

На правах рукописи

**Миноченко Игорь Леонидович**

**Роль  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспорта и хлорной  
проводимости мембраны в регуляции  
электрической и сократительной активности  
гладкомышечных клеток мочеточника  
морской свинки**

03.00.13- физиология

03.00.02- биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

ТОМСК – 2005

**Работа выполнена в государственном образовательном  
учреждении высшего профессионального образования  
«Сибирский государственный медицинский университет»  
Федерального агентства по здравоохранению и социальному  
развитию Российской Федерации**

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук,  
профессор  
доктор медицинских наук

**Баскаков Михаил Борисович  
Ковалев Игорь Викторович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор  
доктор биологических наук,  
профессор

**Байков Александр Николаевич  
Евдокимов Евгений Васильевич**

**Ведущая организация:**

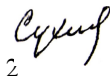
**ГУ НИИ физиологии СО РАМН, г. Новосибирск**

Защита состоится " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2005 г. в \_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 в Сибирском  
государственном медицинском университете (634050, г. Томск,  
Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Сибирского  
медицинского университета (г. Томск, проспект Ленина, 107).

Автореферат разослан " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2005 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

  
2

**Суханова Г. А.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Изменение внутриклеточной концентрации ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) является ключевым звеном в цикле сокращение-расслабление гладких мышц (ГМ) [Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г., 1988; Баскаков М.Б. с соавт., 1988-2001; Ткачук В.А., 1998; Kuriyama H. e.a., 1998]. В физиологических условиях этот процесс инициируется взаимодействием биологически активных веществ (БАВ) с соответствующими рецепторами гладкомышечных клеток (ГМК), в результате чего происходит открывание рецептор-управляемых, а затем и потенциал-зависимых кальциевых каналов [Шуба М.Ф., Бурый В.А., 1984; Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г., 1988; Kuriyama H. e.a., 1998].

Длительное время считалось, что в основе электрогенеза ГМК лежат изменения проводимости мембраны к ионам кальция, калия и натрия [Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г., 1988]. В последние годы пристальное внимание уделяется хлорным токам [Duan D. e.a., 1997-1999; Chipperfield A., Harper A., 2000; Lamb F. e.a., 2000].

Известно, что распределение ионов хлора между внешней средой и цитоплазмой ГМК далеко от равновесного и основной ион-транспортной системой, обеспечивающей поддержание неравновесного электрохимического потенциала этих анионов в ГМК, является  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт [Шуба М., Кочемасова Н., 1988; Kuriyama H., e.a., 1998; Akar F., O'Neill W. e.a., 2001]. В настоящее время появляются свидетельства того, что электронейтральные ионные транспортеры, такие как  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  и  $\text{K}^+, \text{Cl}^-$ -котранспорт могут вносить важный вклад в регуляцию электрической и сократительной активности ГМК. Отличительной особенностью последних является чувствительность к изменениям объема клеток, а основной функцией – регуляция их объема и поддержание гомеостаза моновалентных ионов [Adragna N. e.a., 2000; Akar F. e.a., 1999-2001; Russell J., 2000]. Для ГМК это свойство ионных транспортеров имеет особую значимость, поскольку благодаря высокому отношению площади поверхности мембраны к объему клетки при большой плотности ионных каналов каждый цикл активации сопровождается изменением осмолярности цитоплазмы и, соответственно, ее объема. Наряду с этим, при сокращении ГМК способны укорачиваться более чем наполовину от длины, обеспечивающей максимальное сокращение, и, таким образом, существенно изменять свой объем. Предпосылки для значительных изменений объема ГМК в нормальных условиях имеются и в связи с особенностями пространственной и структурной организацией цитоскелета. Все это дает основание предполагать, что объем-чувствительный ионный транспорт вовлечен в регуляцию электрической и сократительной активности ГМК, а также чувствительности и реактивности гладких мышц к действию БАВ.

Действительно, было показано, что в сегментах и культурах ГМК сосудов  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт активируется при действии вазоконстрикторов. Напротив, ингибирование этого переносчика наблюдается под влиянием

вазодилататоров, стимулирующих цАМФ- и цГМФ-опосредованные сигнальные системы [Adragna N. e.a., 1999, 2000, 2002]. Активация цАМФ-опосредованной сигнальной системы сопровождается стрикцией ГМК аорты крысы [Orlov S. e.a., 1996].

Вместе с тем, регуляторные механизмы, используемые клетками с участием этого транспортера, малоизученны, хотя предполагается, что влияние модуляции  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта на функцию ГМК реализуется через хлорные токи ГМК. [Dayue D. e.a., 1995; Chipperfield A., Harper A., 2000; Ковалев И. с соавт., 2004; Anfinogenova Y. e.a., 2004].

В кардиомиоцитах установлено наличие, по меньшей мере, 7 типов хлорных каналов [Joseph R. e.a., 2000]. В ГМК показано присутствие объем-чувствительных,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых, потенциал-зависимых и других хлорных каналов [Chipperfield A., 2000]. Роль хлорных токов в регуляции сопряжения-возбуждения в ГМК мочеоточника не исследовалась. Нет достаточной ясности и в вопросах, связанных с участием вторичных мессенджеров в регуляции активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и хлорной проводимости мембраны ГМК. Так, существующие сведения о наличии цГМФ- и цАМФ-зависимых механизмов угнетения  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и хлорной проводимости мембраны, встречают весьма аргументированное возражение о том, что в основе этого процесса может лежать антагонизм во взаимодействии кальциевой сигнальной системы и циклических нуклеотидов [Waniishi Y. e.a., 1998; Zhang Y. e.a., 1998].

Механизмы действия агонистов  $\text{H}_1$ -гистаминэргических и  $\alpha_1$ -адренэргических рецепторов на электрические и сократительные свойства ГМК на протяжении трех десятилетий привлекают внимание исследователей. Это обусловлено, во-первых, важной ролью, которую эти БАВ играют в регуляции многих физиологических и патофизиологических процессов в гладкомышечных органах; во-вторых, несмотря на большой экспериментальный материал, позволяющий создать общие представления о механизмах действия этих соединений на электрические и сократительные свойства ГМК, ряд вопросов не нашел удовлетворительного решения. Так, до настоящего времени нет достаточной ясности в понимании вклада различных фракций внеклеточного и внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , а также отдельных компонентов ионной проводимости мембраны в механизмы регуляции агонистами  $\text{H}_1$ -гистамино- и  $\alpha_1$ -адренорецепторов электрогенеза и сокращений ГМК [Cheranov S., 2002; Yashiro Y., 2003]. В наибольшей мере это относится к хлорной проводимости мембраны ГМК [Fuller C., Benos D. e.a., 1998; Lovgren F., Triggie C., 1998; Zhang Y. e.a., 1998; Chipperfield A., 2000].

Названные проблемы, имеющие важное значение для понимания фундаментальных механизмов регуляции функции гладкомышечных органов и сосудов, являются актуальными и для создания теоретико-экспериментальной базы для разработки новых принципов коррекции патологических синдромов, связанных с нарушением функции гладкомышечных образований. Повышение сократительной активности ГМК, опосредованное  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспортом и хлорной проводимостью мембраны, может лежать в основе развития эссенциальной гипертензии, что подтверждается увеличением экспрессии

соответствующих генов у линии гипертензивных крыс [Davis J. e.a., 1993; Jiang G. e.a., 2003], а также быть причиной спастических состояний органов, сформированных гладкими мышцами, при нарушениях водно-солевого обмена и метаболических сдвигах в организме.

**Целью исследования** явилось изучение роли  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и хлорной проводимости мембраны гладкомышечных клеток в механизмах регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц мочеоточника морской свинки.

### **Задачи исследования**

1. Изучить роль  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта в генерации потенциалов действия и сокращений гладкомышечных клеток мочеоточника.
2. Изучить вклад хлорной проводимости мембраны в электрогенез и сокращения гладкомышечных клеток мочеоточника.
3. Исследовать влияние объем-зависимой активации и ингибирования  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта на электрические и сократительные свойства гладкомышечных клеток мочеоточника.
4. Оценить влияние изменений внутриклеточного содержания цГМФ и цАМФ на активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и хлорную проводимость мембраны гладкомышечных клеток мочеоточника морской свинки.
5. Изучить роль ионов кальция, содержащихся в саркоплазматическом ретикулуме, в регуляции хлорной проводимости мембраны гладкомышечных клеток мочеоточника.
6. Исследовать роль  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта в механизмах действия мезатона и гистамина на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеоточника.
7. Исследовать роль хлорной проводимости мембраны в механизмах действия исследуемых биологически активных веществ на электрические и сократительные свойства гладкомышечных клеток мочеоточника.

### **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ**

1. В генерации потенциалов действий и сокращений гладкомышечных клеток мочеоточника морской свинки существенная роль принадлежит  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорту и хлорным токам.
2. Гипер- и изоосмотическая стрижия ведет к усилению сокращений ГМК мочеоточника в ответ на действие деполяризующего тока, тогда как их набухание вызывает противоположный эффект. Эти эффекты опосредованы модуляцией  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и изменением хлорных токов мембраны гладкомышечных клеток.
3. цГМФ увеличивает чувствительность гладкомышечных клеток к действию буметанида, но снижает эффекты блокирования хлорных каналов.
4. Основная роль в активации кальций-зависимых хлорных токов принадлежит ионам кальция, входящим в клетки во время потенциала действия.
5. Стимуляция гистамином и мезатоном потенциалов действия и сокращений гладкомышечных клеток мочеоточника морской свинки связана с активацией  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта.

6. Возбуждение  $H_1$ -гистаминэргических и  $\alpha_1$ -адренэргических рецепторов повышает кальций-зависимую хлорную проводимость мембраны.

### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА**

Впервые показано, что  $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорт и хлорные токи играют важную роль в генерации потенциалов действия и сокращений гладкомышечных клеток мочеточника. Впервые выявлено, что влияние изменений объема клеток на электрогенез и сокращения ГМК мочеточника опосредовано модуляцией  $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорта и хлорных токов мембраны этих клеток. Впервые установлено, что повышение нитропруссидом натрия внутриклеточной концентрации цГМФ увеличивает вклад  $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорта в генерацию потенциалов действий и сокращений ГМК мочеточника, но ведет к снижению хлорной проводимости мембраны. Впервые показано, что кальций, депонированный в саркоплазматическом ретикулуме, и цАМФ не играют существенной роли в регуляции хлорной проводимости мембраны ГМК мочеточника морской свинки.

