На правах рукописи

КОЛЬЦОВА Светлана Владимировна

МИОГЕННЫЙ ОТВЕТ СОСУДОВ: РОЛЬ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ И НАТРИЙ-КАЛИЙ-ХЛОР КОТРАНСПОРТА

03.03.01 – физиология, 03.01.02 – биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории физико-химии биомембран биологического факультета Московского Государственного Университета им. М. В. Ломоносова, а также в лаборатории патофизиологии ионного транспорта медицинского факультета университета Монреаля.

Научные руководители:

Доктор биологических наук, профессор Сергей Николаевич Орлов
Доктор медицинских наук, профессор Михаил Борисович Баскаков

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор Ольга Сергеевна Тарасова
Доктор биологических наук, профессор Валерий Петрович Зинченко

Ведущая организация:

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Защита состоится 31 октября 2011 года в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д.501.001.93 в Московском Государственном Университете им. М. В. Ломоносова по адрессу: 119991, Москва, Ленинские горы, биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан 30 сентября 2011г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Гладкомышечные клетки (ГМК) играют центральную роль в регуляции просвета кровеносных сосудов, а следовательно системного артериального давления и локального снабжения тканей кислородом. В этой связи исследование механизмов регуляции возбуждения и сокращения ГМК занимает центральное место как в нормальной физиологии системы кровообращения, так и при исследовании патогенеза таких распространенных болезней современного человека как артериальная гипертензия, ишемические состояния, инсульт, почечная недостаточность, сахарный диабет и др.

Миогенный ответ (МО), уникальное свойство мелких сосудов, развивается в ответ на изменение внутрисосудистого давления и играет ведущую роль в регуляции кровоснабжения тканей и их защите от резких колебаний системного артериального давления. Следует однако отметить, что не смотря на физиологическую и патофизиологическую значимость МО, начальные механизмы, лежащие в основе преобразования изменений давления внутри микроциркуляторного сосудистого русла в сокращение ГМК, остаются неустановленными.

Исследования, проведенные в последние годы, указывают на важную роль пуринергической сигнальной системы и Na^+,K^+,$2Cl^-$ котранспорта (NKCC) в регуляции сокращения ГМК и формировании МО. В самом деле, было установлено, что напряжение сдвига, изменения скорости движения внеклеточной жидкости и клеточного объема, т.е. параметров, изменяющихся при перепадах внутрисосудистого давления, приводят к высвобождению ATP и других природных агонистов пуринерических рецепторов из всех типов исследованных клеток, включая ГМК, клетки крови и эндотелиальные клетки (Tatur et al., 2007; Burnstock, 2007; Zhao et al., 2007). В свою очередь, активация пуринорецепторов ГМК лежит в основе тканеспецифической ауто- и эндокринной регуляции тонуса кровеносных сосудов и ремоделирования сосудистого русла (Erlinge, Burnstock 2008; Burnstock, 2006). Так, например,

было установлено, что МО афферентной артериолы почечного клубочка находится под контролем пуринергических P2X рецепторов, активирующихся внеклеточным АТР (Inscho, 2009). Следует однако отметить, что набор пуринергических рецепторов, абсолютная величина и динамика МО резко отличаются в ГМК различных сосудистых бассейнов. Сведения об участии пуринергических рецепторов в регуляции МО ограничиваются в основном данными, полученными на афферентных артериолах почечных клубочков.

Важная роль NKCC в развитии сокращения ГМК и миогенного ответа сосудов поодтверждается тем, что буметанид и другие петлевые диуретики, известные как мощные ингибиторы этого преносчика, вызывают расслабление ГМК аорты за счет снижения внутриклеточной концентрации хлора, гиперполяризации и инактивации Ca^{2+} каналов L-типа (Anfinogenova et al., 2004). Было показано, что как буметанид, так и фуросемид полностью блокируют МО и сокращение ГМК афферентной артериолы в ответ на добавки ангиотензина II (Wang et al., 2007). Необходимо однако отметить, что петлевые диуретики могут подавлять сокращение ГМК действуя на мишени, отличные от NKCC. В самом деле, было установлено, что наряду с NKCC буметанид и фуросемид снижают активность всех клонированных изоформ Na^+-независимого K^+,Cl^- котранспорта (Lauf, Adragna, 2000) и влияют на активность сигнальных систем клетки, отличных от ионных транспортеров (Mozhayeva et al., 1994; Stanke-Labesque et al., 2000). Кроме того, данные о величине ингибирующего действия петлевых диуретиков на сокращение ГМК существенно различаются. Так, например, Анфиногенова с соавторами обнаружили 3-4 кратное снижение сократительной активности аорты крысы при действии фенилэфрина (ФЭ) (Anfinogenova et al., 2004), в то время как Akar с соавторами выявил только 10-20% снижение сокращения, индуцированного этим агонистом α_1-адренэргических рецепторов (Akar et al., 2001). Одной из возможных причин этих отличий может быть различия концентраций бикарбоната в растворах, использованных в этих работах. Малоизученным

остается также вопрос о роли эндотелия в ингибирующем действии петлевых диуретиков.

