579-84.
36. Akar, F. Vasoconstrictors and nitrovasodilators reciprocally regulate the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in rat aorta / F. Akar, E. Skinner, J.D. Klein, M. Jena, R.J. Paul, W.C. O'Neill // *Am J Physiol*. – 1999. – 276. – P.C1383-C1390.
37. Albert, A.P. Properties of a constitutively active Ca²⁺-permeable non-selective cation channel in rabbit ear artery myocytes / A.P. Albert, A.S. Piper, W.A. Large // *J Physiol*. – 2003. - 549(Pt 1). - p143-56. Epub 2003 Apr 04.
38. Alda, J.O. Purification and chemical characterization of a potent inhibitor of the Na-K-Cl cotransport system in rat urine / J.O. Alda, J.A. Mayoral, M. Lou, I. Gimenez, R.M. Martinez, R.P. Garay // *Biochem Biophys Res Commun*. 1996. - 221(2). – P.279-85.
39. Alda, J.O. Site of origin of an urinary Na-K-Cl cotransport inhibitor / J.O. Alda, M. Alvarez-Guerra, M. Lou, I. Gimenez, A. Soler, R.P. Garay // *Mineral Electrolyte Metab.* - 1995. – 21 – P.403-410.
40. Alexander, S.P.H. Trends in pharmacological Sciences Receptor and Ion Channel Supplement / S.P.H. Alexander, J.A. Peters. - 2000. Vol. 11. Elsevier, - Amsterdam.
41. Alvarez-Guerra, M. Endogenous inhibitor of Na-K-Cl cotransport system in inbred Dahl rats / M. Alvarez-Guerra, F. Vargas, J.O. Alda, R.P. Garay // *Am. J. Physiol.* - 1997. – 272. - F356-F363.
42. Alvarez-Guerra, M. The erythrocyte Na,K,Cl cotransporter and its circulating inhibitor in Dahl salt-sensitive rats / M. Alvarez-Guerra, C. Nazaret, R.P. Garay // *J.Hypertens.* - 1998. –16. – P.1499-1504.
43. Alvarez-Leefmans, F.J. Chloride transport, osmotic balance and presynaptic inhibition / F.J. Alvarez-Leefmans // In: *Presynaptic Inhibition and Neural Control*, edited by P. Rudomý'n, R. Romo, and L. Mendell. New York: Oxford Univ. Press, 1997.
44. Alvarez-Leefmans, F.J. Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes / F.J. Alvarez-Leefmans FJ, Gami SM, Giraldez F, Noguer I // *J. Physiol. (Lond.)* 406: 225–246, 1988.

45. Alvarez-Leefmans, F.J. Intracellular Cl⁻ regulation and syn-aptic inhibition in vertebrate and invertebrate neurons / F.J. Alvarez-Leefmans // In: Chloride Channels and Carriers in Nerve, Muscle and Glial Cells, edited by F. J. Alvarez-Leefmans and J. M. Russell. New York: Plenum, 1990, P.109–158.
46. Anderson, R.G.W. The caveolae membrane system / R.G.W. Anderson // *Annu. Rev. Biochem.* 67. – 1998. - P.199–225.
47. Anfinogenova, Y.J. Swelling-induced K⁺ fluxes in vascular smooth muscle cells are mediated by charybdotoxin-sensitive K⁺ channels / Y.J. Anfinogenova, X. Rodriguez, R. Grygorczyk, N. Adragna, P.K. Lauf, P. Hamet, S.N. Orlov // *Cell Physiol Biochem.* – 2001. – 11. – P.295-310.
48. Anfinogenova, Y.J. Vascular smooth muscle contraction in hyperosmotic medium: role of Ca²⁺, anion channels and cell volume-sensitive Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport / Y.J. Anfinogenova, A.A. Kilin, I.V. Kovalev, M.B. Baskakov, S.N. Orlov // *J.Hypertens.* – 2004. – 21. – P.S101.
49. Arnon, A. Na⁺ entry via store-operated channels modulates Ca²⁺ signaling in arterial myocytes / A. Arnon, J.M. Hamlyn, M.P. Blaustein // *Am J Physiol Cell Physiol.* - 2000. - 278. - P.C163-C173.
50. Asano, M. Comparison of inhibitory effects of Y-27632, a Rho kinase inhibitor, in strips of small and large mesenteric arteries from spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats / M. Asano, Y. Nomura // *Hypertens Res.* – 2003. - 26(1). –p.97-106.
51. Asano, M. Contribution of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ to the activation of Ca²⁺ -activated K⁺ channels in the resting state of arteries from spontaneously hypertensive rats / M. Asano, Y. Nomura // *J Hypertens.* – 2002. - 20(3). - P.447-54.
52. Babitch, J. Channel hands / J. Babitch // *Nature.* - 1990. – 346. – P.321–322.
53. Babu, G.J. Isoform switching from SM-B to SM-A myosin results in decreased contractility and altered expression of thin filament regulatory proteins / G.J. Babu, G.J. Pyne, Y. Zhou, C. Okwuchukwasanya, J.E. Brayden, G. Osol, R.J. Paul, R.B. Low, M. Periasamy // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2004. - 287(3):C723-9. Epub 2004 May 12.

54. Bachmann, A. Potent inhibition of the CFTR chloride channel by suramin / A. Bachmann, U. Russ, U. Quast // *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 1999. - 360: P.473-476.
55. Bae, Y.M. Ca²⁺-dependent membrane currents in vascular smooth muscle cells of the rabbit / Y.M. Bae, K.S. Kim, J.K. Park, E. Ko, S.Y. Ryu, H.J. Baek, S.H. Lee, W.K. Ho, Ye. Earm // *Life Sci (England).* – 2001. - 69(21). – P.2451-66.
56. Bahamonde, M.I. Voltage-dependent anion channel localises to the plasma membrane and peripheral but not perinuclear mitochondria / M.I. Bahamonde, M.A. Valverde // *Pflugers Arch.* 2003. - 446(3). – P.309-13. Epub 2003 Apr 16.
57. Bahinski, A. Chloride conductance regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac myocytes / A. Bahinski, A.C. Nairn, P. Greengard, D.C. Gadsby // *Nature.* - 1989. – 340. – P.718–721.
58. Bannister, J. Relaxation of isolated rat arterial smooth muscle by chloride transport inhibitors / J. Bannister, A.R. Chipperfield, P. Dubb, A.A. Harper, A. Haus-sain // *J. Physiol.* - 1999. - 520P, 99.
59. Barandier, C. Small G proteins as novel therapeutic targets in cardiovascular medicine / C. Barandier, X.-F., Ming, Z. Yang // *News Physiol Sci.* – 2003. – 18. – P.18-22.
60. Bárány, K. Myosin light chains / K. Bárány, Bárány M // *In Biochemistry of Smooth Muscle Contraction* (M. Bárány, Ed.). - 1996a. – P.21-35, Academic Press.
61. Bárány, M. (1996). *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction.* Academic Press.
62. Bárány, M. Exchange of the actin-bound nucleotide in intact arterial smooth muscle / Bárány, M, Barron JT, Gu L, Bárány K // *J. Biol. Chem.* – 2001. –276. – P.48398-48403.
63. Bárány, M. Inositol 1,4,5-trisphosphate production / K. Bárány, Bárány M // *In Biochemistry of Smooth Muscle Contraction* (M. Bárány, Ed.). - 1996b. – P.269-282, Academic Press.
64. Bárány, M. Protein phosphorylation during contraction and relaxation / K. Bárány, Bárány M // *In Biochemistry of Smooth Muscle Contraction* (M. Bárány, Ed.). - 1996c. - P.321-339, Academic Press.

65. Barnes, P.J. Beta-adrenoreceptors smooth muscle, nerves cells / P. Barnes // *Life sci.* - 1993. - V.52,N26. - P.2101- 2109.
66. Barros J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis / L.F. Barros, T. Hermosilla, J. Castro // *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* – 2001. - 130(3). – P.401-9.
67. Beall, A.C. Cyclic nucleotide-dependent vasorelaxation is associated with the phosphorylation of a small heat shock-related protein / A.C. Beall, K. Kato, J.R. Goldenring, R. Rasmussen, C.M. Brophy // *J. Biol. Chem.* – 1997. –272. – P.11283-11287.
68. Becker, P.L. Regulation of calcium concentration in voltage-clamped smooth muscle cells / P.L. Becker, J.J. Singer, J.V. Walsh, F.S. Fay // *Science.* – 1989. – 244. – P.211–214.
69. Begum, N. Insulin signaling in the vasculature / N. Begum // *Front Biosci.* 2003. - 1;8. - P.s796-804.
70. Berger, HA. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases / H.A. Berger, S.M. Travis, M.J. Welsh // *J. Biol. Chem.* – 1993. –268. – P.2037–2047.
71. Berk, B.C. Spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells in culture exhibit increased growth and Na⁺/H⁺ exchange / B.C. Berk, G. Vallega, A.J. Muslin, H.M. Gordon, M. Canessa, R.W. Alexander // *J.Clin.Invest.* - 1989. – 83. – P.822-829.
72. Berridge, M. Receptors and on calcium signaling / M. Berridge // *Trends. Pharmacol. Sci.* - 1984.- V.2101 - P.345-360.
73. Bescond, J. Characterization of an angiotensin-II-activated chloride current in rabbit sinoatrial cells / J. Bescond, P. Bois, J. Petit-Jacques, J. Lenfant // *J. Membr. Biol.* – 1994. - 140. – P.153–161.
74. Bialecki, R. KCa channel antagonists reduce NO donor-mediated relaxation of vascular and tracheal smooth muscle / R. Bialecki, C.Stinson-Fisher // *Am. J. Physiol.*-1995. - V.268,N1. - P.L152-L159.
75. Bianchi, G. Red blood cell abnormalities and spontaneous hypertension in rats. A genetically determined link / G. Bianchi, P. Ferrari, P. Trizio, M. Ferrandi, L. Torielli, B.R. Barber, E. Polli // *Hypertension.* - 1985, 7. – P.319-325.

76. Biel, M. Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung / M. Biel, P. Ruth, E. Bosse, R. Hullin, W. Stuhmer, V. Flockerzi, F. Hofmann // *FEBS Lett.* – 1990. – 269. – P.409–412.
77. Bkaily, G. Receptors and second messenger modulation of Ca²⁺ and K⁺ channels activity in vascular smooth muscle cells. In: *Ion Channels of Vascular Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells*, edited by N. Sperelakis and H. Kuriyama. New York: Elsevier, 1992, P.185–198.
78. Blaustein, MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness / M.P. Blaustein // *Am J Physiol Cell Physiol.* - 1993. – 264. – P.C1367-C1387
79. Blumenstein, Y. Intracellular Na⁺ inhibits voltage-dependent N-type Ca²⁺ channels by a G protein subunit-dependent mechanism / Y. Blumenstein, O.P. Maximyuk, N. Lozovaya, N.M. Yatsenko et al // *J Physiol.* – 2004. – 556. – P.121-134.
80. Boese, SH. The swelling-activated anion conductance in the mouse renal inner medullary collecting duct cell line mIMCD-K2 / S.H. Boese, M. Glanville, M.A. Gray, N.L. Simmons // *J Membr Biol.* – 2000. – 177. – P.51-64.
81. Bookstein, C. A unique sodium–hydrogen exchange isoform (NHE-4) of the inner medula of the rat kidney is induced by hyperosmolarity / C. Bookstein, M.W. Musch, A. DePaoli, M. Villereal, M.C. Rao, E.B. Chang // *J. Biol. Chem.* – 1994. – 269. –P. 29 704–29 709.
82. Bookstein, C. Characterization of the rat Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4 and localization in rat hippocampus / C. Bookstein, M.W. Musch, A. DePaoli, Y. Xie, K. Rabenau, M. Villereal, M.C. Rao, E.B. Chang // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1996. – 271. - C1629–C1638.
83. Borin, ML. Intracellular free Na⁺ in resting and activated A7r5 vascular smooth muscle cells / M.L. Borin, W.F. Goldman, M.P. Blaustein // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1993. – 264. – P.C1513-C1524.
84. Bortner, CD. Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes / C.D. Bortner, J.A. Cidlowski // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1996. – 271. – P.C950– C961.

85. Bourcier, N. Purinergic-induced ion current in monolayers of C7-MDCK cells: role of basolateral and apical ion transporters / N. Bourcier, R. Grygorczyk, M. Gekle, Y. Berthiaume, S.N. Orlov // *J Membr Biol.* - 2002, - 186. – P.131-143.
86. Bourreau, J.P. Acetylcholine Ca²⁺ stores refilling directly involves a dihydropyridine-sensitive channels in dog trachea / J.P. Bourreau, A.P. Abela, C.Y. Kwan, E.E. Daniel // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 30) – 1991. - 261 – P.C497–C505.
87. Brock, T.A. Angiotensin increases Na⁺ entry and Na⁺/K⁺ pump activity in cultures of smooth muscle from rat aorta / T.A. Brock, L.J. Lewis, J.B. Smith // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1982. – 79. – P.1438-1442.
88. Brophy, C.M. The small heat shock-related protein-20 is an actin-associated protein / Brophy, CM, Lamb S, Graham A // *J. Vasc. Surg.* – 1999. – 29. – P.326-333.
89. Brown, R.A. Increased Na⁺K⁺Cl⁻ cotransport in rat arterial smooth muscle in deoxycorticosterone (DOCA)/salt-induced hypertension / R.A. Brown, A.R. Chipperfield, J.P. Davis, A.A. Harper // *J Vasc Res.* – 1999. – 36. – P.492-501.
90. Brozovich, F.V. Rho signaling: agonist stimulation and depolarization come together / F.V. Brozovich // *Circ Res.* – 2003. - 19;93(6). – P.481-3.
91. Bruschi, G. Myoplasmic Ca²⁺-force relationship studied with fura-2 during stimulation of rat aortic smooth muscle / G. Bruschi, M.E. Bruschi, G. Regolisty, A. Borghetti // *Am J Physiol.* - 1988. –254. – P.H840-H854.
92. Bukosi, R.D. Intracellular Ca²⁺ and force determined simultaneously in isolated resistance arteries / R.D. Bukosi, C. Bergmann, A. Gairard, J.C. Stoclet // *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.* 26) – 1989. – 257. –P. H1728–H1735.
93. Bülbring, E. Correlation between membrane potential, spike discharge and tension in smooth muscle / Bülbring, E // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1955. – 128. – P.200-221.
94. Bülow, A. Membrane stretch evoked by cell swelling increases contractile activity in vascular smooth muscle through dihydropyridine-sensitive pathways / A. Bülow, B. Johansson // *Acta Physiol Scand.* – 1994. – 152. – P.419-427.
95. Burdyga, T.V. On the mechanisms whereby temperature affects excitation-contraction coupling in smooth muscle [In Process Citation] / T.V. Burdyga, S. Wray // *J Gen Physiol (United States)*. - 1 2002. - 119(1). – P.93-104.

96. Burg, M.B. Macromolecular Crowding as a Cell Volume Sensor / MB. Burg // *Cell Physiol Biochem.* – 2000. –10. –P.251-256.
97. Burgstaller, G. Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains / G. Burgstaller, M. Gimona // *J Cell Sci.* – 2004. - 117(Pt 2). – P.223-31.
98. Bursell, J.D. Swelling-activated K⁺ transport via two functionally distinct pathways in eel erythrocytes / J.D. Bursell, K. Kirk // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 1996. – 270. – P.R61–R70.
99. Bussolati, O. The stimulation of Na,K,Cl cotransport and of system A for neutral amino acid transport is a mechanism for cell volume increase during the cell cycle / O. Bussolati, J. Uggeri, S. Belletti, V. Dall'Asta, G.C. Gazzola // *FASEB J.* – 1996. - 10(8). – P.920-6.
100. Bustamante, M. Regulatory volume increase is associated with p38 kinase-dependent actin cytoskeleton remodeling in rat kidney MTAL / M. Bustamante, F. Roger, M.L. Bochaton-Piallat, G. Gabbiani, P.Y. Martin, E. Feraille // *Am J Physiol Renal Physiol.* - 2003 - 285(2). – P.F336-47. Epub 2003 Apr 29.
101. Cabantchik, Z.I. Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes / Z.I. Cabantchik, R. Greger, // *Am. J. Physiol.* – 1992. – 262. – P.C803-C827.
102. Caffrey, J.M. Calcium channels of amphibian stomach and mammalian aorta smooth muscle cells / J.M. Caffrey, I.R. Josephson, A.M. Brown // *Biophys. J.* – 1986. – 49. – P.1237–1242.
103. Canessa, M. Cell growth and Na-K-Cl cotransport responses of vascular smooth muscle cells of Milan rats / M. Canessa, G. Salazar, E. Werner, G. Vallega, A. Gonzalez // *Hypertension.* – 1994. - 23(6 Pt 2). – P.1022-6.
104. Cantiello, HF. Actin-binding protein contributes to cell volume regulatory ion channel activation in melanoma cells / H.F. Cantiello, A.G. Prat, J.V. Bonventre, C.C. Cunningham et al // *J. Biol. Chem.* – 1993. – 268. – P.4596–4599.
105. Cario-Toumaniantz, C. Role of Rho kinase signalling in healthy and varicose human saphenous veins / C. Cario-Toumaniantz, S. Evellin, S. Maury, O. Baron et al // *Br J Pharmacol.* – 2002. - 137(2). – P.205-12.
106. Carmeliet, E. Mechanisms and control of repolarization / E. Carmeliet // *Eur. Heart J.* – 1993. – 14. – P.3–13.

107. Caron, L. Cloning and functional characterization of a cation-Cl⁻ cotransporter interacting protein / L. Caron, F. Rousseau, E. Gagnon, P. Isenring // *J. Biol. Chem.* - 2000. - 275. - P.32 027-32 036.
108. Carter, R.W. Acute and chronic NOS inhibition enhances alpha(2)- adrenoreceptor-stimulated RhoA and Rho kinase in rat aorta / R.W. Carter, M. Begaye, N.L. Kanagy // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* - 2002. - 283(4). - P.H1361-9.
109. Casteels, R. Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive Ca²⁺ store in vascular smooth muscle cells of rabbit ear artery / R. Casteels, G. Droogmans // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1981. - 317. - P.263-279.
110. Chamberlin, M.E. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view / M.E. Chamberlin, K. Strange // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* - 1989. - 257. - P.C159-C173.
111. Chen, Q. The superficial buffer barrier in vascular smooth muscle / Q. Chen, M. Cannel, C. Van Breemen // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* - 1992. - 70. - P.509-514.
112. Chen, Q. The superficial buffer barrier in venous smooth muscle: sarcoplasmic reticulum refilling and unloading / Q. Chen, C. Van Breemen // *Br. J. Pharmacol.* - 1993. - 109. - P.336-343.
113. Chipperfield, A.R. An acetazolamide-sensitive inward chloride pump in vascular smooth muscle / A.R. Chipperfield, J.P.L. Davis, A.A. Harper // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1993. - 194. P.407-412.
114. Chipperfield, A.R. Chloride in smooth muscle / A.R. Chipperfield, A.A. Harper // *Prog Biophys Mol Biol.* - 2000. - 74. - P.175-221.
115. Chipperfield, A.R. Evidence for volume regulatory increase in rat arterial smooth muscle / A.R. Chipperfield, J.P.L. Davis, A.A. Harper // *Exp. Physiol.* - 1991. - 76. - P.971-974.
116. Chipperfield, A.R. Sodium-independent inward chloride pumping in rat cardiac ventricular cells / A.R. Chipperfield, J.P.L. Davis, A.A. Harper // *Am. J. Physiol.* - 1997. - 272. - P.H735-H739.
117. Chipperfield, A.R. The (Na⁺+K⁺+Cl⁻) cotransport system / A.R. Chipperfield // *Clin. Sci.* - 1986. - 71. - P.465-476.

