

АНФИНОГЕНОВА ЯНА ДЖОНОВНА

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

03.00.13 – физиология

03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

ТОМСК – 2005

Работа выполнена
в ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава

НАУЧНЫЕ КОНСУЛЬТАНТЫ:

доктор медицинских наук,
профессор
доктор биологических наук,
профессор

Баскаков Михаил Борисович

Орлов Сергей Николаевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук
доктор биологических наук, профессор

Байков Александр Николаевич

Афанасьев Сергей Александрович

Евдокимов Евгений Васильевич

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

ГУ НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН

Защита состоится " ____ " _____ 2005 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава (634050 г. Томск, Московский тракт, 2).

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

Автореферат разослан " ____ " _____ 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Суханова Г. А.

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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 последнее десятилетие появились данные о наличии в клетках Na^+ - и Cl^- -опосредованной сигнализации [Taurin S. et al., 2002; 2003; Liedtke C.M. et al., 2002; Muimo R. et al., 1998; Treharne K.J., 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 J.F., Harper A., 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 N. et al, 2000; Akar F. et al., 1999; 2001; Russell J.M., 2000]. Кроме влияния на ионтранспортирующие системы мембраны, клеточный объем вовлечен в регуляцию разнообразных функций клеток, включая пролиферацию, рост, программируемую гибель и некроз [Van Cruchten S., Van Den Broeck W., 2002; Lang F. et al., 2000; Barros J. et al., 2001; Okada Y. 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 влияни-

ем вазодилаторов, стимулирующих цАМФ- и цГМФ-опосредованные сигнальные системы [Akar F. et al, 1999; 2001; Orlov S.N. et al, 1992; Owen N.E., Ridge K.M., 1989; Smith J.B., Smith L., 1987; Tseng G.N., Berk B.C., 1992]. Противоположная регуляция вазоконстрикторами и вазодилаторами была обнаружена при исследовании Na^+ -независимого K^+, Cl^- котранспорта [Adragna N. et al, 2000; 2004], другого члена суперсемейства Cl^- -сопряженных котранспортеров, который обеспечивает направленный наружу перенос Cl^- [Adragna N. 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, ($\text{NKCC1}^{-/-}$ knockout mice) характеризуются пониженной величиной кровяного давления и снижением тонуса и величины сократительных ответов сегментов сосудистых ГМК при действии α_1 -адреноагониста фенилэфрина [Flagella M. et al., 1999; Meyer J.W. et al., 2002].

Важная роль клеточного объема в регуляции сократительной функции ГМК подтверждается тем, что аппликация биологически активных веществ, активирующих цАМФ-зависимую сигнальную систему, ведет к стрикции культуральных ГМК аорты [Orlov S.N. et al., 1996]. К сходному результату ведет дезинтеграция актинового цитоскелета, состояние которого, в свою очередь, модулируется активностью ряда протеинкиназ [Burgstaller G., Gimona M., 2004; Nunes J.P., 2002; Matrougui K. et al., 2001; Abedi H., Zachary I., 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 F.S. et al., 2000; Chipperfield J.F., Harper A., 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 J.R. 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 Na^+ , K^+ , 2Cl^- котранспорта в моделях изменения объема клеток.
2. Изучить роль Na^+ , K^+ , 2Cl^- 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 ингибировании Na^+ , K^+ , 2Cl^- 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 изменении 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 Na^+ , K^+ , 2Cl^- 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 устойчи-

вы 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 $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта, 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 $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ 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 ГМ 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 ГМ 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 конгресс «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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Объектами исследования служили изолированные де-эндотелизированные гладкомышечные сегменты аорты белых крыс и культуральные сосудистые гладкомышечные клетки, полученные из аорты крыс линии Wistar-Kyoto (WKY).

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 внутривентральной анестезии нембуталом (70 мг/кг) проводили декаптацию, выделяли аорту, помещали ее в физиологически сбалансированный солевой раствор, 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, а 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 гладкомышечных сегментов аорты крысы. Для исследования сократительной активности гладкомышечные сегменты фиксировали с помощью стальных крючков в камере объемом 1 мл, изготовленной из органического стекла. Камеру заполняли аэрируемым физиологическим раствором и термостатировали при 37°C в условиях проточной перфузии (1 мл/мин).

Гладкомышечные сегменты, закрепленные в перфузионной камере, растягивали нагрузкой 50-100 мН, после чего с помощью шелковой нити фиксировали на штоке электромеханического преобразователя (механотрон МХ2Б, Москва). Сегменты отмывали физиологическим раствором в течение 40-50 минут при pH=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 присутствии тестируемых соединений. В качестве непроникающего биологически неактивного осмолита использовали сахарозу (50-300 мМ). *Гиперосмотическую стрикцию* вызывали добавлением 150 мМ сахарозы. *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 или 70 мМ.

Амплитуда сократительных ответов гладкомышечных сегментов рассчитывалась в процентах от амплитуды гиперкалиевого (эквимолярное замещение 30 мМ NaCl на KCl) или контрольного сокращения иной природы в зависимости от целей эксперимента. Изменения механического напряжения регистрировали с помощью XY рекодера (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Получение культуры сосудистых гладкомышечных клеток линии WKY-7. Для культивирования сосудистых ГМК, полученных из аорты крыс линии Wistar-Kyoto (WKY), была использована стратегия low-density seeding с целью выделить линию клеток, обладающих наиболее высокой экспрессией специфичного для гладких мышц α -актина, белка SM22 и киназы легких цепей миозина (КЛЦМ). Линия клеток WKY-7 обладала наибольшей чувствительностью к ангиотензину II и эндотелину-1, измеренной по уровню митоген-активированного фосфорилирования протеинкиназы ERK1/2. 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 $Na^+, K^+, 2Cl$ котранспорта (НКСС). Активность НКСС измеряли как буметанид-чувствительный компонент входа ^{86}Rb . Клетки WKY-7, посаженные в 24-ячеистые 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 мМ убаина в присутствие или в отсутствие буметанида. После 5-минутной инкубации при 37°C, накопление изотопа останавливали добавлением 2 мл ледяной среды W, содержащей 100 мМ $MgCl_2$ и 10 мМ HEPES-TRIS буфер (pH 7.4). Радиоактивность инкубационной среды и лизата клеток были измерены с помощью жидкого сцинтилляционного 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 S.N. et al., 1996].

Измерение объема клеток линии WKY-7. Объем внутриклеточной воды измеряли как пространство, доступное для [^{14}C]-меченой мочевины [Orlov S.N. 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 клетках WKY-7. Содержание внутриклеточного Cl^- в WKY-7 измерялось через поддерживаемое распределение ^{36}Cl по методу [Orlov S.N. et al., 1996]. Для расчета $[Cl^-]_i$, объем внутриклеточной воды оценивался в параллельных экспериментах по протоколу, приведенному выше. Чтобы измерить содержание Cl^- в сосудистых ГМК, сегменты предварительно инкубировали в физиологическом растворе, содержащем 2 мкCi/мл ^{36}Cl . В ряде экспериментов, буметанид и сахараза добавлялись в последние 30 мин инкубации. Затем сегменты омывали 3×50 мл аликвотами ледяного физиологического раствора и солубилизировали в сцинтилляционной смеси, содержащей Triton X100:toluene 1:2, 4 г/л 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазол (PPO) и 0.1 г/л 1,4-бис[5-фенил-2-оксазолил]-бензен; 2-2'-з-фенилен-бис[5-фенилоксазол] (POPOP). Внутриклеточное содержание Cl^- (нМ/мг) рассчитывалось как $[Cl^-]_i=A/am$, где A – радиоактивность образцов (срм), a – специфическая радиоактивность Cl^- в среде (срм/нМ), m – влажный вес сегментов (мг), измеренный перед инкубацией.

Измерение активности потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов в клетках WKY-7. Активность потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов оценивалась как верапамил- или нифедипин-чувствительный компонент входа ^{45}Ca . Культуральные клетки WKY-7, помещенные в 24-ячеистые планшеты, преинкубировали в течение 30 мин в физиологическом растворе. Затем среду аспирировали и добавляли физиологиче-

ский раствор, содержащий 0.1 мМ CaCl₂ в присутствии или отсутствии нифедипина и верапамила. Накопление изотопа инициировали добавлением 0.25 мл физиологического раствора такого же состава, содержащего 3 мкCi/мл ⁴⁵Ca, и прекращали через 5 мин, как описано выше. Чтобы индуцировать деполяризацию мембраны, увеличивали содержание KCl до 60 мМ, эквимолярно заменяя NaCl. Исследование радиоактивности сред инкубации и лизата клеток проводилось с помощью сцинтилляционного анализатора.

Растворы и реактивы. Физиологический раствор содержал (мМ): 120.4 NaCl, 5.9 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 5.5 глюкоза, 15 C₄H₁₁O₃N [tris(oxymethyl)-aminometan] (pH 7.4; 316.4 мосМ). Бескальциевый раствор содержал 0.5 мМ ЭГТА и 3.6 мМ MgCl₂. С целью избежать влияния Cl⁻/HCO₃⁻ 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 ⁸⁶Rb в WKY-7 в бесхлорном физиологическом растворе, KCl, NaCl и MgCl₂ заменяли глюконатом натрия, глюконатом калия 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 ⁸⁶Rb в сосудистых ГМК [Orlov S.N. et al., 1992]. При исследовании влияния селективной нормализации ионного состава раствора (Na⁺, Cl⁻) на сократительные реакции сегментов использовали холинхлорид и глутамат натрия.

Используемые реактивы. Реактивы были получены из SIGMA (St. Louis, Mo., USA) за исключением ЭГТА, POPOP, PPO (Serva, Heidelberg, Germany), верапамила (Orion, Helsinki, Finland), нифлумовой кислоты (Gedeon Richter) 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.

Статистическая обработка. Результаты представлены как среднее арифметическое ± 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 клеток WKY-7 — активность НКСС; 2) активность НКСС — механическое напряжение сегментов; 3) объем клеток WKY-7 — механическое напряжение. Достоверными считали различия при значении p<0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 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 $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта и других объем-чувствительных ионтранспортирующих систем клетки без дополнительного воздействия какими-либо биологически активными соединениями. Первым этапом исследования объем-чувствительных механизмов в регуляции сократительной активности сосудистых ГМК было изучение сократительных ответов изолированных гладкомышечных сегментов аорты крысы при моделировании *гиперосмотической* и *изоосмотической стрикции* и *гипоосмотического набухания* клеток.

3.1.1. Сокращение гладкомышечных сегментов аорты в модели гиперосмотической стрикции клеток. С целью установить влияние *гиперосмотически*-индуцированного снижения клеточного объема на механическое напряжение (МН) сосудистых сегментов, был исследован эффект модифицированного физиологического раствора, содержащего 50–300 мМ сахарозы в качестве непроникающего осмолита. Повышение осмолярности раствора (25–600 мОсМ) приводило к развитию воспроизводимого дозозависимого сокращения (Рис. 1). В качестве основного исследуемого параметра во всех последующих экспериментах была выбрана амплитуда сокращения сегментов при добавлении 150 мМ сахарозы, вызывающей 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. Амплитуда сокращения на 20 минуте действия 150 мМ сахарозы составляла $51.8 \pm 9.0\%$ по сравнению с величиной контрольного гиперкалиевого сокращения.

3.1.2. Сократительные реакции гладкомышечных сегментов аорты в модели изоосмотической стрикции клеток. С целью изучить влияние альтернативного способа снижения объема сосудистых ГМК на их сократительную активность был исследован эффект так называемой *изоосмотической стрикции* клеток, которую вызывали восстановлением осмолярности среды после длительного *гипоосмотического* воздействия. Гладкомышечные сегменты экспонировали в *гипоосмотической* среде в течение 60 минут с целью вызвать потерю внутриклеточных осмолитов [Mongin A.A., Orlov S.N., 2001]. После этого сегменты возвращали в *нормоосмотический* раствор. В этой модели восстановление ионного состава раствора приводило к резкой транзиторной активации $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта (НКСС), что является одним из основных механизмов регуляторного увеличения объема сосудистых ГМК [Mongin A.A., Orlov S.N., 2001] и что было продемонстрировано с использованием культуральных клеток линии WKY-7 при запуске *изоосмотической стрикции* с помощью манипуляций, аналогичных использованным в данной серии экспериментов. Восстановление осмолярности раствора до 120.4 мМ NaCl после 60-минутной инкубации в *гипоосмотическом* растворе, содержащем 40.4 мМ NaCl, во всех случаях приводило к развитию транзиторного сокращения, длительность кото-

рого составляла 38.8 ± 1.6 мин, а амплитуда – $21.6 \pm 8.7\%$ по сравнению с величиной гиперкалиевой контрактуры ($n=8$) (рис. 2).

3.1.3. Сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели ги-поосмотического 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. 3). Амплитуда транзиторного 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.