Впервые установлено, что в реализации влияния гистамина и мезатона на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника морской свинки участвует  $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорт и хлорная проводимость мембраны. Усиление входящего хлорного тока под влиянием этих БАВ связано с активацией  $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорта.

### **НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

Полученные данные являются вкладом в развитие фундаментальных представлений о механизмах сопряжения возбуждения-сокращения в ГМК. Результаты исследования дополняют существующие знания о путях регуляции биологически активными веществами тонуса гладких мышц. Приоритетные данные о роли анион-транспортирующих систем и способах их участия в механизмах регуляции функции ГМК открывают перспективные подходы для разработки новых принципов коррекции патологических синдромов, связанных с нарушением сократительной функции гладкомышечных образований.

Основные положения работы используются в курсах лекций, читаемых на кафедре биофизики и функциональной диагностики и кафедре нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета, кафедре физиологии человека и животных Томского и Кемеровского государственных университетов. Методические приемы и полученные данные используются в научных исследованиях, проводимых на кафедре биофизики и функциональной диагностики, кафедре нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета. Области применения полученных данных являются физиология, биофизика, фармакология.

### **Апробация работы**

Основные результаты диссертации обсуждены на XII, XIII национальных конгрессах по болезням органов дыхания (Москва, 2002, 2003); на XIX съезде Всероссийского физиологического общества им. И.П. Павлова (Екатеринбург, 2004); на II, III, IV, V конгрессах молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2001, 2002, 2004, 2005), II Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых медиков с международным участием (Владивосток, 2001), IV съезде физиологов Сибири с международным участием (Новосибирск, 2002), 13 Европейском съезде по гипертензии (Милан, Италия, 2003), симпозиуме с международным участием «Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц» (Томск, 2004), на международном симпозиуме “Biological Motility. International Symposium” (Pushchino, Russia, 2004), V Сибирском физиологическом съезде (Томск, 2005).

Основные результаты диссертации опубликованы в 19 печатных работах, в т.ч. 9 – в центральной и зарубежной печати.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы собственных результатов и их обсуждения и заключения. Библиография включает 306 ссылок, в том числе 84 – на работы отечественных авторов и 222 – зарубежных. Работа иллюстрирована 18 рисунками и включает 2 таблицы.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объектом исследования** служили изолированные препараты гладких мышц мочеочечника морской свинки. Из очищенных от соединительной ткани мочеочечников нарезались сегменты длиной 10-12 мм.

Для одновременной регистрации электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток использовалась методика двойного сахарозного моста [Артеменко Д.П. с соавт., 1964]. Раствор сахарозы в концентрации 0,3 М готовился на основе деионизированной воды с удельным сопротивлением не ниже 15 МОм·см.

Отведение электрических потенциалов проводили с помощью неполяризующихся электродов. Механическое напряжение (МН) гладкомышечных препаратов регистрировали механотроном 6MX2Б в условиях, близких к изометрическим.

Отводимые сигналы после усиления подавались на АЦП (32 канала, разрядность -12 бит, отношение сигнал/шум - 70 дБ, частота дискретизации -2 кГц) и обрабатывались с помощью IBM PC.

В качестве контрольных (100%) служили значения амплитуды анэлектротонического потенциала (АЭП), параметров потенциала действия (амплитуда пикового компонента и длительность плато) и амплитуды сокращения ГМК в растворе Кребса в ответ на электрический стимул.

Результаты исследований обрабатывались методом вариационной статистики. Для оценки достоверности различий парных выборок использовались критерии t-Стьюдента и Колмогорова-Смирнова.

### **Используемые растворы:**

Раствор Кребса (в mM): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; трис(оксиметил)-аминометана – 15,5; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; глюкозы – 11,5. pH растворов поддерживался в пределах 7,35 – 7,40; температура – 37±0,1° С.

Модифицированные растворы Кребса:

1. Гиперосмотический раствор (466,4 мОсм), получаемый добавлением 150 mM сахарозы.
2. Гипоосмотический раствор (212 мОсм) с концентрацией NaCl 70 mM.
3. Тестирующие растворы готовились на основе раствора Кребса и его модификаций с добавлением соответствующих реактивов.

**Используемые реактивы:** сахароза, фенилэфрин (мезатон), гистамина гидрохлорид (все – Россия), нитропруссид натрия, буметанид, тапсигаргин (все – Sigma); нифлумовая кислота, форсколин, SITS (4-acetoamido-4'-isothiocyano stilbene-2,2'-disulfonic acid), тетраэтиламмония хлорид (все – Serva).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Влияние ингибитора Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup>-котранспорта буметанида на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника морской свинки**

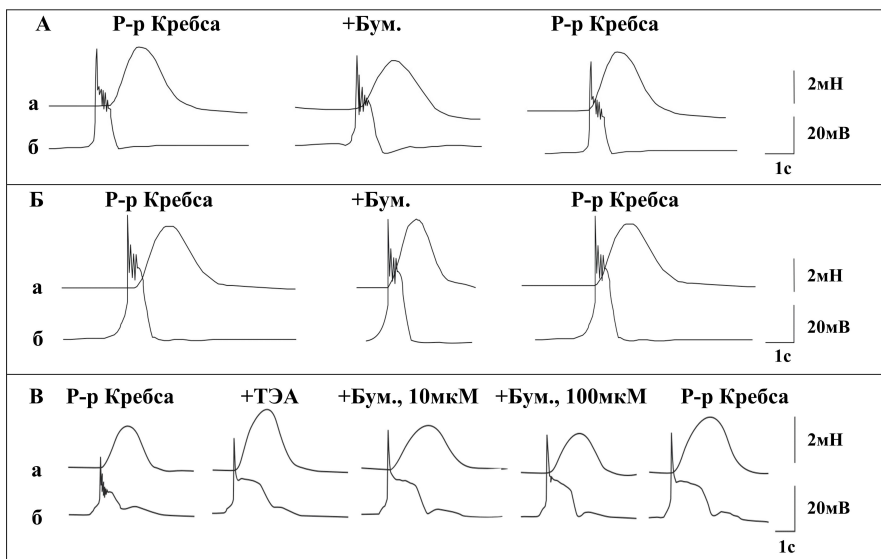
Участие Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup>-котранспорта в электрогенезе и сокращениях ГМК мочеточника изучалось с использованием селективного ингибитора этого транспортера буметанида [Orlov S. e.a., 1996].

После 40 мин инкубации в нормальном растворе Кребса в ответ на электрический стимул регистрировались типичные для ГМК мочеточника морской свинки потенциалы действия (ПД), состоящие из пикового компонента, осцилляций и плато, сопровождаемые сокращениями (Рис.1А).

Буметанид в концентрации 10 мкМ на 8-10 мин вызывал гиперполяризацию мембраны и достоверное снижение силы сокращений ГМК мочеточника морской свинки до 85,5±3,6% (n=10, p<0,05) от исходных значений в растворе Кребса. Усиление деполяризующего тока не приводило к восстановлению исходной силы сокращений исследуемых гладких мышц. При действии буметанида показатели электрической активности ГМК (амплитуда анэлектротонического потенциала, амплитуда и длительность плато потенциала действия) не изменялись (Рис.1А).



Буметанид в более высоких концентрациях (50–100 мкМ) не оказывал влияния на параметры электрической и сократительной активности ГМК мочеточника морской свинки (Рис.1Б).



**Рис.1.** Влияние буметанида на электрическую (б) и сократительную (а) активность ГМК мочеточника морской свинки:

**А** – действие 10 мкМ буметанида (+Бум.);

**Б** – действие 100 мкМ буметанида (+Бум.);

**В** – тоже, что А и Б, но на фоне 5 мМ тетраэтиламмония (+ТЭА)

Справа калибровочный сигнал и отметка времени.

Известно, что в большинстве ГМК гиперполяризация мембраны может быть обусловлена усилением калиевой проводимости мембраны [Шуба М.Ф., Бурый В.А., 1984; Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г., 1988; Kuriyama H. e.a., 1998]. Для выявления ионной природы влияния буметанида на электрическую и сократительную активность использовался блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЭА) [Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г., 1982; Шуба М.Ф., Бурый В.Г., 1984].

Так как на фоне 5 мМ ТЭА эффекты ингибитора  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта сохранялись (Рис.1В), можно предположить, что гиперполяризация мембраны ГМК мочеточника не связана с калиевой проводимостью.

В свою очередь, действие буметанида может вызывать изменение процессов перераспределения ионов хлора при угнетении активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта. Отсутствие при этом значимых изменений параметров вызванных ПД может быть обусловлено низкой базальной активностью  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта в ГМК, на что указывают ряд авторов

[Orlov S. e.a., 1996; O'Neill W. e.a., 2001]. В связи с этим, можно предположить, что угнетение сокращений при действии буметанида обусловлено уменьшением внутриклеточной концентрации хлора и влиянием на сократительный аппарат ГМК без существенных нарушений электрогенеза клеток [Davis J. e.a., 2000; Lamb F. e.a., 2000].

Ослабление действия буметанида с увеличением его концентрации может быть связано с вовлечением неселективных эффектов этого соединения. Действительно, имеются данные, подтверждающие селективность ингибитора к изучаемому виду котранспорта в концентрациях не превышающих 10 мкМ [Adragna N. e.a., 2000-2002].

В следующих сериях экспериментов изучались эффекты активации и ингибирования  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта изменением объема клеток.

## **2. Влияние гипер- и изоосмотической стрикции на потенциал действия и сокращение гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки**

Изменение осмолярности среды инкубации является эффективным методическим подходом для модуляции объем-чувствительного ионного транспорта и выяснения роли систем поддержания постоянства клеточного объема в регуляции клеточных функций. Использование этого приема позволяет влиять на активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта без использования фармакологических средств и химических соединений [Akar F. e.a., 1999, 2001; Adragna N. e.a., 2000; Russell J., 2000; Anfinogenova Y. e.a., 2004].