- 118.Chitaley K. Microtubule depolymerization facilitates contraction of vascular smooth muscle via increased activation of RhoA/Rho-kinase / Chitaley K, Webb RC // *Med Hypotheses*. – 2001. - 56(3). – P.381-5.
- 119.Ciano-Oliveira, C.D. Hyperosmotic stress activates Rho: differential involvement in Rho kinase-dependent MLC phosphorylation and NKCC activation / C.D. Ciano-Oliveira, G. Sirokmány, K. Szászi, W.T. Arthur et al // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2003. – 285. – P.C555-C566.
- 120.Clemo, HF. Does ClC-3 modulate cardiac cell volume? / H.F. Clemo, J.S. Danetz, C.M. Baumgarten // *Biophys. J.* – 1999. – 76. – P.A203.
- 121.Clemo, HF. Swelling-activated Gd 31 –sensitive cation current and cell volume regulation in rabbit ventricular myocytes / H.F. Clemo, C.M. Baumgarten // *J. Gen. Physiol.* – 1997. – 110. – P.297–312.
- 122.Colclasure, G.C. Cytosolic protein concentration is the primary volume signal for swelling-induced [K-Cl] cotransport in dog red cells / G.C. Colclasure, J.C. Parker // *J Gen Physiol*. – 1992. - 100(1). – P.1-10.
- 123.Collier, ML. Unitary chloride channels activated by protein kinase C in guinea pig ventricular myocytes / M.L. Collier, J.R. Hume // *Circ. Res.* – 1995. –76. – P.317–324.
- 124.Collier, ML. Unitary Cl 2 channels activated by cytoplasmic Ca 21 in canine ventricular myocytes / M.L. Collier, P.C. Levesque, J.L. Kenyon, J.R. Hume // *Circ. Res.* – 1996. – 78. – P.936–944.
- 125.Collins, K.D. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces / Collins, KD, Washabaugh MW// *Q Rev Biophys.* – 1985. – 18. – P.323-422.
- 126.Conte-Camerino, D. M. En-antiomers of clofibric acid analogs have opposite actions on rat skeletal muscle chloride channels / D. Conte-Camerino M. Mambri, A. Deluca, D. Tri-Carico, S.H. Bryant, V. Tortorella, G. Bettoni // *Pflügers Arch.* – 1988. – 413. – P.105–107.
- 127.Counillon, L. The expanding family of eucaryotic Na⁺/H⁺ exchangers / L. Counillon, J. Pouyssegur // *J. Biol. Chem.* – 2000. – 275. – P.1–4.
- 128.Crabtree, G.R. Calcium, calcineurin, and the control of transcription / G.R. Crabtree // *J. Biol. Chem.* - 2001. – 276. – P.2313-2316.
- 129.Criddle, D.N. Comparative inhibitory effects of niflumic acid and novel synthetic derivatives on the rat isolated stomach fundus [In Process Citation] / D.N.

- Criddle, A. Meireles; L.B Macedo; J.H.Leal-Cardoso et al.// *J Pharm Pharmacol* (England). – 2002. - 54(2). P283-8
- 130.Criddle, D.N. Effect of niflumic acid on noradrenaline-induced contractions of the rat aorta / Criddle, DN, Soares de Moura R, Greenwood IA, Large WA // *Br. J. Pharmacol.* – 1996. – 118. – P.1065-1071.
- 131.Criddle, DN. Inhibitory action of niflumic acid on noradrenalina- and 5-hydroxytryptamine-induced pressor responses in the isolated mesenteric bed of the rat / D.N. Criddle, R. Soares de Moura, I.A. Greenwood, W.A. Large // *Br. J. Pharmacol.* - 1997. – 120. – P.813-818.
- 132.Crowley, C.M. The mechanism of excitation-contraction coupling in phenylephrine-stimulated human saphenous vein / C.M. Crowley, C.H. Lee, S.A. Gin, A.M. Keep et al // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2002. - 283(4). – P.H1271-81.
- 133.Cuneo, P. “Macromolecular crowding” is a primary factor in the organization of the cytoskeleton / P. Cuneo, E. Margi, A. Verzola, E. Grazi // *Biochem. J.* - 1992. – 281. – P.507-512.
- 134.Cunningham, SA. Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea / S.A. Cunningham, M.S. Awayda, J.K. Bubien, I.I. Ismailov et al // *J Biol Chem.* – 1995. – 270. – P.31016-31026.
- 135.Curtis, T.M. Evidence for two endothelin Et(A) receptor subtypes in rabbit arteriolar smooth muscle [In Process Citation] / T.M. Curtis, C.N. Scholfield // *Br J Pharmacol* (England)/ - 2001. - 134(8). - p1787-95.
- 136.Curtis, T.M. Transient Ca²⁺-activated Cl-currents with endothelin in isolated arteriolar smooth muscle cells of the choroids / T.M. Curtis, C.N. Scholfield // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2000. - 41(8). – P.2279-85.
- 137.D’Angelo, G. Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin light chain phosphorylation / G. D’Angelo, L.P. Adam // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2002. - 282(2). – P.H602-10.
- 138.D’Urso, G. Production of ouabain-like factor in normal and ischemic rat heart / G. D’Urso, S. Frascarelli, S. Balzan, R. Zucchi et al // *J Cardiovasc Pharmacol.* - 2004. - 43(5). – P.657-62.

139. Dai Y. Role of Cl⁻ current in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery / Y. Dai, J.H. Zhang // *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (United States). – 2001. – 281(5). – p.H2159-67.
140. Damron, D.S. Role of PKC, tyrosine kinases, and Rho kinase in α -adrenoceptor-mediated PASM contraction / D.S. Damron, N. Kanaya, Y. Homma, S.O. Kim et al // *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.* – 2002. – 283. – P.L1051-L1064.
141. Darman, R.B. A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC / R.B. Darman, B. Forbush // *J Biol Chem.* – 2002. – 4. – 277(40). – P.37542-50. Epub 2002 Jul 26.
142. Davis, A. Functional significance of protein kinase A (PKA) activation by endothelin-1 and ATP: negative regulation of SRF-dependent gene expression by PKA / A. Davis, K. Hogarth, D. Fernandes, J. Solway et al // *Cell.Signaling.* – 2003. – 15. –P.597-604.
143. Davis, J.P.L. Accumulation of intracellular chloride by (Na-K-Cl) cotransport in rat arterial smooth muscle is enhanced in deoxycorticosterone acetate (DOCA)/salt hypertension / J.P.L. Davis, A.R. Chipperfield, A.A. Harper // *J. Mol.Cell.Cardiol.* – 1993. – 25. – P.233-237.
144. Davis, J.P.L. Evidence against a contribution of Na⁺-Cl⁻ cotransport to chloride accumulation in rat arterial smooth muscle / J.P.L. Davis // *J. Physiol.* 491, 61-66.
145. Davis, J.P.L. Stimulation of intracellular chloride accumulation by noradrenaline potentiates its depolarisation of rat aorta smooth muscle in vitro. *Br. J. Pharmacol.* - 1997. – 133. - P.639-642.
146. Davis, J.P.L. The effects of Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-transport and Cl⁻—HCO₃⁻ exchange blockage on the membrane potential and intracellular chloride levels of rat arterial smooth muscle, in vitro / J.P.L. Davis // *Exp. Physiol.* - 1992. – 77. – P.857-862.
147. Davis, J.P.L. The three mechanisms of intracellular chloride accumulation in vascular smooth muscle of human umbilical and placental arteries / J.P.L. Davis, P.F.W. Chien, A.R. Chipperfield, A. Gordon et al // *Pflugers Archiv.* – 2000. – 441. – P.150-154.

148. Davis, M.J. Signaling Mechanisms Underlying the Vascular Myogenic Response / M.J. Davis, M.A. Hill // *Physiological Reviews*. - 1999. - 79. - 2. - P.387-423.
149. De Alfonso, R. A Ca^{2+} /CaM protein kinase associated with Ca^{2+} transport in sarco(endo)plasmic vesicles from tracheal smooth muscle / R. De Alfonso, I. De Becemberg, M. Alfonso // *Life Sci*. - 1996. - V.58,N17. - P.1403-1412.
150. De Angelis, C. Hypoxia triggers release of an endogenous inhibitor of Na(+)-K(+)-ATPase from midbrain and adrenal / C. De Angelis, G.T.Jr. Hauptert // *Am J Physiol*. - 1998. - 274(1 Pt 2). - P.F182-8.
151. de la Sierra, A. Erythrocyte ion fluxes in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy / A. de la Sierra, A. Coca, J.C. Pare, M. Sanchez et al // *Circulation*. - 1993. - 88(4 Pt 1). - P.1628-33.
152. Dessy, C. A role for MAP kinase in differentiated smooth muscle contraction evoked by alpha-adrenoceptor stimulation / C. Dessy, I. Kim, C.L. Sougnez, R. Laporte et al // *Am J Physiol*. - 1998. - 275(4 Pt 1). - P.C1081-6.
153. Di Fulvio, M. Protein kinase G regulates potassium chloride cotransporter-3 expression in primary cultures of rat vascular smooth muscle cells / M. Di Fulvio, T.M. Lincoln, P.K. Lauf, N.C. Adragna // *J Biol Chem*. - 2001. - 276(24). - P.21046-52.
154. Dick, G.M. Effects of anion channel antagonists in canine colonic myocytes: comparative pharmacology of Cl^- , Ca^{2+} and K^+ currents / G.M. Dick, I.D. Kong, K.M. Sanders // *Br J Pharmacol*. - 1999. - 127. - P.1819-1831.
155. Doughty, J.M. Measurement of chloride flux associated with the myogenic response in rat cerebral arteries / J.M. Doughty, P.D. Langton // *J Physiol*. - 2001. - 534(Pt 3). - P.753-61.
156. Drewnowska, K. Regulation of cellular volume in rabbit ventricular myocytes, bumetanide, chlorothiazide and ouabain / K. Drewnowska, C.M. Baumgarten // *Am. J. Physiol*. - 1991. - 260. - P.C122-C131.
157. Du, XY. Cardiac swelling-induced chloride current depolarizes canine atrial myocytes / X.Y. Du, S. Sorota // *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 41)* - 1997. - 272. - P.H1904-H1916.

- 158.Duan, D. A serine residue in ClC-3 links phosphorylation-dephosphorylation to chloride channel regulation by cell volume / D. Duan, S. Cowley, B. Horowitz, J.R. Hume // *J. Gen. Physiol.* – 1999. – 113. – P.57–70.
- 159.Duan, D. Alpha-adrenergic control of volume-regulated Cl⁻ currents in rabbit atrial myocytes. Characterization of a novel ionic regulatory mechanism / D. Duan, B. Fermini, S. Nattel // *Circ. Res.* – 1995. – 77. – P.379–393.
- 160.Duan, D. Evidence that outwardly rectifying Cl⁻ channels underlie volume-regulated Cl⁻ currents in heart / D. Duan, J.R. Hume, S. Nattel // *Circ. Res.* 1997b. – 80. – P.103–113.
- 161.Duan, D. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel / D. Duan, C. Winter, S. Cowley, J.R. Hume, B. Horowitz // *Nature.* - 1997a. – 390. - 417–421.
- 162.Duan, D.Y. Sustained outward current observed after I_{to1} inactivation in rabbit atrial myocytes is a novel Cl⁻ current / D.Y. Duan, B. Fermini, S. Nattel // *Am. J. Physiol.* 1992. – 263. - (*Heart Circ. Physiol.* 32). – P.H1967—H1971.
- 163.Dumler, F. Body composition analysis by bioelectrical impedance in chronic maintenance dialysis patients: comparisons to the National Health and Nutrition Examination Survey III / F. Dumler, C. Kilates // *J Ren Nutr.* – 2003. - 13(2). – P.166-72.
- 164.Dunham, P.B. Effects of urea on K-Cl cotransport in sheep red blood cells: evidence for two signals of swelling / P.B. Dunham // *Am J Physiol.* – 1995. - 268(4 Pt 1). – P.C1026-32.
- 165.Duzgun, S.A. Mitogen-activated protein phosphorylation in endothelial cells exposed to hyperosmolar conditions / S.A. Duzgun, H. Rasque, H. Kito, N. Azuma et al // *J Cell Biochem.* – 2000. - 76(4). – P.567-71.
- 166.Earley, J.J. Caldesmon inhibits active crossbridges in unstimulated vascular smooth muscle: an antisense oligodeoxynucleotide approach / J.J. Earley, X. Su, R.S. Moreland // *Circ Res.* – 1998. - 83(6). – P.661-7.
- 167.Ebertz, S.L. Cryoprotectant permeability parameters for cells used in a bioengineered human corneal equivalent and applications for cryopreservation / S.L. Ebertz, L.E. McGann // *Cryobiology.* – 2004. - 49(2). – P.169-80.

- 168.Ehring, G.R. Swelling-activated chloride channels in multidrug-sensitive and -resistant cells / G.R. Ehring, Y.V. Osipchuk, M.D. Cahalan // *J Gen Physiol.* – 1994. – 104. – P.1129-1161.
- 169.Ellershaw, D.C. Dual modulation of swelling-activated chloride current by NO and NO donors in rabbit portal vein myocytes / D.C. Ellershaw, I.A. Greenwood, W.A. Large // *J Physiol.* – 2000. - 528 Pt 1. – P.15-24.
- 170.Erdödi, F. Phosphorylation of the 20,000 dalton myosin light chain isoforms of arterial smooth muscle by myosin light chain kinase and protein kinase C / F. Erdödi, A. Rokolya, M. Bárány, K. Bárány // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1988. – 266. – P.583-591.
- 171.Fasshauer, M. Suppression of aquaporin adipose gene expression by isoproterenol, TNFalpha, and dexamethasone / M. Fasshauer, J. Klein, U. Lossner, M. Klier, S. Kralisch et al // *Horm Metab Res.* – 2003. - 35(4). – P.222-7.
- 172.Fay, F.S. Cellular and molecular physiology of calcium signalling in smooth muscle cells / F.S. Fay, S. Yagi, T. Itoh, J. McCarron et al // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1992. – 58. - *Suppl.* II. – P.35P–40P.
- 173.Fay, FS. Aequorion luminescence during activation of single smooth muscle cells / F.S. Fay, M.H. Shleven, W.C. Granger, S.R. Taylor // *Nature.* – 1979. – 180. – P.506–508.
- 174.Fedorova, OV. Plasma marinobufagenin-like and ouabain-like immunoreactivity in adrenocorticotropin-treated rats / O.V. Fedorova, D.E. Anderson, A.Y. Bagrov // *Am J Hypertens.* – 1998. - 11(7). - P.796-802.
- 175.Feng, J. Inhibitory phosphorylation site for rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase / J.Feng, M. Ito, K. Ichikawa, N. Isaka et al // *J. Biol. Chem.* - 1999. – 274. – P.37385-37390.
- 176.Ferrandi, M. Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: comparison of two independent assays / M. Ferrandi, P. Manunta, S. Balzan, J.M. Hamlyn et al // *Hypertension.* – 1997. - 30(4). – P.886-96.
- 177.Flagella, M. Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf / M. Flagella, L.L. Clarke, M.L. Miller, L.C. Erway, et al // *J Biol Chem.* – 1999. – 274. – P.26946-26955.

- 178.Flatman, P.W. Regulation of Na-K-2Cl cotransport by phosphorylation and protein-protein interactions / P.W. Flatman // *Biochim Biophys Acta.* – 2002. – 1566(1-2). – P.140-51.
- 179.Frelin, C. Biochemical characterization of the Na⁺/K⁺/Cl⁻ co-transport in chick cardiac cells / C. Frelin, O. Chassande, M. Lazdunski // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1986. – 134. – P.326–331.
- 180.Fridman, A.I. Marinobufagenin, an endogenous ligand of alpha-1 sodium pump, is a marker of congestive heart failure severity / A.I. Fridman, S.A. Matveev, N.I. Agalakova, O.V. Fedorova // *J Hypertens.* – 2002. - 20(6). – P.1189-94.
- 181.Fukumitsu, T. Increase in calcium channel current by beta-adrenoceptor agonists in single smooth muscle cells isolated from porcine coronary artery / T. Fukumitsu, H. Hayashi, H. Tokuno, T. Tomita // *Br. J. Pharmacol.* – 1990. – 100. – P.593–599.
- 182.Fuller, C.M. Ca²⁺-activated Cl⁻ channels: a newly emerging anion transport family / C.M. Fuller, D.J. Benos // *News Physiol Sci.* – 2000. – 15. – P.165-171.
- 183.Furstenau, M. Calcium sparks in human coronary artery smooth muscle cells resolved by confocal imaging / M. Furstenau, M. Lohn, C. Ried, F.C. Luft et al // *J Hypertens.* – 2000. - 18(9). – P.1215-22.
- 184.Fussle, R. On the mechanism of membrane damage by alpha-toxin / R. Fussle, S. Bhakdi, A. Sziegoleit, J. Tranum-Jensen et al // *J. Biol. Chem.* – 1981. – 91. – P.83–94.
- 185.Gadsby, DC. The CFTR chloride channel of mammalian heart / D.C. Gadsby, G. Nagel, T.C. Hwang // *Annu. Rev. Physiol.* – 1995. – 57. – P.387–416.
- 186.Gamba, G. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney / G. Gamba, A. Miyanoshita, M. Lombardi, J. Lytton et al // *J. Biol. Chem.* – 1994. – 269. – P.17 713–17 722.
- 187.Gandhi, R. Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung / R. Gandhi, R.C. Elble, A.D. Gruber, K.D. Schreur et al // *J Biol Chem.* – 1998. – 273. – P.32096-32101.