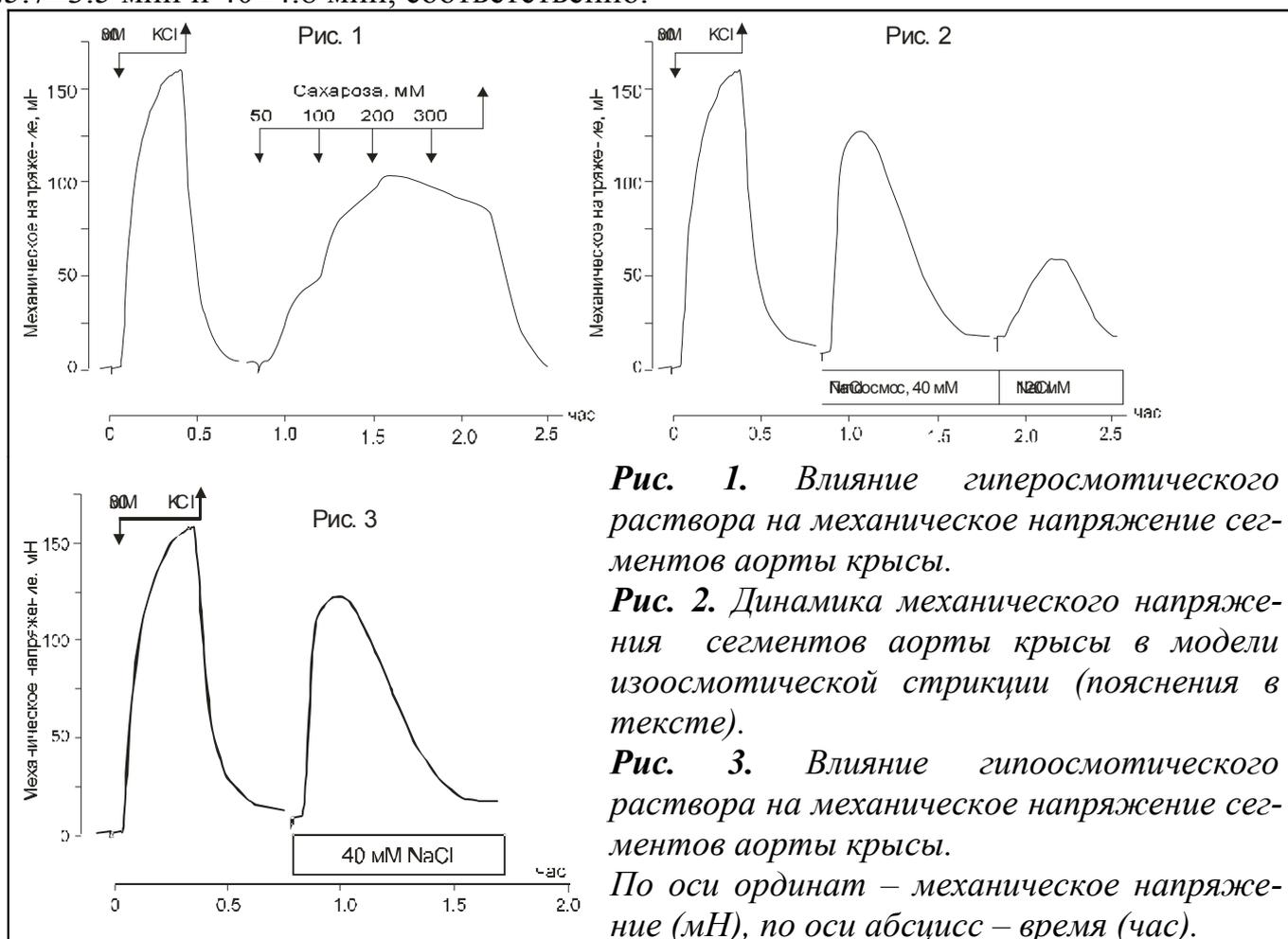


Рис. 1. Влияние гиперосмотического раствора на механическое напряжение сегментов аорты крысы.

Рис. 2. Динамика механического напряжения сегментов аорты крысы в модели изоосмотической стрикции (пояснения в тексте).

Рис. 3. Влияние гипоосмотического раствора на механическое напряжение сегментов аорты крысы.

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

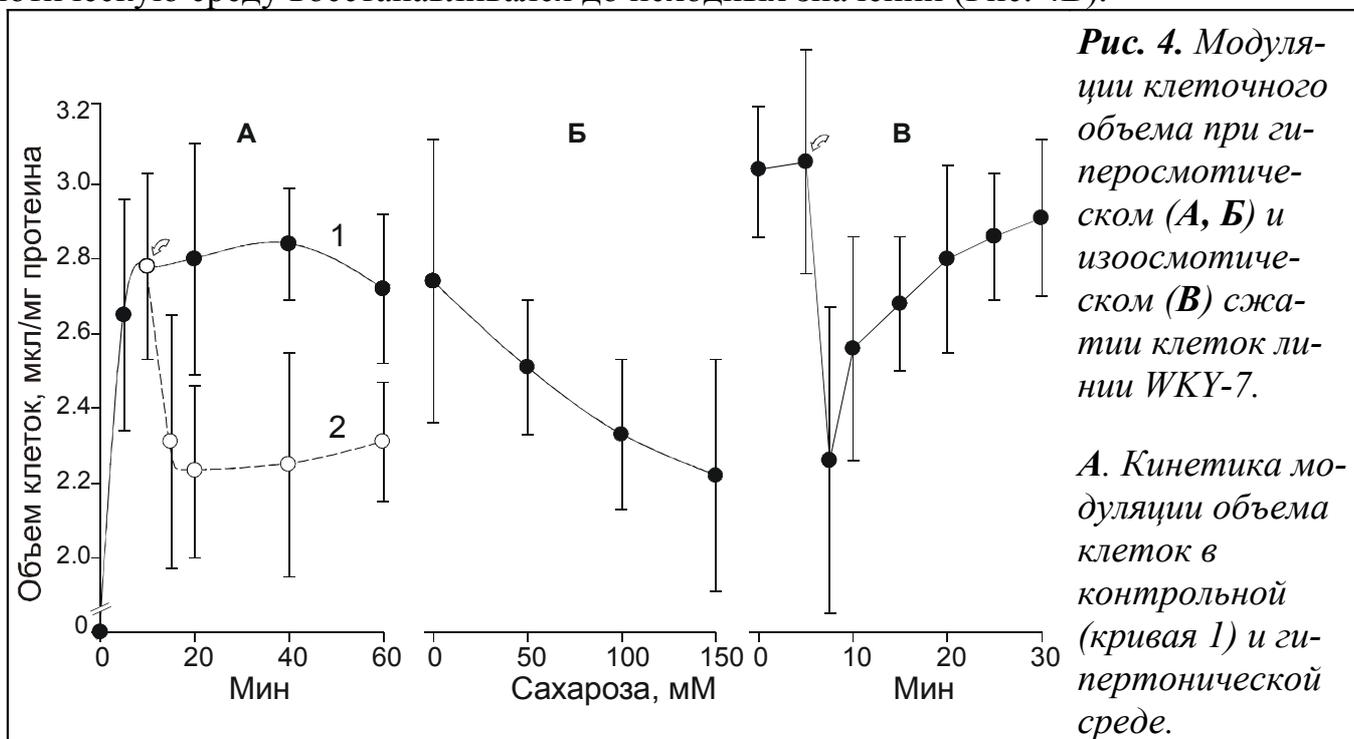
3.2. Изменения объема гладкомышечных клеток и активность НКСС

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. 10-минутная инкубация клеток линии WKY-7 была достаточна для установления равновесного распределения [^{14}C]-меченой мочевины между внутриклеточной средой и средой инкубации. Перенос клеток в гиперосмотическую среду, содержащую 150 мМ сахарозы быстро снижал объем клеток WKY-7 на $\sim 20\%$. Данное снижение объема оставалось поддерживаемым и не претерпевало существенных изменений в течение последующих 40 минут (Рис. 4, А, кривая 2). Рисунок 4Б 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 клеток WKY-7 в модели *изоосмотической стрикции*, был применен протокол, обычно используемый для подобных исследований [Orlov S.N. et al., 1992; 1996; 2004] и соответствующий схеме экспериментов, выполненных на гладкомышечных сегментах аорты. 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 *регуляторного увеличения объема*. Действительно, было обнаружено, что в данной модели стрикции объем клеток WKY-7 транзитивно снижался и через ~30 минут после переноса в изоосмотическую среду восстанавливался до исходных значений (Рис. 4В).



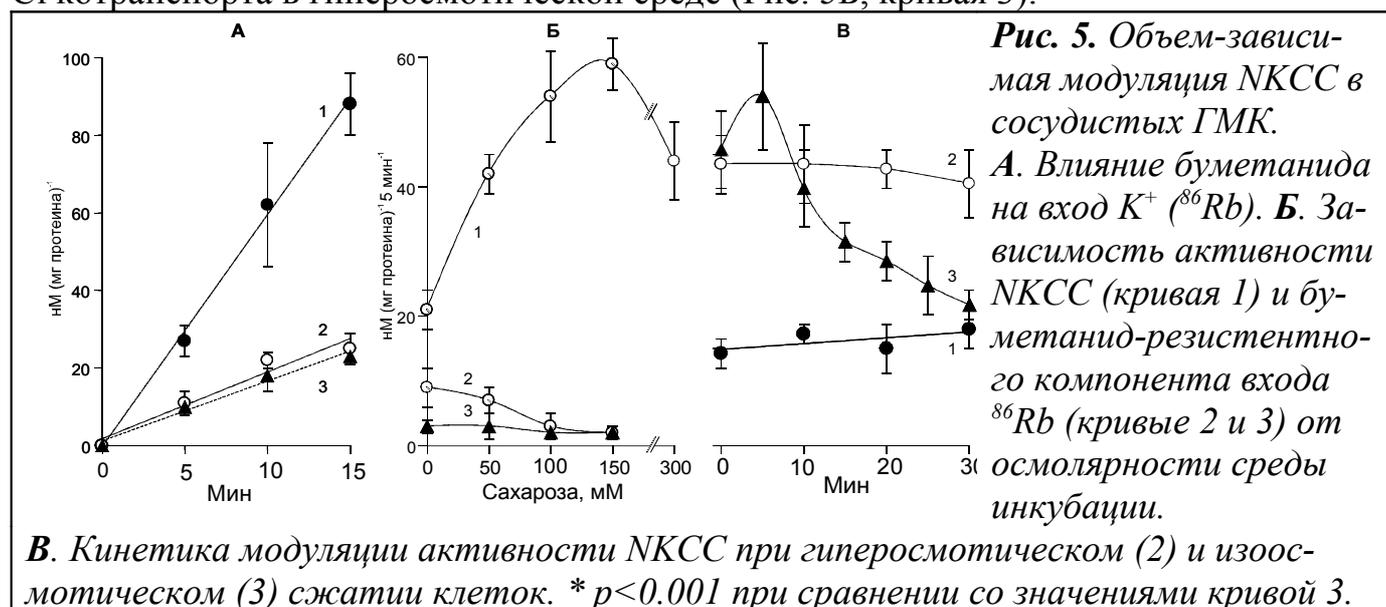
В момент времени, указанный стрелкой было добавлено 0.5 мл гиперосмотического (150 мМ сахарозы) раствора (кривая 2).

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 мМ NaCl), содержащий $[^{14}\text{C}]$ -меченую мочевины.

Гипоосмотическое набухание (70.4 мМ NaCl) вело к транзитивному увеличению объема клеток, максимальное значение которого составило 3.68 ± 0.22 мкл/мг протеина. После 45 минут инкубации в гипоосмотической среде наблюдалось лишь легкое увеличение объема до 3.03 ± 0.16 мкл/мг протеина по сравнению с 2.85 ± 0.18 мкл/мг протеина в контроле. Полученные данные согласуются с динамикой транзитивного сокращения сегментов аорты в гипоосмотическом растворе.

3.2.2. Активность $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта в клетках 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 NKCC [Russell J.M., 2000]. Несмотря на то, что резкая активация NKCC характерна как для гипер-, так и для изоосмотической стрикции, особенностью сосудистых ГМК по сравнению с другими типами клеток является то, что NKCC опосредует регуляторное увеличение объема только в случае изоосмотической, но не гиперосмотической, стрикции. Более того, при гиперосмотическом сжатии сосудистых ГМК регуляторного увеличения объема не наблюдается вообще. Для оценки возможного вклада NKCC в сократительные реакции сегментов при стрикции, была исследована динамика изменения активности этого котранспортера в клетках WKY-7 с учетом схем экспериментов, использованных в работе с сегментами аорты. Активность NKCC оценивалась как буметанид-чувствительный компонент накопления ^{86}Rb , аналога K^+ в отношении мембранного транспорта.

В присутствии ингибитора Na^+, K^+ -АТФазы убаина добавление 10 мкМ буметанида снижало значение накопления K^+ (^{86}Rb) в ~ 3 раза (Рис. 5А). Дальнейшее повышение концентрации этого соединения до 100 мкМ незначительно влияло на вход K^+ (^{86}Rb) (Рис. 5А, линия 3). Эти данные согласуются со значением K_i для этого соединения в пределах от 0.2 до 2 мкМ [Russell J.M., 2000]. Повышение осмолярности среды при добавлении 150 мМ сахарозы вело к ~ 3 -кратной активации NKCC (Рис. 5Б, кривая 1). Дальнейшее повышение осмолярности среды ингибировало активность NKCC. Угнетение NKCC, вероятно, обусловлено реципрокным ингибированием котранспортера внутриклеточным Cl^- [Russell J.M., 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. 5Б, кривая 2). Этот эффект полностью исчезал в отсутствие внеклеточного Cl^- , что указывает на подавление базальной активности K-Cl котранспорта в гиперосмотической среде (Рис. 5Б, кривая 3).



Несмотря на то, что активность K-Cl котранспорта также подавляется петлевыми диуретиками, константа ингибирования K-Cl котранспорта буметанидом име-

ет более высокие значения, чем для НКСС в клетках различных типов [Gillen C.M. et al., 1996; Gillen C.M., Forbush 3rd. B., 1999].

Повышение активности НКСС сохранялось до 30-ой минуты инкубации клеток в гиперосмотическом растворе. В противоположность этому, *изоосмотическая стрикция* вела к транзиторной активации этого переносчика, которая полностью исчезала к 30-ой минуте после переноса клеток из гипоосмотической в изоосмотическую среду (рис. 5В, кривая 3).

Динамика изменения объема клеток WKY-7, активности НКСС и развития сократительных ответов сегментов аорты в соответствующих моделях стрикции проявляли существенное сходство (рис. 6А, Б). Кривая механического напряжения сегментов была незначительно смещена вправо по сравнению с модуляциями объема клеток, что, вероятно, обусловлено меньшей скоростью диффузии растворов с измененным составом в пределах стенки сосудистых сегментов по сравнению со скоростью диффузии в культуральной среде.