Электрическая и сократительная активность ГМК мочеточника исследовалась в моделях гиперосмотической и изоосмотической стрикции, гипоосмотического набухания клеток.

### **2.1. Влияние гиперосмотического раствора на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток**

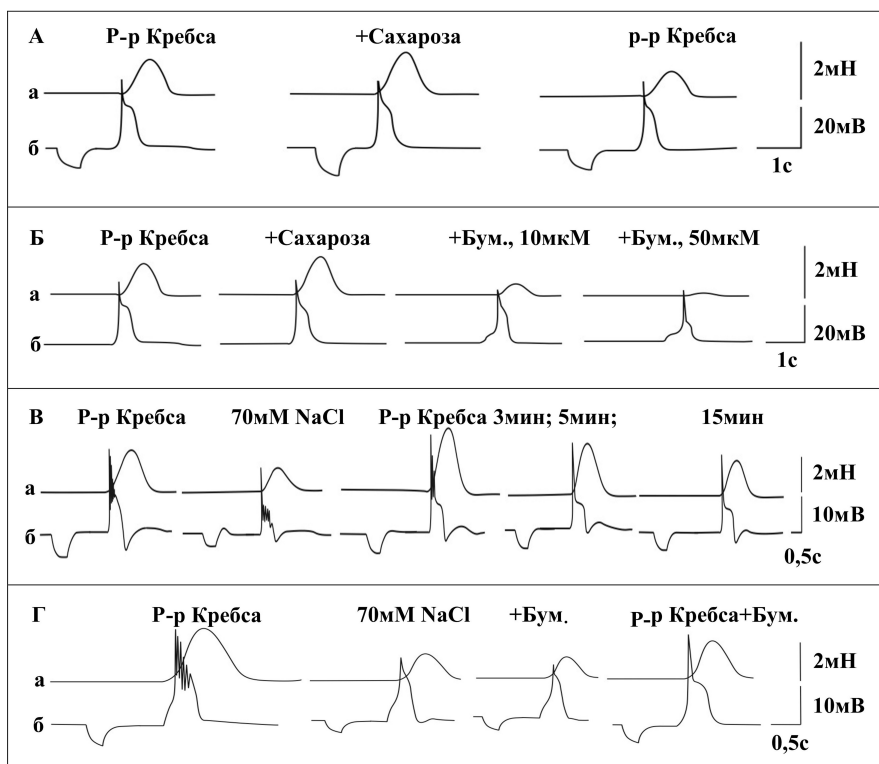
Для активации  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта использовался модифицированный раствор Кребса, содержащий 150 мМ сахарозы в качестве непроникающего осмолита (осмолярность 466,4 мОсм) [Adragna N. e.a., 2000, 2004].

В гиперосмотической среде происходило повышение механического напряжения гладких мышц мочеточника. Амплитуда вызванных деполяризующим током сокращений ГМК мочеточника увеличивалась до  $132,3 \pm 5,9\%$  ( $n=10$ ,  $p<0,01$ ) в сравнении с контролем в нормальном растворе Кребса. Амплитуда анелектрогенных потенциалов возрастала до  $125 \pm 6\%$ , при неизменных параметрах потенциала действия (Рис.2А).

Предобработка гладкомышечных препаратов буметанидом (10 мкМ) не только подавляла активацию сократительного ответа ГМК мочеточника гиперосмотическим раствором, но и снижала амплитуду сокращений, вызванных деполяризующим током, до  $42 \pm 10\%$ , относительно контроля в нормальном растворе Кребса ( $n=11$ ,  $p<0,01$ ).

Добавление 10 мкМ буметанида к гиперосмотической среде приводило к снижению амплитуды сократительного ответа до  $35 \pm 10\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ), а

увеличение его концентрации до 50 мкМ –  $15 \pm 5\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ) от контрольных значений в растворе Кребса (Рис.2Б).



**Рис.2.** Влияние гетероосмотических растворов на электрическую (б) и сократительную (а) активность ГМК мочеточника морской свинки:

**А** – действие гиперосмотического раствора с добавлением 150 мМ сахарозы к раствору Кребса (+Сахароза);

**Б** – то же, что и А, но при добавлении 10 и 50 мкМ буметанида (+Бум.);

**В** – действие гипоосмотического раствора с пониженным содержанием NaCl (70 мМ NaCl);

**Г** – то же что и В, но при добавлении 50 мкМ буметанида (+Бум.)

Остальные обозначения, те же, что и на рис.1.

Эти данные свидетельствуют о том, что активация вызванных деполяризующим током сокращений ГМК мочеточника морской свинки при гиперосмотической стрикции клеток обусловлена стимуляцией  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспорта в гиперосмотической среде.

## 2.2. Влияние гипоосмотического раствора Кребса на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток

В гипоосмотической среде, полученной за счет снижения содержания в растворе Кребса NaCl до 70 мМ (осмолярность 212 мОсм), на фоне деполаризации мембраны наблюдалось кратковременное увеличение механического напряжения ГМК мочеточника морской свинки, исчезающее к 10-12 мин. К 15 мин инкубации в гипоосмотической среде, наблюдалась гиперполяризация мембраны, уменьшение амплитуды анэлектронических потенциалов, ПД и сокращений: до  $81 \pm 15\%$ ,  $55 \pm 10,5\%$  и  $45,2 \pm 9,3\%$  ( $n=8$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно контроля в нормальном растворе Кребса (Рис.3В). Достоверных изменений продолжительности плато ПД зарегистрировано не было.

В многочисленных исследованиях показано, что снижение осмолярности омывающего раствора оказывает ингибирующее действие на активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта сосудистых и эпителиальных клеток [O'Neill W., 1997; Akar F. e.a., 1999, 2001; Russell J., 2000].

Можно полагать, что угнетение электрической и сократительной активности ГМК мочеточника при длительной инкубации клеток в гипоосмотической среде обусловлено уменьшением входящих хлорных токов вследствие подавления  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и снижения электрохимического потенциала для ионов хлора. Предшествующий этому кратковременный прирост механического напряжения ГМК мочеточника может быть вызван транзиторным увеличением хлорного тока из-за начального повышения электрохимического потенциала ионов хлора в результате уменьшения их наружной концентрации.

Нормализация осмолярности омывающего раствора при перфузии препаратов нормальным раствором Кребса приводила к восстановлению исходных показателей электрической и сократительной активности ГМК. Однако этому процессу на 2-3 мин в нормальном растворе Кребса предшествовало транзиторное увеличение амплитуды ПД и сокращений ГМК мочеточника до  $110 \pm 7\%$  и  $145 \pm 14\%$  ( $n=12$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно контрольных значений в растворе Кребса. Предобработка 10 мкМ буметанида достоверно снижала это активирующее влияние отмывания (Рис.2Г). Амплитуда ПД и сокращений при этом составляли  $95 \pm 15\%$  и  $102 \pm 11\%$  ( $n=10$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно контроля в отсутствии ингибитора  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта.

Такая динамика изменений электрической и сократительной активности ГМК обусловлена, по-видимому, следующим. При перфузии гладкомышечных препаратов гипоосмотическим раствором происходит потеря внутриклеточных осмолитов [Mongin A., Orlov S., 2001]. После возвращения гладкомышечного препарата в нормальный раствор Кребса происходит уменьшение объема клеток, так называемая изоосмотическая стрикция [O'Neill W., 1997; Akar F. e.a., 1999, 2001; Russell J., 2000; Anfinogenova Y. e.a., 2004]. Нормализация ионного состава перфузионного раствора ведет к резкой транзиторной активации  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта, что является одним из основных механизмов регуляторного восстановления объема сосудистых ГМК [Mongin A., Orlov S., 2001]. Эффект активации

$\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта, как механизма регуляторного восстановления объема клеток, проявлялся в транзиторном увеличении амплитуды ПД и сокращений.

Эти данные позволяют заключить что, во-первых,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт играет важную роль в регуляции электрогенеза и сокращений ГМК мочеточника, и данные о том, что предобработка буметанидом значительно снижала активирующее влияние гипер- и изосоосмотической стрикции на сокращения (Рис.2Г), являются еще одним свидетельством в пользу такого положения.

Во-вторых, опосредованная стрикцией стимуляция  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта, приводит к усилению сокращений ГМК мочеточника в ответ на действие деполяризующего тока, тогда как угнетение  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта при их набухании вызывает противоположный эффект.

Для выяснения механизмов, используемых клетками с участием  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта, изучалась роль хлорной проводимости мембраны в электрогенезе и сокращениях ГМК мочеточника.

### **3. Изучение роли хлорной проводимости мембраны в электрогенезе и сокращениях гладкомышечных клеток мочеточника**

Блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых хлорных каналов нифлумовая кислота (НК) в концентрации 10 мкМ, к 15-20 мин вызывал уменьшение амплитуды пикового компонента ПД и сокращения ГМК мочеточника до  $90,5 \pm 7,9\%$  и  $77,5 \pm 9,9\%$  ( $n=11$ ,  $p<0,05$ ) соответственно, относительно исходных значений в нормальном растворе Кребса. При увеличении концентрации НК до 50 мкМ амплитуда ПД и сокращений уменьшались до  $87,4 \pm 11\%$  и  $50,8 \pm 15\%$  относительно контроля в нормальном растворе Кребса ( $n=15$ ,  $p<0,01$ ) (Рис.3А). В концентрации 100 мкМ НК значительно угнетала ПД и сократительный ответ: амплитуда ПД и сократительного ответа при этом составляли  $52,5 \pm 4,7\%$  и  $32,6 \pm 5,8\%$  ( $n=15$ ,  $p<0,01$ ), соответственно, относительно контрольных значений в растворе Кребса (Рис.3Б).