188. Ganitkevich, V.Y. Contribution of two types of calcium channels to membrane conductance of single myocytes from guinea-pig coronary artery / V.Y. Ganitkevich, G. Isenberg // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1990. – 426. – P.19–42.
189. Ganitkevich, V.Y. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder / V.Y. Ganitkevich, G. Isenberg // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1991. – 435. – P.187–205.
190. Gannon, B.J. Aquaporin-1 expression in visceral smooth muscle cells of female rat reproductive tract / B.J. Gannon, G.M. Warnes, C.J. Carati, C.J. Verco // *J Smooth Muscle Res.* – 2000. - 36(5). – P.155-67.
191. Garay R.P. Inhibition of the Na⁺/K⁺ cotransport system by cyclic AMP and intracellular calcium in human red cells / R.P. Garay // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – 688. – P.786-792.
192. Garay, R.P. 1993. A potent inhibitor of the Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport system in urine from salt-loaded rats / R.P. Garay, O. Alda, A. Soler, I. Pares et al. // *J. Hypertension* 11 (Suppl. 5), P.S266-S267.
193. Garber, S. Volume-regulated anion channels and the control of a simple cell behavior / S. Garber, M.D. Cahalan // *Cell. Physiol. Biochem.* - 1997. – 7. – P.229–241.
194. Garner, M.H. Na,K-ATPase in the nuclear envelope regulates Na⁺: K⁺ gradients in hepatocyte nuclei / M.H. Garner // *J Membr Biol.* – 2002. - 187(2). – P.97-115.
195. Gerstheimer, F.P. A chloride-bicarbonate exchanging anion carrier in vascular smooth muscle of the rabbit / F.P. Gerstheimer, M. Muehleisen, D. Nehring, V.A.W. Kreye // *Pflügers Arch.* - 1987. – 409. – P.60-66.
196. Ghisdal, P. Rho-dependent kinase is involved in agonist-activated calcium entry in rat arteries / P. Ghisdal, G. Vandenberg, N. Morel // *J Physiol.* – 2003. - 551(Pt 3). – P.855-67. Epub 2003 Jul 09.
197. Gillen, C.M. Functional interaction of the K-Cl cotransporter (KCC1) with the Na-K-Cl cotransporter in HEK-293 cells / C.M. Gillen, B. 3rd. Forbush // *Am J Physiol.* – 1999. - 276(2 Pt 1). – P.C328-36.
198. Gillen, C.M. Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride co-

- transporter family / C.M. Gillen, S. Brill, J.A. Payne, B. 3rd. Forbush // *J Biol Chem.* – 1996. - 5;271(27). – P.16237-44.
- 199.Gilles, R. Comparative aspects of cell osmoregulation and volume control / R. Gilles // *Renal Physiol. Biochem.* – 1988. – 11. – P.277–288.
- 200.Glukhova, M.A. Phenotypic changes of human aortic smooth muscle cells during development and in adult / M.A. Glukhova, M.G. Frid, V.E. Koteliansky // *J.Atheroscler.Thromb.* – 1994. - 1(suppl. 1). P.S47-S49.
- 201.Godfraind T. Calcium antagonists and vasodilation / T. Godfraind // *Pharmac. Ther.* – 1994. -Vol. 64. – P.37-75.
- 202.Godfraind, T. Calcium antagonists and vasodilation / T. Godfraind // *Pharmacol. Ther.* – 1994. – 64. – P.37-75.
- 203.Gogelein, G.R.H. Mechanism of NaCl secretion in rectal gland tubules of spiny dogfish (*Squalus acanthias*). III. Effects of stimulation of secretion by cyclic AMP / G.R.H. Gogelein, E. Schlatter, F. Wang, J.N. Forrest // *Pflügers Arch.* – 1984. – 402. – P.376-384.
- 204.Gogelein, G.R.H. Stimulation of NaCl secretion in the rectal gland of the dogfish *Squalus acanthias* / G.R.H. Gogelein, E. Schlatter // *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* – 1988. – 90. – P.733-737.
- 205.Gollasch, M. Ca²⁺ channels, Ca²⁺ sparks, and regulation of arterial smooth muscle function / M. Gollasch, M. Lohn, M. Furstenau, M.T. Nelson et al. // *Z Kardiol.* – 2000. – 89. - Suppl 2. – P.15-9.
- 206.Gollasch, M. Ontogeny of local sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ signals in cerebral arteries: Ca²⁺ sparks as elementary physiological events / M. Gollasch, G.C. Wellman, H.J. Knot, Jaggar J.H. et al. // *Circ Res.* – 1999. - 84(1). – P.125.
- 207.Golovina, VA. Na⁺ pump α_2 -subunit expression modulates Ca²⁺ signaling / V.A. Golovina, H. Song, P.F. James, J.B. Lingrel et al. // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2003. – 284. – P.C475-C486.
- 208.Goncharova, EA. Activation of p38 MAP-kinase and caldesmon phosphorylation are essential for urokinase-induced human smooth muscle cell migration / E.A. Goncharova, A.V. Vorotnikov, E.O. Gracheva, C.L. Wang et al. // *Biol Chem.* – 2002. - 383(1). – P.115-26.

209. Gorenne, I. Caldesmon phosphorylation is catalyzed by two kinases in permeabilized and intact vascular smooth muscle / I. Gorenne, X. Su, R.S. Moreland // *J Cell Physiol.* – 2004. - 198(3). – P.461-9.
210. Gorenne, I. Inhibition of p42 and p44 MAP kinase does not alter smooth muscle contraction in swine carotid artery / I. Gorenne, X. Su, R.S. Moreland // *Am J Physiol.* – 1998. - 275(1 Pt 2). – P.H131-8.
211. Gould, D.J. α -adrenoceptor activation of chloride conductance in rat iris arterioles / D.J. Gould, C.E. Hill // *Am. J. Physiol.* - 1996. – 27. – P.H2469-H4276.
212. Graves, J.E. Tonic regulation of vascular tone by nitric oxide and chloride ions in rat isolated small coronary arteries / J.E. Graves, I.A. Greenwood, W.A. Large // *Am J Physiol Heart Circ Physiol (United States)*. – 2000. - 279(6). P.H2604-11.
213. Greenwood, I.A. Comparison of the effects of fenamates on Ca^{2+} -activated chloride and potassium currents in rabbit portal vein smooth muscle cells / I.A. Greenwood, W.A. Large // *British Journal of Pharmacology*. – 1995. – 116. – P.2939–2948.
214. Greenwood, I.A. Differential regulation of Ca^{2+} -activated Cl^{-} currents in rabbit arterial and portal vein smooth muscle cells by Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinase / I.A. Greenwood, J. Ledoux, N. Leblanc // *J Physiol.* – 2001. - 534(Pt. 2). – P.395-408.
215. Greenwood, I.A. Inhibition of Ca^{2+} -activated Cl^{-} currents in smooth muscle cells by compounds structurally similar to niflumic acid / I.A. Greenwood, W.A. Large // *British Journal of Pharmacology*. – 1998. – 123. - 324P.
216. Greenwood, I.A. Modulation of $\text{ICl}(\text{Ca})$ in vascular smooth muscle cells by oxidizing and cysteine-reactive reagents / I.A. Greenwood, N. Leblanc, D.V. Gordienko, W.A. Large // *Pflugers Arch.* – 2002. - 443(3). – P.473-82. Epub 2001 Oct 06.
217. Grinstein, S. Activation of permeabilized neutrophils: role of anions / S. Grinstein, W. Furuya, G.P. Downey // *Am. J. Physiol.* – 1992. - 263 (*Cell Physiol.* 32). – P.C78-C75.
218. Grummt, F. The effect of cyclic nucleotides on cellular ATP levels and ribosomal RNA synthesis in Ehrlich ascites cells / F. Grummt, I. Grummt // *Eur J Biochem.* – 1977. - 79(2). – P.387-93.

- 219.Grunnet, M. KCNQ1 channels sense small changes in cell volume / M. Grunnet, T. Jespersen, N. MacAulay, N.K. Jorgensen et al. // *J Physiol.* – 2003. – 549(Pt 2). – P.419-27. Epub 2003 Apr 17.
- 220.Haas M. Properties and diversity of (Na-K-Cl) cotransporters / M. Haas // *Ann. Rev. Physiol.* - 1989. – 51. – P.443-457.
- 221.Haas, M. Bumetanide inhibits (Na-K-Cl) cotransport at a chloride site / M. Haas, T.J. Mcmanus // *Am. J. Physiol.* – 1983. - 245 (*Cell Physiol.* 14). – P.C235—C240.
- 222.Haas, M. Catecholamine-stimulated ion transport in duck red cells. Gradient effects in electrically neutral (Na-K-2Cl) co-transport / M. Haas, W.F. Schmidt, T.J. Mcmanus // *J. Gen. Physiol.* - 1982. - 80. - P.125–147.
- 223.Haas, M. The Na-K-Cl cotransporters / M. Haas, B. Forbush // *J. Bioenerg. Biomemb.* - 1998. – 30. – P.161-172.
- 224.Haas, M.D. Dual mechanisms for Na-K-Cl cotransport regulation in airway epithelial cells / M.D. Haas, D. McBrayer, .JR. Yankaskas // *Am. J.Physiol.* – 1993. - 264 (*Cell Physiol.* 33). – P.C189-C200.
- 225.Hagiwara, N. Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes / N. Hagiwara, H. Masuda, M. Shoda, H. Irisawa // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1992. – 456. - 285–302.
- 226.Hallows, K.R. Fundamental principles and physiological roles of cell volume regulation / K.R. Hallows, P.A. Knauf // In: *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, edited by K. Strange. Boca Raton, FL: CRC, 1994, P.3-30.
- 227.Hamilton, C. Calmodulin and excitation-contraction coupling / C. Hamilton, I. Serysheva, G. Strasburg // *News Physiol. Sci.*-2000. - V.15, N.12. - P.201-204.
- 228.Hannafin, J.A. Active chloride transport in rabbit thick ascending limb of Henle's loop and elasmobranch rectal gland: chloride fluxes in isolated plasma membranes / J.A. Hannafin, R. Kinne // *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* - 1985. – 155. - P.415–421.
- 229.Hansen, P.B. Chloride regulates afferent arteriolar contraction in response to depolarization / P.B. Hansen; B.L. Jensen; O. Skott // *Hypertension (United States)*. - 1998, 32(6). – P.1066-70.

- 230.Hartshorne, D.J. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation / D.J. Hartshorne, M. Ito, F. Erdödi // *J. Muscle Res. Cell Motil.* - 1998. – 19. – P.325-341.
- 231.Harvey, RD. Chloride current in mammalian cardiac myocytes. Novel mechanism for autonomic regulation of action potential duration and resting membrane potential / R.D. Harvey, C.D. Clark, J.R. Hume // *J. Gen. Physiol.* - 1990. – 95. - 1077–1102.
- 232.Harvey, RD. Effects of stilbenedisulfonic acid derivatives on the cAMP-regulated chloride current in cardiac myocytes / R.D. Harvey // *Pflügers Arch.* – 1993. – 422. – P.436–442.
- 233.Hassid, A. NO alters cell shape and motility in aortic smooth muscle cells via protein tyrosine phosphatase 1B activation / A. Hassid, J. Yao, S. Huang // *Am J Physiol.* – 1999. - 277(3 Pt 2). – P.H1014-26.
- 234.Herrera, A.M. Influence of calcium on myosin thick filament formation in intact airway smooth muscle / A.M. Herrera, K.-H. Kuo, C.Y. Seow // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* - 2002. - 282. – P. C310-C316.
- 235.Herzig, S. Mechanisms of beta-adrenergic stimulation of cardiac Ca²⁺ channels revealed by discrete-time Markov analysis of slow gating / S. Herzig, P. Patil, J. Neumann, C.M. Staschen, D.T. Yue // *Biophys. J.* – 1993. – 65. – P.1599–1612.
- 236.Higashi, M. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system / M. Higashi, H. Shimokawa, T. Hattori, J. Hiroki // *Circ Res.* – 2003. - 93(8). – P.767-75. Epub 2003 Sep 18.
- 237.Higgins, C.F. Cell swelling-activated chloride channels and their regulation by P-glycoprotein / C.F. Higgins, K.H. Weylandt, C. Nastrucci, A. Sardini, K. Linton et al.// *Chloride Channels*, edited by R. Kozlowski. Oxford, UK: Isis Medical Media. In press.
- 238.Hirakawa, Y. Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels in mouse and rabbit aortic smooth muscle cells: regulation by intracellular Ca²⁺ and NO / Y. Hirakawa, M. Gericke, R.A. Cohen, VM. Bolotina // *Am J Physiol.* – 1999. - 277(5 Pt 2). – P.H1732-44.

- 239.Hiraoka, M. Calcium-sensitive and -insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes / M. Hiraoka, S. Kawano // *J. Physiol. (Lond.)* - 1989. - 410. - P.187-212.
- 240.Hiraoka, M. Role of cardiac chloride currents in changes in action potential characteristics and arrhythmias / M. Hiraoka, S. Kawano, Y. Hirano, T. Furukawa // *Cardiovasc. Res.* - 1998. - 40. - P.23-33.
- 241.Hodgkinson, J.L. 3-D image reconstruction of reconstituted smooth muscle thin filaments containing calponin : visulaization of interactions between F-actin and calponin / J.L. Hodgkinson, M. el-Mezgueldi, R. Craig, P. Vibert et al. // *J. Mol. Biol.* - 1997. - 273. - P159-159.
- 242.Hoffmann, E.K. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation / E.K. Hoffmann, P.B. Dunham // *Int. Rev. Cytol.* - 1995. - 161. - P.173-262.
- 243.Hoffmann, E.K. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells / E.K. Hoffmann, L.O. Simonsen // *Physiol. Rev.* 1989. - 69. - 315-382.
- 244.Hogg, RC. Time course of spontaneous calcium-activated chloride currents in smooth muscle cells from the rabbit portal vein / R.C. Hogg, Q. Wang, W.A. Large // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1993. - 464. - P.15-31.
- 245.Holevinsky, KO. ATP-sensitive K^+ channel opener acts a potent Cl^- channel inhibitor in vascular smooth muscle cells / K.O. Holevinsky, Z. Fan, M. Frame, J.C. Makielski, U. Groppi, D.J. Nelson // *J. Membr. Biol.* - 1994. - 137. - P.59-70.
- 246.Hool, L.C. Role of G proteins in alpha1 -adrenergic inhibition of the beta-adrenergically activated chloride current in cardiac myocytes / L.C. Hool, L.M. Oleksa, R.D. Harvey // *Mol. Pharmacol.* - 1997. - 51. - P.853-860.
- 247.Hu, E. Rho kinase inhibitors as potential therapeutic agents for cardiovascular diseases / E. Hu, D. Lee // *Curr Opin Investig Drugs.* - 2003. - 4(9). - P.1065-75.
- 248.Hughes S. Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina in vivo / Hughes S, Chan-Ling T. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* - 2004. - 45(8). - P.2795-806.
- 249.Hughes, AD. 1995. Calcium channels in vascular smooth muscle cells.

- 250.Hullin, R. Calcium channel β subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain / R. Hullin, D. Singer-Lahat, M. Freichel, M. Biel et al. // *EMBO J.* – 1992. – 11. – P.885–890.
- 251.Hume, JR. Anion transport in heart / Hume JR., Dayue Duan, Mei Lin Collier, Jun Yamazaki, Burton Horowitz // *Physiological Reviews.* – 2000. -Vol. 80, No.1. – P.31-81.
- 252.Hwang, T.C. Molecular pharmacology of the CFTR Cl^- channel / T.C. Hwang, D.N. Sheppard // *Trends Pharmacol Sci.* – 1999. – 20. – P.448-453.
- 253.Hyvelin J.M. Effect of changes in pH on wall tension in isolated rat pulmonary artery: role of the RhoA/Rho-kinase pathway / J.M. Hyvelin, C. O'Connor, P. McLoughlin // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2004. - 287(4). – P.L673-84. Epub 2004 Feb 06.
- 254.Ikigai, H. Assembly of the alpha-toxin-hexamer of *Staphylococcus aureus* in the liposome membrane / H. Ikigai, T. Nakae // *J. Biol. Chem.* – 1987. – 262. – P.2156–2160.
- 255.Inoue, R, Isenberg G. Acetylcholine activates nonselective cation channels in guinea-pig ileum through a G-protein. *Am. J. Physiol.* 258 (*Cell Physiol.* 27): C1173–C1178, 1990.
- 256.Inoue, Y, Nakao K, Okabe K, Izumi H, Kanda S, Kitamura K, Kuriyama H. Some electrical properties of human pregnant myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990. 162: 1090–1098.
- 257.Isenring, P. Comparison of Na-K-Cl cotransporters: NKCC1, NKCC2 and HEK cell Na-K-Cl cotransporter / P. Isenring, S.C. Jacoby, J.A. Payne, B. Forbush I // *J.Biol.Chem.* – 1998. – 273. – P.11295-11301.
- 258.Isenring, P. Ion and bumetanide binding by the Na-K-Cl cotransporter. Importance of transmembrane domains / P Isenring, B Forbush III // *J.Biol.Chem.* – 1997. – 272. – P.24556-24562.
- 259.Ishikawa, Y. alpha(1)-adrenoceptor-induced trafficking of aquaporin-5 to the apical plasma membrane of rat parotid cells / Y. Ishikawa, M.T. Skowronski, N. Inoue, H. Ishida // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1999. - 265(1). – P.94-100.

- 260.Ito, M. Myosin phosphatase: structure, regulation and function / M. Ito, T. Nakano, F. Erdodi, D.J. Hartshorne // *Mol Cell Biochem.* – 2004. - 259(1-2). – P.197-209.
- 261.Itoh, A. Enhancement of aquaporin-3 by vasoactive intestinal polypeptide in a human colonic epithelial cell line / A. Itoh, T. Tsujikawa, Y. Fujiyama, T. Bamba // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2003. - 18(2). – P.203-10.
- 262.Itoh, T. Characteristic features of noradrenaline-induced Ca²⁺ mobilization and tension in arterial smooth muscle of the rabbit / T. Itoh, J. Kajikuri, H. Kuriyama // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1992. – 457. – P.297–314.
- 263.Itoh, T. Effects of pinacidil on contractile proteins in high K⁺-treated intact and in b-escin-treated skinned smooth muscle of the rabbit mesenteric artery / T. Itoh, S. Suzuki, H. Kuriyama // *Br. J. Pharmacol.* - 1991. – 103. – P.1697–1702.
- 264.Iwasaki, H. Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor / H. Iwasaki; S. Eguchi; H. Ueno; F. Marumo et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol (United States)*. – 2000. - 278(2). P.H521-9;
- 265.Iyadomi, I. α -Adrenergic inhibition of the beta-adrenoceptor-dependent chloride current in guinea pig ventricular myocytes / I. Iyadomi, K. Hirahara, T. Ehara // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1995. – 489. – P.95–104.
- 266.Jackson, WF. Ion channels and vascular tone / W.F. Jackson // *Hypertension (United States)*. – 2000. - 35(1 Pt 2). – P.173-8.
- 267.Jaconi, M. Calcium release and influx colocalize to the endoplasmic reticulum / M. Jaconi, J. Pyle, R. Bortolon, J. Ou et al. // *Curr. Biol.* – 1997. –7. – P.599-602.
- 268.Jaggar, JH. Ca²⁺ channels, ryanodine receptors and Ca²⁺-activated K⁺ channels: a functional unit for regulating arterial tone / J.H. Jaggar, G.C. Wellman, T.J. Heppner, V.A. Porter et al. // *Acta Physiol Scand.* – 1998. - 164(4). – P.577-87.
- 269.James, A.F. A quantitative analysis of cell volume and resting potential determination and regulation in excitable cells / James A. Fraser and Christopher L.-H. Huang. // *J Physiol.* - 2004. - 559. – 2. – P.459-478.
- 270.Janssen, L.J. Excitation-contraction coupling in pulmonary vascular smooth muscle involves tyrosine kinase and Rho kinase / L.J. Janssen, H Lu-Chao, S. Netherton // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* – 2001. – 280. – P.L666-74.

- 271.Janssen, L.J. KCl evokes contraction of airway smooth muscle via activation of RhoA and Rho-kinase / L.J. Janssen, T. Tazzeo, J. Zuo, E.Pertens, S. Keshavjee // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2004. - 287(4). – P.L852-8. Epub 2004 Jun 18.
- 272.Je, H.D. Calponin is required for agonist-induced signal transduction--evidence from an antisense approach in ferret smooth muscle / H.D. Je, S.S. Gangopadhyay, T.D. Ashworth, K.G. Morgan // *J Physiol.* – 2001. - 537(Pt 2). P.567-77.
- 273.Jensen, B.L. Chloride is essential for contraction of afferent arterioles after agonists and potassium / B.L. Jensen, P. Ellekvist, O. Skott // *Am. J. Physiol.* - 1997. – 272. – P.F389-F396.
- 274.Jensen, P.E. Endogenous and exogenous agonist-induced changes in the coupling between $[Ca^{2+}]_i$ and force in rat resistance arteries / P.E. Jensen, M.J. Mulvany, C. Aalkjaer // *Pflugers Arch.* – 1992. –420. - 536–543.
- 275.Jentsch T.J. Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels / T.J. Jentsch, V. Stein, F. Weinreich, A.A. Zdebik // *Physiol. Rev.* - 2002. - Vol.82, No.2, P.503-568.
- 276.Jessen, B.S. Activation of $Na^+,K^+,2Cl^-$ cotransport system by reorganization of the actin filaments in Ehrlich ascites tumor cells / B.S. Jessen, E.K. Hoffmann // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – 1110. – P.199–201.
- 277.Jia, Y. Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase // Y. Jia, C.J. Mathews, J.W. Hanrahan // *A. J. Biol. Chem.* – 1997. – 272. – P.4978–4984.
- 278.Jiang, B. Expression and roles of Cl^- channel $ClC-5$ in cell cycles of myeloid cells / B. Jiang, N. Hattori, B. Liu, Y. Nakayama et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. - 317(1). – P.192-7.
- 279.Jiang, G. Aldosterone regulates the $Na-K-Cl$ cotransporter in vascular smooth muscle / G. Jiang, S. Cobbs, J.D. Klein, W.C. O'Neill // *Hypertension.* – 2003. – 41. – P.1131-1135.
- 280.Jiang, G. Growth factors stimulate the $Na-K-2Cl$ cotransporter $NKCC1$ through a novel $Cl(-)$ -dependent mechanism / G. Jiang, J.D. Klein, W.C. O'Neill // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2001. - 281(6). – P.C1948-53.