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

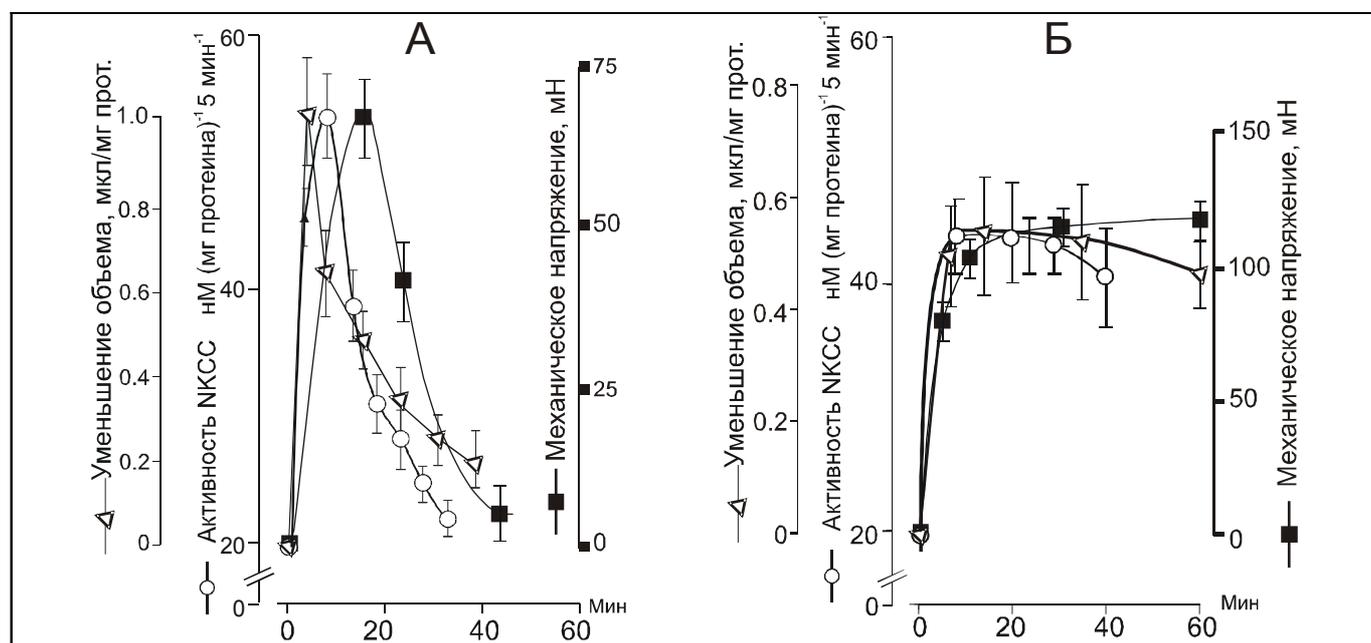


Рис. 6. Зависимости уменьшения объема гладкомышечных клеток, активности НКСС и механического напряжения сегментов аорты крысы от времени в моделях *изоосмотической* (А) и *гиперосмотической* (Б) стрикции.

Уменьшение объема клеток рассчитывалось как разность между контрольными и опытными значениями.

Полученные результаты также показали, что НКСС играет важную роль в регуляции сокращения гладкомышечных сегментов в модели *изоосмотической стрик-*

ции. Блокатор НКСС буметанид (10 мкМ), ингибировал НКСС, подавлял *регуляторное увеличение объема* и пролонгировал сокращение сегментов. Этот факт свидетельствует о первичной роли снижения объема клеток в развитии сокращения гладкомышечных сегментов в модели *изоосмотической стрикции*.

Механизм функциональной связи клеточного объема, активности НКСС и сократительной активности ГМК, по всей видимости, включает следующие этапы:

- 1) индуцированную стрикцией активацию сенсора клеточного объема,
- 2) изменение активности объем-чувствительной серин-треониновой киназы (hsgk) [Waldegger S. et al., 1997], препятствующей осмотическому сжатию клеток [Wagner C.A. et al., 2000],
- 3) опосредованную киназой hsgk активацию НКСС [Lang F. et al., 2002], сопряженную с фосфорилированием молекулы котранспортера [Russell J.M., 2000],
- 4) НКСС-зависимое увеличение $[Cl^-]_i$,
- 5) развитие сокращения гладкомышечных сегментов или в результате Cl^- -опосредованной деполяризации мембраны (происходящей в случае активации Cl^- каналов), или в результате запуска внутриклеточных Cl^- -зависимых регуляторных каскадов. Последнее предположение основано на данных, подтверждающих существование Cl^- -чувствительных каскадов, вовлекающих Cl^- -зависимые протеиновые киназы в 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 $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта в сократительные реакции гладкомышечных сегментов аорты крысы в моделях изменения клеточного объема, при аппликации БАВ и гиперкалиевой деполяризации мембраны

Как было показано, модуляция активности НКСС является важным механизмом регуляции объема ГМК. С целью дальнейшего исследования роли НКСС в сократительной регуляции сосудистых ГМК при моделировании набухания и стрикции и при их активации с помощью БАВ и гиперкалиевого раствора, был исследован эффект селективного блокатора НКСС буметанида на развитие сокращений изолированных сегментов аорты крысы при действии контрактильных стимулов различной природы.

3.3.1. Роль $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта в сокращениях гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированных модуляциями клеточного объема

3.3.1.1. Роль $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта в развитии гиперосмотически-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы. Согласно полученным данным, *гиперосмотическое* воздействие ведет к стрикции клеток, сопровождающейся поддерживаемой активацией НКСС. Предобработка сегментов в течение 5, 15, 30 и 60 минут ингибитором этого переносчика буметанидом в концентрациях 10, 50, 100 мкМ снижала амплитуду гиперосмотического сокращения. Степень ингибирующего действия буметанида зависела от времени предобработки и достигала максимальных значений после 30 мин инкубации (рис. 7, 11).

3.3.1.2. Роль $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта в развитии сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели изоосмотической стрикции клеток. Транзиторная активация НКСС является основным механизмом *регуляторного уве-*

личения объема при *изоосмотической стрижии* ГМК. Для выявления вклада этого переносчика в развитие транзиторного сокращения, развивающегося в модели *изоосмотического* снижения объема, был исследован эффект блокатора НКСС буметанида. 5–60-минутная предобработка буметанидом (10 мкМ) существенно удлиняла сокращение сегментов ($p < 0.005$, таблица 1) независимо от времени предобработки. При этом имелась тенденция к увеличению амплитуды сокращения (рис. 8, таблица 1). Полученные данные подтверждают важную роль клеточного объема в развитии сокращения ГМК при *изоосмотической стрижии*.

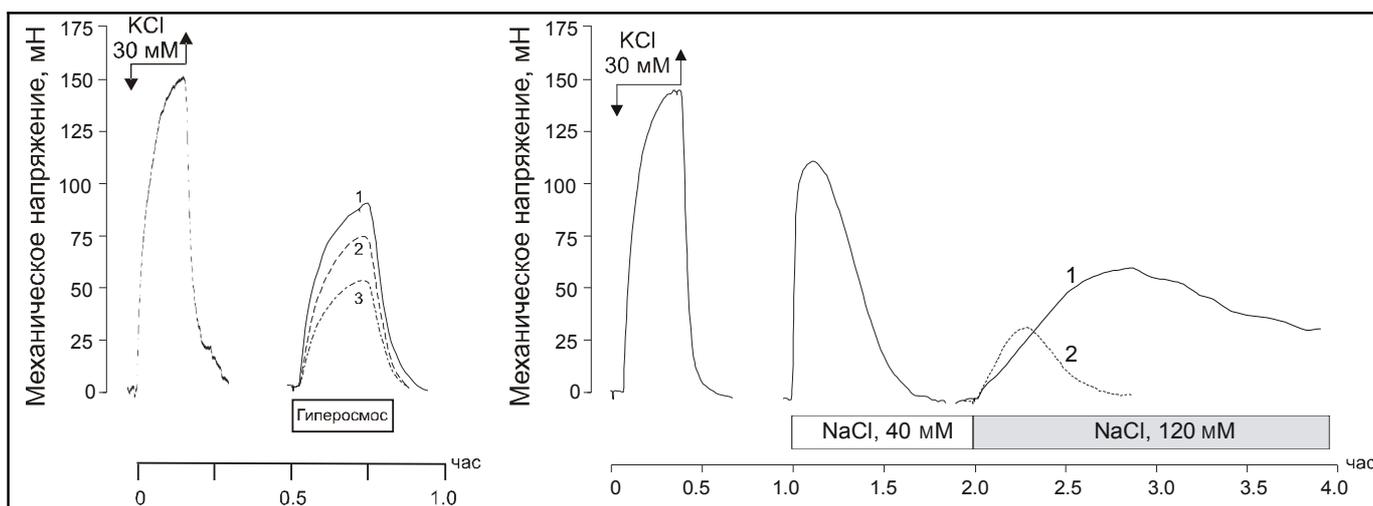


Рис. 7. Сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели гиперосмотической стрижии клеток в отсутствии (кривая 1) и присутствии 10-мкМ (кривая 2) или 100-мкМ буметанида (кривая 3).

Рис. 8. Сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели *изоосмотической стрижии* клеток в присутствии (кривая 1) и отсутствии 10-мкМ буметанида (кривая 2). Буметанид добавляли за 5 минут до восстановления ионного состава раствора.

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

Таблица 1. Эффект 5-минутной предобработки буметанидом на амплитуду и длительность сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы в модели *изоосмотической стрижии* (% гиперкалиевого сокращения (30 мМ KCl)).

	Амплитуда сокращения, %	Длительность сокращения, мин
Контроль	21.6±8.7 (n=8)	38.8±1.6 (n=8)
Буметанид, 10 мкМ	39.5±14.7 (n=6)	143.8±8.5* (n=6)

* $p < 0.005$ по сравнению с контролем.

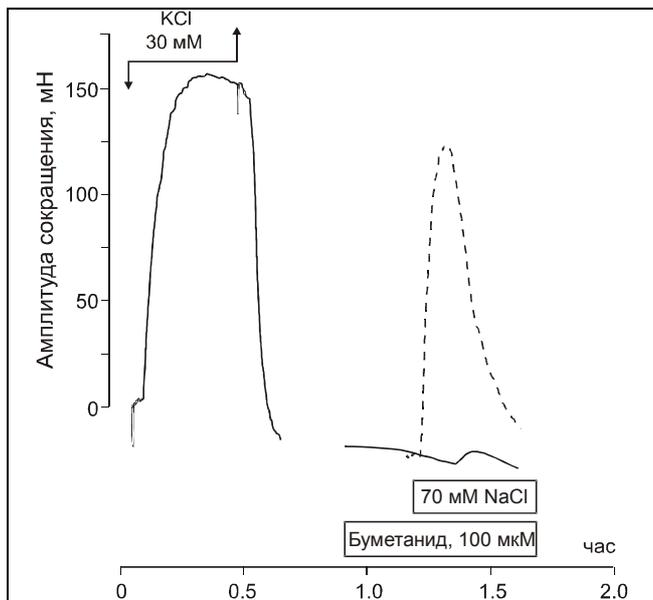


Рис. 9. Влияние буметанида на гипосмотически-индуцированное сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы. Пунктиром показано контрольное сокращение сегментов в отсутствие буметанида.

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

3.3.1.3. Роль $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта в развитии гипосмотически-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы.

Предобработка сегментов блокатором НКСС буметанидом (10 мкМ) существенно снижала величину гипосмотически-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 гипосмотически-индуцированного сокращения, так же как и в случае 15-мин предобработки 100-мкМ буметанидом (рис. 9). Полученные данные свидетельствуют о вовлечении НКСС в обеспечении сократительной активности сосудистых ГМК при гипосмотическом набухании клеток.

По всей видимости, основным НКСС-опосредованным механизмом, участвующим в гипосмотически-индуци-

рованном сокращении, является базальное поддержание неравновесного электрохимического потенциала ионов Cl^- . В этом случае гипосмотическая активация объем-чувствительных хлорных каналов ведет к деполяризации мембраны и активации потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов с последующим развитием классического кальций-зависимого сокращения. В связи с предложенной гипотезой, транзиторный характер сокращения обусловлен несколькими факторами: 1) ингибированием НКСС в гипосмотической среде [Russell J.M., 2000], 2) снижением электрохимического градиента хлора в результате гипосмотической активации K-Cl котранспорта [Adragna N. et al., 2000, 2004] и выхода Cl^- через Ca^{2+} - и объем-активированные хлорные каналы и 3) инактивацией и/или закрыванием объем-чувствительных Cl^- каналов за счет развивающегося регуляторного снижения объема. Основным механизмом последнего в сосудистых ГМК является выход K^+ по харибдотоксин-чувствительным Ca^{2+} -активируемым K^+ каналам [Anfinogenova Y.J. et al., 2001], что само по себе может вызывать реполяризацию мембраны и способствовать расслаблению.

3.3.2. Участие $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта в сокращении гладкомышечных сегментов аорты крысы при гиперкалиевой деполяризации мембраны. Одним из предполагаемых механизмов действия блокатора НКСС буметанида является его способность вызывать гиперполяризацию мембраны ГМК 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 сосудистых ГМК [Davis J.P.L. et al, 1993], а также на дан-

ных, согласно которым НКСС участвует в создании неравновесного градиента анионов хлора [Davis J.P.L., 1992; Koncz C., Daugiras J.T., 1994; Davis J.P.L. et al., 2000]. Эта гипотеза позволила предположить, что буметанид должен оказывать ингибирующий эффект на развитие сокращения, индуцированного умеренной гиперкалиевой деполяризацией мембраны сосудистых ГМК. Действительно, предобработка сегментов буметанидом (10, 50, 100 мкМ) в течение 5, 15, или 30 минут снижала максимальную амплитуду гиперкалиевого (KCl, 30 мМ) сокращения (рис. 11). При этом 30-минутная предобработка буметанидом (50, 100 мкМ) вела к двукратному подавлению амплитуды сокращения.