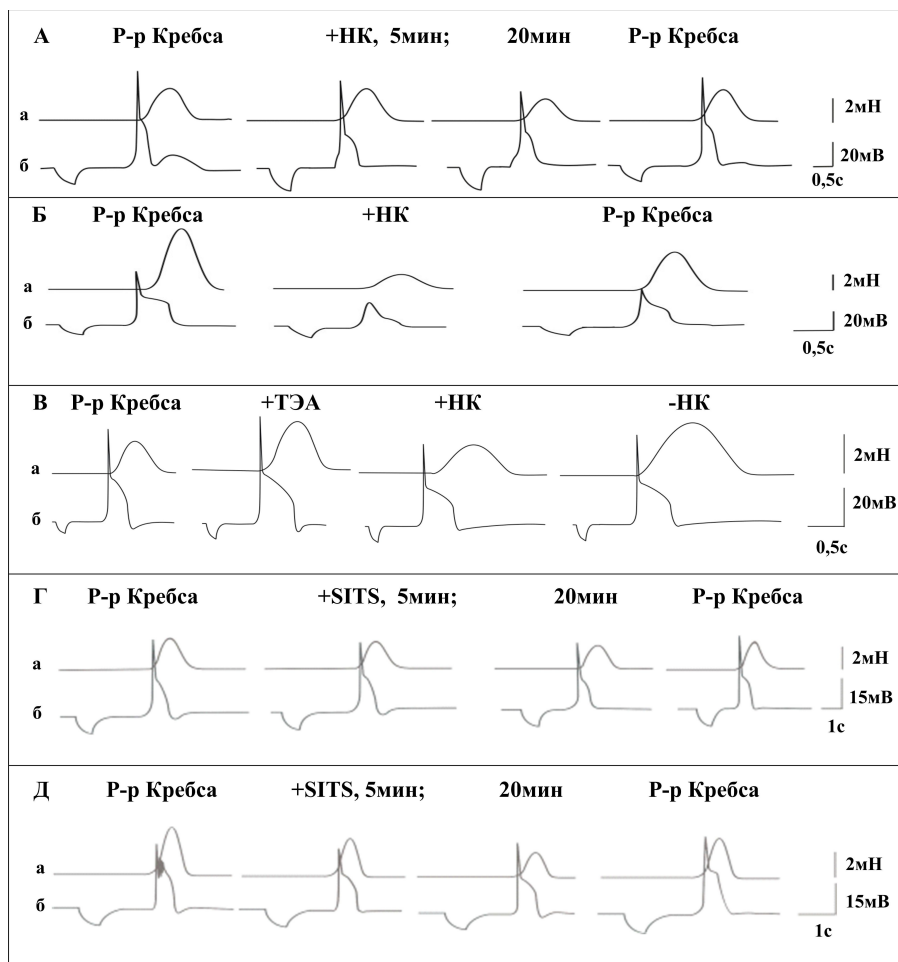
Описанные эффекты НК имели обратимый характер и все оцениваемые параметры электрической и сократительной активности ГМК восстанавливались практически до исходных значений после 20-30 мин отмывания в нормальном растворе Кребса.

Наблюдаемое при действии нифлумовой кислоты увеличение амплитуды АЭП ( $115 \pm 7\%$ ,  $n=15$ ,  $p<0,05$  относительно контроля в растворе Кребса) свидетельствует о повышении сопротивления мембраны.

Действие блокатора объем-чувствительных хлорных каналов SITS на ПД и сокращения ГМК мочеточника было менее выраженным, чем НК. Так в концентрации 50 мкМ амплитуда ПД и сокращений снижались до  $91,5 \pm 5,4\%$  и  $84,5 \pm 5,2\%$  ( $n=9$ ,  $p<0,05$ ), соответственно (Рис.3Г), что составило  $92 \pm 2,2\%$  и  $60,4 \pm 4,1\%$  от эффекта 50 мкМ нифлумовой кислоты ( $p<0,05$ ).

Увеличение содержания SITS до 100 мкМ вызывало снижение амплитуды сократительного ответа до  $58,5 \pm 6,5\%$  ( $n=9$ ,  $p<0,05$ ) относительно

контрольных значений в нормальном растворе Кребса, и  $52 \pm 4,2\%$  относительно эффектов 100 мкМ нифлумовой кислоты (Рис.3Д).



**Рис.3.** Влияние блокаторов хлорных каналов нифлумовой кислоты и SITS на электрическую (б) и сократительную (а) активность ГМК мочеточника морской свинки:

**А** – влияние 50 мкМ нифлумовой кислоты (+HK);

**Б** – влияние 100 мкМ нифлумовой кислоты (+HK);

**В** – то же, что и А, но на фоне 5 мМ тетраэтиламмония (ТЭА);

**Г** – влияние 50 мкМ SITS (+SITS);

**Д** – влияние 100 мкМ SITS (+SITS).

Остальные обозначения, те же, что и на рис.1

Для выявления возможной роли калиевой компоненты проводимости мембраны в развитии вышеописанных эффектов, использовался блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЭА). При добавлении 5 мМ ТЭА развивалась характерная для него активация электрической и сократительной активности ГМК: амплитуда ПД составляла  $121 \pm 9\%$ , длительность плато ПД  $-216 \pm 23\%$ , амплитуда сокращений  $157 \pm 18\%$  ( $n=13$ ,  $p<0,01$ ) относительно контрольных значений в растворе Кребса.

Нифлумовая кислота (50 мкМ) на фоне действия ТЭА угнетала ПД и сокращения до  $87,1 \pm 2,6\%$  и  $77,5 \pm 7,9\%$  ( $n=9$ ,  $p<0,01$ ), соответственно, относительно контрольных значений в ТЭА-содержащем растворе (Рис.3В). Следовательно, в присутствии блокатора калиевых каналов НК продолжала оказывать свое угнетающее действие на ПД и сокращения ГМК. ГМК мочеточника.

Таким образом, уменьшение блокаторами хлорной проводимости мембраны приводит к снижению как электрической, так и сократительной активности ГМК мочеточника. Это свидетельствует о существенной роли хлорной проводимости мембраны в формировании ПД и генерации сокращений исследуемых гладкомышечных клеток.

#### **4. Изучение роли хлорной проводимости мембраны в механизмах реализации эффектов модуляции $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $2\text{Cl}^-$ -котранспорта**

Для исследования роли хлорной проводимости мембраны в механизмах реализации эффектов модуляции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспорта использовались блокаторы хлорных каналов нифлумовая кислота и SITS. В гиперосмотической среде, полученной добавлением 150 мМ сахарозы в нормальный раствор Кребса, блокаторы хлорных каналов проявляли более выраженное угнетающее действие на ПД и сокращение ГМК, чем в контроле.

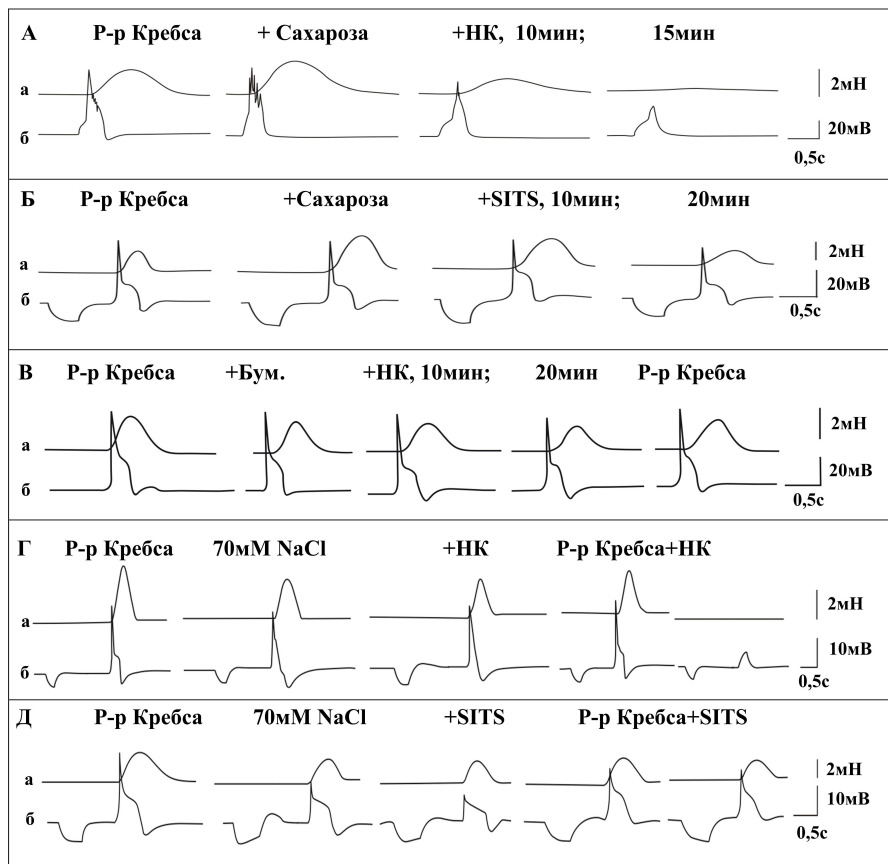
Добавление 50 мкМ нифлумовой кислоты в гиперосмотический раствор вызывало снижение амплитуды ПД и сократительного ответа до  $40 \pm 5,4\%$  и  $10 \pm 3,6\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно контроля в нормальном растворе Кребса (Рис.4А). Этот угнетающий эффект нифлумовой кислоты был выше, чем в изотонических условиях, где амплитуда ПД и сокращений уменьшались лишь до  $87,4 \pm 11\%$  и  $50,8 \pm 15\%$  относительно контроля в растворе Кребса ( $n=15$ ,  $p<0,01$ ) (Рис.3А).

Подобное усиление угнетающего эффекта наблюдалось и для SITS. В гиперосмотическом растворе Кребса аппликация 50 мкМ SITS приводила к снижению амплитуды ПД и сокращения до  $87 \pm 18\%$  и  $43 \pm 10\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно контроля в нормальном растворе Кребса (Рис.4Б).

Кроме того, блокаторы хлорной проводимости полностью предотвращали усиление электрической и сократительной активности ГМК мочеточника морской свинки, полученное в условиях изотонической стрижки (Рис.4Г-Д).

Напротив, предобработка буметанидом значительно ослабляла угнетающее действие нифлумовой кислоты. Так, в концентрации 100 мкМ НК вызывала недостоверное снижение силы сократительного ответа (Рис.4В) и лишь при 200 мкМ ее угнетающий эффект становился выраженным: амплитуда сокращений составляла  $44 \pm 12\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ), относительно контроля в

растворе Кребса. В отсутствие ингибитора  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта тот же блокатор хлорных каналов уже в концентрации 100 мкМ значительно подавлял электрическую и сократительную активность ГМК (Рис.3Б).