Все вышеизложенное определяет необходимость изучения роли NKCC1 и пуринергической системы в регуляции сокращений и миогенного ответа сосудов. Выявление клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе развития сокращений и миогенного ответа сосудов и обеспечивающих функциональное многообразие сосудов, имеет важное фундаментальное значение. Следует особо подчеркнуть, что от понимания специфики этих механизмов во многом зависит успех разработки новых лекарственных препаратов, лишенных побочных эффектов.

Исходя из вывшесказанного, **целью настоящей работы было исследование роли пуринергических рецепторов и NKCC1 в регуляции сокращения и миогенного ответа брыжеечных артерий мыши.**

Основные задачи исследования:

1. Изучить роль пуринергических рецепторов в регуляции сокращения и формировании миогенного ответа брыжеечных артерий.
2. Проверить влияние буметанида и анионов бикарбоната на миогенный ответ и сокращение брыжеечных артерий мыши.
3. Используя культуру ГМК аорты крысы, исследовать участие бикарбоната в регуляции буметанидом электрического потенциала и внутриклеточных концентраций Ca^{2+} и Cl^{-}.
4. Исследовать роль эндотелия в ингибирующем действии буметанида на миогенный ответ и сокращения брыжеечных артерий, вызванные деполяризацией, а также активацией α_1–адренергических и пуринергических рецепторов.
5. Проанализировать роль универсальной изоформы Na^{+}, K^{+}, $2Cl^{-}$ котранспорта (NKCC1) в регуляции сокращения гладких мышц и развитии миогенного ответа брыжеечных артерий петлевыми диуретиками.

Научная новизна и практическая значимость работы. В нашей работе впервые установлено, что как NKCC, так и пуринергические рецепторы вовлечены в развитие МО брыжеечных артерий мыши.

Впервые показано, что ATP и UTP вызывают транзиторное и поддерживаемое сокращения брыжеечных артерий через активацию $P2X_1$ и $P2Y_6$ рецепторов, соответственно. Установлено, что $P2Y_6$ рецепторы, но не $P2X_1$ вовлечены в развитие МО брыжеечных артерий.

Впервые исследована роль анионов бикарбоната в ингибрущем действии петлевых диуретиков на сокращения, вызванные умеренной деполяризацией, а также агонистами α_1–адренергических и пуринергических рецепторов. Установлено, что анионы бикарбоната ингибируют NKCC и уменьшают вклад этого переносчика в сокращения брыжеечных артерий. Ингибирующее действие анионов бикарбоната обусловлено снижения буметанид-чувствительной компоненты мембранного потенциала и внутриклеточных концентраций ионов Ca^{2+} и Cl^- путем подавлением активности NKCC.

С помощью генетически модифицированных животных впервые показано, что ингибирующее действие петлевых диуретиков на сокращения и МО брыжеечных артерий обусловлено их взаимодействием с универсальной изоформой Na^+, K^+, $2Cl^-$ котранспорта.

Результаты исследования являются важным вкладом в развитие фундаментальных знаний о механизмах формирования МО и сокращений сосудов. На основании полученных результатов предложена модель вовлечения NKCC1 и пуринергических рецепторов в регуляцию миогенного ответа брыжеечных артерий. Рассмотрены возможные пути вовлечения этой регуляторной системы в развитие артериальной гипертензии и осложнений, связанных с ингибированием МО в почках и других органах, чувствительных к долгосрочному повышению системного артериального давления. Рассматриваемая модель также предполагает, что нарушения кислотно-щелочного равновесия и парциального давления углекислого газа, вызванные ишемическими состояниями и болезнью почек, могут сопровождаться

локальными изменениями сосудистого тонуса вследствие изменения активности NKCC1.

Положения, выносимые на защиту:

1. Сокращения брыжеечных артерий, вызванные ATP и UTP, обусловлены активацией $P2X_1$ и $P2Y_6$ рецепторов соответственно. В формировании миогенного ответа брыжеечных артерий мыши основную роль играют $P2Y_6$ рецепторы.
2. Буметанид подавляет миогенный ответ и сокращения брыжеечных артерий, вызванные умеренной деполяризацией, стимуляцией α_1-адренорецепторов и $P2Y_6$ рецепторов.
3. Бикарбонат уменьшает буметанид-чувствительную компоненту сопряжения возбуждения и сокращения ГМК брыжеечных артерий. Ингибирующее действие HCO_3^- обусловлено снижением буметанид-чувствительной компоненты регуляции мембранного потенциала, внутриклеточных концентраций ионов Ca^{2+} и Cl^-, что частично связано с ингибирующим действием этого аниона на активность NKCC1.
4. Ингибирующее действие буметанида на сокращения и развитие миогенного ответа брыжеечных артерий обусловлено взаимодействием с универсальной изоформой $Na^+,K^+,2Cl^-$ котранспорта ГМК этих сосудов.