На основе гипотезы о гиперполяризующем действии буметанида было сформулировано предположение, что эффект этого соединения должен 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 должно относительно снижаться. Для проверки данного предположения было исследовано влияние буметанида на амплитуду сокращения, вызванного эквимолярным замещением 60 мМ NaCl на KCl. Данная концентрация KCl была выбрана в связи с тем, что вызывала субмаксимальное по амплитуде повышение механического напряжения и, в то же время, снижение концентрации NaCl до 60.4 мМ в данном случае не должно было оказывать существенного влияния на активность НКСС, константа сродства которого равна к натрию ~25 мМ [Russell J.M., 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. 10 А, 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 сосудистых ГМК при гиперкалиевой деполяризации.

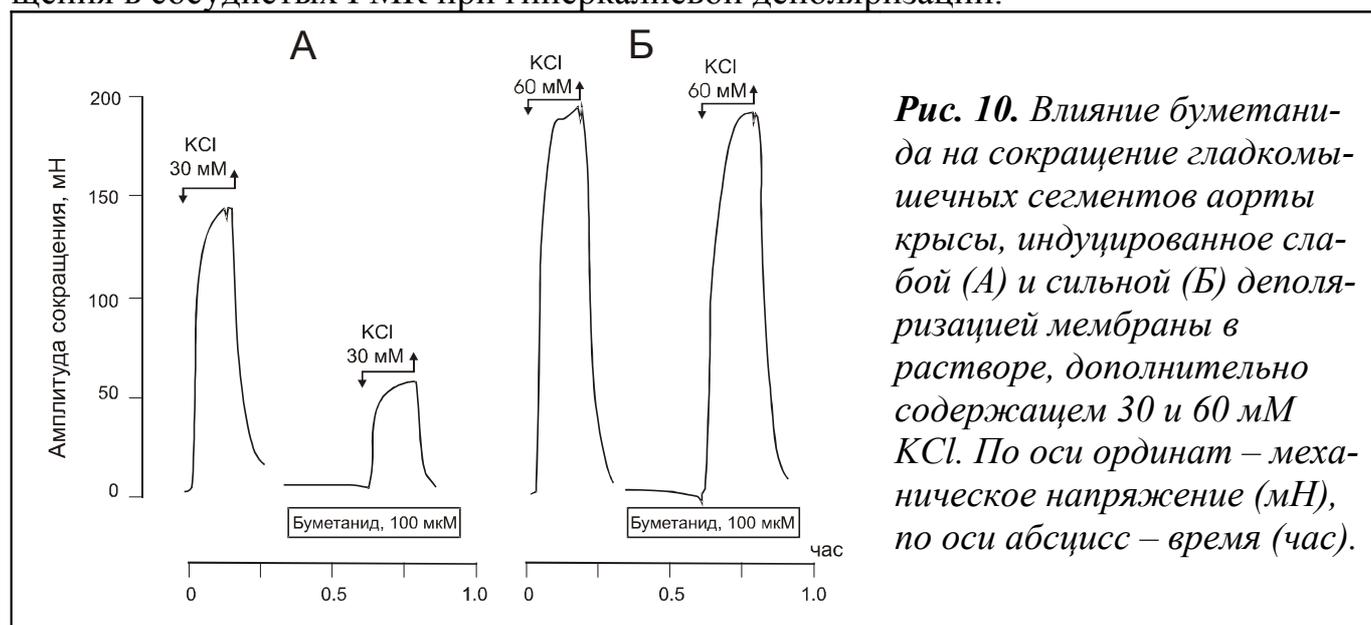


Рис. 10. Влияние буметанида на сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированное слабой (А) и сильной (Б) деполяризацией мембраны в растворе, дополнительно содержащем 30 и 60 мМ KCl. По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

3.3.3. Роль $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта в сокращениях гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированных аппликацией БАВ. С целью установить

вовлечение НКСС в механизмы сократительного действия вазоактивных соединений было исследовано влияние блокатора НКСС буметанида на развитие ФЭ- и ангиотензин(АТ II)-индуцированных сокращений сегментов аорты крысы. Данные агонисты были выбраны в силу их важной физиологической роли в регуляции тонуса сосудов.

Предобработка буметанидом (10, 50, 100 мкМ) в течение 5, 15, и 30 минут достоверно снижала максимальную амплитуду ФЭ(1 мкМ)-индуцированного сокращения (рис. 11). 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) (рис. 11, 12, Б) по сравнению с контролем. Ингибирующее действие 100-мкМ буметанида сохранялось после устранения этого соединения из раствора, по крайней мере, в течение последующих 40 минут.

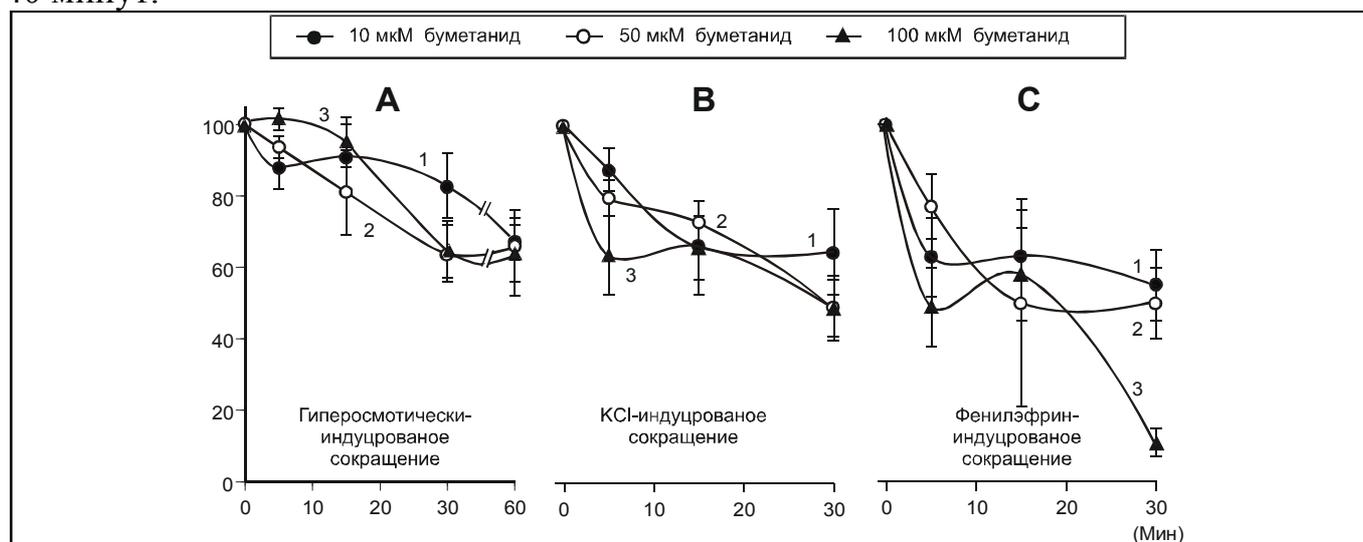


Рис. 11. Зависимость амплитуды сокращения гладкомышечных сегментов аорты от времени предобработки буметанидом (10, 50 и 100 мкМ). Сокращения вызвали гиперосмотическим раствором (А), гиперкалиевой деполяризацией (Б) и фенилэфрином (В)

Добавление в раствор ангиотензина II (АТ-II) (0.5 мкМ) приводило к развитию неподдерживаемого воспроизводимого сокращения сегментов аорты крысы, максимальная амплитуда которого составляла $27.7 \pm 4.9\%$ по сравнению с величиной гиперкалиевого (30 мМ KCl) 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). Полученные данные указывают на участие НКСС в сократительных реакциях сосудистых гладких мышц на действие БАВ.

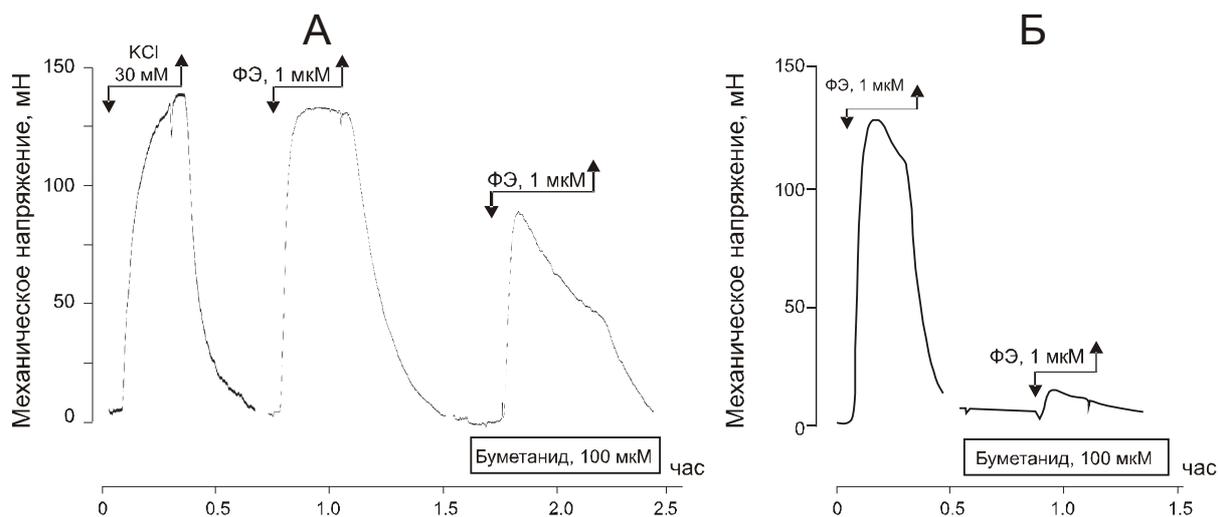


Рис. 12. Влияние 10- и 30-минутной предобработки буметанидом (100 мкМ) на развитие ФЭ-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы (А и Б, соответственно). По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

3.4. Изучение роли хлорной проводимости мембраны в регуляции сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты крысы. Одним из ключевых механизмов действия блокатора НКСС буметанида на сократительные реакции сегментов является снижение НКСС-опосредованного неравновесного градиента Cl⁻. В связи с этим было исследовано влияние модуляторов хлорной проницаемости мембраны на развитие сокращений сосудистых ГМК.

3.4.1. Участие Cl⁻ проводимости мембраны в сокращении гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированном аппликацией гиперкалиевого раствора. Предобработка сегментов блокатором Ca²⁺-активируемых Cl⁻ каналов нифлумовой кислотой (50, 100 мкМ) существенно снижала амплитуду гиперкалиевого сокращения сегментов. Эффект нифлумовой кислоты был обратим, и после отмывания сегментов наблюдалось постепенное восстановление амплитуды гиперкалиевого сокращения. Необходимо отметить, что аппликация нифлумовой кислоты вызывала снижение базального тонуса сегментов и ее расслабляющее действие усиливалось в зависимости от времени предобработки.

Таблица 2. 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
Нифлум. 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 по сравнению с контролем.

15-минутная предобработка SITS, но не DIDS, также частично подавляла развитие гиперкалиевого сокращения (таблица 2). Это, вероятно, объясняется ингиби-

рующим действием SITS в отношении Cl⁻ каналов, в то время как DIDS является, прежде всего, блокатором Cl⁻/HCO₃⁻ обменника [Chipperfield A.R., Harper A.A., 2000], функционирование которого невозможно в среде, не содержащей бикарбонат-ионы.

3.4.2. Участие хлорной проводимости мембраны в сокращении гладкомышечных сегментов аорты крысы, индуцированном аппликацией агониста α_1 -адренергических рецепторов фенилэфрина. Механизмы активации Cl⁻ каналов при действии БАВ могут включать агонист-индуцированное открывание низкоселективных рецептор-управляемых катионных каналов, при котором происходит увеличение внутриклеточной концентрации кальция. Поступивший в примембранные слои кальций может активировать Ca²⁺-зависимые Cl⁻ каналы и K⁺ каналы. Кроме того, открывание Cl⁻ каналов может происходить при активации G-белков, что подтверждается данными, полученными при исследовании Cl⁻-зависимой деполяризации мембраны мезангиальных клеток [Kremer S.G. 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 вазоконстрикторов и возможной модуляцией Ca²⁺-активируемой хлорной проводимости мембраны, было исследовано влияние блокатора Cl⁻ каналов этого типа нифлумовой кислоты на развитие ФЭ(1 мкМ)-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов. Нифлумовая кислота вызывала снижение амплитуды сокращения, при этом 5-минутная предобработка 100 мкМ-концентрацией этого соединения отменяла поддерживаемый компонент сокращения (n=7), а 15-минутная предобработка полностью предотвращала развитие ФЭ-индуцированного сокращения во всех экспериментах серии (n=8).

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*. Одним из предполагаемых механизмов вовлечения НКСС в регуляцию сократительной активности ГМК является увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора и формирование неравновесного электрохимического хлорного потенциала. Снижение наружной концентрации ионов хлора ведет к увеличению величины электрохимического хлорного потенциала, 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 mM NaCl)-индуцированного сокращения (n=8). 15-минутная аппликация блокаторов анионной проводимости SITS (100 мкМ) и DIDS (200 мкМ) также полностью подавляла развитие сокращения при аппликации гипоосмотического (70.4 mM 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 ги-

потезу о том, что основным механизмом участия НКСС в регуляции сократительной активности гладких мышц является генерация неравновесного хлорного потенциала.

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. 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.

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

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

Восстановление осмотического давления раствора посредством добавления сахарозы (160 мМ) во всех экспериментах изменяла характер гипоосмотического сокращения. Сокращение становилось поддерживаемым в течение длительного времени. 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.

Замена сахарозы глутаматом натрия 80 мМ на фоне поддерживаемой контрактуры вызывала расслабление гладкомышечных сегментов до исходного уровня.

Учитывая данные литературы и полученные результаты, можно утверждать, что механизмы индукции 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 стрижки клеток. Само по себе уменьшение объема миоцитов при гиперосмотическом воздействии ведет к согласованному пассивному увеличению концентрации внутриклеточных осмолитов. До настоящего времени вклад хлорной проводимости мембраны в развитие гиперос-

мотически-индуцированного сокращения сосудистых ГМК оставался неизученным. В связи с этим было исследовано действие блокаторов хлорной проводимости мембраны на развитие гиперосмотически-индуцированного сокращения ГМК.