**Рис.4.** Влияние блокаторов хлорных каналов и объем-зависимых эффектов модуляции  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта на электрическую (б) и сократительную (а) активность ГМК мочеточника морской свинки:

**А** – влияние гиперосмотического раствора (+Сахароза) и 50 мкМ нифлумовой кислоты (+НК);

**Б** – влияние гиперосмотического раствора с добавлением 150 мМ сахарозы к раствору Кребса (+Сахароза) и 50 мкМ SITS;

**В** – влияние 10 мкМ буметанида (+Бум.) и 200 мкМ нифлумовой кислоты (+НК);

**Г** – влияние гипоосмотического раствора с пониженным содержанием NaCl (70 мМ, NaCl) и 50 мкМ нифлумовой кислоты (+НК);



Д – влияние гипосмотического раствора (70 мМ, NaCl) и 50 мкМ SITS. Остальные обозначения, те же, что и на рис.1.

Таким образом, результаты экспериментов с нифлумовой кислотой и SITS указывают на то, что основную роль в реализации эффектов модуляции активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта играют хлорные токи через мембрану ГМК мочеточника. По-видимому, активация котранспорта в ГМК мочеточника морской свинки может приводить к увеличению электрохимического потенциала этих анионов и как следствие – входящего деполяризующего тока. Наоборот, подавление активности котранспортера буметанидом снижает влияние блокаторов хлорных каналов на электрическую и сократительную активность ГМК.

В связи с этим, можно предполагать, что изменение хлорной проводимости мембраны ГМК мочеточника является и одним из ключевых звеньев в механизмах реализации активирующих  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт факторов.

### **5. Исследование роли цАМФ- и цГМФ в регуляции $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и хлорной проводимости мембраны гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки**

Для повышения внутриклеточной концентрации цАМФ и цГМФ использовались активатор аденилатциклазы форсколин и активатор растворимой фракции гуанилатциклазы [Ткачук В.А., 1983, 1998] – нитропруссид натрия [Реутов В.П., Орлов С.Н., 1993], соответственно.

#### 5.1. Влияние буметанида и нифлумовой кислоты на эффекты нитропруссид натрия в гладкомышечных клеток мочеточника

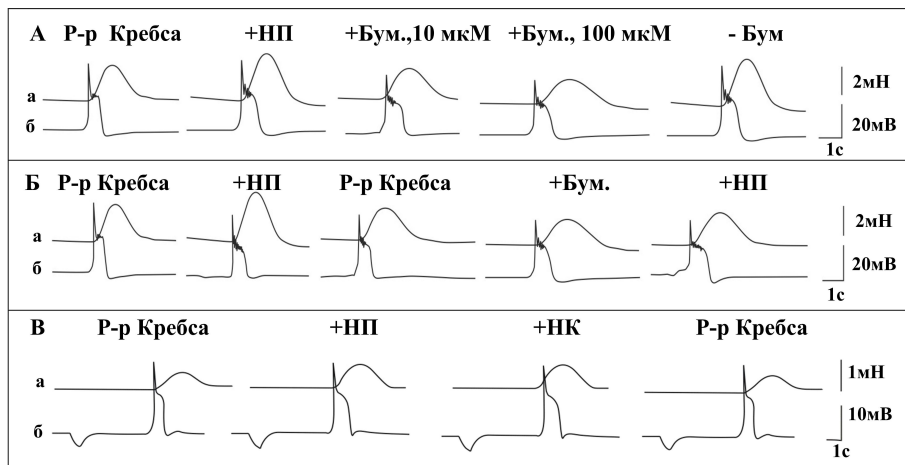
В концентрации 100 мкМ нитропруссид натрия увеличивал длительность плато ПД и амплитуду сокращений до  $111 \pm 6\%$  и  $130 \pm 9\%$  ( $n=17$ ,  $p<0,01$ ) соответственно в сравнении с исходными значениями в нормальном растворе Кребса (Рис.5А).

Достоверных изменений амплитуды анэлектротонических потенциалов и ПД при этом не регистрировалось.

На фоне действия 100 мкМ нитропруссид натрия добавление 10 мкМ буметанида вызывало снижение сократительной и электрической активности ГМК мочеточника. Амплитуда пикового компонента ПД и сокращений составляли  $78 \pm 15\%$  и  $79 \pm 13\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ) соответственно, относительно контрольных значений в присутствии нитросоединения (Рис.5А). Величина анэлектротонических потенциалов и длительность плато ПД не изменялись.

Увеличение концентрации буметанида в растворе до 100 мкМ на фоне нитропруссид натрия приводило к еще большему угнетению сократительного ответа ГМК мочеточника: амплитуда сокращений составляла при этом  $71 \pm 4\%$  от сократительного ответа при действии 10 мкМ буметанида в присутствии нитропруссид натрия ( $n=6$ ,  $p<0,01$ ). Предобработка гладкомышечных препаратов буметанидом ослабляла активацию сокращений ГМК мочеточника нитропруссидом натрия. Так, при добавлении 100 мкМ нитропруссид натрия на фоне действия 10 мкМ буметанида амплитуда сокращений составляла  $80 \pm 12\%$  ( $n=11$ ,  $p<0,05$ ) от соответствующих значений в отсутствии ингибитора

котранспорта, где прирост сокращений достигал значений  $130 \pm 9\%$  ( $n=11$ ,  $p<0,05$ ). Достоверных изменений исследуемых параметров электрической активности не наблюдалось ( $p>0,05$ ).



**Рис.5.** Влияние буметанида и нифлумовой кислоты на эффекты нитропруссид натрия в ГМК мочеточника:

**А** – добавление 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП) и 10 и 100 мкМ буметанида (+Бум);

**Б** - то же, что А, но на фоне 10 мкМ буметанида (+Бум);.

**В** – добавление 100 нифлумовой кислоты (+НК) на фоне нитропруссид натрия.

Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Таким образом, в присутствии нитропруссид натрия увеличилась чувствительность ГМК к действию ингибитора  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта, что указывает на повышение вклада этого транспортера в генерацию сокращений исследуемых ГМК. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что активация нитропруссидом натрия сокращений ГМК мочеточника, по крайней мере, частично, связана со стимуляцией  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта.

В отличие от буметанида, присутствие 100 мкМ нитропруссид натрия ослабляло угнетающее влияние нифлумовой кислоты на электрическую и сократительную активность ГМК. Добавление НК в концентрации 100 мкМ на фоне действия нитропруссид натрия не вызывало достоверных изменений параметров ПД и сокращения ( $p>0,05$ ). Лишь дальнейшее увеличение концентрации нифлумовой кислоты до 500 мкМ приводило к снижению амплитуды ПД и сокращений ГМК до  $78,0 \pm 8,5\%$  и  $64,5 \pm 8,2\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно контрольных значений при действии нитропруссид натрия.

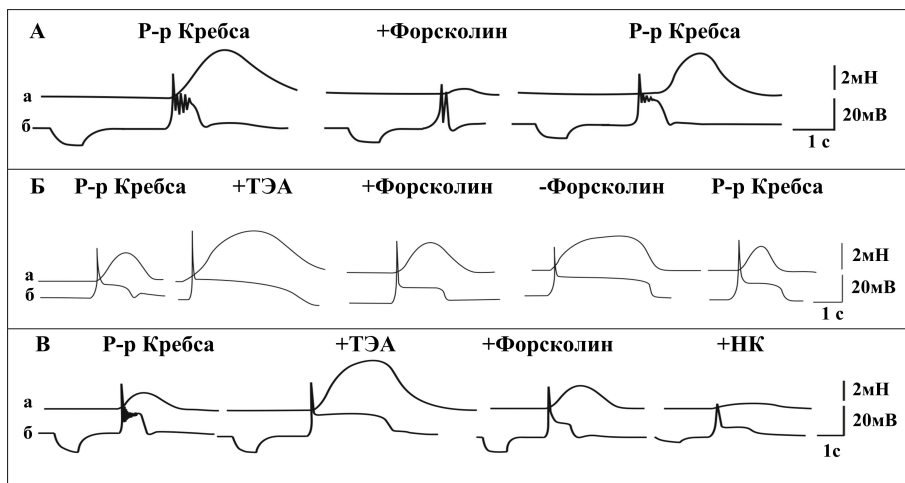
По-видимому, ослабление угнетающего влияния нифлумовой кислоты на ПД и сокращения ГМК мочеточника в присутствии нитропруссид натрия

могло быть обусловлено уменьшением вклада хлорных токов в генерацию ПД в результате снижения этим нитросоединением хлорной проводимости мембраны, вероятно, ее кальций-зависимой составляющей.

Подтверждают такую возможность данные о цГМФ-зависимом угнетении кальций-активируемых хлорных токов изолированных ГМК [Waniishi Y. e.a., 1998; Zhang Y. e.a., 1998].

## 5.2. Влияние буметанида и нифлумовой кислоты на эффекты форсколина в гладкомышечных клетках мочеточника

Форсколин в концентрации 1 мкМ вызывал снижение амплитуды ПД до  $85,6 \pm 8\%$ , длительности плато до  $35 \pm 4\%$  и силы сократительного ответа до  $20 \pm 5\%$  в сравнении с контрольными значениями в нормальном растворе Кребса ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ) (Рис.6А).



**Рис.6.** Влияние буметанида и нифлумовой кислоты на эффекты форсколина в ГМК мочеточника морской свинки:

**А** – добавление форсколина 1 мкМ (+форсколин) в раствор Кребса;

**Б** – тоже, что и А, но на фоне ТЭА 5 мМ (+ТЭА);

**В** – добавление 50 мкМ нифлумовой кислоты (+НК) на фоне действия ТЭА и форсколина.

Остальные обозначения те же, что и на рис.1.

На фоне действия 1 мкМ форсколина добавление 50 мкМ нифлумовой кислоты вызывало снижение амплитуды ПД и сокращений ГМК до  $88 \pm 6,5\%$  и  $54 \pm 8\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно контроля в растворе Кребса (Рис.6В).

Этот эффект блокатора хлорных каналов не отличался от такового в отсутствии активатора аденилатциклазы (Рис.3А).