- 281.Jiang, J. Role of Cl⁻ currents in rat aortic smooth muscle activation by prostaglandin F2 alpha / J. Jiang, P.H. Backx, H. Teoh, M.E. Ward // *Eur J Pharmacol.* – 2003. - 481(2-3). – P.133-40.
- 282.Jiang, J. Role of Cl⁻ currents in rat aortic smooth muscle activation by prostaglandin F2 alpha / Jiang, J, Backx PH, Teoh H, Ward ME. // *Eur J Pharmacol.* 2003 Nov 28;481(2-3):133-40.
- 283.Jones K.A. F-actin stabilization increases tension cost during contraction of permeabilized airway smooth muscles in dog / K.A. Jones, W.J. Perkins, R.R. Lorenz, Y.S. Prakash et al. // *J.Physiol.* - 1999. – 519. – P.527-538.
- 284.Jones, AW. Altered ion transport in vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. Influence of aldosterone, norepinephrine and angiotensin / A.W. Jones // *Circ Res.* – 1973. – 33. – P.563-572.
- 285.Jorgensen, N.K. On the role of calcium in the regulatory volume decrease (RVD) response in Ehrlich mouse ascites tumor cells / N.K. Jorgensen, S. Christensen, H. Harbak, A.M. Brown et al. // *J Membr Biol.* – 1997. - 157(3). – P.281-99.
- 286.Juhaszova, M. Na⁺-Ca²⁺ exchanger in arteries: identification by immunoblotting and immunofluorescence microscopy / M. Juhaszova, A. Ambesi, G.E. Lindenmayer, R.J. Bloch et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1994. – 266. – P.C234-C242.
- 287.Jury, J. Actions of putative chloride channel blocking agents on canine lower esophageal sphincter (LES) [In Process Citation] / J. Jury, M. Patel, T. Bowes, E.E. Daniel // *Can J Physiol Pharmacol (Canada).* – 2001. - 79(12). – P.1007-14.
- 288.Kaibuchi, K. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the rho family GTPases in mammalian cells / K. Kaibuchi, S. Kuroda, M. Amano // *Annu. Rev. Biochem.* - 1999. – 68. – P.459-486.
- 289.Kamouchi, M. Simultaneous activation of Ca(2+)-dependent K⁺ and Cl⁻ currents by various forms of stimulation in the membrane of smooth muscle cells from the rabbit basilar artery / M. Kamouchi, M. Fujishima, Y. Ito, K. Kitamura // *J Smooth Muscle Res.* – 1998. - 34(2). – P.57-68.
- 290.Kandabashi, T. Evidence for protein kinase C-mediated activation of Rho-kinase in a porcine model of coronary artery spasm / T. Kandabashi, H.

- Shimokawa, K. Miyata, I. Kunihiro // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2003. - 23(12). – P.2209-14. Epub 2003 Oct 30.
- 291.Kaneda, M. Activation of chloride current by P2 -purinoceptors in rat ventricular myocytes / M. Kaneda, K. Fukui, K. Doi // *Br. J. Pharmacol.* – 1994. – 111. – P.1355–1360.
- 292.Kang, Y.S. Caveolin internalization by heat shock or hyperosmotic shock / Y.S.Kang, Y.G. Ko, J.S. Seo // *Exp Cell Res.* – 2000. - 255(2). – P.221-8.
- 293.Kao, C.Y. *Cellular Aspects of Smooth Muscle Function.* 1997. Cambridge University Press.
- 294.Kapus, A. Functional characterization of three isoforms of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells / A. Kapus, S. Grinstein, S. Wazan, B. Kandasamy et al. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – 269. – P.23 544–23 552.
- 295.Karaki, H. Calcium release in smooth muscle / H. Karaki, B. Weiss // *Life sci.* - 1988. - V.42,N2. - P.111-122.
- 296.Kawano, S. Activation mechanism of Ca²⁺-sensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes / S. Kawano, Y. Hirayama, M. Hiraoka // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1995. – 486. - 593–604.
- 297.Kawano, Y. Smooth muscle contraction by small GTPase Rho / Y. Kawano, T. Yoshimura, K. Kaibuchi // *Nagoya J Med Sci.* – 2002. - 65(1-2). – P.1-8.
- 298.Kawasaki, M. Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells / M. Kawasaki, S. Uchida, T. Monkawa, A. Miyawaki, K. Mikoshiba, F. Marumo, and S. Sasaki // *Neuron* 12: 597–604, 1994.
- 299.Kawasaki, M. Stable and functional expression of the ClC-3 chloride channel in somatic cell lines / M. Kawasaki, M. Suzuki, S. Uchida, S. Sasaki, F. MaRumo // *Neuron* 14: 1285–1291, 1995.
- 300.Kenyon, J.L. 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers / J.L. Kenyon, W.R. Gibbons // *J. Gen. Physiol.* 73: 139–157, 1979a.
- 301.Kenyon, J.L. Influence of chloride, potassium, and tetraethylammonium on the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers / J.L. Kenyon, W.R. Gibbons // *J. Gen. Physiol.* 73: 117–138, 1979b.

- 302.Kerschbaum, H.H. Monovalent permeability, rectification, and ionic block of store-operated calcium channels in Jurkat T lymphocytes / H.H. Kerschbaum, M.D. Cahalan // *J. Gen. Physiol.* – 1998. – 111. – P.521-537.
- 303.Kimura, M. Specific inhibition of stretch-induced increase in L-type calcium channel currents by herbimycin A in canine basilar arterial myocytes / M. Kimura, K. Obara, T. Sasase, T. Ishikawa et al. // *Br J Pharmacol (England)*. – 2000. – 130(4) P.923-31.
- 304.Kinjo, A.R. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation studied by density functional theory: Statics / A.R. Kinjo, S. Takada // *Physical Review*. – 2002. – E 66, 031911.
- 305.Kinne, R. The use of membrane vesicles to study the NaCl/KCl cotransporter involved in active transepithelial chloride transport / R. Kinne, B. Koenig, J. Hannafin, E. Kinne-Saffran, D.M. Scott, K. Zierold // *Pflügers Arch.* - 1985. – 405. - Suppl. 1. – P.S101—S105.
- 306.Kirk, K. Functional properties and physiological roles of organic solute channels / K. Kirk, K. Strange // *Annu. Rev. Physiol.* – 1998. – 60. – P.719–739.
- 307.Kiselyov, K. Functional interaction between InsP₃ receptors and store-operated Htrp3 channels / K. Kiselyov, X. Xu, G. Mozhayeva, T. Kuo et al. // *Nature*. - 1998. – 396. – P.478-482.
- 308.Kitamura, K. Chloride channels and their functional roles in smooth muscle tone in the vasculature / K. Kitamura, J. Yamazaki // *Jpn. J. Pharmacol.* – 2001. – 85. – P.351-357.
- 309.Kitazawa, T. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility / T. Kitazawa, M. Eto, T.P.Woodsome, D.L. Brautigam // *J. Biol. Chem.*- 2000. – 275. – P.9897-9900.
- 310.Klein J.D. Myosin light chain phosphorylation in endothelial cells is regulated by cell volume and correlates with volume-regulatory Na-K-2Cl cotransport (Abstract) / J.D. Klein, W.C. O'Neill // *J.Gen.Physiol.* – 1993. – 102. – P.18a.
- 311.Klein, J.D. JNK is a volume-sensitive kinase that phosphorylates the Na-K-2Cl cotransporter in vitro / J.D. Klein, S.T. Lamitina, W.C. O'Neill // *Am J Physiol.* – 1999. - 277(3 Pt 1). – P.C425-31.

- 312.Klein, J.D. Regulation by cell volume of Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransport in vascular endothelial cells: role of protein phosphorylation / J.D. Klein, P.B. Perry, W.C. O'Neill // *J Membr Biol.* – 1993. - 132(3). – P.243-52.
- 313.Klein, J.D. Volume-sensitive myosin phosphorylation in vascular endothelial cells: correlation with Na-K-2Cl cotransport / J.D. Klein, W.C. O'Neill // *Am J Physiol.* – 1995. - 269(6 Pt 1). – P.C1524-31.
- 314.Klockner, U. Intracellular calcium ions activate a low-conductance chloride channel in smooth-muscle cells isolated from human mesenteric artery / U. Klockner // *Pflügers Arch.* – 1993. – 424. - 231–237.
- 315.Knapp, J. Calcium-independent activation of the contractile apparatus in smooth muscle of mouse aorta by protein phosphatase inhibition / J. Knapp, S. Aleth, F. Balzer, W. Schmitz // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* - 2002 366(6). - P.562-9. Epub 2002 Oct 01.
- 316.Koch, W.J. cDNA cloning of a dihydropyridine-sensitive calcium channel from rat aorta / W.J. Koch, P.T. Ellinor, A. Schwartz et al.// *J. Biol. Chem.* – 1990. – 265. – P.17786–17791.
- 317.Koh, YH. Osmotic stress induces HB-EGF gene expression via Ca(2+)/Pyk2/JNK signal cascades in rat aortic smooth muscle cells / Y.H. Koh; W. Che; S. Higashiyama; M. Takahashi et al. // *J Biochem (Tokyo) (Japan).* – 2001. - 130(3). – P.351-8
- 318.Kokubin, S. Effects of various intracellular Ca ion concentrations on the calcium current of guinea pig single ventricular cells / S. Kokubin, W. Irisawa // *J. Physiol. (Gr. Brit.).* – 1984. – V. 34. – P. 599-611.
- 319.Koncz, C. Use of MQAE for measurement of intracellular [Cl⁻] in cultured aortic smooth muscle cells / C. Koncz, J.T. Daugiras // *Am. J. Physiol.* - 1994. – 267. – P.H2114-H2123.
- 320.Konev, SV. Structural Lability of Biological Membranes, Minsk: Nauka i Tekhnika, 1987.
- 321.Kordylewski, L. Rat atrial myocyte plasmalemmal caveolae in situ. Reversible experimental increases in caveolar size and in surface density of caveolar necks / L. Kordylewski, G.E. Goings, E. Page // *Circ Res.* – 1993. - 73(1). – P.135-46.
- 322.Kotelevtsev, Yu.V. Genetic analysis of inheritance of Na⁺,K⁺ cotransport, calcium level in erythrocytes and blood pressure in F₂ hybrids of spontaneously hy-

- pertensive and normotensive rats / Yu.V. Kotelevtsev, S.N. Orlov, N.I. Pokudin, V.M. Agnaev et al. // *Bull Exp Biol Med.* – 1987. – 103. – P.456-458.
- 323.Kovalev, I.V. Effect of $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransport inhibitor bumetanide on electrical and contractile activity of smooth muscle cells in guinea pig ureter / I.V. Kovalev, M.B. Baskakov, Y.J. Anfinogenova, Y.L. Borodin et al. // *Bull.Exp.Biol.Med.* – 2003. - 136(8). – P.145-149.
- 324.Kracke, G.R. Asymmetry of Na-K-Cl cotransport in human erythrocytes / G.R. Kracke, M.A. Anatra, P.B. Dunham // *Am. J. Physiol.* – 1983. -254 (Cell Physiol. 23). – P.C243—C250.
- 325.Kracke, GR. Effect of membrane potential on furosemide-inhibitable sodium influxes in human red blood cells / G.R. Kracke, P.B. Dunham // *J. Membr. Biol.* – 1987. – 98. - 117–124.
- 326.Kravtsov, G.M. A new view of K^+ -induced contraction in rat aorta: the role of Ca^{2+} binding / G.M. Kravtsov, I.C. Bruce, T.K. Wong, C.Y. Kwan // *Pflugers Archiv.* – 2003. – 446. – P.529-540.
- 327.Kremer, S.G. Multiple signaling pathways for Cl^- -dependent depolarization of mesangial cells: role of Ca^{2+} , PKC, and G proteins / S.G. Kremer, W. Zeng, S. Sridhara, K.L. Skorecki // *Am J Physiol.* – 1992. - 262(4 Pt 2). – P.F668-78.
- 328.Kreye, V.A.W. Evidence for furosemide-sensitive active chloride transport in vascular smooth muscle / V.A.W. Kreye, P.K. Bauer, I. Villhauer et al. // *Eur. J. Pharm.* - 1981. – 73. – P.91-95.
- 329.Kumar, R. Expression of guanylyl cyclase-A/atrial natriuretic peptide receptor blocks the activation of protein kinase C in vascular smooth muscle cells. Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase / R. Kumar, W. Cartledge, T. Lincoln, K. Pandey // *Hypertension.* - 1997. - V.29,N1. - P.414-421
- 330.Kuriyama, H. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels / H. Kuriyama, K. Kitamura, T. Itoh, R. Inoue // *Physiol. Rev.*- 1998. - V. 78. - P.811–920.
- 331.Kutzweiler, T.A. Asp804 and Asp808 in the transmembrane domain of the Na,K-ATPase α -subunit are cation coordinated residues / T.A. Kutzweiler, J.M. Argüello, J.B. Lingrel // *J Biol Chem.* – 1996. – 271. – P.29682-29687.

- 332.Lai, ZF. Modulation of intracellular Cl⁻ homeostasis by lectin-stimulation in Jurkat T lymphocytes / Z.F. Lai, Y.Z. Chen, K. Nishi // *Eur J Pharmacol.* – 2003. - 482(1-3). – P.1-8.
- 333.Lamb F.S. The endothelium modulates the contribution of chloride currents to norepinephrine-induced vascular contraction /
- 334.Lamb, F.S. Chloride ion currents contribute functionally to norepinephrine-induced vascular contraction / F.S. Lamb, T.J. Barna // *Am J Physiol* - 1998a. – 275. – P.H151-60.
- 335.Lamb, F.S. Chloride ion currents contribute functionally to norepinephrine-induced vascular contraction / F.S. Lamb, T.J. Barna // *Amer. J. Physiol.* - 1998b. – 275. – P.H161-H168.
- 336.Lamb, F.S. Expression of CLCN voltage-gated chloride channel genes in human blood vessels / F.S. Lamb, G.H. Clayton, B.X .Liu, R.L. Smith et al. // *J Mol Cell Cardiol.* – 1999. - 31(3). – P.657-66.
- 337.Lamb, F.S. Role of Cl⁻ channels in alpha-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the anesthetized rat / F.S. Lamb, N.W. Kooy, S.J. Lewis // *Eur J Pharmacol (Netherlands).* – 2000. - 401(3). – P.403-12.
- 338.Lambert, I.H. Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells / I.H. Lambert // *Neurochem Res.* – 2004. - 29(1). – P.27-63.
- 339.Lambert, I.H. Role of prostaglandins and leukotrienes in volume regulation by Ehrlich ascites tumor cells / I.H. Lambert, E.K. Hoffmann, P. Christensen // *J Membr Biol.* – 1987. - 98(3). - 247-56.
- 340.Lamboley, M. Recruitment of smooth muscle cells and arterial vasomotion / M. Lamboley, A.Schuster, J.L. Beny, J.J. Meister // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2003. - 285(2). – P.H562-9. Epub 2003 Feb 06.
- 341.Lan, C. Endothelin-1 modulates hemoglobin-mediated signaling in cerebrovascular smooth muscle via RhoA/Rho kinase and protein kinase C / C. Lan, D. Das, A. Wloskowicz, B. Vollrath // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2004. - 286(1). – P.H165-73. Epub 2003 Sep 18.
- 342.Lang, F. Ca²⁺ entry and vasoconstriction during osmotic swelling in vascular smooth muscle cells / F. Lang, G. Busch, G. Zempel, J. Ditlevsen et al. // *Pflügers Arch.* – 1995. – 431. – P.253-258.

- 343.Lang, F. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death / F. Lang, M. Ritter, N. Gamper, S. Huber et al. // *Cell Physiol Biochem.* – 2000. - 10(5-6). – P.417-28.
- 344.Lang, F. Functional significance of cell volume mechanisms / F. Lang, G. Busch, M. Ritter, H. Volkl et al. // *Physiol Rev.* – 1998. – 78. – P.247-306.
- 345.Lang, F. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms / F. Lang, G.L. Busch, M. Ritter, H. Volkl et al. // *Physiol Rev.* –1998. -78. – P.247–306. *Acta* 1285. – 1996. – P.229–236.
- 346.Lang, F. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms / F. Lang, G.L. Busch, M. Ritter, H. Volkl, S. Waldegger, E. Gulbins, D. Haussinger // *Physiol. Rev.* – 1998. – 78. – P.247–306.
- 347.Lang, F. Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase - implications for transport, excitability and cell proliferation / F. Lang, G. Henke, H.M. Embark, S.Waldegger et al. // *Cell Physiol Biochem.* – 2003. - 13(1). – P.41-50.
- 348.Lang, F. The diversity of volume regulatory mechanisms / F. Lang, G.L. Busch, H. Volkl // *Cell Physiol. Biochem.* - 1998b. – 8. – P.1–45.
- 349.Langton, P.D. Effect of mechanical strain on expression of Na⁺,K⁺-ATPase alpha subunits in rat aortic smooth muscle cells / P.D Langton., E. Songu-Mize; X. Liu; L.J. Hymel // *Am J Med Sci (United States).* – 1998. - 316(3). – P.196-9.
- 350.Lanius, R.A. gamma-Aminobutyric acidA receptor regulation by a chloride-dependent kinase and a sodium-dependent phosphatase / R.A. Lanius, B.A. Pasqualotto, C.A. Shaw // *Brain Res Mol Brain Res.* – 1993. - 20(3). – P.192-8.
- 351.Large, W.A. Characteristics and physiological role of the Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in smooth muscle / W.A. Large, Q. Wang // *Am. J. Physiol.* - 1996. – 271. – P.C435-C454.
- 352.Lauzon, A.-M. Coiled-coil unwinding at the smooth muscle myosin head-rod junction is required for optimal mechanical performance / A.-M. Lauzon, P.M. Fagnant, D.M. Warshaw, K.M. Trybus // *Biophys. J.* - 2001. - 80. – P.1900-1904.
- 353.Ledoux, J. Dynamics of Ca²⁺-dependent Cl⁻ channel modulation by niflumic acid in rabbit coronary arterial myocytes / J. Ledoux, IA Greenwood, N. Leblanc // *Mol Pharmacol.* 2005 Jan;67(1):163-73. Epub 2004 Oct 1.