15-ти минутная предобработка сегментов блокатором Ca^{2+} -зависимых Cl^- каналов нифлумовой кислотой (10–100 мкМ) [Greenwood I.A., Large W.A., 1995] дозозависимо угнетала амплитуду гиперосмотически-индуцированного сокращения, снижая амплитуду механического ответа более чем десятикратно при концентрации 100 мкМ (таблица 3).

На гладкомышечных клетках портальной вены кролика были получены данные [Greenwood I.A., Large W.A., 1995; Greenwood I.A., Large W.A., 1998], что нифлумовая кислота может не только блокировать Ca^{2+} -зависимые Cl^- токи, но и активировать калиевую проводимость мембраны сосудистых ГМК, 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 (таблица 3).

15-минутная предобработка SITS (50-500 мкМ), являющимся неселективным блокатором хлорной проводимости мембраны, включая Ca^{2+} -активируемые Cl^- каналы [Fuller C.M., Venos D.J., 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 (таблица 3).

Согласно данным, полученным на клетках ранних эмбрионов мыши [Sonoda M. et al., 2003], хлорные токи, индуцируемые высоким осмотическим давлением среды инкубации, чувствительны к блокатору Ca^{2+} -активируемых хлорных каналов нифлумовой кислоте и нечувствительны к DIDS, в то время как DIDS подавляет хлорные токи, активируемые набуханием клеток, что было подтверждено и в данном исследовании. Другие авторы установили, что Ca^{2+} -активируемые хлорные каналы в ГМК легочной артерии кролика не чувствительны к DIDS [Piper A.S. et al., 2002].

Полученные результаты предполагают существование в сосудистых ГМК, по крайней мере, двух различных типов хлорных каналов, различающихся по своей чувствительности к блокаторам и активирующихся набуханием или стрижкой клеток, соответственно. В действительности, в сосудистых ГМК экспрессированы хлорные каналы, по крайней мере, трех субтипов [Chipperfield A.R., Harper A.A., 2000], через которые может происходить выход хлора. Это подтверждается подавляющим действием на гиперосмотическое сокращение таких блокаторов анионной проводимости мембраны, как SITS и нифлумовая кислота.

Для исследования вовлечения хлорной проводимости мембраны в сокращении сосудистых ГМК в альтернативной модели сжатия клеток оценивали влияние предобработки нифлумовой кислотой, SITS и DIDS на развитие транзиторного повышения тонуса сегментов при *изоосмотической стрижке*.

Нифлумовая кислота снижала амплитуду сокращения при *изоосмотической стрижке* до $6.2 \pm 1.4\%$ от амплитуды гиперкалиевого сокращения по сравнению с $21.6 \pm 8.7\%$ в ее отсутствии ($p < 0.05$; $n = 7$). 15-минутная предобработка SITS (100 мкМ) не изменяла максимальную амплитуду сокращения, но задерживала нормализацию механического напряжения подобно буметаниду ($P < 0.05$), что, вероятно, свя-

зано с тем, что SITS может вызывать ингибирование НКСС. Предобработка сегментов DIDS не влияла на развитие сокращения.

Таблица 3. Влияние блокаторов хлорной проводимости мембраны на амплитуду сокращения, вызванного гиперосмотическим воздействием (150 мМ сахарозы).

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

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

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

Как указывалось выше, НКСС участвует в регуляции сосудистого тонуса через поддержание $[Cl^-]_i$. Было показано, что действие буметанида на сокращения, вызванные активацией α_1 -адренергических рецепторов, умеренной деполяризацией мембраны (30 мМ KCl), *гипоосмотическим набуханием* и *гиперосмотической стрижкой*, зависело 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 стрижки* наблюдалось уже при 5-минутной предобработке и концентрации 10 мкМ. По всей видимости, полное и быстрое ингибирование НКСС, обнаруженное в культуральных сосудах ГМК в присутствии 10 мкМ не означает, что эта концентрация ведет к быстрому снижению $[Cl^-]_i$ и гиперполяризации мембран ГМК на тканевом уровне. Кроме того, снижение электрохимического хлорного потенциала 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 *гиперосмотической стрижки* клеток, но подавлял регуляторное увеличение объема, определяемое в клетках, подвергнутых *изоосмотическому сжатию* (таблица 4). Сравнение действия сахарозы на клеточный объем и Cl^-_i показывают, что повышение $[Cl^-]_i$ на ~40% при *гиперосмотической*

стрикции, в основном, обусловлено снижением клеточного объема, нежели активацией НКСС. Напротив, в изоосмотически сжатых клетках, преинкубированных в гипосмотической среде с низким содержанием Cl^- , увеличение $[\text{Cl}^-]_i$ является следствием активации НКСС и резко уменьшается в присутствии буметанида. Действительно, ингибирование НКСС буметанидом снижало 40%-ое повышение $[\text{Cl}^-]_i$ 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 (таблица 4).

Таблица 4. Влияние гипо- и изоосмотического сжатия на внутриклеточное содержание воды и Cl^- в ГМК линии WKY-7.

Тип сжатия клеток и длительность 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±0.13*	63±3*	56±4*
Контроль	2.87±0.18	2.78±0.09	28±4	-
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

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Длительное культивирование клеток влияет на различные клеточные функции, включая активность ионных транспортеров [Verk V.C. et al., 1989; Raat N.J. et al., 1994]. В культуральных сосудистых ГМК, 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 влияние буметанида на $[\text{Cl}^-]_i$ на тканевом уровне – в сегментах аорты, обработанных в соответствии с моделью гиперосмотической стрикции, и в контрольных не стимулированных сегментах.

Таблица 5 показывает, что 30-минутная преинкубация с 100-мкМ буметанидом вызывала достоверное ~40% снижение содержания Cl^- в контрольных не стимулированных сегментах аорты и полностью отменяла увеличение $[\text{Cl}^-]_i$, обусловленное 20-минутным гиперосмотическим сжатием клеток в присутствии 150 мМ сахарозы.

Таблица 5. Влияние буметанида и сахарозы на содержание внутриклеточного Cl^- в гладкомышечных сегментах аорты крысы.

Присутствие буметанида (концентрация/время преинкубации)	Присутствие сахарозы (время)	Внутриклеточный Cl^- (нМ/мг влажного веса)
Контроль	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*

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Совокупность полученных данных позволяют сделать вывод о том, что существует два пути вовлечения НКСС в регуляцию сократительной активности сосудистых ГМК. Оба из них связаны с НКСС-опосредованным созданием неравновесного электрохимического хлорного потенциала, который при открывании Cl⁻ каналов будет обуславливать хлорный ток.

В первом случае ключевая роль принадлежит базальной активности НКСС, и основным триггерным НКСС-зависимым механизмом сокращения будет не столько повышение активности НКСС, сколько открывание хлорных каналов и снижение электрохимического хлорного потенциала. По всей видимости, данный тип НКСС-зависимой регуляции превалирует в случае сокращений, вызванных активацией α_1 -адренергических рецепторов, умеренной деполяризацией мембраны (30 мМ KCl) и *гипоосмотическим набуханием*. Это подтверждается необходимостью длительной предобработки буметанидом для проявления его максимального подавляющего эффекта.

Второй путь НКСС-опосредованной регуляции сокращений связан с дополнительным повышением активности НКСС и появляющимся *de novo* электрохимическим хлорным потенциалом. В этом случае максимальный эффект буметанида должен проявляться при минимальном времени предобработки этим соединением. Действительно, 5-минутная предобработка буметанидом (10 мкМ) была достаточной для изменения характера сокращения сегментов в модели *изоосмотической стрижки*. Дальнейшее увеличение времени предобработки (до 60 мин) и концентрации буметанида (до 100 мкМ) не изменяли действие этого препарата на сокращение ГМК.

3.6. Кальций-зависимая регуляция сократительных реакций сосудистых ГМК при изменении осмолярности среды инкубации

Дальнейшим этапом работы было проведение сравнительного анализа особенностей оперирования Ca²⁺-зависимых механизмов регуляции сократительных ответов гладкой мышцы сосудов при изменении объема клеток, активации α_1 -адренергических рецепторов и деполяризации мембраны.

3.6.1. Ca²⁺-зависимые механизмы сократительных реакций сосудистых сегментов при изменении объема клеток, активации α_1 -адренергических рецепторов и деполяризации мембраны. Для изучения роли ионов Ca²⁺ в сократительной регуляции сегментов аорты были использованы блокаторы потенциал-зависимых Ca²⁺ каналов верапамил и нифедипин, а также бескальциевый ЭГТА-содержащий раствор.

Несмотря на то, что предобработка сегментов верапамилом (10 мкМ) резко подавляла развитие сокращения, вызываемого аппликацией гиперкалиевого раствора (30 мМ KCl), она не оказывала влияния на амплитуду гиперосмотически-индуцированного сокращения (150 мМ сахарозы), которая составила 96.7±10.2% по сравнению с контролем ($p > 0.5$). Предобработка нифедипином (3 мкМ) аналогичным образом подавляла гиперкалиевое сокращение, но также не влияла на амплитуду сокращения (92,5±12,9%, $p > 0.2$) в гиперосмотическом растворе (таблица 6).

Так же, как и при гиперосмотическом воздействии, сокращение сегментов в модели *изоосмотической стрикции* было нечувствительно к нифедипину (таблица 6). Это свидетельствует о том, что механизмы сократительных реакций при моделировании стрикции клеток не связаны с активацией потенциал-зависимых кальциевых каналов.

С целью дальнейшего изучения роли кальция в развитии гиперосмотического сокращения, была проведена серия экспериментов с использованием бескальциевого раствора, содержащего хелатор ионов кальция ЭГТА. Инкубация сегментов в бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе (500 мкМ) 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. 13, таблица 6), несмотря на то, что при 60-минутной преинкубации в бескальциевой среде должна уменьшаться концентрация внутриклеточного кальция в [Sato K. et al., 1992; Bruschi et al., 1988].

Таблица 6. Влияние блокаторов кальциевых каналов L типа и бескальциевого раствора на амплитуду сокращения гладкомышечных сегментов аорты крысы.

Блокатор, мкМ	Амплитуда сокращения, %				
	КСl, 30 мМ	ФЭ, 1 мкМ	Гипоосмос, 40 мМ NaCl	Гиперосмос (сахароза, 150 мМ)	Изоосм. стрикция
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=6)	—	4.5±2.3* (n=6)	46.1±4.4 (n=6)	18.4±6.1 (n=6)
Верапамил, 10	4.6±1.6* (n=6)	25.8±7.3* (n=6)	3.8±1.1* (n=6)	48.3±2.7 (n=6)	—
—Ca ²⁺ ; ЭГТА, 500	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)

* $p < 0.05$ в сравнении с контролем. Результаты, представленные в таблице, рассчитаны в процентах по сравнению с амплитудой гиперкалиевого сокращения, величина которого принята за 100%.

Для исследования роли внеклеточного кальция в развитии сокращения в модели *изоосмотической стрикции* клеток было изучено действие ЭГТА-содержащего бескальциевого раствора. 60-минутная инкубация в бескальциевом растворе (500 мкМ ЭГТА) резко подавляла развитие гиперкалиевой (30 мМ КСl) контрактуры, но не оказывала существенного влияния на развитие сокращения при *изоосмотической модели стрикции* (рис. 14, таблица 6).

Гипоосмотически-вызванное сокращение опосредовано Ca²⁺-зависимыми механизмами и, прежде всего, активацией потенциал-зависимых Ca²⁺ 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.

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

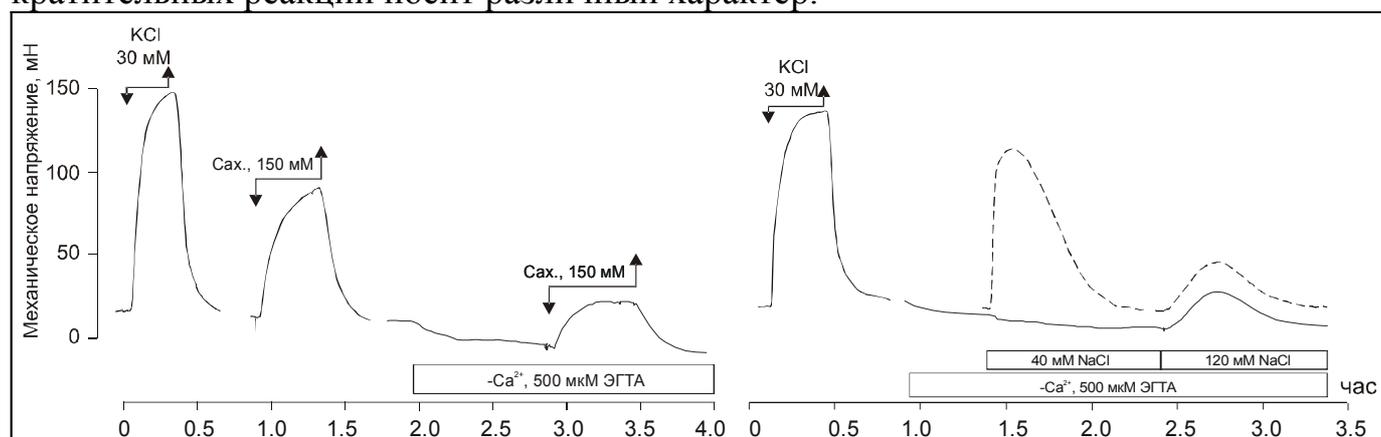


Рис. 13. Влияние бескальциевого ЭГТА-содержащего раствора на гиперосмотически индуцированное сокращение сегментов аорты.

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

Рис. 14. Влияние бескальциевого ЭГТА-содержащего раствора на сокращение сегментов аорты в модели изоосмотической стрикции. 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 ГМК в отсутствии внешнего Ca^{2+} можно считать изменение чувствительности клеток к этим ионам [Janssen L.J. et al., 2001; Nakaо F. et al., 2002].