В присутствии блокатора калиевых каналов тераэтиламмония (5 мМ) угнетающее действие форсколина достоверно ослаблялось (Рис.6Г): амплитуда, длительность плато ПД и сила сокращений составляли  $105\pm 15\%$ ,  $135\pm 12\%$ ,  $155\pm 14\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно контроля в растворе Кребса. В сравнении с эффектами в отсутствии 5 мМ ТЭА изучаемые параметры ПД и сокращений усиливались до  $123\pm 11\%$ ,  $385\pm 12\%$ ,  $775\pm 23\%$ , соответственно.

На фоне совместного применения форсколина и ТЭА, использовался блокатор хлорных каналов нифлумовая кислота (Рис.6Д). В этих условиях его добавление в концентрации 50 мкМ приводило к снижению амплитуды ПД и сокращения до  $74\pm 7\%$  и  $33\pm 8,4\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно контрольных значений в растворе Кребса. Эти данные не отличались достоверно ( $p>0,05$ ) от значений, полученных при действии 50 мкМ нифлумовой кислоты на фоне 5 мМ ТЭА в отсутствии форсколина (Рис. 3В).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ, в отличие от цГМФ, не влияет на оперирование  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспорта и хлорную проводимость мембраны ГМК мочеочечника.

## **7. Изучение роли ретикулярного кальция в регуляции хлорной проводимости мембраны гладкомышечных клеток мочеочечника**

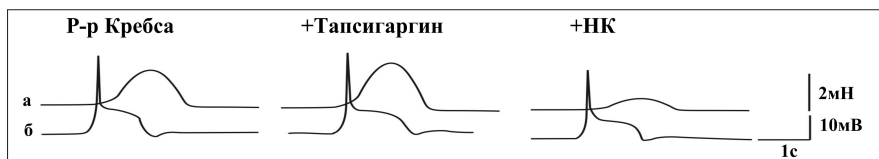
Известно, что внутриклеточные депо ионов кальция, в том числе, саркоплазматический ретикулум (СПР), не играют значимой роли в генерации сокращений большинства видов ГМК, по сравнению с его внеклеточным пулом [Бурый В.А., Шуба М.Ф., 1984]. Вместе с тем, нельзя полностью исключить влияния освобождающихся из СПР ионов кальция на кальций-зависимую хлорную проводимость мембраны ГМК мочеочечника. Для исследования роли ретикулярного кальция в регуляции хлорной проводимости мембраны ГМК использовался ингибитор  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СПР тапсигаргин [Gomez-Viquez L. e.a., 2003; Yashiro Y., Duling B., 2003].

Тапсигаргин в концентрации 1 мкМ вызывал увеличение длительности плато ПД и усиление сокращений ГМК мочеочечника до  $133\pm 8\%$  и  $138\pm 9\%$  ( $n=8$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно исходных значений в нормальном растворе Кребса (Рис.7).

Эффект тапсигаргина может быть обусловлен снижением кальций-зависимой компоненты калиевой проводимости мембраны ГМК и уменьшением ее ограничивающего влияния на длительность плато ПД. Важная роль ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , освобождаемых из СПР, в активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой компоненты калиевой проводимости мембраны ГМК показана в ряде исследований [Cheranov S., 2002; Yashiro Y., 2003].

Однако в присутствии тапсигаргина нифлумовая кислота в концентрации 50 мкМ вызвала снижение амплитуды ПД и сокращения до  $87,4\pm 27\%$  и

33±5% (n=7, p<0,05), соответственно, относительно контроля в растворе Кребса (Рис.7). Этот эффект блокатора хлорной проводимости мембраны достоверно не отличался от его действия в отсутствии ингибитора  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СПР (Рис.3А).



**Рис.7.** Влияние 100 мкМ нифлумовой кислоты (+НК) на фоне действия 1 мкМ тапсигаргина на электрическую (б) и сократительную (а) активность ГМК мочеточника морской свинки.

Остальные обозначения те же, что и на рис.1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что уменьшение тапсигаргином количества кальция, освобождаемого из СПР при возбуждении ГМК мочеточника, не изменяет вклада кальций-зависимой хлорной проводимости мембраны в генерацию ПД и сокращений ГМК мочеточника.

## **8. Влияние гистамина и мезатона на $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $2\text{Cl}^-$ -котранспорт и хлорную проводимость мембраны гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки**

### 8.1. Влияние мезатона и гистамина на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника

Добавление в раствор Кребса 10 мкМ мезатона приводило к увеличению длительности плато ПД и амплитуды сокращения до  $151\pm19\%$  и  $288\pm28\%$  (n=16, p<0,01), соответственно, относительно контрольных значений (рис.5А).

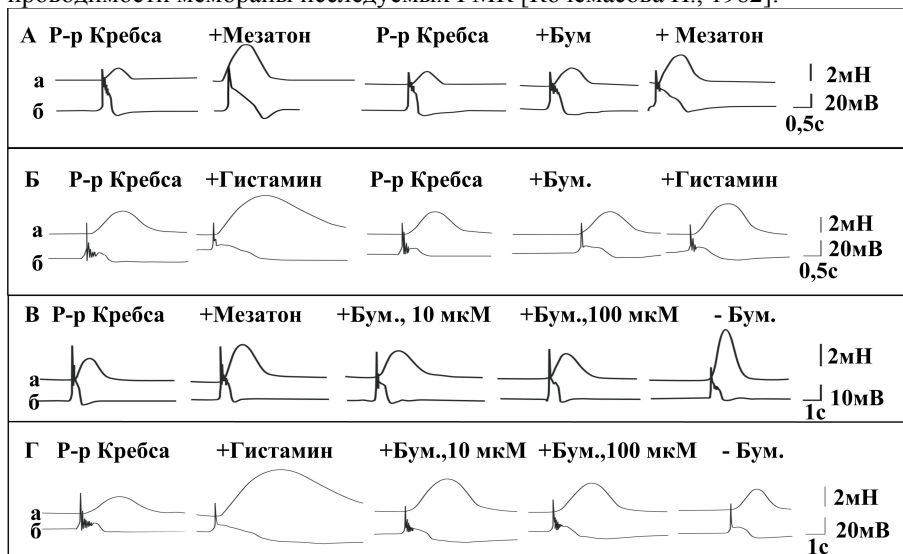
После удаления мезатона параметры ПД и сокращения восстанавливались до исходных значений к 10-15 мин отмывания препарата нормальным раствором Кребса (Рис.8А).

Гистамин в концентрации 10 мкМ также вызывал достоверное увеличение длительности плато ПД и амплитуды сократительного ответа ГМК мочеточника до  $261\pm25\%$  и  $220\pm23\%$  (n=11, p<0,01), соответственно, в сравнении с исходными значениями в нормальном растворе Кребса (Рис.8В).

Как и в случае с мезатоном, параметры ПД и сокращения ГМК восстанавливались к 10-15 мин после удаления гистамина из омывающего раствора.

Увеличение длительности плато ПД при действии гистамина обусловлено повышением, прежде всего, натриевой проводимости мембраны ГМК мочеточника. Стимуляция гистамином сокращений обусловлена увеличением количества кальция, входящего через не инактивирующиеся потенциал-зависимые кальциевые каналы плазмалеммы во время плато ПД.

В отличие от гистамина удлинение плато при действии мезатона связано с уменьшением входа кальция по этим каналам, вследствие чего снижается ограничивающее длительность плато влияние кальций-зависимой калиевой проводимости мембраны исследуемых ГМК [Кочемасова Н., 1982].



**Рис.8.** Влияние мезатона, гистамина и буметанида на электрическую (а) и сократительную (б) активность ГМК мочеточника морской свинки:

**А** – влияние 10 мкМ мезатона (+Мезатон) на фоне 10 мкМ буметанида (+Бум.);

**Б** – влияние 10 мкМ гистамина (+Гистамин) на фоне 10 мкМ буметанида (+Бум.);

**В** – влияние различных концентрация буметанида на фоне 10 мкМ мезатона;

**Г** – то же, что и В, но на фоне 10 мкМ гистамина.

Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

## 8.2. Влияние буметанида на эффекты гистамина и мезатона в гладкомышечных клетках мочеточника

Предобработка ГМК мочеточника 10 мкМ буметанида снижала активирующее влияние мезатона (Рис.9А) и гистамина (Рис.9Б) на ПД и сокращения. Продолжительность плато ПД и амплитуда сокращения при добавлении 10 мкМ мезатона составляли  $82,7 \pm 3,3\%$  и  $63,8 \pm 4,4\%$  ( $n=16$ ,  $p<0,01$ ), соответственно, относительно контрольных значений (100%), регистрируемых при действии мезатона в отсутствии ингибитора  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспорта.

Значения этих показателей при действии 10 мкМ гистамина в присутствии буметанида также снижались и составляли  $90\pm 3\%$  и  $77\pm 4\%$  ( $n=9$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно контроля в отсутствии буметанида.

Напротив, предобработка ГМК мезатоном (Рис.9В) и гистамином (Рис.9Г), как и гипер- и изоосмотическая стрижия клеток, значительно усиливала угнетающее действие буметанида. Если в отсутствии биологически-активных веществ добавление 10 мкМ буметанида вызывало снижение амплитуды сокращения до  $85,5\pm 3,6\%$  ( $n=10$ ,  $p<0,05$ ), то в присутствии 10 мкМ мезатона и гистамина, сократительный ответ снижался до величин  $54,8\pm 8,1\%$  ( $n=8$ ,  $p<0,05$ ) и  $64,2\pm 17,9\%$  ( $n=9$ ,  $p<0,01$ ), соответственно.

Следует отметить, что буметанид ослаблял, но не устранял активирующие эффекты мезатона и гистамина на ПД и сокращения. При его добавлении параметры ПД и амплитуда сокращений оставались выше контрольных значений в растворе Кребса (Рис.8В,Г).

Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что в механизмах действия гистамина и мезатона на ПД и сокращения ГМК мочеточника существенная роль принадлежит активации  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспорта.

### 8.3. Влияние блокаторов хлорной проводимости мембраны на эффекты мезатона и гистамина в гладкомышечных клетках мочеточника

Для выявления роли хлорной проводимости мембраны в механизмах действия гистамина и мезатона на электрическую и сократительную активность ГМК использовались блокаторы хлорных токов нифлумовая кислота и SITS.