- 354.Ledoux, J. Modulation of Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels by calcineurin in rabbit coronary arterial myocytes / J. Ledoux, I. Greenwood, L.R. Villeneuve, N. Leblanc // *J Physiol.* – 2003. - 552(Pt 3). – P.701-14. Epub 2003 Aug 22.
- 355.Lee, C.H. The mechanism of phenylephrine-mediated [Ca(2+)](i) oscillations underlying tonic contraction in the rabbit inferior vena cava / C.H. Lee, D. Poburko, P. Sahota, J. Sandhu et al. // *J Physiol.* – 2001. - 534(Pt 3). – P.641-50.
- 356.Lee, C.J. Membrane stretch increases the activity of Ca(2+)-activated K⁺ channels in rabbit coronary vascular smooth muscles / C.J. Lee, S. Kwon, Y.H. Lee, D.S. Ahn et al. // *Yonsei Med J (Korea (south))*. – 2000. - 41(2). – P.266-72.
- 357.Lee, H.A. Bumetanide, the specific inhibitor of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport, inhibits 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃-induced osteoclastogenesis in a mouse co-culture system / H.A. Lee, H. Jeong, E.Y. Kim, M.Y. Nam et al. // *Exp Physiol.* – 2003. - 88(5). – P.569-74.
- 358.Lee, Y.H. Regulation of vascular smooth muscle tone by N-terminal region of caldesmon. Possible role of tethering actin to myosin / Y.H. Lee, C. Gallant, H. Guo, Y. Li et al. // *J Biol Chem.* – 2000. - 275(5). – P.3213-20.
- 359.Lehman, W. Visualization of caldesmon on smooth muscle thin filaments / W. Lehman, P. Vibert, R. Craig // *J. Mol. Biol.* - 1997. – 274. – P.310-317.
- 360.Lemonnier L. Bcl-2-dependent modulation of swelling-activated Cl⁻ current and ClC-3 expression in human prostate cancer epithelial cells / L. Lemonnier, Y. Shuba, A. Crepin, M. Roudbaraki et al. // *Cancer Res.* – 2004. - 64(14). – P.4841-8.
- 361.Levesque, PC. Anion and cation modulation of the guinea-pig ventricular action potential during beta-adrenoceptor stimulation / P.C. Levesque, C.D. Clark, S.I. Zakarov, L.V. Rosensh-Traukh, J.R. Hume // *Pflügers Arch.* – 1993. – 424. – P.54–62.
- 362.Levitan, I. Modulation of volume-regulated Cl⁻ current by F-actin / I. Levitan, C. Almonte, P. Mollard, S.S. Garber // *J. Membrane Biol.* – 1995. – 147. – P.283–294.
- 363.Levko, A.V. [Response of the rat erythrocyte glycolytic system to hyperosmotic shrinkage] / A.V. Levko, S.L. Aksentsev, T.G. Gurlo, S.V. Konev et al. // *Biofizika.* – 1995. - 40(2). – P.377-82.

- 364.Li, S. Signal transduction in matrix contraction and the migration of vascular smooth muscle cells in three-dimensional matrix / S. Li, J.J. Moon, H. Miao, G. Jin et al. // *J Vasc Res.* – 2003. - 40(4). – P.378-88. Epub 2003 Jul 29.
- 365.Li, X.-D. The interaction between the regulatory light chain domains on two heads is critical for regulation of smooth muscle myosin / X-D. Li, J. Saito, R. Ikebe, K. Mabuchi, et al. // *Biochemistry*, - 2000. – 39. – P.2254-2260.
- 366.Lingrel, J.B. Ligand binding sites of Na,K-ATPase / J.B. Lingrel, M.L. Croyle, A.L. Woo, J.M. Argüello // *Acta Physiol Scand.* – 1998. - 163 (suppl. 643). – P.69-77.
- 367.Liu, X. Acetylcholine-induced chloride current oscillations in swine tracheal smooth muscle cells / X. Liu, J.M. Farley // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1996. – 276. – P.78–186.
- 368.Loirand, G. Evidence for two distinct calcium channels in rat vascular smooth muscle cells in short term primary culture / G. Loirand, P. Pacaud, C. Mironneau, J. Mironneau // *Pflugers Arch.* – 1993. – 407. – P.1149–1152.
- 369.Lopatin, D.A. Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia / D.A. Lopatin, E.K. Ailamazian, R.I. Dmitrieva, V.M. Shpen et al.// *J Hypertens.* – 1999. - 17(8). - 1179-87.
- 370.Ludens, J.H. Nature of the inhibition of Cl⁻ transport by furo-semide: evidence for competitive inhibition of active transport of toad cornea / J.H. Ludens // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1982. – 223. – P.25–29.
- 371.Lynn J. Phospholipase C isoforms, cytoskeletal organization, and vascular smooth muscle / J. Lynn, A. Hughes // *News Physiol. Sci.*- 2000.-V.15,N.2.- P.41-45.
- 372.Lytle, C. A volume-sensitive protein kinase regulates the Na-K-2Cl cotransporter in duck red blood cells / C. Lytle, T. McManus // *Am J Physiol.* – 1998. - 274(4 Pt 1). – P.C1002-10.
- 373.Lytle, C. Activation of the avian erythrocyte Na-K-Cl cotransport protein by cell shrinkage, cAMP, fluoride, and calyculin-A involves phosphorylation at common sites / C. Lytle // *J Biol Chem.* – 1997. – 272. – P.15069-77.
- 374.Lytle, C. Coordinate modulation of Na-K-2Cl cotransport and K-Cl cotransport by cell volume and chloride. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Nov;283(5):C1422-31

375. Lytle, C. Na-K-Cl cotransport in shark rectal gland. II. Regulation in isolated tubules / C. Lytle, B. Forbush III // *Am. J. Physiol.* - 1992b. - 262 (*Cell Physiol.* 31). – P.C1009-C1017.
376. Lytle, C. The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation / C. Lytle, B. Forbush III // *J. Biol. Chem.* - 1992a. – 267. – P.25438-25443.
377. Ma, Y.H. Chloride-dependent calcium transients induced by angiotensin II in vascular smooth muscle cells / Y.H. Ma, H.W. Wei, K.H. Su, H.E. Ives et al. // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2004. - 286(1). – P.C112-8.
378. Macknight, A.D. Regulation of cellular volume / A.D. Macknight, A. Leaf // *Physiol. Rev.* – 1977. – 57. – P.510–573.
379. Madden, T.L. Crowding-induced organization of cytoskeletal elements: I. Spontaneous demixing of cytoplasmic proteins and model filaments to form filament bundles / T.L. Madden, J. Herzfeld // *Biophys.J.* – 1993. – 65. – P.1147-1154.
380. Mairbaur, H. Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransport, Na⁺/H⁺ exchange, and cell volume in ferret erythrocytes / H. Mairbaur, C. Herth // *Am J Physiol.* – 1996. - 271(5 Pt 1). – P.C1603-11.
381. Majno, G. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death / G. Majno, I. Joris // *A J Pathol.* – 1995. – 146. –P.3-15.
382. Mamoto, T. Relationship between exercise performance and water distribution measured by new bioelectrical impedance analysis in patients with chronic obstructive pulmonary disease / T. Mamoto, H. Fujiwara, Y. Toyama, K. Hirata et al. // *Clin Physiol Funct Imaging.* – 2003. - 23(4). – P.230-5.
383. Martonosi, A. Studies on actin. III. G-F transformation of actin and muscular contraction (experiments *in vivo*) / A. Martonosi, M.A.Gouvea, J. Gergely // *J. Biol. Chem.* - 1960. – 235. – P.1707-1710.
384. Marunaka, Y. Effects of insulin and phosphatase on a Ca²⁺-dependent Cl⁻ channel in a distal nephron cell line / Y. Marunaka, D.C. Eaton // *J. Gen. Physiol.* – 1990. – 95. – P.773–789.
385. Masuda, T. Effect of propofol on hypotonic swelling-induced membrane depolarization in human coronary artery smooth muscle cells / T. Masuda, Y.

- Tomiyaama, H. Kitahata, Y. Kuroda et al. // *Anesthesiology*. – 2004. - 100(3). – P.648-56.
- 386.Matchkov, V.V. A cyclic GMP-dependent calcium-activated chloride current in smooth-muscle cells from rat mesenteric resistance arteries / V.V. Matchkov, C. Aalkjaer, H. Nilsson // *J Gen Physiol*. – 2004. - 123(2). - P.121-34. Epub 2004 Jan 12.
- 387.Mathews, J. Effects of F-actin stabilization or disassembly on epithelial Cl secretion and Na-K-2Cl cotransport / J. Mathews, J. Smith, B. Hrnjez. // *Am. J. Physiol.* – 1997. -272 (*Cell Physiol.* 41). –P. C254-C262.
- 388.Matrougui, K. Involvement of Rho-kinase and the actin filament network in angiotensin II-induced contraction and extracellular signal-regulated kinase activity in intact rat mesenteric resistance arteries / K. Matrougui, L.B. Tanko, L. Loufrani, D. Gorny et al. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2001. - 21(8). – P.1288-93.
- 389.Matsuoka, S. Chloride-sensitive nature of the adrenaline-induced current in guinea-pig cardiac myocytes / S. Matsuoka, T. Ehara, A. Noma // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1990. – 425. – P.579–598.
- 390.Matsuzaki, T. Hypertonicity-induced expression of aquaporin 3 in MDCK cells / T. Matsuzaki, T. Suzuki, K. Takata // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2001. - 281(1). – P.C55-63.
- 391.McDonald, T.F. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells / T.F. McDonald, , S. Pelzer, W. Trautwein, D.J. Pelzer // *Physiol.Rev.* – 1994. – 74. – P.365-512.
- 392.McRoberts J.A. Furosemide-sensitive salt transport in the Madin-Darby canine kidney cell line: evidence for the cotransport of Na⁺,K⁺ and Cl⁻. J.A. McRoberts, S. Erlinger, M.J. Rindler, M.H. Saier // *J. Biol. Chem.* – 1982. – 257. –P. 2260–2266.
- 393.Mehta, D. Actin polymerization stimulated by contractile activation regulates force development in canine tracheal smooth muscle / D. Mehta, S.J. Gunst // *J. Physiol.* - 1999. – 519. – P.820-840.
- 394.Meyer, J.W. Decreased blood pressure and vascular smooth muscle tone in mice lacking basolateral Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter / J.W. Meyer, M. Flagella,

- R.L. Sutliff, J.N. Lorenz et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2002. – 283. – P.H1846-55.
- 395.Middleton, L.M. PKC regulation of cardiac CFTR Cl⁻ channel function in guinea pig ventricular myocytes / L.M. Middleton, R.D. Harvey // *Am. J. Physiol.* – 1998. -275 (Cell Physiol. 44). – P.C293—C302.
- 396.Mills, J.C. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation / J.C. Mills, N.L. Stone, J. Erhardt, R.N. Pittman // *J Cell Biol.* – 1998. - 140(3). – P.627-36.
- 397.Minetti, G. Characterization of the hypertonically induced tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3 / G. Minetti, C. Seppi, A. Ciana, C. Balduini et al. // *Biochem J.* – 1998. - 335(Pt 2). – P.305-11.
- 398.Minton, A.P. Macromolecular crowding and molecular recognition / A.P. Minton // *J Mol Recognit.* – 1993. – 6. – P.211-214.
- 399.Moffatt, J.D. Pharmacologically distinct intracellular calcium pools regulate tonic and oscillatory responses in porcine thoracic duct / J.D. Moffatt, T.M. Cocks // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2004. - 43(1). – P.83-92.
- 400.Mongin, A.A. Hypotonic cell swelling changes Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport activity and a mode of its operation in cultured glial cells / A.A. Mongin, S.L. Aksentsev, A.S. Fedulov, Z.B. Kvacheva et al. // *J. Neurochem.* – 1997. – 69. – P.S31.
- 401.Mongin, A.A. Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor / A.A. Mongin, S.N. Orlov // *Pathophysiology.* – 2001. – 8. – P.77-88.
- 402.Moore, E.D. Coupling of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, Na⁺/K⁺ pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle / E.D. Moore, E.F. Etter, K.D. Philipson, W.A. Carrington et al. // *Nature.* – 1993. – 365. – P.657-660.
- 403.Morita, H. Angiotensin II activation of a chloride current in rabbit cardiac myocytes / H. Morita, J. Kimura, M. Endoh // *J. Physiol. (Lond.).* – 1995. – 483. - P119–130.
- 404.Mount, D.B. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family / D.B. Mount, A.Mercado, L. Song, J. Xu e al. // *J Biol Chem (United States).* – 1999. - 274(23). – P.16355-62.

405. Mount, D.B. The electroneutral cation-chloride cotransporters / D.B. Mount, E. Delpire, G. Gamba, A.E. Hall et al. // *J.Exp.Biol.* – 1999. – 201. – P.2091-2102.
406. Muimo, R. Nucleoside diphosphate kinase and Cl(-)-sensitive protein phosphorylation in apical membranes from ovine airway epithelium / R. Muimo, S.J. Banner, L.J. Marshall, A. Mehta // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 1998. - 18(2). – P.270-8.
407. Muraki, K. Effect of isoprenaline on Ca²⁺ channel current in single smooth muscle cells isolated from taenia of the guinea-pig caecum / K. Muraki, T.B. Bolton, Y. Imaizumi, M. Watanabe // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1993. – 471. – P.563–582, 764.
408. Murphy, R.A. Signal transduction in smooth muscle / R.A. Murphy // *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*. - 1999. - vol.134.
409. Murthy K. Heterologous desensitization of response mediated by selective PKC-dependent phosphorylation of G_(i-1) and G_(i-2) / K. Murthy, J. Grider, G. Makhlof // *Am.J.Physiol.Cell Physiol.*-2000.-V.279,N4.-C.925-934.
410. Muzyamba, M.C. Regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in turkey red cells: the role of oxygen tension and protein phosphorylation / M.C. Muzyamba, A.R. Cossins, J.S. Gibson // *J Physiol.* – 1999. - 517 (Pt 2). – P.421-9.
411. Myssina, S. Cl⁻ channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca(2⁺)-induced erythrocyte 'apoptosis' / S. Myssina, P.A. Lang, D.S. Kempe, S. Kaiser et al. // *Cell Physiol Biochem.* – 2004. - 14(4-6). – P.241-8.
412. Naganska, E. Ultrastructural characteristics of necrotic and apoptotic mode of neuronal cell death in a model of anoxia in vitro / E. Naganska, E. Matyja // *Folia Neuropathol.* – 2001. -39(3). – P.129-39.
413. Nagumo, H. Rho-kinase inhibitor HA-1077 prevents rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells / H. Nagumo, Y. Sasaki, Y. Ono, Okamoto et al. // *Am. J. Physiol.* - 2000. – 278. – P.C57-C65.
414. Nakao, F. Involvement of Src family protein tyrosine kinases in Ca²⁺ sensitization of coronary artery contraction mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway / F. Nakao, S. Kobayashi., K. Mogami, Y. Mizukami et al. // *Circ Res.* – 2002. - 15;91. – P.953-960.
415. Nakayama, K. Interactive role of tyrosine kinase, protein kinase C, and Rho/Rho kinase systems in the mechanotransduction of vascular smooth mus-

- cles / K. Nakayama, K. Obara, Y. Tanabe, M. Saito et al. // *Biorheology*. – 2003. - 40(1-3). – P.307-14.
- 416.Nelson, M.T. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone / M.T. Nelson, J.B. Patlak, J.F. Worley, N.B. Standen // *Am. J. Physiol.* – 1990. -259 (*Cell Physiol.* 28). – P.C3-C18.
- 417.Neylon CB. Vascular biology of endothelin signal transduction / C.B. Neylon // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 1999. - 26(2). – P.149-53.
- 418.Nilius B. Annexin II modulates volume-activated chloride currents in vascular endothelial cells / B. Nilius, V. Gerke, J. Prenen, G. Szucs et al. // *J. Biol. Chem.* – 1996. – 271. – P.30 631–30 636.
- 419.Nilius B. Role of rho and rho-kinase in the activation of volume-regulated anion channels in bovine endothelial cells / B. Nilius, T. Voets, J. Prenen, H. Barth, K. Aktories, K. Kaibuchi, G. Droogmans, J. Eggermont // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1999. –516. – P.67–74.
- 420.Nilius B. Volume-activated Cl⁻ channels / B. Nilius, J. Eggermont, T. Voets, G. Droogmans // *Gen. Pharmacol.* – 1996. – 27. – P.1131–1140.
- 421.Nilsson H. Role of intracellular calcium for noradrenaline-induced depolarization in rat mesenteric small arteries / H. Nilsson, L.M. Videbaeck, C. Toms, M.J. Mulvany // *J. Vasc. Res.* - 1998. – 35 – P.36-44.
- 422.Nobles M. Extracellular acidification elicits a chloride current that shares characteristics with ICl(swell) / M. Nobles, C.F. Higgins, A. Sardini // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2004. - 287(5). – P.C1426-35. Epub 2004 Aug 11.
- 423.Noguera M. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in contractile responses of denuded rat aorta related to various Ca²⁺ sources / M. Noguera, M. Ivorra, C. Lugnier, P. D'Ocon // *N.- Sch. Arch.Pharmacol.* - 2001. - V.363,N6. - P.612-619.
- 424.Novarino, G. Involvement of the intracellular ion channel CLIC1 in microglia-mediated beta-amyloid-induced neurotoxicity / G. Novarino, C. Fabrizi, R. Tonini, M.A. Denti et al. // *J Neurosci.* – 2004. - 24(23). – P.5322-30.
- 425.Nunes, J.P. Cytoskeleton, passive tension and the contraction of the rat aorta to phorbol 12,13-dibutyrate / J.P. Nunes // *Pharmacol Res.* – 2002. - 46(2). – P.113-7.

426. Nunes, J.P. The influence of the wall tension on the contractile responses of arteries / J.P. Nunes, S. Guimaraes // *Fundam Clin Pharmacol.* – 1999. - 13(2). – P.193-7.
427. O'Donnell, M.E. Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle / M.E. O'Donnell, N.E. Owen // *Physiol. Rev.* - 1994. – 74. – P.683-721.
428. O'Donnell, M.E. Endothelial Na-K-Cl cotransport regulation by tonicity and hormones: phosphorylation of cotransport protein / M.E. O'Donnell, A. Martinez, D. Sun // *Am J Physiol.* – 1995. - 269(6 Pt 1). – P.C1513-23.
429. O'Neill, W.C. Functional coupling of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport and Ca²⁺-dependent K⁺ channels in vascular endothelial cells / W.C. O'Neill, D.F. Steinberg // *Am. J. Physiol.* - 1995. - 269 (*Cell Physiol.* 38). – P.C267–C274.
430. O'Neill, W.C. Physiological significance of volume-dependent transporters / W.C. O'Neill // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* - (1999). – 276. – P.C995–C1011.
431. O'Neill, W.C. Regulation of vascular endothelial cell volume by Na-K-2Cl cotransport / W.C. O'Neill, J.D. Klein // *Am.J.Physiol.* – 1994. – 262. – P.C436-C444.
432. Ohki, S-Y. Solution NMR structure of the myosin phosphatase inhibitor protein CPI-17 shows phosphorylation-induced conformational changes responsible for activation / S-Y. Ohki, M. Eto, A. Kariya, T. Hayano et al. // *J. Mol. Biol.* - 2001. – 314. – P.839-849.
433. Ohta T. Chloride currents activated by caffeine in rat intestinal smooth muscle cells / T. Ohta, S. Ito // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1993. – 465. – P.149–162.
434. Ohya Y. Effects of inositol phosphates on the membrane activity of smooth muscle cells of the rabbit portal vein / Y. Ohya, K. Terada, K. Yamaguchi, R. Inoue et al. // *Pflugers Arch.* – 1988. –412. – P.382–389.
435. Oike M. Histamine H₃-receptor activation augments voltage-dependent Ca²⁺ current via GTP hydrolysis in rabbit saphenous artery / M. Oike, K. Kitamura, H. Kuriyama // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1992. – 448. – P.133–152.
436. Okada Y. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD) / Y. Okada, E. Maeno, T. Shimizu, K. Dezaki et al. // *J Physiol.* – 2001. - 532(Pt 1). – P.3-16.