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 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 ГМК гиперкалиевым раствором (KCl, 60 мМ) с целью активировать потенциал-зависимый вход кальция внутрь клеток. Вопреки первоначальному предположению о развитии кальциевой сенсбилизации ГМК, в моделях стрикции клеток не было обнаружено повышение чувствительности сегментов к наружному кальцию. Напротив, в отличие от контрольных условий, сокращения на аппликацию CaCl_2 не наблюдалось вовсе, что свидетельствует о резком снижении чувствительности сегментов к внеклеточному кальцию при стрикции ГМК (рис. 15, 16).

После отмывания сегментов в ЭГТА-содержащем бескальциевом растворе с нормализованной осмолярностью наблюдалась тенденция к восстановлению чувствительности сегментов к сократительному действию CaCl_2 .

Более того, гиперосмотическая и изоосмотическая стрижия ГМК в присутствии наружного кальция также приводила к существенному подавлению сократительного действия ФЭ (1 мкМ) и гиперкалиевого раствора (30 мМ КСl) (Рис. 17).

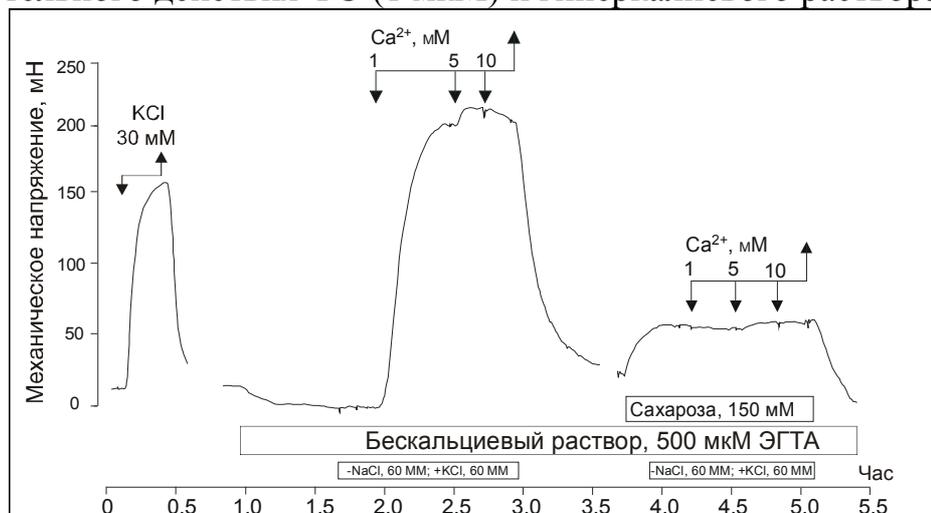


Рис. 15. Влияние гиперосмотической стрижии на Ca^{2+} -зависимое гиперкалиево сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы. По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

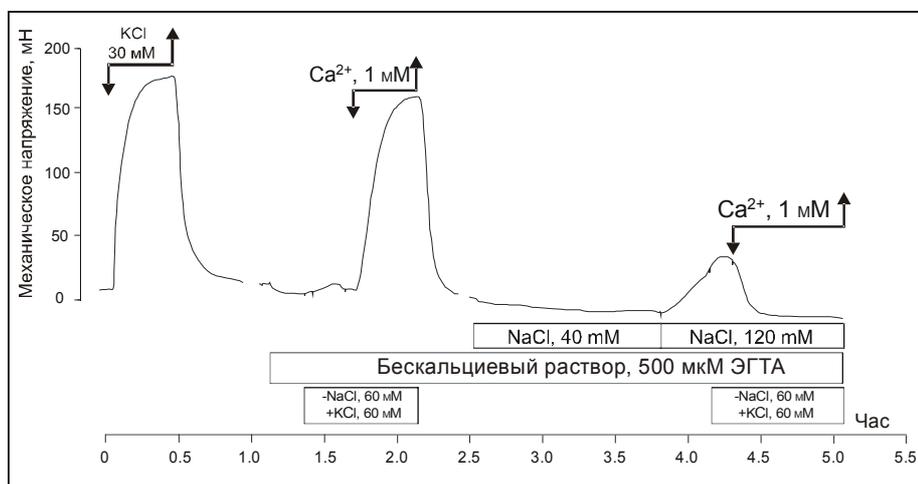


Рис. 16. Влияние изоосмотической стрижии на Ca^{2+} -зависимое гиперкалиево сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы. По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час)

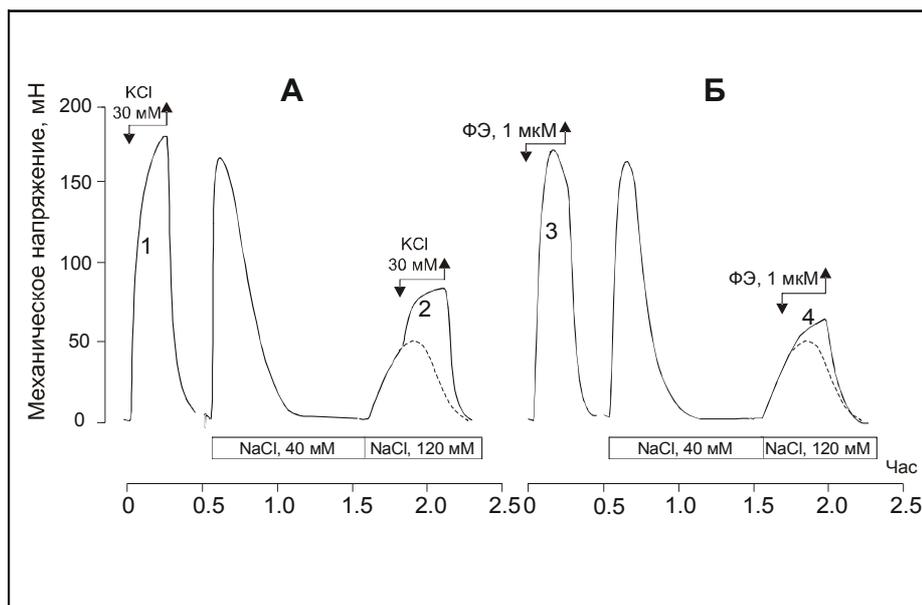


Рис. 17. Влияние гиперкалиевого раствора (А) и фенилэфрина (Б) на механическое напряжение сегментов аорты крысы в контроле (кривые 1, 3) и в модели изоосмотической стрижии клеток (кривые 2, 4). По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час).

Можно предположить следующие механизмы ингибирования КСl- и ФЭ-индуцированных сокращений в моделях стрижии клеток:

1. Возможно, при сжатии клеток происходит подавление потенциал-зависимого входа Ca^{2+} , который играет важную роль в развитии КС1- и ФЭ-индуцированного сокращения, но не участвует в развитии сокращения сегментов в обеих моделях стрикции. Это предположение связано с тем, что стрикция клеток может изменять архитектуру мембраны и влиять на белок-липидные взаимодействия в мембране, что влечет за собой изменение функционального состояния ион-транспортных систем, включая кальциевые каналы.
2. Не исключено, что стрикция клеток может разобщать механизмы возбуждения-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 в данном ЭГТА-буфере уже будет насыщающей. Однако, учитывая, что максимальная амплитуда Ca^{2+} -зависимого сокращения превышает величину гиперосмотически-индуцированного в несколько раз, данное предположение кажется маловероятным.

С целью установить, изменяется ли чувствительность клеток к констрикторам во время *гипоосмотического набухания*, были проведены контрольные исследования сократительного действия ФЭ (1 мкМ) и гиперкалиевого раствора (30 мМ КС1) 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.

Блокатор НКСС буметанид модулировал реактивность ГМК к гиперкалиевому раствору в гипоосмотической среде. Предобработка 10-мкМ буметанидом угнетала тестирующее 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 ($p < 0.03$). Напротив, увеличение концентрации буметанида до 100 мкМ потенцировало амплитуду гиперкалиевого сокращения, развивающегося в гипоосмотических условиях, что, по всей видимости, связано с подавляющим действием буметанида на К-С1 котранспорт, активация которого происходит при *гипоосмотическом набухании* клеток и важная роль которого в сократительной регуляции ГМК 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).

3.6.3. Потенциал-зависимый вход Ca^{2+} в ГМК линии WKY-7 при изменении осмолярности среды инкубации. При исследовании сократительной активности сегментов аорты было обнаружено, что в моделях стрикции сокращение гладкомышечных сегментов осуществлялось в бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе и было резистентным к блокаторам потенциал-зависимых кальциевых каналов. В свя-

зи с этим было изучено потенциал-зависимое накопление ^{45}Ca в культуральных клетках аорты крысы линии WKY-7, обладающих выраженным контрактильным фенотипом, подтвержденным экспрессией ряда сократительных и регуляторных белков (α -актин, белок SM22 и КЛЦМ), и имеющих высокую чувствительность к ангиотензину II и эндотелину-1, измеренную по уровню митоген-активированного фосфорилирования протеинкиназы ERK1/2.

В ГМК линии WKY-7, гиперкалиевая деполяризация мембраны вела к 2-3-кратному увеличению входа ^{45}Ca . Ни нифедипин, ни верапамил существенно не влияли на базальное накопление Ca^{2+} , однако полностью устраняли вызванный деполяризацией вход Ca^{2+} с $K_i \sim 0.01$ и 1 мкМ, соответственно. 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. 18).

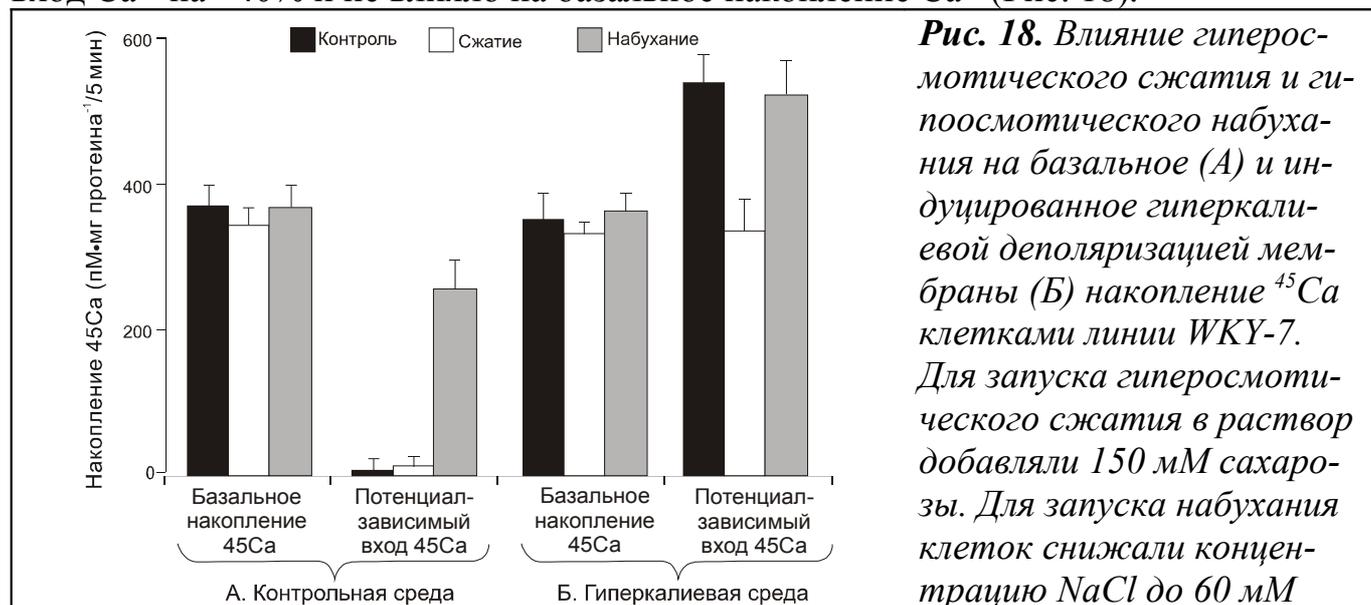


Рис. 18. Влияние гиперосмотического сжатия и гипоосмотического набухания на базальное (А) и индуцированное гиперкалиевой деполяризацией мембраны (Б) накопление ^{45}Ca клетками линии WKY-7. Для запуска гиперосмотического сжатия в раствор добавляли 150 мМ сахарозы. Для запуска набухания клеток снижали концентрацию NaCl до 60 мМ

В связи с обнаружением различий во влиянии буметанида на сокращение, индуцированное умеренной (30 мМ KCl) и сильной (60 мМ KCl) деполяризацией (рис. 10), было исследовано накопление ^{45}Ca при трех разных концентрациях наружного K^+ . 30-минутная предобработка 10 мкМ-буметанидом не влияла на накопление ^{45}Ca при $[\text{K}^+]_o = 6$ и 60 мМ, в то время как при умеренной деполяризации мембраны ($[\text{K}^+]_o = 30$ мМ) нифедипин-чувствительный компонент накопления ^{45}Ca снижался в обработанных буметанидом клетках \sim двукратно (таблица 7).

Таблица 7. Влияние буметанида на накопление ^{45}Ca в клетках WKY-7.

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 10 мкМ	1188±88 1117±71	354±29 361±47	834 756
-----------------	---------------	--------------------	------------------	------------

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

Таким образом, *стрикция* клеток не влияет на базальное накопление ^{45}Ca и существенно подавляет потенциал-зависимый вход кальция в клетки WKY-7, в то время как *гипоосмотическое набухание*, напротив, ведет к индукции потенциал-зависимого входа ^{45}Ca (таблица 8). Эти результаты согласуются с данными о влиянии нифедипина и верапамила на сокращения сегментов в соответствующих моделях изменения объема клеток.

Таблица 8. Влияние гипоосмотического набухания на накопление ^{45}Ca в ГМК линии WKY-7.

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

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе проведен системный анализа роли НКСС, Cl^- каналов, внутриклеточного хлора, внеклеточного Ca^{2+} и объема клеток в регуляции сократительной активности сосудистых ГМК. Обобщенная схема объем-зависимой ветви регуляции сократительной активности сосудистых гладкомышечных клеток представлена на рисунке 19.

Модуляции объема клеток достаточны, чтобы индуцировать сокращение сосудистых ГМК. Полученные данные показывают, что переносы сегментов в гипер- или гипотонические растворы ведут к развитию сокращения сосудистых ГМК.