Нифлумовая кислота в концентрации 50 мкМ на фоне действия мезатона (10 мкМ) к 15-20мин инкубации приводила к значительному угнетению ПД и сокращений ГМК мочеточника морской свинки. Амплитуда ПД и сокращений при этом составляли  $45,5\pm 4,7\%$  и  $22,6\pm 5,8\%$  (Рис.9А), относительно контроля в растворе Кребса.

Добавление 50 мкМ SITS в присутствии 10 мкМ мезатона снижало эти же показатели до  $86\pm 10\%$  и  $32,4\pm 10,4\%$  ( $n=12$ ,  $p<0,01$ ), соответственно, относительно контрольных значений в нормальном растворе Кребса.

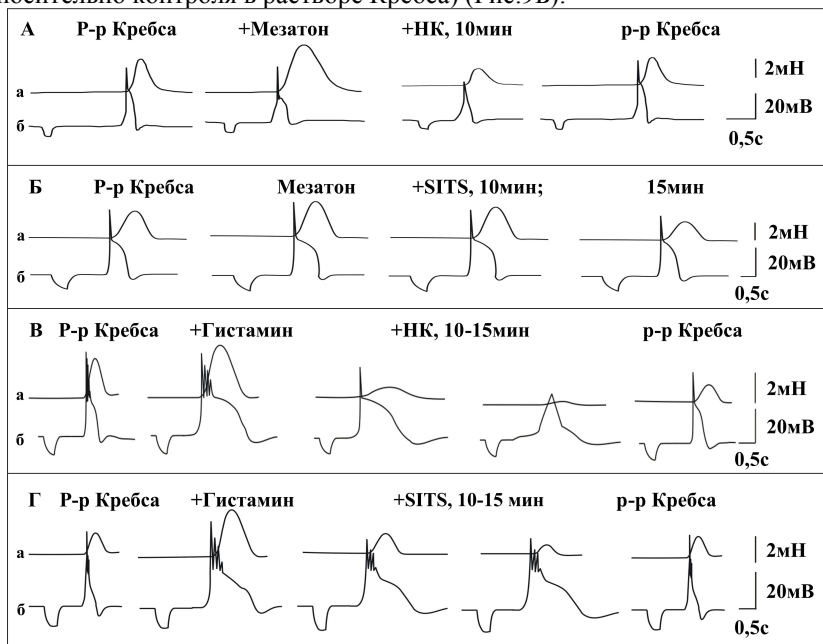
Амплитуда ПД и сокращения ГМК при действии SITS снижались в меньшей степени, чем в присутствии нифлумовой кислоты. Значения параметров ПД и сокращений в присутствии SITS составили  $189\pm 15\%$ ,  $141\pm 12\%$ , ( $n=12$ ,  $p<0,01$ ), соответственно, относительно их величины при действии НК. Изменения длительности плато ПД при действии SITS были недостоверными ( $110\pm 15\%$ ;  $n=12$ ,  $p>0,05$ ) (Рис.9Б).

На фоне действия гистамина нифлумовая кислота в концентрации 50 мкМ уже на 5мин инкубации также вызывала значительное снижение амплитуды ПД и сокращения до  $55\pm 11\%$  и  $30,5\pm 17\%$  ( $n=12$ ,  $p<0,05$ ), соответственно, относительно исходных значений в растворе Кребса. (Рис.9В).

Добавление 50 мкМ SITS в раствор, содержащий 10 мкМ гистамина, приводило к достоверному угнетению амплитуды ПД и сокращений до

82±14% и 49,5±25,4%, соответственно, по сравнению с контролем в нормальном растворе Кребса (Рис.9Г).

На фоне гистамина действие SITS на амплитуду ПД и сокращения ГМК было выражено в меньшей степени, чем нифлумовой кислоты. Параметры ПД и сокращений в присутствии SITS составляли 187±13% и 151±14%, (n=12, p<0,01) от их значений при действии НК. Изменения длительности плато ПД при действии SITS были недостоверными (120±25%; n=12, p>0,05 относительно контроля в растворе Кребса) (Рис.9Б).



**Рис.9.** Влияние блокаторов хлорных каналов на электрическую (б) и сократительную (а) активность ГМК мочеточника морской свинки на фоне действия мезатона и гистамина:

**А** – действие 50 мкМ нифлумовой кислоты (+НК) на фоне 10 мкМ мезатона (+Мезатон);

**Б** – действие 50 мкМ SITS (+SITS) на фоне действия 10 мкМ мезатона (+Мезатон);

**В** – то же что и А, но на фоне действия 10 мкМ гистамина (+Гистамин);

**Г** – то же что и Б, но на фоне действия 10 мкМ гистамина (+Гистамин).

Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Таким образом, проведенные исследования указывают на то, что активирующее ПД и сокращения влияние гистамина и мезатона может быть связано не только с повышением внутриклеточной концентрации свободного



кальция за счет входа этих ионов по потенциал-зависимым кальциевым каналам и высвобождением из внутриклеточных депо, но и с усилением деполяризующего хлорного тока. Его кальций-зависимая компонента, чувствительная к действию нифлумовой кислоты, может являться наиболее вероятной мишенью используемых биологически-активных веществ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени имеется множество доказательств того, что в основе электрогенеза ГМК лежат изменения проводимости мембраны к ионам кальция, калия и натрия [Шуба М., Кочемасова Н., 1988]. Однако в последние годы появились свидетельства об участии хлорных токов в поддержании потенциала покоя и генерации ПД некоторых типов гладкомышечных клеток. [Duan D. e.a., 1997-1999; Chipperfield A., Harper A., 2000; Lamb F. e.a., 2000]. Имеются единичные данные о существенном вкладе анионов хлора в регуляцию сократительной активности сосудистых гладких мышц [Анфиногенова Я.Д. с соавт., 2002-2004; Burdyga T., Wray S., 2002]. Следует отметить, что в отличие от большинства других электровозбудимых клеток, ГМК характеризуются неравновесным распределением ионов хлора между цитоплазмой и внешним раствором и электрохимический градиент этих анионов направлен наружу [Kuriyama H. e.a., 1998].

Основным механизмом, отвечающим за неравновесное распределение ионов хлора в ГМК, является  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт [Russell J., 2000; Akar F., 2001; O'Neill W. e.a., 2001]. Действительно, проведенные нами исследования показали, что ингибирование  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта буметанидом и гипоосмотическим раствором приводит к гиперполяризации мембраны и к снижению амплитуды вызванных электрическим стимулом потенциалов действия и сокращений. Напротив, стимуляция этого котранспорта гипер- или изоосмотической стрижией клеток повышает электрическую и сократительную активность ГМК мочеоточника. Вероятно, это обусловлено изменениями внутриклеточной концентрации анионов хлора и, в соответствии с уравнением  $I_{\text{Cl}} = g_{\text{Cl}}(E_m - E_{\text{Cl}})$ , – к модуляции хлорных токов ГМК. Возникающая при действии буметанида гиперполяризация мембраны служит указанием на то, что хлорные токи в ГМК мочеоточника участвуют в поддержании потенциала покоя.

Изменением распределения ионов хлора, по-видимому, обусловлено усилением сократительных ответов ГМК мочеоточника морской свинки при стрижии и их угнетение при набухании. Повышение деполяризующего хлорного тока при возрастании электрохимического потенциала ионов хлора ведет к увеличению потенциал-зависимого входа катионов кальция, непосредственно участвующих в инициации и развитии сокращений ГМК [Шуба М.Ф., Бурый В.А., 1984].

Заключение о том, что модуляция активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта оказывает влияние на ПД и сокращения ГМК мочеоточника за счет изменения именно хлорных токов, подтверждается экспериментами с использованием блокаторов хлорных каналов нифлумовой кислоты и SITS. В самом деле, эти соединения, во-первых, угнетали ПД и сокращения ГМК, во-вторых – их эффект усиливался на фоне активации  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта, т.е. в условиях, когда повышается электрохимический потенциал ионов хлора и, следовательно, вклад хлорных токов в электрогенез ГМК, и, наоборот, был менее выраженным при ингибировании этого вида котранспорта.

Многочисленные физиологически активные вещества влияют на функцию гладких мышц через систему вторичных посредников. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что цГМФ, но не цАМФ, реализует свое влияние на сократительную функцию ГМК мочеточника, по крайней мере, частично, с участием  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта. Действительно, угнетение его буметанидом ослабляло стимуляцию сокращений этих клеток активатором гуанилатциклазы нитропруссидом натрия, а в присутствии последнего усиливалось эффекты буметанида. Эти данные указывают на то, что циклический гуанозинмонофосфат оказывает положительное модулирующее влияние на  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт.

Вместе с тем, нитропруссид натрия уменьшал чувствительность ГМК мочеточника к действию блокатора кальций-активируемых хлорных каналов - нифлумовой кислоты. Полученные данные могут служить свидетельством в пользу того, что увеличение циклическим гуанозинмонофосфатом активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта может влиять на сократительные свойства ГМК независимо от опосредованной хлорными токами деполяризации мембраны. Возможность этого обсуждается рядом авторов [Zhang Y. e.a., 1998; Waniishi Y. e.a., 1998; Burduga T., Wray S., 2002; Anfinogenova Y. e.a., 2004].

Проведенные эксперименты с активатором аденилатциклазы форсколином указывают на то, что механизмы регуляции функции ГМК мочеточника, используемые клетками с участием цАМФ не связаны с модуляцией  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и хлорных токов. Угнетающее влияние цАМФ на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника, как это было показано ранее, обусловлено в значительной степени повышением калиевой проводимости мембраны [Баскаков М.Б. с соавт., 2002].

Как свидетельствуют данные исследований с нифлумовой кислотой – блокатором кальций-зависимых хлорных каналов, последние играют существенную роль в регуляции электрогенеза ГМК мочеточника. Кальций-зависимые хлорные токи могут активироваться как ионами кальция, входящими во время ПД, так и кальцием, освобождаемым из саркоплазматического ретикулула при возбуждении клеток [Бурый В., Шуба М., 1984; Kuriyama H. e.a., 1998]. Поскольку выключение кальциевого насоса саркоплазматического ретикулула тапсигаргином не оказывало достоверного влияния на ПД и сокращения ГМК мочеточника можно полагать, что наиболее значимую роль в модуляции кальциевой компоненты хлорной проводимости играет кальций, входящий в клетки во время генерации потенциала действия.