- 437.Okada Y. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD) / Y. Okada, E. Maeno, T. Shimizu, K. Dezaki et al.// J. Physiol. (Lond.). – 2001. – P.532 3–16.
- 438.Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor / Y. Okada // Am. J. Physiol. - 1997. - 273 (Cell Physiol. 42). – P.C755—C789.
- 439.Okamoto T. Caveolins, a family of scaffolding proteins organizing ‘preassembled signalling complexes’ at the plasma membrane / T. Okamoto, A. Schlegel, P.E. Scherer, M. Lizanti // J. Biol. Chem. – 1998. – 273. – P.5419–5422.
- 440.Oleksa L.M. α 1-adrenergic inhibition of the beta-adrenergically activated Cl⁻ current in guinea pig ventricular myocytes // L.M. Oleksa, L.C. Hool, R.D. Harvey // Circ. Res. - 1996. – 78. - P1090–1099.
- 441.Orlov S.N. Bumetanide-sensitive ion fluxes in vascular smooth muscle cells: lack of functional Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport / S.N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // J.Membrane Biol. – 1996. – 153. – P.125-135.
- 442.Orlov, S.N. Altered beta-adrenergic regulation of Na-K-Cl cotransport in cultured smooth muscle cells from rat aorta of spontaneously hypertensive rats: role of the cytoskeleton network / S.N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // Am. J. Hypertens. - 1995. – 8. – P.739-747.
- 443.Orlov, S.N. Altered α -adrenergic regulation of Na-K-Cl cotransport in cultured smooth muscle cells from the aorta of spontaneously hypertensive rats / S.N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // Am.J.Hypertens. – 1995. – 8. – P.739-747.
- 444.Orlov, S.N. Apoptosis in serum-deprived vascular smooth muscle cells: evidence for cell volume-independent mechanism. / S.N. Orlov, D. Pchejetski, S. Taurin, N. Thorin-Trescases et al. // Apoptosis. – 2004. – 9. – P.55-66.
- 445.Orlov, S.N. Apoptosis in serum-deprived vascular smooth muscle cells: evidence for cell volume-independent mechanism / S.N. Orlov, D. Pchejetski, S. Taurin, N. Thorin-Trescases et al. // Apoptosis. – 2004. – 9. – P.55-66.
- 446.Orlov, S.N. Bumetanide-sensitive ion fluxes in vascular smooth muscle cells: lack of functional Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport / S.N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // J. Membrane Biol. – 1996. – 153. – P.125–135.

- 447.Orlov, S.N. Bumetanide-sensitive ion fluxes in vascular smooth muscle cells: lack of functional $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransport / S.N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // *J.Membrane Biol.* – 1996. – 153. – P.125-135.
- 448.Orlov, S.N. Ca-activated K channels of erythrocytes: the study by means of the registration of Ca-induced alterations of membrane potential / S.N. Orlov, I.V.-Petrova, M.B. Baskakov, M.A. Medvedev // *Biol Membr.* – 1992. – 9. – P.885-903.
- 449.Orlov, S.N. cAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} influx in vascular smooth muscle cells / S.N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // *Hypertension.* – 1996. – 27. – P.774-780.
- 450.Orlov, S.N. Cell volume in vascular smooth muscle is regulated by bumetanide-sensitive ion transport / S.N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* -1996b. – 270. – P.C1388–C1397.
- 451.Orlov, S.N. Cell volume in vascular smooth muscle is regulated by bumetanide-sensitive ion transport / S.N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // *Am.J.Physiol.* – 1996. – 270. – P.C1388-C1397.
- 452.Orlov, S.N. Genetic and biochemical determinants of abnormal monovalent ion transport in primary hypertension / S.N.Orlov, N.Adragna, V.A. Adarichev, P. Hamet // *Am J Physiol.* – 1999. – 276. – P.C511-C536.
- 453.Orlov, S.N. Genetic and biochemical determinants of abnormal monovalent ion transport in primary hypertension / S.N. Orlov, N. Adragna, V.A. Adarichev, P. Hamet // *Am J Physiol.* – 1999. – 276. – P.C511-C536.
- 454.Orlov, S.N. Hypertension. In *Red cell membrane transport in health and disease* / Bernhardt I. and Ellory J.C., editors. Springer, Berlin. 2003, P.587-602.
- 455.Orlov, S.N. Hypertension. In: Bernhardt I, Ellory JC, editors. *Red cell membrane transport in health and disease*. Berlin: Springer, 2003: P.587-602.
- 456.Orlov, S.N. Inversion of the intracellular Na^+/K^+ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3 / S.N. Orlov, N. Thorin-Trescases, S.V. Kotelevtsev, J. Tremblay et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – 274. – P.16 545–16 552.
- 457.Orlov, S.N. Inversion of the intracellular Na^+/K^+ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3 / S.N. Orlov, N. Thorin-

- Trescases, S.V. Kotelevtsev, J. Tremblay et al. // *J Biol Chem.* – 1999. – 274. – P.16545-16552.
- 458.Orlov, S.N. Na^+/K^+ pump and endothelial cell survival: $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -independent necrosis triggered by ouabain, and protection against apoptosis mediated by elevation of $[\text{Na}^+]_i$ / S.N. Orlov, N. Thorin-Trescases, D. Pchejetski, S. Taurin et al. // *Pflügers Archiv.* – 2004. – 448. – P.335-345.
- 459.Orlov, S.N. Na^+/K^+ pump and Na^+/K^+ co-transport in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: baseline activity and regulation / S.N. Orlov, T.J. Resink, J. Bernhardt, F.R. Buhler // *J.Hypertens.* - 1992b. – 10. – P.733-740.
- 460.Orlov, S.N. Na^+/K^+ pump and Na^+/K^+ co-transport in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: baseline activity and regulation / S.N. Orlov, T.J. Resink, J. Bernhardt, F.R. Buhler // *J.Hypertens.* – 1992. – 10. – P.733-740.
- 461.Orlov, S.N. Volume-dependent regulation of cation transport and polyphosphoinositide metabolism in human and rat erythrocytes: features revealed in primary hypertension / S.N. Orlov, N.I. Pokudin, P.V. Gulak, Yu.V. Postnov // *Physiol Bohemoslov.* – 1990. - 39(1). – P.15-26.
- 462.Orlov, S.N. Volume-dependent regulation of ion carriers in human and rat erythrocytes: role of cytoskeleton and protein phosphorylation / S.N. Orlov, S.R. Kuznetsov, I.A. Kolosova, S.L. Aksentsev et al. // *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova.* – 1997. - 83(5-6). – P.119-47.
- 463.Orlov, S.N. Volume-dependent regulation of ion transport and membrane phosphorylation in human and rat erythrocytes / S.N. Orlov, N.I. Pokudin, P.V. Gulak, Yu.V. Postnov // *J Membr Biol.* – 1989. - 107(2). – P.105-17.
- 464.Orlov, S.N. Volume-dependent regulation of sodium and potassium fluxes in cultured vascular smooth muscle cells: dependence on medium osmolality and regulation by signalling systems / S.N. Orlov, T.J. Resink, J. Bernhardt, F.R. Buhler // *J Membrane Biol.* - 1992a. – 126. – P.199-210.
- 465.Orlowski, J. Na^+/H^+ exchangers of mammalian cells / J .Orlowski, S. Grinstein // *J. Biol. Chem.* – 1997. – 272. – P.22 373–22 376.

- 466.Overholt, J.L. On the mechanism of rectification of the isoproterenol-activated chloride current in guinea-pig ventricular myocytes / J.L. Overholt, M.E. Hobert, R.D. Harvey // *J. Gen. Physiol.* - 1993. – 102. – P.871–895.
- 467.Owen, N.E. Mechanism of angiotensin II stimulation of Na-K-Cl cotransport of vascular smooth muscle cells / N.E. Owen, K.M. Ridge // *Am.J.Physiol.* – 1989. – 257. – P.C629-C636.
- 468.Owen, N.E. Na/K/Cl cotransport in cultured human fibroblasts / N.E. Owen, M.L. Prastein // *J. Biol. Chem.* - 1985. – 260. – P.1445-1451.
- 469.Owen, N.E. Regulation of Na/K/Cl cotransport in vascular smooth muscle cells / N.E. Owen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1984. – 125. – P.500-508.
- 470.Owen, N.E. Regulation of Na/K/Cl cotransport in vascular smooth muscle cells / N.E. Owen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1984. – 125. – P.500-508.
- 471.Owens G. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation / G. Owens // *Acta Physiol Scand.*- 1998.-V. 164(4).-P.623-635.
- 472.Owens G. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation / G. Owens // *Acta Physiol Scand.*- 1998.-V. 164(4).-P.623-635.
- 473.Pacaud, P. Release of Ca²⁺ by noradrenaline and ATP from the same Ca²⁺ store sensitive to both InsP₃ and Ca²⁺ in rat portal vein myocytes / P. Pacaud, G. Loirand // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1995. – 484. – P.549–555.
- 474.Page E. Water channel proteins in rat cardiac myocyte caveolae: osmolarity-dependent reversible internalization / E. Page, J. Winterfield, G. Goings, A. Bastawrous et al. // *Am J Physiol.* – 1998. - 274(6 Pt 2). - H1988-2000.
- 475.Palfrey H.C. cAMP-stimulated cation cotransport in avian erythrocytes: inhibition by “loop” diuretics / H.C. Palfrey, P.W. Feit, P. Greengard // *Am. J. Physiol.* – 1980. -238 (Cell Physiol. 7). – P.C139—C148.
- 476.Palfrey H.C. The ATP and Mg²⁺ dependence of Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransport reflects a requirement for protein phosphorylation: studies using calyculin A / H.C. Palfrey, E.B. Pewitt // *Pflugers Arch.* – 1993. - 425(3-4). – P.321-8.
- 477.Papakonstanti, E.A. Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation / E.A. Papakonstanti, E.A. Vardaki, C. Stournaras // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2000. – 10. – P.257–264.

478. Pasqualotto B.A. Regulation of GABAA and AMPA receptors by agonist and depolarizing stimulation requires phosphatase or kinase activity / B.A. Pasqualotto, R.A. Lanius, C.A. Shaw // *Neuroreport*. – 1993. - 4(4). – P.447-50.
479. Pasqualotto, B.A. / B.A. Pasqualotto et al. // *Neuroreport*, 4 (1993) 447-450
480. Paul, R.J. Effects of microtubule disruption on force, velocity, stiffness and [Ca(2+)](i) in porcine coronary arteries / R.J. Paul, P.S. Bowman, M.S. Kolodney // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2000. - 279(5). – P.H2493-501.
481. Pearce, J.D. Differential effects of Rho-kinase inhibition on artery wall mass and remodeling / J.D. Pearce, J. Li, M.S. Edwards, W.P. English et al. // *J Vasc Surg*. – 2004. - 39(1). – P.223-8.
482. Pedersen, P.A. Contribution of Ti⁺, K⁺, and Na⁺ binding of Asn776, Ser775, Thr774, and Thr771 in cytoplasmic prt of the fifth transmembrane segment in alfa-subunit of renal Na,K-ATPase / P.A. Pedersen, J.M. Nielsen, J.H. Rasmussen, P.L. Jorgensen // *Biochemistry*. – 1998. – 37. – P.17818-17827.
483. Pedersen, S.F. Possible interrelationship between changes in F-actin and myosin II, protein phosphorylation, and cell volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells / S.F. Pedersen, E.K. Hoffmann // *Exp Cell Res*. – 2002. - 277(1). – P.57-73.
484. Pedersen, S.F. Rho family GTP binding proteins are involved in the regulatory volume decrease in NIH3T3 mouse fibroblasts / S.F. Pedersen, K.H. Beisner, C. Hougaard, B.M. Willumsen et al. // *J. Physiol*. – 2002. – 541. – P.779-796.
485. Pedersen, S.F. The cytoskeleton and cell volume regulation / S.F. Pedersen, E.K. Hoffmann, J.W. Mills // *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. – 2001. - 130(3). – P.385-99.
486. Peiro, C. Angiotensin II mediates cell hypertrophy in vascular smooth muscle cultures from hypertensive Ren-2 transgenic rats by an amiloride- and furosemide-sensitive mechanism / C. Peiro, J. Angulo, J.L. Llergo, L. Rodriguez-Manas et al. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1997. - 240(2). – P.367-71.
487. Perry, P.B. Swelling-activated K fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K₂Cl cotransport and K channels / P.B. Perry, W.C. O'Neill // *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. – 1993. – 265. – P.C763–C769.

- 488.Philipp, S. A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL / S. Philipp, A. Cavalie, M. Freichel, U. Wissenbach et al. // *EMBO J.* – 1996. – 15. – P.6166-6171.
- 489.Piper, A.S. Direct effect of Ca²⁺-calmodulin on cGMP-activated Ca²⁺-dependent Cl⁻channels in rat mesenteric artery myocytes / A.S. Piper, W.A. Large // *J Physiol.* 2004 Sep 1;559(Pt 2):449-57. Epub 2004 Jul 2.
- 490.Piper, A.S. Dual effect of blocking agents on Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells / A.S. Piper, I.A. Greenwood, W.A. Large // *J Physiol.* – 2002. – 539. – P.119-131.
- 491.Piper, A.S. Multiple conductance states of single Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells / A.S. Piper, W.A. Large // *J Physiol.* – 2003. - 547(Pt 1). – P.181-96. Epub 2003 Jan 10.
- 492.Piper, A.S. Single cGMP-activated Ca(+)-dependent Cl(-) channels in rat mesenteric artery smooth muscle cells / A.S. Piper, W.A. Large // *J Physiol.* – 2004. - 555(Pt 2). – P.397-408. Epub 2004 Jan 14.
- 493.Platts, S.H. Microtubule-dependent regulation of vasomotor tone requires Rho-kinase / S.H. Platts, L.A. Martinez-Lemus, G.A. Meininger // *J Vasc Res.* – 2002. - 39(2). – P.173-82.
- 494.Pollock, N.J.H. Chloride channels blockers inhibit Ca²⁺ uptake by smooth muscle sarcoplasmic reticulum / N.J.H. Pollock, M.E. Kargacin, G.J. Kargacin // *Biophys. J.* - 1998. – 75. – P.1759-1766.
- 495.Polte, T.R. Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress / T.R. Polte, G.S. Eichler, N. Wang, D.E. Ingber // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2004. - 286(3). – P.C518-28.
- 496.Postnov, Yu.V. Altered permeability of the erythrocyte membrane for sodium and potassium in spontaneously hypertensive rats / Yu.V. Postnov, S.N. Orlov, P.V. Gulak, A.S. Shevchenko // *Pflugers Archiv.* – 1976. – 365. – P.257-263.
- 497.Postnov, Yu.V. Altered sodium permeability, calcium binding and Na-K-AT-Pase activity in the red blood cell membrane in essential hypertension / Yu.V. Postnov, S.N. Orlov, A.S. Shevchenko, A.M. Adler // *Pflugers Archiv.* – 1977. – 371. – P.263-269.

498. Puceat, M. Specific activation of adenylyl cyclase V by a purinergic agonist / M. Puceat, C. Bony, M. Jaconi, G. Vassort // *FEBS Lett.* - 1998. – 431. – P.189–194.
499. Quayle J. KATP channels in vascular smooth muscle / J. Quayle, N. Standen // *Cardiovasc. Res.*-1994.-V.28,N6.-P.797-804.
500. Quevillon-Cheruel, S. Role of the C-terminal extremities of the smooth muscle myosin heavy chains: implication for assembly properties / S. Quevillon-Cheruel, G. Foucault, M. Desmadril, A-M. Lompre, et al. // *FEBS Letters.* - 1999. – 454. – P.303-306.
501. Raat, N.J. Regulation of Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransport in rabbit proximal tubule primary culture / N.J. Raat, A. Hartog, van C.H. Os, R.J. Bindels et al.// *Am.J.-Physiol.* – 1994. – 267. – P.F63-F69.
502. Raat, N.J.H. Culturing induced expression of basolateral Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter BSC2 in proximal tubule, aortic endothelium, and vascular smooth muscle / N.J.H. Raat, E. Delpire, C.H. van Os, R.J.M. Bindels // *Pflügers Arch.* - 1996. – 431. – P.458-460.
503. Rembold, C.M. (cGMP-mediated phosphorylation of heat shock protein 20 may cause smooth muscle relaxation without myosin light chain dephosphorylation in swine carotid arte / C.M. Rembold, D.B. Foster, J.D. Strauss, C.J. Wingard et al. // *J. Physiol.* - 2000. – 524. – P.865-878.
504. Remillard, C.V. Role of Ca²⁺- and swelling-activated Cl⁻ channels in alpha₁-adrenoceptor-mediated tone in pressurized rabbit mesenteric arterioles / C.V Remillard, M.A. Lupien, V. Crepeau, N. Leblanc // *Cardiovasc Res.* – 2000. – 46. – P.557-68.
505. Rhoden, K.J. Evidence of Na-K-Cl cotransport in airway smooth muscle / K.J. Rhoden, J.S. Douglas // *Am. J. Physiol.* - 1995. – 268. – P.L551-L557.
506. Rishal, I. Na⁺ promotes the dissociation between GaGDP and Gbg, activating G-protein-gated K⁺ channels / I. Rishal, T. Keren-Raifman, D. Yakubovich, T. Ivanina et al. // *J Biol Chem.* – 2003. – 278. – P.3840-3845.
507. Robinson, N.C. Identification of an N-terminal amino acid of the CLC-3 chloride channel critical in phosphorylation-dependent activation of a CaMKII-activated chloride current / N.C. Robinson, P Huang, MA Kaetzel, F.S. Lamb et al.// *J Physiol.* 2004 Apr 15;556(Pt 2):353-68. Epub 2004 Jan 30.

- 508.Roger, F. Cell shrinkage triggers the activation of mitogen-activated protein kinases by hypertonicity in the rat kidney medullary thick ascending limb of the Henle's loop. Requirement of p38 kinase for the regulatory volume increase response / F. Roger, P.Y. Martin, M. Rousselot, H. Favre et al. // *J Biol Chem.* – 1999. - 274(48). – P.34103-10.
- 509.Rohra, D.K. Functional role of Cl⁻ channels in acidic pH-induced contraction of the aorta of spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats / D.K. Rohra, S.Y. Saito, Y. Ohizumi // *Eur J Pharmacol.* – 2002. - 453(2-3). – P.279-86.
- 510.Rohwer, J.M. Implications of macromolecular crowding for signal transduction and metabolite channeling / J.M. Rohwer, P.W. Postma, B.N. Kholodenko, H.V. Westerhoff // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. - Vol.95. – P.10547–10552.
- 511.Rose, C.R. MDA-receptor-mediated Na⁺ signals in spines and dendrites / C.R. Rose, A. Konnerth // *J Neurosci.* – 2001. - 21. – P.4207-4214.
- 512.Rovner, A.S. The carboxyl-terminal isoforms of smooth muscle myosin heavy chain determine thick filament assembly properties / A.S.Rovner, P.M.Fagnant, S. Lowey, K.M. Trybus // *J. Cell. Biol.* - 2002. – 156. – P.113-124.
- 513.Rowner, A.S. A long, weakly charged actin-binding loop is required for phosphorylation dependent regulation of smooth muscle myosin / A.S. Rowner // *J. Biol. Chem.* - 1998. – 273. – P.27939-27944.
- 514.Russ R. Pancreatic islet transplantation, but not intensive insulin therapy, corrects the pulmonary vascular complications of streptozotocin diabetes / R. Russ, B. Tobin // *Can. J. Physiol. Pharmacol.*- 1998.-V.76,N4.-P.407-417.
- 515.Russell, J.M. ATP-dependent chloride influx into internally dialyzed squid giant axons / J.M. Russell // *J. Membr. Biol.* - 1976. – 28. – P.335-349.
- 516.Russell, J.M. Sodium-potassium-chloride cotransport / J.M. Russell // *Physiol.Rev.* – 2000. – 80. – P.212-276
- 517.Rutllant, J. Osmotic tolerance limits and properties of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa / J. Rutllant, A.C. Pommer, S.A. Meyers // *J Androl.* – 2003. - 24(4). – P.534-41.
- 518.Sachs, J.R. The role of ATP in swelling-stimulated K-Cl cotransport in human red cell ghosts. Phosphorylation-dephosphorylation events are not in the signal transduction pathway / J.R. Sachs, D.W. Martin // *J Gen Physiol.* – 1993. - 102(3). – P.551-73.