Несколько свидетельств указывают на то, что это сокращение запускается модуляцией клеточного объема, а не изменившейся осмолярностью среды инкубации. Во-первых, величина сокращения сегментов, запускаемого сахарозой в концентрациях 50-150 мМ пропорциональна снижению объема клеток. Во-вторых, объем клеток WKY-7 при *гипоосмотическом набухании* быстро нормализуется механизмами регуляторного снижения объема через активацию K^+ и Cl^- каналов [Anfinogenova Y.J. et al., 2001]. Эти данные согласуются с результатами, показывающими транзиторный

характер сокращения сегментов в гипоосмотической среде и лишь незначительное повышение объема клеток после 45 минут инкубации в гипоосмотической среде (3.03 ± 0.16 против 2.85 ± 0.18 мкл/мг протеина в контроле). *В-третьих*, наблюдается соответствие динамики поддерживаемого сокращения при аппликации сахарозы и транзиторного сокращения при *изоосмотической стрижии* с поддерживаемым и транзиторным характером снижения объема клеток в этих моделях стрижии. *В-четвертых*, транзиторная кинетика снижения объема клеток при *изоосмотической стрижии* обусловлена НКСС-опосредованным регуляторным увеличением объема [Orlov S.N. et al., 1996]. *В-пятых*, как снижение объема клеток, так и развитие сокращения при *изоосмотической стрижии* пролонгируется при ингибировании НКСС буметанидом.

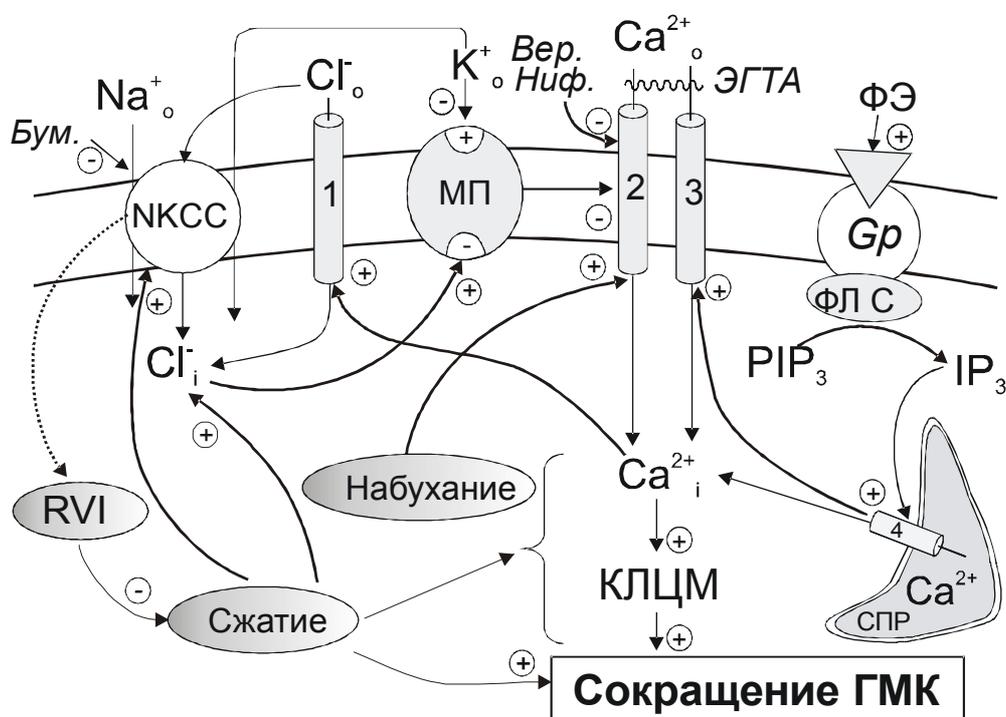


Рис. 19. Схема объем-зависимой регуляции сократительной активности сосудистых ГМК. 1 – Ca^{2+} -активируемые хлорные каналы; 2, 3 – Ca^{2+} каналы; МП – мембранный потенциал; НКСС – $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорт; 4 – Ca^{2+} каналы саркоплазматического ретикулума; RVI – регуляторное увеличение объема; СПР – саркоплазматический ретикулум; ФЛ С – фосфолипаза С; Гр – ГТФ-связывающий белок; ФЭ – фенилэфрин; КЛЦМ – киназа легких цепей миозина.

Сокращение гладкомышечных сегментов аорты крысы при сжатии и набухании: различия в Ca^{2+} -опосредуемой сигнализации. Несмотря на однонаправленное действие в отношении механического напряжения сегментов, клеточные механизмы, лежащие в основе сократительных ответов ГМК при сжатии и набухании

клеток существенно различаются. Действительно, подобно K^+ -зависимой деполяризации мембраны, *гипоосмотическое набухание* повышает вход ^{45}Ca , ингибируемый нифедипином. Более того, как нифедипин, так и верапамил подавляют сокращение сегментов при набухании. Эти результаты однозначно свидетельствуют о том, что индуцированное набуханием сокращение сосудистых ГМК опосредовано активацией Ca^{2+} каналов L-типа. В противоположность этому, сокращение, вызываемое *гипер-* и *изоосмотической стрикцией*, устойчиво к блокаторам потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов.

Сокращение ГМК при сжатии сохраняется также в отсутствии наружного Ca^{2+} и истощении внутриклеточных депо Ca^{2+} при длительной инкубации в бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе, то есть в условиях, отменяющих K^+ - и ФЭ-индуцированные сокращения. Более того, стрикция резко подавляет сократительные ответы на гиперкалиевый раствор и аппликацию ФЭ. Напротив, 30-минутная преинкубация в гипоосмотическом растворе, предшествующая *изоосмотической стрикции*, повышает амплитуду K^+ -индуцированного сокращения и не влияет на амплитуду сокращения, вызванного ФЭ. 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 сосудистых ГМК. Так, Кравцов с соавторами продемонстрировал возможность сокращения аорты крысы при гиперкалиевой деполяризации 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 $[Ca^{2+}]_i$. Повышение K^+ в изотонической среде вызывало увеличение связывания ^{45}Ca с плазмалеммой ГМК аорты. В противоположность общепринятой точке зрения о ключевой роли $[Ca^{2+}]_i$ в сопряжении возбуждения-сокращения ГМК, авторы выдвинули гипотезу, что взаимодействие актина и миозина может активироваться Mg^{2+} -зависимым связыванием Ca^{2+} с кальциевым каналом [Kravtsov G.M. et al, 2003]. Тем не менее, необходимо подчеркнуть, что в противоположность сокращению ГМК в моделях стрикции, K^+ -индуцированное сокращение в без- Mg^{2+} растворе подавлялось блокаторами Ca^{2+} каналов L-типа [Kravtsov G.M. et al., 2003]. Кроме того, *гиперосмотическая стрикция* клеток может непосредственно запускать фосфорилирование легких цепей миозина и Rho-зависимую транслокацию миозина II [Klein J.D., O'Neill W.C., 1993, 1995; Pedersen P.A. et al., 2002; Shrode L.D. et al., 1995; Takeda M. et al., 1993]. Одним из механизмов изменения реактивности сосудистых ГМК в моделях стрикции клеток, возможно, выступает увеличение общей концентрации макромолекул

(macromolecular crowding), ключевая роль которой была установлена в регуляции объем-чувствительного мембранного транспорта [Colclasure G.C. et al., 1992; Dunham P.B. et al., 1995] и элементов цитоскелета [Cuneo P. et al., 1992; Madden T.L., Herzfeld J., 1993].

Роль $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта и внутриклеточного Cl^- . Основной гипотезой вовлечения $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта в сократительную регуляцию ГМК является создание неравновесного электрохимического хлорного потенциала. В этом случае, сокращение ГМК 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 гладкомышечных сегментов при гиперкалиевой деполяризации мембраны ГМК, а также при действии ФЭ и гипоосмотического растворов. 2. Селективный ингибитор НКСС буметанид вызывает снижение амплитуды сокращений сегментов, вызванных аппликацией фенилэфрина, KCl (30 мМ), а также гипо- и гиперосмотического растворов. 3. Ингибирование НКСС буметанидом ведет к гиперполяризации мембраны сосудистых ГМК [Davis J.P.L. et al., 1993] и снижению $[Cl^-]_i$ в как в интактных, так и в стимулированных аппликацией сахарозой сегментах аорты. 4. Буметанид подавляет сокращение сегментов при слабой, но не сильной, деполяризации мембраны. Последнее наблюдение можно было бы связать с подавлением активности НКСС, обусловленном снижением концентрации Na^+_o со 120 мМ до 60 мМ. Однако, высокая афинность НКСС для Na^+_o ($K_{1/2} \sim 25$ мМ) [Orlov S.N. et al., 1996] противоречит этому предположению.

По всей видимости, в модели *гиперосмотической стрикции* быстрое повышение $[Cl^-]_i$ в сосудистых ГМК 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 *изоосмотической*, но не *гиперосмотической стрикции* клеток. Вероятно, НКСС вовлечен в сократительную регуляцию ГМК аорты при стрикции как модулятор $[Cl^-]_i$, но независимо от Cl^- -зависимой 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, главного следствия деполяризации мембраны.

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 гладкомы-

щечных 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 проходящую 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 ме-

ханизмом запуска сокращения сосудистых ГМК при активации α_1 -адренергических рецепторов и гиперкалиевой деполяризации мембраны.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Эпителий–зависимая регуляция сократительной активности гладких мышц трахеи и бронхов кролика // Сб. Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы. – Томск, СГМУ, 1997 г., с.171–172 (Соавт. Капилевич Л.В., Пан В.В.).
2. Эпителий регулирует сократительную активность гладких мышц трахеи и бронхов // Сб. резюме в журн. Пульмонология. – 1997 г. «VII Нац. конгр. по болезням органов дыхания». Москва 2–5 июля, 1372, с.370 (Соавт. Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А., Ковалев И.В.).
3. Участие цАМФ в регуляции сократительных реакций гладких мышц трахеи и бронхов // Сб. резюме в журн. Пульмонология. – 1997 г. «VII Нац. конгр. по болезням органов дыхания». Москва 2–5 июля, 181, с.53 (Соавт. Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А., Ковалев И.В.).
4. Особенности эпителийзависимых сократительных реакций гладких мышц в различных отделах респираторного тракта // В мат. сб. 3 съезда физиологов Сибири и Дальнего Востока, Новосибирск, 1997, 165, с.93 (Соавт. Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А., Ковалев И.В.).
5. Внутриклеточные сигнальные системы в эпителии и гладких мышцах воздухоносных путей // Пульмонология, 1997, № 2, с.72–76 (Соавт. Баскаков М.Б., Капилевич Л.В., Медведев М.А., Петров Е.Ю., Ковалев И.В.).
6. Особенности эпителий–зависимых сократительных реакций гладких мышц в различных отделах респираторного тракта // В сб. Медико–биол. аспекты нейро–гуморальной регуляции, 1997, СГМУ, – Томск, с.217–219 (Соавт. Баскаков М.Б., Панов А.А., Капилевич Л.В., Медведев М.А., Ковалев И.В.).
7. Влияние нитропруссид натрия на гладкомышечные полоски мочеточника и taenia coli морской свинки // Тез. докл. XVII с. Всерос. физиол. о–ва им. И.П. Павлова, Ростов-на-Дону, 1998 г., с.102 (Соавт. Баскаков М.Б., Ковалев И.В., Капилевич Л.В., Попов А.Г., Панов А.А., Петров Е.Ю.).
8. Исследование чувствительности гладкомышечных клеток к нитропруssidу натрия в различных отделах респираторного тракта // Сб. резюме в ж. Пульмонология.– 1998г. «VIII Нац. Конгр. по болезням органов дыхания».– Москва, 22–24 окт, 1998 г., XXI.1, с.208 (Соавт. Баскаков М.Б., Капилевич Л.В., Ковалев И.В.).
9. Особенности эпителийзависимых сократительных реакций гладких мышц в различных отделах респираторного тракта // Сб. резюме в ж. Пульмонология.– 1998 г. «VIII Нац. Конгр. по болезням органов дыхания». – Москва, 22–24 окт., 1998 г, XXI.5, с.209 (Соавт. Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Ковалев И.В., Медведев М.А.).

10. Особенности зависимых от эпителия сократительных реакций гладких мышц в различных отделах респираторного тракта // *Бюлл. exper. биол. и мед.* – 1998 г. № 12. С.618–620 (Соавт. Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Ковалев И.В., Медведев М.А.).
11. Релаксирующий эффект нитропрусида натрия в гладких мышцах: роль ионов кальция // Сб. резюме в ж. *Пульмонология.*– 1998г. «VIII Нац. Конгр. по болезням органов дыхания» – Москва 22–24 окт., 1998 г, XXI.7, с. 210. (Соавт. Ковалев И.В., Панов А.А., Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А., Попов А.Г.).
12. Роль монооксида азота в регуляции эндотелиально–гладкомышечных взаимодействий в стенке кровеносных сосудов малого круга кровообращения // Сб. резюме в ж. *Пульмонология.* 1999 г. «IX Нац. Конгресс по болезням органов дыхания» – Москва 31 октября – 3 ноября, XXI.8, с.167. (Соавт. Капилевич Л.В., Ковалев И.В., Коптева Л.Ю., Носарев А.В., Баскаков М.Б.).
13. Исследование релаксирующего действия нитропрусида натрия на гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином // Сб. Межрег. науч. кон. Сибири и Дальнего Востока, посвященной 150–летию со дня рождения академика Павлова И.П. 25–26 ноября, 1999г, Томск, ТГУ, –с.187–189 (Соавт. Панов А.А., Попов А.Г., Бородин Ю.Л., Ковалев И.В., Медведев М.А. и др., всего 7 человек).
14. Исследование роли цГМФ–зависимых процессов в электромеханическом сопряжении гладких мышц // Сб. Межрег. науч. кон. Сибири и Дальнего Востока, посвященной 150–летию со дня рождения академика И.П. Павлова. 25–26 ноября, 1999 г., Томск, ТГУ, с.189–191 (Соавт. Панов А.А., Попов А.Г., Бородин Ю.Л., Ковалев И.В., Медведев М.А. и др., всего 7 человек).
15. Влияние эпителия на сократительные реакции трахеи и бронхов кроликов // *Совр. проблемы фундам. и клин. медицины (Сб. трудов молодых уч. и студ.)* Томск, 1999. С.3–4 (Соавт. Коптева Л.Ю., Носарев А.В.)
16. Релаксирующий эффект нитропрусида натрия в гладких мышцах: роль ионов кальция // Сб. статей «Актуальные проблемы пульмонологии» – Москва, 2000 г., с.722–729 (Соавт. Ковалев И.В., Панов А.А., Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А., Попов А.Г.)
17. Влияние нитросоединений на электромеханическое сопряжение гладкомышечных клеток мочеточника // *Бюлл. exper. биол. и мед.*– 2000, т.129.–N5. С.539–541 (Соавт. Ковалев И.В., Панов А.А., Бородин Ю.Л., Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А.).
18. Особенности холинэргической регуляции гладких мышц легочных артерий кролика // *Бюлл. exper. биол. и мед.*– 2000, т.130.–N8. С.134–136 (Соавт.