Несмотря на многолетние исследования механизмов действия агонистов  $\text{H}_1$ -гистаминэргических и  $\alpha_1$ -адренэргических рецепторов на электрические и сократительные свойства ГМК, ряд вопросов не нашел удовлетворительного решения. Так, до настоящего времени нет достаточной ясности в понимании вклада ион-транспортирующих систем, а также различных фракций внеклеточного и внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и отдельных компонентов ионной проводимости мембраны в эффекты этих физиологически активных веществ [Cheranov S., 2002; Yashiro Y., 2003]. В наибольшей мере это относится к

хлорной проводимости мембраны ГМК [Fuller C., Benos D. e.a., 1998; Lovren F., Triggle C., 1998; Zhang Y. e.a., 1998; Chipperfield A., 2000].

Есть основания полагать, что гистамин и мезатон стимулируют  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт. Действительно, угнетение  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта буметанидом значительно снижало активацию используемыми адreno-гистаминэргическими миметиками ПД и сокращений ГМК мочеточника морской свинки.

Известно, что передача сигнала от  $\alpha_1$ -адreno и  $\text{H}_1$ -гистаминэргических рецепторов к внутриклеточным эффекторам осуществляется с участием обеих ветвей кальциевой сигнальной системы: кальмодулин-зависимой и С-киназной [Rasmussen H. e.a., 1984; Расмуссен Г., 1989]. Можно предположить, что в качестве мишени для соответствующих протеинкиназ служит и  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт, активность которого зависит от степени его фосфорилирования [Gillen C., Bliss F., 1999; Russell J., 2000].

Эксперименты с применением блокаторов хлорных каналов показали, что мезатон и гистамин реализуют свое активирующее действие на ПД и сокращения ГМК мочеточника, в том числе, и посредством увеличения хлорной проводимости мембраны. Это может быть обусловлено повышением кальций-зависимой компоненты хлорной проводимости мембраны исследуемых ГМК. Последнее, как уже указывалось, связано в первую очередь с увеличением входящих кальциевых токов, но не с освобождением кальция из саркоплазматического ретикулама.

## ВЫВОДЫ

1. Ингибирование  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта буметанидом ведет к гиперполяризации мембраны и снижению силы сокращений гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки.
2. Опосредованная гипер- и изоосмотической стрикцией стимуляция  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта приводит к усилению сокращений гладкомышечных клеток мочеточника в ответ на действие деполяризующего тока, тогда как угнетение  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта при их набухании вызывает противоположный эффект.
3. Уменьшение хлорной проводимости мембраны приводит к угнетению как электрической, так и сократительной активности гладкомышечных клеток мочеточника. Это указывает на существенную роль хлорных токов в генерации ПД и сокращений исследуемых гладкомышечных клеток.
4. Депонированные в саркоплазматическом ретикулеме ионы кальция не играют значимой роли в регуляции кальций-зависимой хлорной проводимости мембраны гладкомышечных клеток мочеточника.
5. Изменение хлорных токов гладкомышечных клеток мочеточника является и одним из ключевых звеньев в механизмах реализации эффектов модуляции  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта.
6. Влияние цГМФ на потенциалы действия и сокращения гладкомышечных клеток мочеточника в значительной степени опосредовано активацией  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта.

7. В механизмах действия гистамина и мезатона на электрогенез и сокращения гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки существенная роль принадлежит  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорту и кальций-зависимым хлорным токам.

### СПИСОК ОСНОВНЫХ ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Влияние ингибиторов фосфодиэстераз циклических нуклеотидов на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток // Бюлл. exper. биол. и мед. - 2002, т.133.-N1. С.47-50. (Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Попов А.Г., Килин А.А., Бородин Ю.Л., Анфиногенова Я.Д., Капилевич Л.В., Медведев М.А.).
2. 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. Vol. 21 (suppl 4), P1.295, S101. (Соавт. I.V. Kovalev, M.B. Baskakov, L.V. Kapilevich, A.A. Panov, Y.L. Borodin, Y.J. Anfinogenova, A.G. Popov, A.A. Kilin, M.A. Medvedev).
3. Влияние буметанида – ингибитора  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта, на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки // Бюлл. exper. биол. и мед. - 2003, т. 136.-N8. С.167-172 (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Анфиногенова Я.Д., Бородин Ю.Л., Килин А.А., Попов А.Г., Капилевич Л.В., Медведев М.А., Орлов С.Н.).
4. Исследование цГМФ-зависимых механизмов действия винпоцетина на гладкомышечные клетки // Экспериментальная и клиническая фармакология.- 2003, т.66, №4, С.25-28. (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Килин А.А., Попов А.Г., Бородин Ю.Л., Панов А.А., Анфиногенова Я.Д., Медведев М.А., Капилевич Л.В.).
5. Миогенные эффеты циклического гуанозинмонофосфата в гладкомышечных клетках. Роль протеинкиназы С // Росс. Физ. журнал им. И.М.Сеченова – 2003-т.89, №4, С.436– 446 (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А., Бородин Ю.Л., Попов А.Г., Анфиногенова Я.Д., Капилевич Л.В.).
6. NO-зависимые механизмы регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц // Росс. Физиол. ж. им. Сеченова.-2004,-т.90, - №8, С.375. (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М. Б., Медведев М. А., Капилевич Л. В., Анфиногенова Я. Д., Бородин Ю. Л., Килин А. А., Попов А.Г., Панов А.А., Носарев А.В.).
7. Роль  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  - котранспорта и хлорной проводимости мембраны в регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки при действии мезатона и гистамина // Бюлл. Сибирской медицины. Тез.докл.V Сибирского физиологического съезда.-2005.-Т.4, Прил.1.-С.116 (соавт.Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Анфиногенова Я.Д., Бородин Ю.Л. и др.).

8. Регуляции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  - котранспорта и хлорной проводимости мембраны циклическими нуклеотидами: вклад в электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки // Бюлл. Сибирской медицины. Тез.докл.V Сибирского физиологического съезда.-2005.-Т.4, Прил.1.-С.114 (соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Анфиногенова Я.Д., Бородин Ю.Л., Килин А.А. и др.).
9. Роль цитоскелета в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц // Бюлл. Сибирской медицины. Тез.докл.V Сибирского физиологического съезда.-2005.-Т.4, Прил.1.-С. 49 (соавт. Килин А.А., Гусакова С.В., Анфиногенова Я.Д., Баскаков М.Б., Ковалев И.В. и др.).
10. Роль цилических нуклеотидов в миогенных реакциях гладкомышечных клеток // «Науки о человеке» сб. стат по мат. II конгресса мол. уч и спец-ов «Научная молодежь на пороге 21 века» (Томск, 17-18 мая 2001) - Томск: STT, 2001.- с.83 (соавт. Попов А.Г., Бородин Ю.Л.)
11. Циклический гуанозинмонофосфат – модулятор миогенных реакций гладкомышечных клеток // «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» - мат. II Росс. конф. мол уч. С межд уч-ем. (Москва, 24-28 апреля 2001) – Т2. – с.301 (соавт. Панов А.А., Килин А.А.)
12. Изучение механизмов толерантности гладких мышц аорты крыс к нитроглицерину // «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» - мат. II Росс. конф. мол уч. С межд уч-ем. (Москва, 24-28 апреля 2001) – Т2. – с.300. (соавт. Килин А.А.)
13. Миогенные реакции гладкомышечных клеток при модуляции внутриклеточного уровня циклического гуанозинмонофосфата // «Актуальные проблемы экспериментальной, профессиональной и клинической медицины» Тезисы докладов 2-ой Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием г. Владивосток 26 апреля 2001. (соавт. Попов А.Г., Бородин Ю.Л., Килин А.А.)
14. Исследование роли  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  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. Бородин Ю.Л., Анфиногенова Я.Д., Килин А.А., Попов А.Г.)
15. 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. Анфиногенова Я.Д., Бородин Ю.Л., Килин А.А.)
16. 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. 125 . (соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Анфиногенова Я.Д., Бородин Ю.Л., Килин А.А. и др.)
17. Роль  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  - котранспорта и хлорной проводимости мембраны в регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки // Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц: Материалы симп. / Под ред. М.А. Медведева, М.Б. Баскакова. – Томск, 2004 – с. 126 (соавт. Килин А.А., Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Анфиногенова Я.Д., Бородин Ю.Л. и др.)
  18. Роль  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорта и внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  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 – 125 с. (Анфиногенова Я.Д., Орлов С.Н., Баскаков М.Б., Безменова М. А., Ковалев И. В. и др.)
  19. Роль  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -котранспорта и хлорной проводимости мембраны в регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки // Вестник РГМУ, №3/34 – материалы Пироговской студенческой научной конференции – Москва, 2004. (соавт. Захарченя А.В., Килин А.А, Анфиногенова Я.Д., Жидков В.И.)

### Список используемых сокращений

АЦ - аденилатциклаза  
 АЭП – анэлектротонический потенциал  
 БАВ - биологически активные вещества  
 ГМК - гладкомышечная клетка  
 ГЦ - гуанилатциклаза  
 ДАГ - диацилглицерол  
 ИТФ - инозитолтрифосфат  
 КЛЦМ - киназа легких цепей миозина  
 НК – нифлумовая кислота  
 НП - нитропруссид натрия  
 ПД - потенциал действия  
 ПК-А – цАМФ-активируемая протеинкиназа  
 ПК-G – цГМФ-активируемая протеинкиназа  
 ПК-С – протеинкиназа С  
 ПП - потенциал покоя  
 ТЭА - тетраэтиламмония хлорид  
 ФАВ - физиологически активные вещества  
 ФЛ-С - фосфолипаза С  
 цАМФ - циклический 3:5-аденозинмонофосфат  
 цГМФ - циклический 3:5-гуанозинмонофосфат

ЦН – циклические нуклеотиды

G – белок – гуанозинтрифосфат (ГТФ) связывающий белок

NO – оксид азота

SITS-4-ацетоамидо-4'-изотиоцианостилбен-2,2'-дисульфониевая кислота