- 519.Sakaguchi, M. Swelling-induced Cl⁻ current in guinea-pig atrial myocytes: inhibition by glibenclamide / M. Sakaguchi, H. Matsuura, T. Ehara // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1997. - 505. - P41-52.
- 520.Sakamoto, K. Inhibition of high K⁺-induced contraction by the ROCKs inhibitor Y-27632 in vascular smooth muscle: possible involvement of ROCKs in a signal transduction pathway / K. Sakamoto, M. Hori, M. Izumi, T. Oka et al. // *J Pharmacol Sci.* - 2003. - 92(1). - P.56-69.
- 521.Sakurada, S. Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction / S. Sakurada, N. Takuwa, N. Sugimoto, Y. Wang et al. // *Circ Res.* - 2003. - 93(6). - P.548-56. Epub 2003 Aug 14.
- 522.Saleh, S.N. Activation of chloride currents in murine portal vein smooth muscle cells by membrane depolarisation involves intracellular calcium release / S.N. Saleh, I.A. Greenwood // *Am J Physiol Cell Physiol.* - 2004. - [Epub ahead of print]
- 523.Saleh, S.N. Activation of chloride currents in murine portal vein smooth muscle cells by membrane depolarization involves intracellular calcium release / S.N. Saleh, IA. Greenwood // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005 Jan;288(1):C122-31. Epub 2004 Sep 8.
- 524.Salvail, D. Functional reconstitution of an eicosanoid-modulated Cl⁻ channel from bovine tracheal smooth muscle [In Process Citation] / D. Salvail, M. Cloutier, E. Rousseau // *Am J Physiol Cell Physiol (United States)*. - 2002,. - 282(3). - P.C567-77.
- 525.Sandau, K.B. Nitric oxide-induced F-actin disassembly is mediated via cGMP, cAMP, and protein kinase A activation in rat mesangial cells / K.B. Sandau, F. Gantner, B. Brune // *Exp Cell Res.* - 2001. - 10. - 271(2). - P.329-36.
- 526.Santell, L. Enhanced phosphorylation and dephosphorylation of a histone-like protein in response to hyperosmotic and hypoosmotic conditions / L. Santell, R.L. Rubin, E.G. Levin // *J Biol Chem.* - 1993. - 268(28). - P.21443-7.
- 527.Saotome, M. Pituitary adenylate cyclase activating peptide induces cGMP-mediated relaxation in guinea-pig airways / M. Saotome, Y. Uchida, A. Nomura, T Endo // *Pulm.Pharmacol.Ther.* - 1998. - V.11,N4. - P.281-285.

- 528.Sato, K. Myosin phosphorylation-independent contraction induced by phorbol ester in vascular smooth muscle / K. Sato, M. Hori, H. Takano-Ohmuro, T. Tsuchiya et al. // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1992. – 261. – P.497-505.
- 529.Sauzeau, V. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle / V. Sauzeau, H. Le Jeune, C. Cario-Toumaniantz, A. Smolenski et al. // *J Biol Chem.* – 2000. - 275(28). – P.21722-9.
- 530.Savineau J-P. Cytosolic calcium oscillations in smooth muscle cells / J-P. Savineau, R. Marthan // *News Physiol. Sci.*- 2000.-15,N2.-P.50-55.
- 531.Schaefer, M. Monitoring of water content and water distribution in ischemic hearts / M. Schaefer, W. Gross, M. Preuss, J Ackemann et al. // *Bioelectrochemistry.* – 2003. - 61(1-2). – P.85-92.
- 532.Schomberg, S.L. Cross Talk Between the GABA_A Receptor and the Na-K-Cl Cotransporter Is Mediated by Intracellular Cl⁻ / S.L. Schomberg, J. Bauer, D.B. Kintner, G. Su et al. // *J Neurophysiol.* – 2003. – 89. – P.159-167.
- 533.Schramm, C.M. Mechanism of proteinkinase C potentiation of airway b-adrenergic relaxation / C.M. Schramm, M.M. Grunstein // *Life Sci.* – 1995. –57. – P.1163–1173.
- 534.Schultz, B.D. Pharmacology of CFTR chloride channel activity / B.D. Schultz, A.K. Singh, D.C. Devor, R.J. Bridges // *Physiol. Rev.* – 1999. – 79. – Suppl. – P.S109—S144.
- 535.Schweda, F. Differential roles of the sodium-calcium exchanger in renin secretion and renal vascular resistance / F. Schweda, B.K. Kramer, A. Kurtz // *Pflugers Arch.* – 2001. - 442(5). – P.693-9.
- 536.Seale, A.P. Cell volume increase and extracellular Ca²⁺ are needed for hyposmotically induced prolactin release in tilapia / A.P. Seale, N.H. Richman 3rd, T. Hirano, I. Cooke et al. // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2003. - 284(5). – P.C1280-9. Epub 2003 Jan 22.
- 537.Shanahan, C.M. Aquaporin-1 is expressed by vascular smooth muscle cells and mediates rapid water transport across vascular cell membranes / C.M. Shanahan, D.L. Connolly, K.L. Tyson, N.R. Cary et al. // *J Vasc Res.* – 1999. - 36(5). – P.353-6.

538. Shaw, C.A. / Shaw, C.A. et al. // *Mol. Neuropharmacol.* – 1992. – 2. – P.297-302.
539. Shaw, C.A. Reversible kinase and phosphatase regulation of brain amino acid receptors in postnatal development / C.A. Shaw, R.A. Lanius // *Brain Res Dev Brain Res.* – 1992. - 70(2). – P.153-61.
540. Shaw, L. Inhibitors of actin filament polymerisation attenuate force but not global intracellular calcium in isolated pressurised resistance arteries / L. Shaw, S. Ahmed, C. Austin, M.J. Taggart // *J Vasc Res.* – 2003. - 40(1). – P.1-10.
541. Shen, M.R. Insulin-like growth factor 1 stimulates KCl cotransport, which is necessary for invasion and proliferation of cervical cancer and ovarian cancer cells / M.R. Shen, A.C. Lin, Y.M. Hsu, T.J. Chang et al. // *J Biol Chem.* – 2004. - 279(38). – P.40017-25. Epub 2004 Jul 19.
542. Sheppard, D.N. Effect of ATP-sensitive K⁺ channel regulators on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride currents / D.N. Sheppard, M.J. Welsh // *J Gen Physiol.* – 1992. – 100. – P.573-591.
543. Shida, S. Effects of Cl⁻ channel blockers on beta-adrenoceptor-mediated decreases in resting potential and intracellular Cl⁻ activity in guinea-pig heart / S. Shida, H. Nakaya, M. Kanno // *Eur. J. Pharmacol.* – 1992. – 212. – P.267–270.
544. Shimokawa, H. Anti-anginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study / H. Shimokawa, K. Hiramori, H. Iinuma, S. Hosoda et al. // *J Cardiovasc Pharmacol.* - 2002. - 40(5). – P.751-61.
545. Shirao, S. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C / S. Shirao, S. Kashiwagi, M. Sato, S. Miwa et al. // *Circ Res.* – 2002. - 26. - 91(2). – P.112-9.
546. Shirasawa, Y. Modulation of protein kinase C (PKC)-mediated contraction and the possible role of PKC epsilon in rat mesenteric arteries / Y. Shirasawa, T.J. Rutland, J.L. Young, D.A. Dean et al. // *Front Biosci.* – 2003. - 1;8. – P.a133-8.
547. Shnyrov, V.L. Thermal inactivation of membrane proteins, volume-dependent Na⁺, K⁽⁺⁾-cotransport, and protein kinase C activator-induced changes of the shape of human and rat erythrocytes / V.L. Shnyrov, S.N. Orlov, G.G. Zhadan, NI. Pokudin // *Biomed Biochim Acta.* – 1990. - 49(6). – P.445-53.

548. Shrode, L.D. Shrinkage-induced activation of Na⁺/H⁺ exchange in primary rat astrocytes: role of myosin light-chain kinase / L.D. Shrode, J.D. Klein, W.C. O'Neill, R.W. Putnam et al. // *Am.J.Physiol.* – 1995. – 269. – P.C257-C266.
549. Shrode, L.D. Shrinkage-induced activation of Na⁺/H⁺ exchange: role of cell density and myosin light chain phosphorylation / L.D. Shrode, J.D. Klein, P.B. Douglas, W.C. O'Neill et al. // *Am J Physiol.* – 1997. - 272(6 Pt 1). – P.C1968-79.
550. Shuba, L M. Phorbol ester activation of chloride current in guinea-pig ventricular myocytes / L.M. Shuba, T. Asai, T.F. McDonald // *Br. J. Pharmacol.* – 1996. – 117. – P.1395–1404.
551. Shum W.W. Involvement of Rho-kinase in contraction of guinea-pig aorta induced by prostanoid EP3 receptor agonists / W.W. Shum, G.Y. Le, R.L. Jones, A.M. Gurney et al. // *Br J Pharmacol.* – 2003. - 139(8). – P.1449-61.
552. Sipido, K.R. [Ca²⁺]_i transients and [Ca²⁺]_i-dependent chloride current in single Purkinje cells from rabbit heart / K.R. Sipido, G. Callewaert, E. Carmeliet // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1993. – 468. – P.641–667.
553. Skou, J.C. Nobel lecture. The identification of the sodium-potassium pump / J.C. Skou // *Biosci.Rep.* - 1998. – 18. – P.155–169.
554. Smirnov, SV, Aaronson PI. Ca²⁺ currents in single myocytes from human mesenteric arteries: evidence for a physiological role of L-type channels / S.V. Smirnov, PI. Aaronson // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1992. – 457. – P.455–475.
555. Smith J.B. Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransport in cultured vascular smooth muscle cells: stimulation by angiotensin II and calcium ionophores, inhibition by cyclic AMP and calmodulin antagonists / J.B. Smith, L. Smith // *J.Membrane Biol.* – 1987. – 99. – P.51-63.
556. Solaro, R.J. Myosin light chain phosphatase a cinderella of cellular signaling / R.J. Solaro // *Circ. Res.* - 2000. – 87. – P.173-175.
557. Somlyo, A.P. Signal transduction and regulation in smooth muscle / A.P. Somlyo, A.V. Somlyo // *Nature*, - 1994. – 372. – P.231-236.
558. Somlyo, A.P. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II / A.P. Somlyo, A.V. Somlyo // *J. Physiol.* - 2000. – 522. – P.177-185.

- 559.Sonoda, M. Acid-permeable anion channels in early mouse embryos and their possible effects on cleavage / M. Sonoda, F. Okamoto, H. Kajiya, Y. Inoue et al. // *Biol Reprod.* – 2003. – 68. – P.947-53.
- 560.Sorota, S. Delayed activation of cardiac swelling-induced chloride current after step changes in cell size / S. Sorota, X.Y. Du // *J. Cardio-vasc. Electrophysiol.* – 1998. – 9. – P.825–831.
- 561.Sorota, S. Pharmacologic properties of the swelling-induced chloride current of dog atrial myocytes / S.J. Sorota // *Cardiovasc. Electro-physiol.* – 1994. – 5. – P.1006–1016.
- 562.Sorota, S. Swelling-induced chloride-sensitive current in canine atrial cells revealed by whole-cell patch-clamp method / S. Sorota // *Circ. Res.* – 1992. –70. – P.679–687.
- 563.Standley, P.R. Cyclic stretch regulates autocrine IGF-I in vascular smooth muscle cells: implications in vascular hyperplasia / P.R. Standley, T.J. Obards, C.L. Martina // *Am J Physiol.* – 1999. - 276(4 Pt 1). – P.E697-705.
- 564.Steenbergen, J.M. The quantal nature of calcium release to caffeine in single smooth muscle cells results from activation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase / J.M. Steenbergen, F.S. Fay // *J. Biol. Chem.* – 1996. –271. – P.1821–1824.
- 565.Steendahl, J. Effects of chloride channel blockers on rat renal vascular responses to angiotensin II and norepinephrine / J. Steendahl, N.H. Holstein-Rathlou, C.M. Sorensen, M. Salomonsson // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2004. - 286(2). – P.F323-30. Epub 2003 Sep 23.
- 566.Strange, K. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels / K. Strange, F. Emma, P. S. Jackson // *Am. J. Physiol.* 270 (Cell Physiol. 39): C711—C730, 1996.
- 567.Strange, K. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels / K. Strange, F. Emma, P.S. Jackson // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1996. – 270. – P.C711–C730.
- 568.Stull, JT. Myosin light chain kinase / JT. Stull, J.K. Krueger, K.E. Kamm, Z-H. Gao et al. // *In Biochemistry of Smooth Muscle Contraction* (M. Bárány, Ed.). - (1996). – P.119-130. Academic Press.

- 569.Sugiyama, Y. Osmotic stress up-regulates aquaporin-3 gene expression in cultured human keratinocytes / Y. Sugiyama, Y. Ota, M. Hara, S. Inoue // *Biochim Biophys Acta.* – 2001. - 1522(2). – P.82-8.
- 570.Sun, X.P. Characterization of large-conductance chloride channels in rabbit colonic smooth muscle / X.P. Sun, S. Supplisson, R. Torres, G. Sachs, E. Meyer // *J. Physiol. (Lond.)* 448: 355–382, 1992.
- 571.Sun, X.P. Chloride channels in myocytes from rabbit colon are regulated by a pertussis toxin-sensitive G protein / X.P. Sun, S. Supplisson, E. Mayer // *Am. J. Physiol.* 264 (Gastrointest. Liver Physiol. 27): G774–G785, 1993.
- 572.Surks, H.K. Myosin phosphatase-Rho interacting protein. A new member of the myosin phosphatase complex that directly binds RhoA / H.K. Surks, C.T. Richards, M.E. Mendelsohn et al. // *J Biol Chem.* – 2003. - 278(51). – P.51484-93. Epub 2003 Sep 23.
- 573.Sward, K. Inhibition of rho-associated kinase blocks agonist induced Ca²⁺sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea pig ileum / K. Sward, K. Dreja, M. Susnjar, P. Hellstrand et al. // *J. Physiol.* - 2000. – 522. – P.33-49.
- 574.Sward, K. The role of RhoA and Rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction / K. Sward, M. Mita, D.P. Wilson, J.T. Deng et al. // *Curr Hypertens Rep.* – 2003. - 5(1). – P.66-72.
- 575.Sweeney, H.L. Regulation of asymmetric smooth muscle myosin II molecules / H.L. Sweeney, L-Q. Chen, K.M. Trybus et al. // *J.B iol. Chem.* - 2000. – 275. – P.41273-41277.
- 576.Szado, T. Agonist-induced mitochondrial Ca²⁺ transients in smooth muscle / T. Szado, K.H. Kuo, K. Bernard-Helary, D. Poburko et al. // *FASEB J.* – 2003. - 17(1). – P.28-37.
- 577.Tabcharani, J.A. Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene / J.A. Tabcharani, X.B. Chang, J.R. Riordan, J.W. Hanrahan // *Nature.* - 1991. – 352. – P.628–631.
- 578.Tajimi, M. Effect of a novel inhibitor of cyclic AMP phosphodiesterase, E-1020, on cytosolic Ca²⁺ level and contraction in vascular smooth muscle / M. Tajimi, H. Ozaki, K. Sato, H. Karaki // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* - 1991. – 344. – P.602–610.

579. Takano, M. Distribution of the isoprenaline-induced chloride current in rabbit heart / M. Takano, A. Noma // *Pflügers Arch.* - 1992. – 420. – P.223–226.
580. Takeda, M. Volume and agonist-induced regulation of myosin light-chain phosphorylation in glomerular mesangial cells / M. Takeda, T. Homma, M.D. Breyer, N. Horiba et al. // *Am.J.Physiol.* – 1993. – 264. – P.F421-F426.
581. Takeshima, H. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor / H. Takeshima, T. Yamazawa, T. Ikemoto, H. Takekura et al. // *EMBO J.* - 1995. – 14. – P.2999–3006.
582. Tanaka, H. Use of chloride blockers: a novel approach for cardioprotection against ischemia-reperfusion damage / H. Tanaka, S. Matsui, T. Kawanishi, K. Shigenobu // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1996. – 278. – P.854–861.
583. Tang, D.D. Downregulation of profilin with antisense oligodeoxynucleotides inhibits force development during stimulation of smooth muscle / D.D. Tang, J. Tan // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2003. - 285(4). – P.H1528-36. Epub 2003 Jun 12.
584. Tang, S. Molecular localization of regions in the L-type calcium channel critical for dihydropyridine action / S, Tang, A, Yatani, A, Bahinski, Y, Mori et al.// *Neuron.* - 1993. – 11. – P.1013–1021.
585. Tani, E. Continuous elevation of intracellular Ca²⁺ is essential for the development of cerebral vasospasm / E. Tani, T. Matsumoto // *Curr Vasc Pharmacol.* – 2004. - 2(1). – P.13-21.
586. Taniguchi, S. Gene expression and functional activity of sodium/calcium exchanger enhanced in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats / S. Taniguchi, K. Furukawa, S. Sasamura, Y. Ohizumi et al. // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2004. - 43(5). – P.629-37.
587. Taurin, S. c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium-mediated, calcium-independent mechanism / S. Taurin, N.O. Dulin, D. Pchejetski, R. Grygorczyk et al. // *J Physiol.* – 2002. – 543. – P.835-847.
588. Taurin, S. Na/K pump and intracellular monovalent cations: novel mechanism of excitation-transcription coupling involved in inhibition of apoptosis [Article in Russian] / S. Taurin, P. Hamet, SN. Orlov // *Mol Biol (Mosk).* - 2003 - 37(3). – P.371-81.

- 589.Thoreson, W.B. Reciprocal Interactions Between Calcium and Chloride in Rod Photoreceptors / Thoreson, WB, Bryson EJ, Rabl K. // *J Neurophysiol* – 2003. – 90. – P.1747-1753.
- 590.Thoroed, S.M. Cell swelling activates phospholipase A2 in Ehrlich ascites tumor cells / S.M. Thoroed, L. Lauritzen, I.H. Lambert, H.S. Hansen et al. // *J Membr Biol.* – 1997. - 160(1). – P.47-58.
- 591.Throckmorton, D.C. Protein kinase C activation during Ca²⁺-independent vascular smooth muscle contraction / Throckmorton, DC, Packer CS, Brophy CM. // *J Surg Res.* – 1998. - 78(1). – P.48-53.
- 592.Tilly, B.C. Activation of the osmo-sensitive chloride conductance involves P21rho and is accompanied by a transient reorganization of the F-actin cytoskeleton / B.C. Tilly, M.J. Edixhoven, L.G. Tertoolen, N. Morii, Y. Saitoh, S. Narumiya, H.R. De Jonge. *Mol. Biol. Cell* 7: 1419–1427, 1996.
- 593.Tilly, B.C. Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances / B.C. Tilly, D.B. Van, L. G. Tertoolen, M.J. Edixhoven, H.R. De Jonge J et al. // *Biol. Chem.* - 1993. – 268. – P.19919–19922.
- 594.Tominaga, M. Glibenclamide, an ATP-sensitive K⁺ channel blocker, inhibits cardiac cAMP-activated Cl⁻ conductance / M. Tominaga, M. Horie, S. Sasayama, Y. Okada // *Circ. Res.* - 1995. – 77. – P.417–423.
- 595.Treharne, K.J. A novel chloride-dependent GTP-utilizing protein kinase in plasma membranes from human respiratory epithelium / K.J. Treharne, L.J. Marshall, A. Mehta // *Am J Physiol.* – 1994. - 267(5 Pt 1). – P.L592-601.
- 596.Trouet, D. Caveolin-1 modulates the activity of the volumeregulated chloride channel / D. Trouet, B. Nilius, A. Jacobs, C. Rémacle et al. // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1999. – 520. – P.113–119.
- 597.Trouet, D. Inhibition of volume-regulated anion channels by dominant-negative caveolin-1 / D. Trouet, D. Hermans, G. Droogmans, B. Nilius et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – 284. – P.461–465.
- 598.Trybus, K. Biochemical studies of myosin / K. Trybus // *METHODS.* - 2000. – 22. – P.327-335.
- 599.Tseng, G.N. Cell swelling increases membrane conductance of canine cardiac cells: evidence for a volume-sensitive Cl channel / G.N. Tseng // *Am. J. Physiol.* - 1992. - 262 (Cell Physiol. 31). – P.C1056—C1068.