Апробация работы. Апробация работы проведена на заседании кафедры физиологии человека и животных и лаборатории физико-химии биомембран биологического факультета МГУ. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 11-ом Ежегодном конгрессе молодых ученых университета Монреаль (Монреаль 2009); на 36-ом Международном конгрессе физиологических наук (Киото 2009); на 6-ом Международном конгрессе по патфизиологии (Монреаль 2010) и на 23-ем съезде Международного общества по изучению гипертонии (Ванкувер 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения,

выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 145 страниц машинописного текста, 32 рисунка и 7 таблиц. Список литературы включает 249 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования. В работе использовались мыши-самцы линии C57Bl/6 в возрасте от 1 до 3 месяцев. *NKCC1*$^{-/-}$ мыши, лишенные Slc12a2 гена на обоих аллелях, были полученны из Jakson laboratory (Barttarbon, Maine, USA). Мышей содержали на обычном питании и при стандартном световом режиме. Животных усыпляли летальной дозой углекислого газа, после чего выделяли кишечник и помещали его в физиологически сбалансированный солевой раствор. Далее отпрепаровывали жировую ткань и выделяли брыжеечные артерии длинной 1-2 мм. Для измерения активности NKCC в эритроцитах кровь получали из бифуркации аорты после глубокой анестезии изофлураном. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (150-200 ед/мл).

Для измерения ионных потоков использовали культуру ГМК аорты крысы линии WKY-7 (Davis et al., 2003). Клетки WKY-7 растили в модифицированной среде Дульбекко (DMEM), содержащей 2 мМ глутамина, 10% бычьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Среда менялась каждые два дня. Клетки, достигшие 80% конфлюэнтности, использовали в экспериментах.

Для **оценки сократительной активности брыжеечных артерий** изолированные сосуды переносили в камеру объемом 15 мл, заполненную физиологическим раствором, и фиксировали на стеклянных капиллярах шелковой нитью с обоих концов. Камеру устанавливали под микроскопом, оснащенным видеокамерой. Получаемый сигнал обрабатывался и на экране монитора регистрировались текущие значения внутреннего диаметра сосудов.

Сегменты отмывали физиологическим раствором 30 минут при pH 7,4, температуре 37°C и давлении 30 мм рт. ст. (10 мм рт. ст. в экспериментах по исследованию миогенного ответа), после чего регистрировали сокращение, вызванное гиперкалиевой деполяризацией ($[K^+]_o$ = 80 мМ). Далее в зависимости от целей эксперимента использовали модифицированный физиологический раствор с измененным ионным составом или содержащий физиологически активные вещества в отсутствие или присутствии тестируемых соединений. Миогенный ответ регистрировали при повышении внутрисосудистого давления с 10 до 80 мм рт. ст.

Методы изучения ионного гомеостаза клеток. Об активности NKCC судили по величине буметанид-чувствительной компоненты скорости входа ($^{86}Rb^+$). Содержание внутриклеточного Cl^- измеряли по равновесному распределению $^{36}Cl^-$ между клетками и средой инкубации (Akimova et al., 2006). Измерение $[Ca^{2+}]_i$ проводилось в клетках нагруженных Ca^{2+}-чувствительным флуоресцентным красителем Fura-2 (Taurin et al., 2002). В работе использовался метод регистрации мембранного потенциала (E_m) в конфигурации интактной клетки (patch-clamp whole cell configuration) и увеличения неселективной проницаемости сарколеммы в зоне ее контакта с пипеткой с помощью локального добавления ионофора нистатина (Greger, Kunzelmann, 1991; Pavenstadt et al., 1993).

Биохимические методы. Наличие NKCC1 в тканевом лизате определяли с помощью одномерного электрофореза и Вестерн-блот анализа. Концентрацию белка в пробах определяли методом Бредфорда или Лоури.

Растворы. Физиологический раствор (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 1.5 $CaCl_2$, 1,2 $MgCl_2$, 5 глюкозы, 20 HEPES. pH корректировали добавлением трис (pH 7,4). Бикарбонатный физиологический раствор содержал 25 мМ $NaHCO_3$ и 120 мМ NaCl. Бескальциевый раствор в отсутствие $CaCl_2$ содержал 2 мМ ЭГТА. PBS (мМ): 136,89 NaCl, 2,68 KCl, 10,13 Na_2HPO_4, 1,76 KH_2PO_4, pH доводили путем добавления 0,1 N HCl до значения 7,4.