- Капилевич Л.В., Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Носарев А.В., Медведев М.А.).
19. Роль оксида азота в эндотелий–зависимой регуляции гладких мышц легочных артерий // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*– 2000, –N1. С.7–19 (Соавт. Капилевич Л.В., Носарев А.В., Баскаков М.Б., Ковалев И.В., Медведев М.А.).
 20. Механизмы NO–индуцированного расслабления гладких мышц сосудов // *Актуальные вопросы кардиологии. Тезисы докладов*, г. Томск, 14–15 сентября, 2000 г., с.242 (Соавт. Ковалев И.В., Попов А.Г., Панов А.А., Бородин Ю.Л., Медведев М.А., и др., всего 7 человек).
 21. Механизмы действия нитропрусида натрия на гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином // *Актуальные вопросы медицины*. Томск, 2000. С.107–109 (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Панов А.А., Попов А.Г., Медведев М.А. и др., всего 7 человек)
 22. Роль цГМФ – зависимых процессов в электромеханическом сопряжении ГМК // *Актуальные вопросы медицины*. Томск, 2000. С 109–110 (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Панов А.А., Попов А.Г., Медведев М.А., и др., всего 7 человек)
 23. Участие цГМФ–зависимых процессов в электромеханическом сопряжении гладких мышц // «Науки о человеке» – Сб. статей молодых ученых и специалистов. По мат. межд. конгр. «Научная молодежь на пороге XXI века» 18–19 мая 2000 г., Томск, СГМУ, с.88–89 (Соавт. Попов А.Г., Панов А.А., Бородин Ю.Л., Килин А.А.).
 24. Участие цГМФ в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц // «Проблемы нейрогуморальной регуляции физиологических функций висцеральных систем» – сб. тез. Докл. Конф., к 100–летию проф. Д.Я. Криницина. – Омск: ИВМ ОмГАУ, 2000.–120 с.: с.36–38 (Соавт. Ковалев И.В., Попов А.Г., Панов А.А., Баскаков М.Б., Медведев М.А. и др., всего 7 человек).
 25. Исследование эндотелий–зависимой регуляции сокращения гладких мышц легочной артерии кроликов // «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» – Материалы II Российской конференции молодых ученых России с международным участием. 24–28 апреля 2001, Москва, Том II, С.300 (Соавт. Носарев А.В.).
 26. Swelling-induced K(+) fluxes in vascular smooth muscle cells are mediated by charybdotoxin-sensitive K(+) channels // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2001; 11(6). – p. 295-310 (Rodriguez X., Grygorczyk R., Adragna N.C., Lauf P.K., Hamet P., Orlov S.N.)
 27. Внутриклеточные сигнальные системы в эпителий– и эндотелийзависимых процессах расслабления гладких мышц // *Успехи физiol. наук*,–2001, Т.32,

- №2, С.88–98 (Соавт. Капилевич Л.В., Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А.)
28. Особенности гистаминэргической регуляции гладких мышц легочных артерий кролика // *Бюлл. экспер. биол. и мед.*– 2001, Т.132.–№8. С.142–144 (Соавт. Капилевич Л.В., Носарев А.В., Баскаков М.Б., Дьякова Е.Ю., Ковалев И.В., Медведев М.А.).
 29. Swelling-induced K^+ influx in vascular smooth muscle cells (VSMC) is mediated by K_{Ca} channels and increased in SHR // (The 11th European Meeting on Hypertension, June 13–17, 2001. Milan, Italy). *Journal of Hypertension*. 2001, Vol. 19 (suppl 2), p. S247 (Afanasieva G., Postnov A.Y., Hamet P., Orlov S.N.)
 30. Реализация эффектов циклического гуанозинмонофосфата в гладкомышечных клетках // В сб. тез. докл. мат. IV Съезда физиологов Сибири с международным участием, Новосибирск, 2002– С.117. (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А., Капилевич Л.В., Панов А.А., и др., всего 9 человек).
 31. Особенности регуляции гладких мышц сосудистой стенки легочной артерии кролика // В сб. тез. докл. мат. IV Съезда физиологов Сибири с международным участием, Новосибирск, 2002– С.109 (Соавт. Капилевич Л.В., Носарев А.В., Дьякова Е.Ю., Ковалев И.В., Баскаков М.Б.).
 32. Влияние ингибиторов фосфодиэстераз циклических нуклеотидов на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток // *Бюлл. экспер. биол. и мед.*– 2002, т.133.–№1. С.47–50 (Соавт. Ковалев И.В., Попов А.Г., Баскаков М.Б., Капилевич Л.В., Медведев М.А. и др., всего 8 человек).
 33. Особенности адренэргической регуляции гладких мышц легочных артерий кролика // *Бюлл. экспер. биол. и мед.*–2002.–Т.133, №3.–С.254–256 (Соавт. Капилевич Л.В., Носарев А.В., Дьякова Е.Ю., Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А.).
 34. Исследование роли $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорта в регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки // Материалы третьего международного конгресса молодых учёных и специалистов – «Науки о человеке». Томск, 16–17 мая 2002, С. 159. (Соавт. Ю.Л. Бородин, Я.Д. Анфиногенова, И.Л. Миноченко, А.Г. Попов).
 35. Механизмы влияния осмотического давления среды на сократительную активность сосудистых гладких мышц // Материалы третьего международного конгресса молодых учёных и специалистов – «Науки о человеке». Томск, 16–17 мая 2002, С. 171. (Соавт. Я.Д. Анфиногенова, Ю.Л. Бородин, И.Л. Миноченко).
 36. Особенности регуляции гладких мышц сосудистой стенки легочной артерии кролика // *Пульмонология*. 12 нац. конгр. по болезням орг. дыхания,

- Москва, 11–15 ноября, 2002 г.–С.143 (Соавт. Капилевич Л.В., Носарев А.В., Дьякова Е.Ю., Ковалев И.В., Баскаков М.Б.).
37. Реализация эффектов гуанилатциклазы в гладкомышечных клетках // *Пульмонология*. 12 нац. конгр. по болезням орг. дыхания, Москва, 11–15 ноября, 2002 г.–С.119 (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А., Панов А.А., Бородин Ю.Л. и др., всего 9 человек).
 38. Inhibition of Na^+ , K^+ , 2Cl^- prevents vascular smooth muscle contraction in Na^+ - and Cl^- -depleted media // (The 19th scientific Meeting of the International Society of Hypertension, and 12th European Meeting on Hypertension, June 23–27, 2002. Prague, Czech Republic). *Journal of Hypertension* 2002, V. 20, Suppl.4.– P.S 280 (Kilin A., Kovalev I.V., Baskakov M., Orlov S.N.)
 39. Влияние буметанида, ингибитора Na^+ , K^+ , 2Cl^- котранспорта на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки // *Бюлл. exper. биол. и мед.*– 2003, Т.135.–№8. С.167–172 (Соавт. Ковалев И.В., Попов А.Г., Баскаков М.Б., Миноченко И.Л., Килин А.А. и др. всего 9).
 40. Исследование цГМФ–зависимых механизмов действия винпоцетина на гладкомышечные клетки // *Эксп. и клин. фармакол.* 2003. Т.66. №4.С. 25–28 (Соавт. Ковалев И.В., Попов А.Г., Баскаков М.Б., Килин А.А., Миноченко И.Л. и др. всего 9).
 41. Electrical and contractile function of vascular smooth muscle cells: regulation by cGMP–dependent mechanisms // (The 13th European Meeting on Hypertension, June 13–17, 2003. Milan, Italy). *Journal of Hypertension*. 2003, V.21, Suppl.4.– P.S101. (Kovalev I.V., Baskakov M., Kapilevich L., Panov A., Medvedev M.A. et al.).
 42. Excitation–contraction coupling in vascular smooth muscle: role of Na–K–Cl cotransport and anion channels // (The 13th European Meeting on Hypertension, June 13–17, 2003. Milan, Italy). *Journal of Hypertension*. 2003, Vol. 21, Suppl 4, S101 (Kilin A., Kovalev I., Baskakov M.B., Orlov S.N.).
 43. Vascular smooth muscle contraction in hyperosmotic medium: role of Ca^{2+} , anion channels and cell volume–sensitive Na–K–Cl cotransport // (The 13th European Meeting on Hypertension, June 13–17, 2003. Milan, Italy). *Journal of Hypertension*. 2003, Vol 21, Suppl 4, S94 (Kilin A, Kovalev I, Baskakov MB, Orlov SN.)
 44. Контрактильные реакции внутренней грудной и лучевой артерий в условиях *in vitro* // Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц: Материалы симп. Под ред. М.А. Медведева, М.Б. Баскакова. – Томск, 2004 – С. 80–82 (Соавт. Килин А.А., Баскаков М.Б., Ковалев И.В., Бородин Ю.Л., Мамчур С.Е. и др., всего 7 человек).

45. NO–зависимая регуляция $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта и хлорной проводимости мембраны гладкомышечных клеток // Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц: Материалы симп. Под ред. М.А. Медведева, М.Б. Баскакова – Томск, 2004 – С. 42–45 (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Бородин Ю.Л., Килин А.А., Миноченко И.Л., Попов А.Г. и др., всего 9 человек)
46. Роль $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта и внеклеточного Ca^{2+} в сокращении гладких мышц аорты крысы в моделях стрикции и набухания клеток // Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц: Материалы симп. / Под ред. М.А. Медведева, М.Б. Баскакова. – Томск, 2004 – С. 50–53 (Соавт. Баскаков М.Б., Безменова М.А., Ковалев И.В., Килин А.А., Миноченко И.Л., Орлов С.Н. и др., всего 8 человек).
47. Excitation–contraction coupling in vascular smooth muscle under hyposmotic challenge: role of $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransport, extracellular calcium, and anion channels // Biological Motility. International Symposium, May 23–June 1, 2004. Pushchino, Russia 2004.–P.22. (Baskakov, M., Medvedev M.A., Kovalev I.V., Borodin Y.L., Kilin A.A. et al.)
48. cGMP–dependent mechanisms in regulation of electric and contractile activity in smooth muscles // Biological Motility. International Symposium, May 23–June 1, 2004. Pushchino, Russia 2004.–P.131. (Kovalev I.V., Baskakov M., Kilin A.A., Nosarev A.V., Borodin Y.L. et al.)
49. Peculiarities of contractile regulation of vascular smooth muscle in rabbit pulmonary artery // Biological Motility. International Symposium, May 23–June 1, 2004. Pushchino, Russia 2004.–P.142. (Nosarev A.V., Kapilevich L.V., Dyakova E.Y., Kovalev I.V., Baskakov M.B.)
50. The regulation of mechanical tension of pulmonary artery smooth muscle by α – and β –adrenoreceptor agonists // *Pulmonology*. 2004.–Suppl.–P.102. 3rd Congress of European Region International Union against Tuberculosis and Lung Diseases (IUATLD). June 22–26 2004. Moscow, Russia (Nosarev A.V., Kapilevich L.V., Dyakova E.Y., Kovalev I.V., Baskakov M.B.)
51. Cell shrinkage–induced vascular smooth muscle contraction: role of Na–K–2Cl cotransport, intracellular Cl^- and L–type of Ca^{2+} channels // (The 14th European Meeting on Hypertension, June 13–17, 2004. Paris, France). *Journal of Hypertension* 2004, Vol. 22, Suppl. 2, P.S44 (Kilin A., Kovalev I., Baskakov M.B., Dulin N.O., Orlov S.N.)
52. Cell shrinkage–induced vascular smooth muscle contraction: role of $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransport, intracellular Cl^- and L–type Ca^{2+} channels // *Pflugers Arch – Eur J Physiol*. 449: 42–55, 2004. (Baskakov M.B., Kovalev I.V., Kilin A.A., Dulin N.O., Orlov S.N.)

53. Cell volume–dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransport and L–type Ca^{2+} channels // (Canadian Cardiovascular Congress, Calgary, Alberta, October 23–27, 2004). *Can. J. Cardiol.* 2004;20 (suppl. D):57D (Baskakov M.B., Kovalev I.V., Kilin A.A., Dulin N.O., Orlov S.N)

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГМ – гладкие мышцы

ГМК – гладкомышечная клетка

КЛЦМ – киназа легких цепей миозина

Ca^{2+}_i – внутриклеточные ионы хлора

ФАВ – физиологически активные вещества

ЭГТА – этиленгликоль-бис-(α -аминоэтиловый эфир)- N,N,N',N' -тетрауксусная кислота

$[Cl^-]_i$ – внутриклеточная концентрация ионов хлора

Cl^-_i – внутриклеточные ионы хлора

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

Na^+_i – внутриклеточные ионы натрия

НКСС – $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорт

RVI – regulatory volume increase (регуляторное увеличение объема)

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

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии ГОУ ВПО СибГМУ

Подписано к печати 17.04.05.

Заказ № 100

Тираж 100 экземпляров