600. Tseng, H. The Na/K/2Cl cotransporter is increased in hypertrophied vascular smooth muscle cells / H. Tseng, B.C. Berk // *J. Biol. Chem.* – 1992. – 267. – P.8161-8167.
601. Urban, N.H. K⁺ depolarization induces RhoA kinase translocation to caveolae and Ca²⁺ sensitization of arterial muscle / N.H. Urban, K.M. Berg, P.H. Ratz // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2003. – 285(6). – P.C1377-85. Epub 2003 Jul 30.
602. Valverde, M.A. Differential effects of tamoxifen and I 2 on three distinguishable chloride currents activated in T84 intestinal cells / M.A. Valverde, G.M. Mintenig, F.V. Sepulveda // *Pflügers Arch.* - 1993. – 425. – P.552–554.
603. Van Breemen, C. Ca-regulation of vascular smooth muscle / C. Van Breemen, C. Cauvin, A. Jons et al // *Federation. Proc.* - 1986. - V.45. - P.2746-2751.
604. Van Cruchten, S. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis / S. Van Cruchten, W. Van Den Broeck // *Anat Histol Embryol.* – 2002. - 31(4). – P.214-23.
605. Van R.C. Endothelin and vasopressin activate low conductance chloride channels in aortic smooth muscle cells / R.C. Van, M. Lazdunski // *Pflügers Arch.* - 1993. – 425. - 156–163.
606. Vandenberg, J.I. Swelling-activated and isoprenaline-activated chloride currents in guinea pig cardiac myocytes have distinct electrophysiology and pharmacology // J.I. Vandenberg, A. Yoshida, K. Kirk, T. Powell // *J. Gen. Physiol.* - 1994. – 104. – P.997–1017.
607. Vivaudou, M.B. Multiple types of Ca²⁺ channels in visceral smooth muscle cells / M.B. Vivaudou, J.J. Singer, J.V. Walsh // *Pflügers Arch.* - 1991. – 418. – P.144–152.
608. Voets, T. Regulation of a swelling-activated chloride current in bovine endothelium by protein tyrosine phosphorylation and G proteins / T. Voets, V. Manolopoulos, J. Eggermont, C. Ellory et al. // *J Physiol.* – 1998. - 506 (Pt 2). – P.341-52.
609. Von Weikersthal S.F. Functional and molecular characterization of a volume-sensitive chloride current in rat brain endothelial cells / S.F. Von Weikersthal, M.A. Barrand, S.B. Hladky // *J Physiol (Lond).* – 1999. – 516. – P.75-84.

610. Wagner, C.A. Effect of urea and osmotic cell shrinkage on Ca²⁺ entry and contraction of vascular smooth muscle cells / C.A. Wagner, S.M. Huber, S. Warntges, G. Zempel et al. // *Pflugers Arch.* – 2000. – 440. – P.295-301.
611. Wakabayashi, S. Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers / S. Wakabayashi, M. Shigekawa, J. Pouyssegur, // *Physiol. Rev.* – 1997. – 77. – P.51–74.
612. Waldegger, S. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume / S. Waldegger, P. Barth, G. Raber, F. Lang // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1997. – 94. – P.4440-4445.
613. Waldegger, S. Effect of cellular hydration on protein metabolism / S. Waldegger, G.L. Busch, N.K. Kaba, G. Zempel // *Miner Electrolyte Metab.* – 1997. – 23(3-6). – P.201-5.
614. Walsh, K.B. Activation of a heart chloride current during stimulation of protein kinase C / K.B. Walsh // *Mol. Pharmacol.* - 1991. – 40. - 342–346.
615. Walsh, K.B. Properties of a protein kinase C-activated chloride current in guinea pig ventricular myocytes / K.B. Walsh, K.J. Long // *Circ. Res.* - 1994. – 74. – P.121–129.
616. Walsh, P.K.B. Effect of chloride channel blockers on the cardiac CFTR chloride and L- type calcium currents / K.B. Walsh, C. Wang // *Cardiovasc. Res.* - 1996. – 32. – P.391–399.
617. Wamhoff, B.R. L-type voltage-gated Ca²⁺ channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism / B.R. Wamhoff, D.K. Bowles, O.G. McDonald, S. Sinha et al. // *Circ Res.* – 2004. - 95(4). – P.406-14. Epub 2004 Jul 15.
618. Wang X. Mechanism of SNAP potentiating antiproliferative effect of calcitonin gene-related peptide in cultured vascular smooth muscle cells / X. Wang, W. Wang, Y. Li, et al. // *J.Mol.Celn Cardiol.*-1999./V.31,N9.-P.1599-1606.
619. Wang, F. Actions of genistein on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating. Evidence for two binding sites with opposite effects / F. Wang, S. Zeltwanger, I.C. Yang, A.C. Nairn et al. // *J Gen Physiol.* – 1998. – 111. – P.477-490.

620. Wang, G.L. Deficiency in ClC-3 chloride channels prevents rat aortic smooth muscle cell proliferation / G.L. Wang, X.R. Wang, M.J. Lin, H. He et al. // *Circ Res.* – 2002. - 91(10). – P.E28-32.
621. Wang, G.X. Functional effects of novel anti-ClC-3 antibodies on native volume-sensitive osmolyte and anion channels in cardiac and smooth muscle cells / G.X. Wang, W.J. Hatton, G.L. Wang, J. Zhong et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2003. - 285(4). – P.H1453-63. Epub 2003 Jun 19.
622. Wang, G.X. Functional effects of novel anti-ClC-3 antibodies on native volume-sensitive osmolyte and anion channels in cardiac and smooth muscle cells / Wang, GX, Hatton WJ, Wang GL, Zhong J et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Oct;285(4):H1453-63. Epub 2003 Jun 19.
623. Wang, G.X. Hypotonic activation of volume-sensitive outwardly rectifying chloride channels in cultured PSMCs is modulated by SGK / G.X. Wang, C. McCrudden, Y.P. Dai, B. Horowitz et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2004. - 287(2). – P.H533-44. Epub 2004 Apr 15.
624. Wang, G.X. Hypotonic activation of volume-sensitive outwardly rectifying chloride channels in cultured PSMCs is modulated by SGK / GX. Wang, C McCrudden, YP Dai, B Horowitz // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Aug;287(2):H533-44. Epub 2004 Apr 15.
625. Wang, Q. Action of histamine on single smooth muscle cells dispersed from the rabbit pulmonary artery / Q. Wang, W.A. Large // *J. Physiol. (Lond.)* - 1993. – 468. - 125–139.
626. Wang, Q. Properties of spontaneous inward currents recorded in smooth muscle cells isolated from the rabbit portal vein / Q. Wang, R.C. Hogg, W.A. Large // *J. Physiol. (Lond.)*. - 1992. – 451. – P.525–537.
627. Wang, S, Chen J, Au KT, Ross MG. Expression of aquaporin 8 and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in human WISH cells. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Apr; 188(4): 997-1001.
628. Wang, Z. Regulatory volume decrease of cardiac myocytes induced by beta-adrenergic activation of the Cl⁻ channel in guinea pig / Z. Wang, T. Mitsuiye, S.A. Rees, A. Noma // *J. Gen. Physiol.* 110: 73–82, 1997.

629. Wede, O.K. Mechanical function of intermediate filaments in arteries of different size examined using desmin deficient mice / O.K. Wede, M. Lofgren, Z. Li, D. Paulin et al. // *J Physiol.* – 2002. - 540(Pt 3). – P.941-9.
630. Wehner, F. Cell volume-regulated cation channels / F. Wehner // *Contrib. Nephrol.* – 1998. – 123. – P.8–20.
631. Wehner, F. The hypertonicity-induced Na⁺ conductance of rat hepatocytes: physiological significance and molecular correlate / F. Wehner, C. Bohmer, H. Heinzinger, F. van den Boom et al. // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2000. – 10.- P.335–340.
632. Weisbrod R. Evidence that additional mechanisms to cyclic GMP mediate the decrease in intracellular calcium and relaxation of rabbit aortic smooth muscle to nitric oxide / R. Weisbrod, M. Griswold, M. Yaghoubi, T. Lincoln // *Br.J.Pharmacol.*-1998.-V.125(8).-P.1695-1707.
633. Wellman, G.C. Membrane depolarization, elevated Ca²⁺ entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats / G.C. Wellman, L. Cartin, D.M. Eckman, A.S. Stevenson et al. // *Am. J. Physiol.* - 2001. – 281. – P.H2559 – H2567.
634. Welsh, D.G. Swelling-activated cation channels mediate depolarization of rat cerebrovascular smooth muscle by hyposmolarity and intravascular pressure / D.G. Welsh, M.T. Nelson, D.M. Eckman, J.E. Brayden // *J Physiol (England).* – 2000. - 527 Pt 1. – P.139-48.
635. Wermelskirchen, D. Veratridine activates a silent sodium channel in rat isolated aorta / D. Wermelskirchen, B. Wilffert, U. Nebel, A. Leidig et al. // *Eur. J. Pharmacol.* – 1992. – 219. – P.253-259.
636. Whisenant, N. Regulatory interaction of ATP, Na⁺ and Cl⁻ in the turnover cycle of the Na-K-2Cl cotransporter / N. Whisenant, M. Khademazad, S. Muallem // *J. Gen. Physiol.* - 1993. – 101. – P.889–908.
637. White, M.M. Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes / M.M. White, M. Aylwin // *Mol Pharmacol.* – 1990. – 37. – P.720-724.
638. Wier, W.G. Alpha1-adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries / W.G. Wier, K.G. Morgan // *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* – 2003. – 150. - 91-139. Epub 2003 Jul 17.

639. Wijetunge, S. pp60c-src increases voltage-operated calcium channel currents in vascular smooth muscle cells / S. Wijetunge, A.D. Hughes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1995. – 217. - 1039–1044.
640. Winpenny, J.P. Calcium-activated chloride conductance in a pancreatic adenocarcinoma cell line of ductal origin (HPAF) and in freshly isolated human pancreatic duct cells / J.P. Winpenny, A. Harris, M.A. Hollingsworth, B.E. Argent // *Pflügers Arch.* – 1998. – 435. – P.796-803.
641. Wondergem, R. Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation / R. Wondergem, W. Gong, S.H. Monen, S.N. Dooley et al. // *J Physiol.* – 2001. - 532(Pt 3). – P.661-72.
642. Worth, N.F. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins / N.F. Worth, B.E. Rolfe, J. Song, G.R. Campbell // *Cell Motil Cytoskeleton.* – 2001. - 49(3). – P.130-45.
643. Xiao, G.N. Effects of Cl⁻ channel blockers on endothelin-1-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells. / G.N. Xiao, Y.Y. Guan, H. He // *Life Sci.* – 2002. - 70(19). – P.2233-41.
644. Xie, Z. Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase as a signal transducer / Z.Xie, A. Askari // *Eur J Biochem.* – 2002. - 269(10). – P.2434-9.
645. Xiong Z. Regulation L-type calcium channels by cyclic nucleotides and phosphorylation in smooth muscle cells from rabbits portal vein / Z. Xiong, N. Sperelakis, R. Fenoglio-Reiser // *J. Vasc. Res.*-1994,-V.31,N5,-P.271-279.
646. Xiong, Z. Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells / Z. Xiong, N. Sperelakis // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 1995. – 27. – P.75–91.
647. Yagi, S. Relationship between force and Ca²⁺ concentration in smooth muscle as revealed by measurements on single cells / S. Yagi, P.L. Becker, F.S. Fay // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1988. – 85. – P.4109–4113.
648. Yamada, M. P₂ -purinoceptor activation stimulates phosphoinositide hydrolysis and inhibits accumulation of cAMP in cultured ventricular myocytes / M. Yamada, Y. Hamamori, H. Akita, and M. Yokoyama // *Circ. Res.* - 1992. – 70. – P.477–485.

649. Yamakage, M. The repolarizing effects of volatile anesthetics on porcine tracheal and bronchial smooth muscle cells / M. Yamakage, X. Chen, A. Kimura, S. Iwasaki et al. // *Anesth Analg* (United States). – 2002. - 94(1). – P.84-8.
650. Yamamoto-Mizuma, S. Altered properties of volume-sensitive osmolyte and anion channels (VSOACs) and membrane protein expression in cardiac and smooth muscle myocytes from *Clcn3*^{-/-} mice / S. Yamamoto-Mizuma, GX Wang, LL Liu, K Schegg et al. // *J Physiol*. 2004 Jun 1;557(Pt 2):439-56. Epub 2004 Mar 12.
651. Yamanaka, J. An important role for the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in the decrease in cytosolic Ca²⁺ concentration induced by isoprenaline in the porcine coronary artery / J. Yamanaka, J. Nishimura, K. Hirano, H. Kanaide // *J Physiol*. – 2003. - 549(Pt 2). - 553-62. Epub 2003 May 09.
652. Yamawake, N. Arrhythmogenic effects of isoproterenol-activated Cl⁻ current in guinea-pig ventricular myocytes / N. Yamawake, Y. Hirano, T. Sawanobori, and M. Hiraoka // *J. Mol. Cell. Cardiol*. - 1992. – 24. - P.1047–1058.
653. Yamazaki J, Kitamura K. Cell-to-cell communication via nitric oxide modulation of oscillatory Cl⁻ currents in rat intact cerebral arterioles. *J Physiol*. 2001 Oct 1;536(Pt 1):67-78.
654. Yamazaki, J. Cell-to-cell communication via nitric oxide modulation of oscillatory Cl⁻ currents in rat intact cerebral arterioles / Yamazaki J; Kitamura K. // *J Physiol* (England). – 2001. - 536(Pt 1). – P.67-78.
655. Yamazaki, J. Inhibitory effects of glibenclamide on cystic fibrosis transmembrane regulator, swelling-activated, and Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res* 81: 101-109, 1997
656. Yamazaki, J. Inhibitory effects of glibenclamide on cystic fibrosis transmembrane regulator, swelling-activated, and Ca²⁺ -activated Cl⁻ channels in mammalian cardiac myocytes / J. Yamazaki, J.R. Hume // *Circ. Res.* 81: 101–109, 1997.
657. Yamazaki, J. Regulation of recombinant cardiac CFTR chloride channels by protein kinase C / J. Yamazaki, F. Britton, M.L. Collier, B. Horowitz, J.R. Hume. *Biophys.* - 1999. - J. 76. – P.1972–1987.
658. Yamboliev, I.A. Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway / Yamboliev IA, J.C. Hedges, J.L. Mutnick, L.P.

- Adam et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2000. - 278(6). – P.H1899-907.
659. Yang, H. Cell signaling pathways mediating epidermal growth factor stimulation of Na:K:2Cl cotransport activity in rabbit corneal epithelial cells / H. Yang, Z. Wang, Y. Miyamoto, P.S. Reinach // *J Membr Biol.* – 2001. - 183(2). – P.93-101.
660. Yano, S. Ionic mechanism for contractile response to hyposmotic challenge in canine basilar arteries / S. Yano, T. Ishikawa, H. Tsuda, K. Obara et al. // *Am J Physiol Cell Physiol.* - 2004 Nov 3 [Epub ahead of print]
661. Yoshino, M. Whole-cell inhibition of inositol trisphosphate-induced Ca²⁺ release in single and unitary Ca channel currents in mammalian intestinal smooth: evidence for the existence of two types of Ca channels / M. Yoshino, T. Someya, A. Nishio, H. Yabu // *Pflugers Arch.* - 1988. – 411. – P.229–231.
662. Yu X-M. Gain control of NMDA-receptor currents by intracellular sodium / X-M. Yu, M.B. Salter // *Nature.* – 1998. – 396. – P.469-474.
663. Yuan, X. J. Ionic currents in rat pulmonary and mesenteric arterial myocytes in primary culture and subculture / X.J. Yuan, W.F. Goldman, M.L. Tod, L.J. Rubin et al. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 1993. – 264. – P.L107-L115.
664. Zhang, D. Microtubule disruption modulates the Rho-kinase pathway in vascular smooth muscle / D. Zhang, Z. Wang, N. Jin, L. Li, R.A. Rhoades et al. // *J Muscle Res Cell Motil.* – 2001. - 22(2). – P.193-200.
665. Zhang, J. A chloride current associated with swelling of cultured chick heart cells / J. Zhang, R.L. Rasmusson, S.K. Hall, M. Lieberman // *J. Physiol. (Lond.)* - 1993. – 472. – P.801–820.
666. Zhang, J. Chloride conductance is activated by membrane distention of cultured chick heart cells / J. Zhang, M. Lieberman // *Cardiovasc. Res.* - 1996. – 32. – P.168–179.
667. Zhang, J. Platelet-derived growth factor regulates K-Cl cotransport in vascular smooth muscle cells / J. Zhang, P.K. Lauf, N.C. Adragna // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2003. - 284(3). – P.C674-80.
668. Zhang, Y. Opposing roles of K(+) and Cl(-) channels in maintenance of opossum lower esophageal sphincter tone / Y. Zhang, D.V. Miller; W.G. Paterson //

- Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol (United States). – 2000. - 279(6). – P.G1226-34.
- 669.Zhao, G. Trapped water of human erythrocytes and its application in cryopreservation / G. Zhao, L. He, H. Zhang, W. Ding et al.// Biophys Chem. – 2004. - 107(2). – P.189-95.
- 670.Zhong, J. Regulation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in pulmonary arterial smooth muscle cells by PKC / J. Zhong, G.X. Wang, W.J. Hatton, I.A. Yamboliev et al. // Am J Physiol Cell Physiol. – 2002. - 283(6). – P.C1627-36. Epub 2002 Aug 07.
- 671.Zhou, J.G. Regulation of intracellular Cl⁻ concentration through volume-regulated ClC-3 chloride channels in A10 vascular smooth muscle cells / JG Zhou, JL Ren, QY Qiu, H. He et al. // J Biol Chem. 2005 Feb 25;280(8):7301-8. Epub 2004 Dec 13.
- 672.Zhu, X. Calcium channels formed by mammalian trp homologues / X. Zhu, L. Birnbaumer. // *News Physiol. Sci.* - 1998. – 13. – P.211-217.
- 673.Zitt, C. Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion / C. Zitt, A. Zobel, A.G. Obukhov, C. Harteneck et al. // *Neuron.* – 1996. –16. - 1189-1196.
- 674.Zygmunt, A.C. Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes / A.C. Zygmunt, W.R. Gibbons // *Circ. Res.* - 1991. – 68. – P.424–437.
- 675.Zygmunt, A.C. Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes / A.C. Zygmunt // *Am. J. Physiol.* - 1994. - 267 (Heart Circ. Physiol. 36). – P.H1984–H1995.
- 676.Zygmunt, A.C. Properties of the calcium-activated chloride current in heart / A.C. Zygmunt, W.R. Gibbons // *J. Gen. Physiol.* - 1992. – 99. – P.391–414.