Результаты и обсуждение

1. Роль пуринорецепторов в регуляции сокращения и миогенного ответа

В нашей работе было показано, что активация пуринергических рецепторов при добавлении ATP и UTP приводит к транзиторным и поддерживаемым сокращениям брыжеечных артерий мыши (рис. 1). Из наших результатов также следует, что транзиторное и поддерживаемое сокращения брыжеечных артерий мыши опосредованы активацией $P2X_1$ и $P2Y_6$ рецепторов соответственно. Наблюдаемая в наших экспериментах (рис. 1) транзиторная кинетика ATP-индуцированного сокращения с последующей пролонгированной инактивацией этого сигнального пути согласуется с быстрым затуханием ATP-индуцированного катионного тока, показанного на клетках, трансфецированных $P2X_1$ и $P2X_3$, но не другими изоформами P2X рецепторов (Roberts et al., 2006; Egan et al., 2006). В самом деле, NF023 - соединение, ингибирующее ионные токи, опосредованные $P2X_1$ и $P2X_3$, значительно уменьшало сокращения брыжеечных артерий, вызванные ATP, но не оказывало влияния на сокращения, индуцированные UTP (рис. 2). На ведущую роль $P2X_1$ рецепторов в сокращениях, опосредованных ATP указывает и отсутствие ингибирующего действия PPADS, сильного антагониста $P2X_2$, $P2X_3$ и $P2X_5$ рецепторов, а так же отсутствие сокращений в ответ на ATP брыжеечных артерий, изолированных из мышей, геном которых не содержит этого рецептора на обоих аллелях (*P2X1*$^{-/-}$ мыши) (Vial, Evans, 2002).

В пользу ключевой роли $P2Y_6$ рецепторов в развитии поддерживаемого сокращения, вызванного UTP, говорят следующие наблюдения. *Во-первых*, поддерживаемые сокращения отсутствовали в брыжеечных артериях, обработанных ATP и α,β- ATP (рис. 1), мощных агонистов всех клонированных P2X и ряда P2Y рецепторов. *Во-вторых*, кажущееся сродство поддерживаемых сократительных ответов было выше для UDP по сравнению с UTP (рис. 3), что согласуется с относительной эффективностью данных соединений при активации клонированных $P2Y_6$, нежели других UTP- и UDP-чувствительных рецепторов, таких как $P2Y_2$ и $P2Y_4$ (Cipleu et al., 2002; Rayment et al., 2007). *В-*

третьих, UTP-индуцированные сокращения отсутствовали при добавлении 10 мкМ MRS2578 (рис. 2). В этой концентрации MRS2578 почти полностью подавляет сигнализацию, вызванную $P2Y_6$ при отсутствие эффекта на активность клонированных $P2Y_2$ и $P2Y_4$ рецепторов (von Kügelgen, 2006).

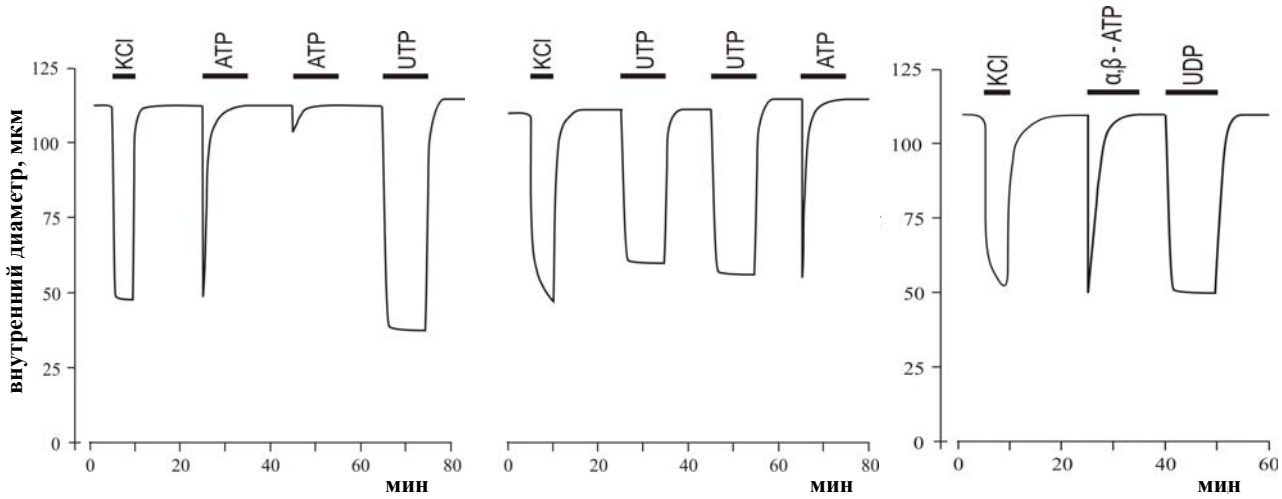

Рис. 1. Типичные кинетики изменения диаметра брыжеечных артерий мыши при действии 80 мМ KCl, 100 мкМ ATP, UTP, UDP и α,β-ATP.

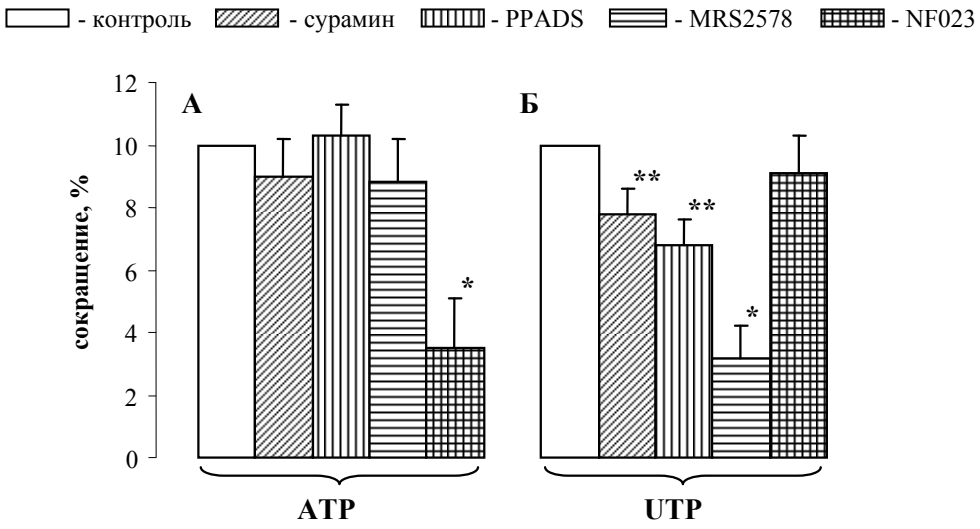

Рис. 2. Действие антагонистов пуринергических рецепторов на сокращения брыжеечных артерий мыши, вызванные ATP (**А**) и UTP (**Б**). 100 мкМ сурамина, 100 мкМ PPADS, 10 мкМ MRS2578 и 10 мкМ NF023 были добавлены за 10 минут до добавления 100 мкМ ATP или UTP. Максимальные значения сокращений в отсутствие антагонистов P2 рецепторов были взяты за 100%. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, полученные в 3 независимых экспериментах. *, ** - $p < 0,02$ и $p < 0,05$ в сравнении с контролем соответственно.

По всей видимости, медленно развивающийся и долговременно сохраняющийся миогенный ответ брыжеечных артерий опосредован активацией $P2Y_6$ рецепторов. Действительно, как UTP-индуцированные сокращения, так и МО были снижены в присутствии ингибитора NKCC буметанида и $P2Y_6$ антагониста MRS2578, но были не чувствительны к $P2X_1$ агонисту NF023 (рис. 2, 4, 6). Напротив, сокращения сосудов, вызванные ATP, блокировались NF023, но не изменялись после предобработки буметанидом и MRS2578 (рис. 2, 6).

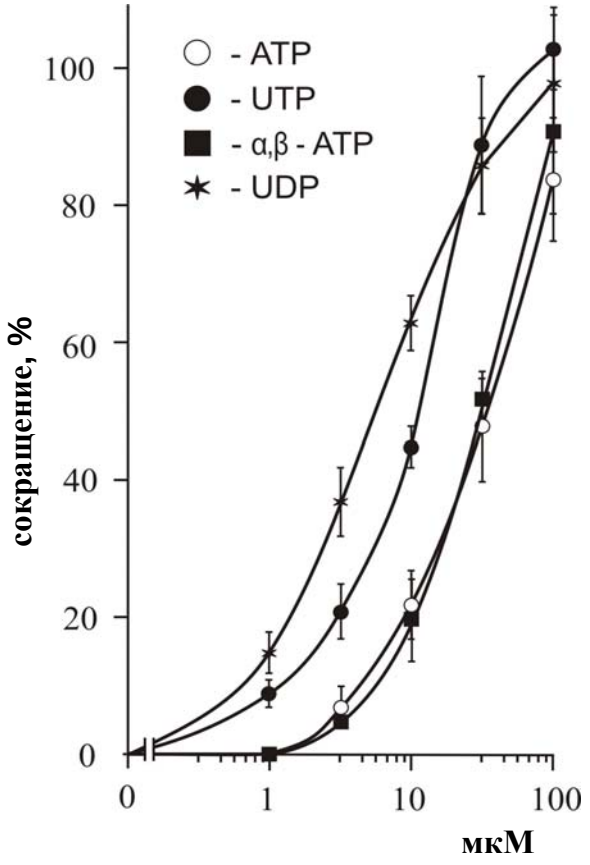

Рис. 3. Концентрационная зависимость действия ATP, UTP, UDP и α,β-ATP на сокращения брыжеечных артерий. За 100% принимали значения гиперкалиевого сокращения (80 мМ KCl). Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, полученные в 3 независимых экспериментах.

Проведенный анализ позволяет предположить следующий механизм вовлечения пуринергических рецепторов и петлевых диуретиков в развитие МО сосудов (рис. 5). Повышение внутрисосудистого давления, действуя через неидентифицированный сенсор, приводит к высвобождению внутриклеточных нуклеотидов, таких как ATP и UTP. Внеклеточный ATP посредством активации неселективных катионных каналов, вероятнее всего $P2X_1$ рецепторов, инициирует направленный внутрь Ca^{2+} ток, обуславливающий повышение

$[Ca^{2+}]_i$ и последующее сокращение ГМК. Эти каналы, однако, быстро инактивируются, что обуславливает транзиторный, нежели продолжительный МО, обнаруженный в брыжеечных артериях мыши. В отличие от ATP, UTP взаимодействует с $P2Y_6$ рецепторами, связанными с $G_{q/11}$ белками, что приводит к высвобождению Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума и активации протеинкиназы С (PKC). В свою очередь, высвобождение Ca^{2+} приводит к активации Cl^--каналов, деполяризации ГМК и активации Ca^{2+}-каналов L-типа. Петлевые диуретики частично блокируют деполяризующее действие Cl^--каналов посредством снижения $[Cl^-]_i$, как было показано на буметанид- и фуросемид- обработанных ГМК различного происхождения (Kreye et al., 1981; Davis et al., 1993; Anfinogenova et al., 2004), тем самым подавляя МО брыжеечных артерий. Наряду с внутриклеточной кальциевой сигнализацией, вызванной активацией $P2Y_6$ рецепторов, миогенный ответ может также быть опосредован PKC, активация которой приводит к увеличению чувствительности к $Ca^{2+}{}_i$ сократительного аппарата через фосфорилирование фосфатазы легких цепей миозина (Davis, Hill, 1999).

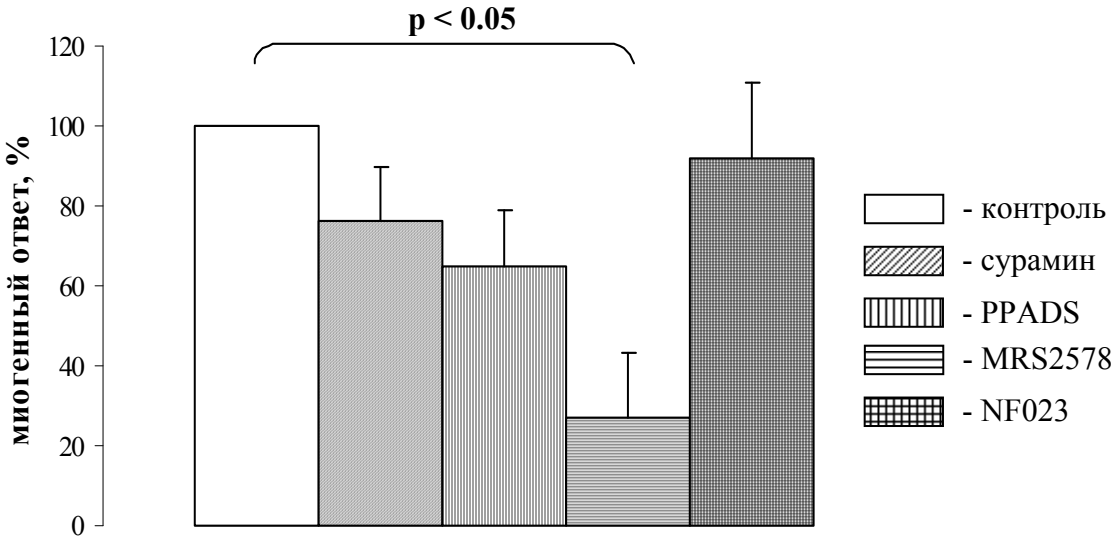

Рис. 4. Влияние 100 мкМ сурамина, 100 мкМ PPADS, 10 мкМ MRS2578 и 10 мкМ NF023 на развитие миогенного ответа брыжеечных артерий мыши. За 100% брали величину МО развивающуюся в отсутствие тестируемых соединений. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, измеренные в четырех независимых экспериментах.

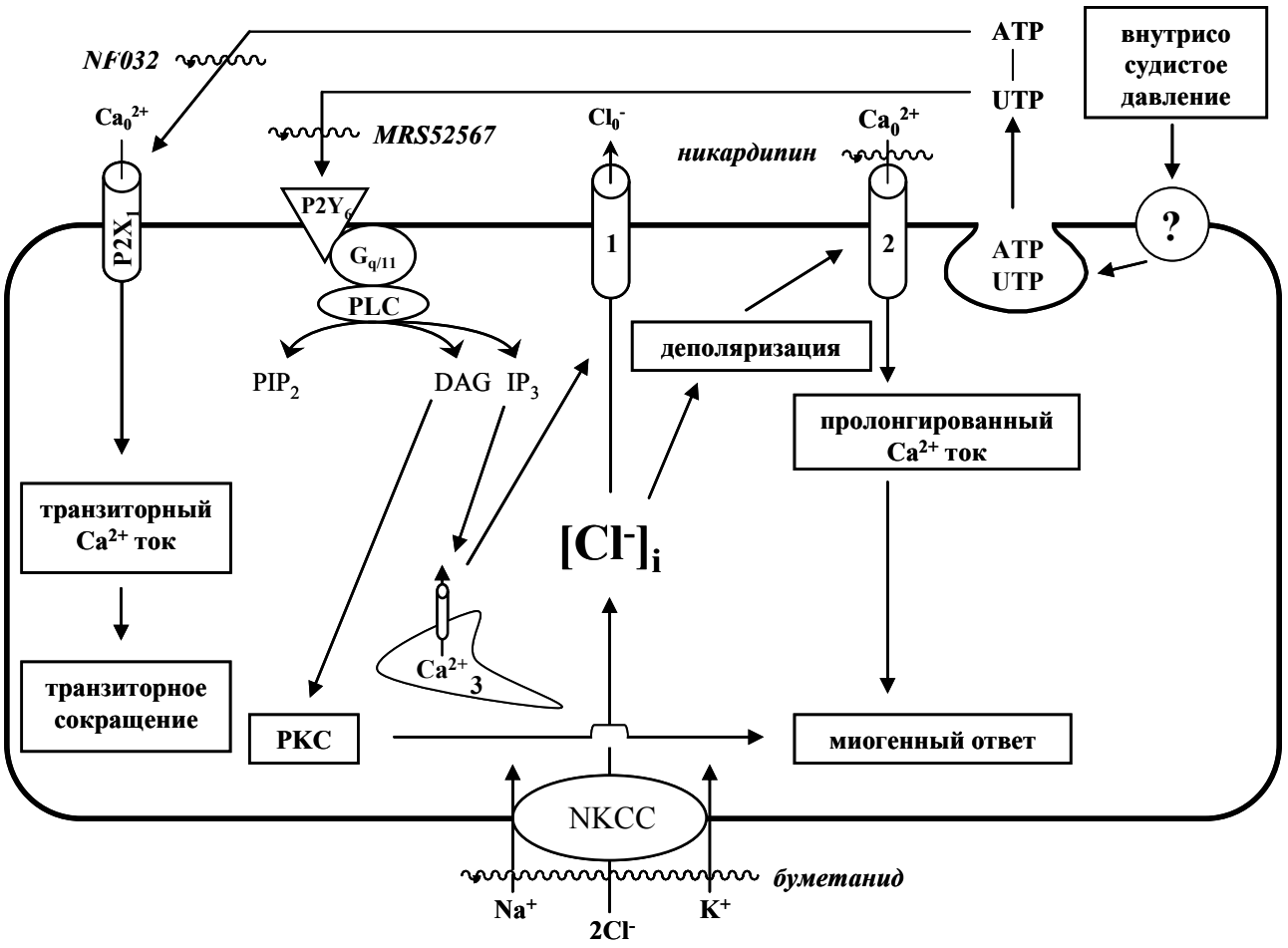

Рис. 5. Схема возможного механизма вовлечения $P2Y_6$ рецепторов и Na^+, K^+, $2Cl^-$-котранспорта (NKCC) в поддержание миогенного ответа. IP_3 – инозитол 1,4,5-трифосфат, PIP_2 – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, PKC – протеинкиназа С, PLC – фосфолипаза С, **1** – Ca^{2+}-активируемые Cl^- каналы, 2 - потенциал-управлямые Ca^{2+} каналы L-типа, **3** – эндоплазматический ретикулум, **?** – неизвестный сенсор давления. Соединения, использованные в нашей работе показаны *курсивом*.

2. Роль диуретиков в регуляции сокращения брыжеечных артерий и ее модуляции внеклеточным HCO_3^-

Мы обнаружили, что предварительная обработка брыжеечных артерий ингибитором Na^+, K^+, $2Cl^-$-котранспорта буметанидом подавляет сокращения, вызванные умеренной деполяризацией ($[K^+]_o$ = 30 мМ) и активацией α-адренергических рецепторов ФЭ в ~2 и 5 раз (рис. 6) соответственно, что согласуется с данными полученными на сегментах аорты крысы (Anfinogenova et al., 2004). Следует однако отметить, что согласно данным, полученным Akar с соавторами, предварительная обработка буметанидом снижает ФЭ-индуцированное сокращение не более чем на 10-20% (Akar et al., 2001). Мы

предположили, что относительно слабый эффект ФЭ, выявленный в этой работе, обусловлен использованием раствора, содержащего 25 мМ бикарбонатного буфера. С целью проверки этой гипотезы мы исследовали концентрационную зависимость действия HCO_3^- на сокращения брыжеечных артерий в отсутствие и присутствии буметанида. В этих экспериментах было установлено, что добавление в физиологический раствор 25 мМ $NaHCO_3$ снижает до 3-5 раз буметанид-чувствительную компоненту сокращений брыжеечных артерий, вызванных умеренной деполяризацией и ФЭ (рис. 7).

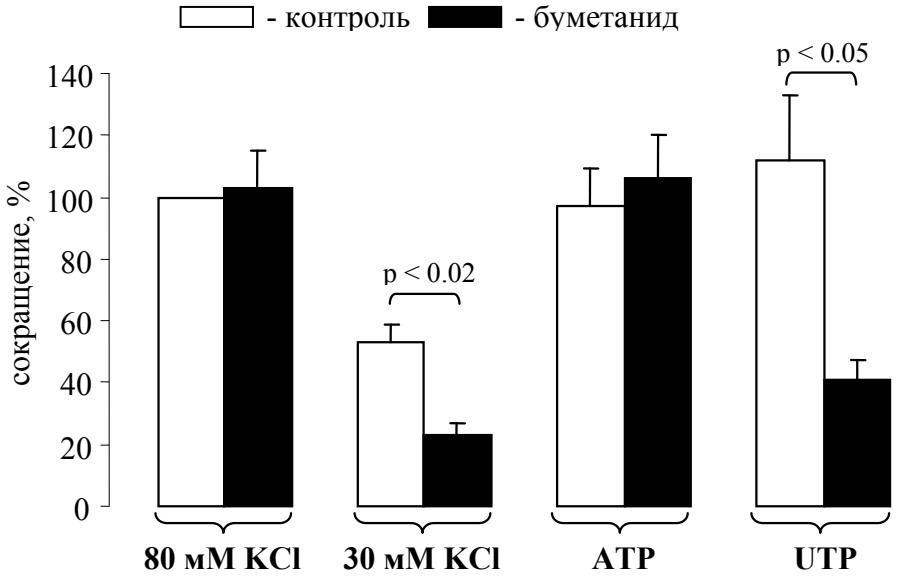

Рис. 6. Действие буметанида на сокращения брыжеечных артерий, вызванные KCl, ATP и UTP. Буметанид (100 мкМ) был добавлен за 30 мин до обработки артерий KCl (80 и 30 мМ), ATP (100 мкМ) и UTP (100 мкМ). За 100% принимали значения гиперкалиевого сокращения (80 мМ KCl), измеренного в отсутствие буметанида. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, полученные в 3 независимых экспериментах.

Для объяснения механизма вовлечения анионов бикарбоната в регуляцию сокращения ГМК сосудов петлевыми диуретиками можно предложить две гипотезы (рис. 8).

Во-первых, HCO_3^- снижает действие петлевых диуретиков на сокращение сосудов через непосредственное взаимодействие с NKCC и ингибирование этого переносчика. Действительно, мы обнаружили, что добавление $NaHCO_3$ снижает в 2-3 раза активность NKCC в культуре ГМК аорты крысы, измеренную по величине буметанид-чувствительной компоненты входа

радиоактивного аналога калия $^{86}Rb^+$ (рис. 9, кривая 3). Не исключено, что ингибирующее действие HCO_3^- обусловлено конкуренцией HCO_3^- и Cl^- за анион-связывающие участки NKCC1.

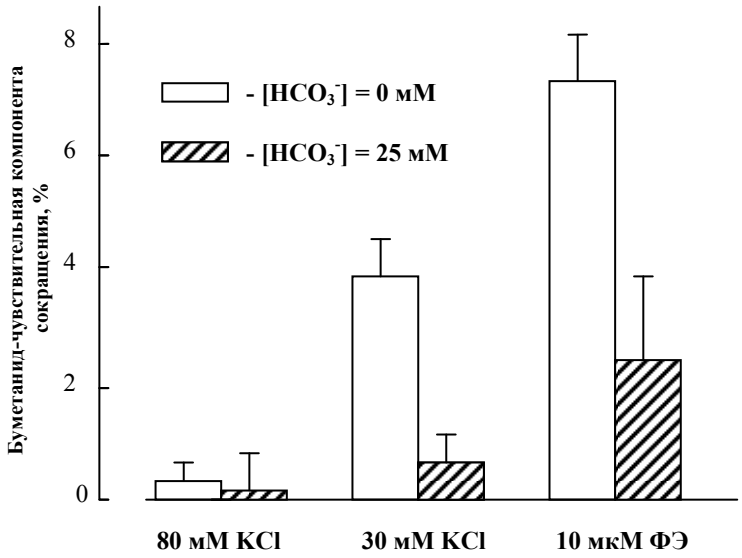

Рис. 7. Буметанид-чувствительная компонента сокращения артерий, индуцированного гиперкалиевой деполяризацией и ФЭ в бескарбонатной среде и в присутствии 25 мМ $NaHCO_3$. Сокращения вызванные этими стимулами в отсутствие буметанида были взяты за 100%. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка.

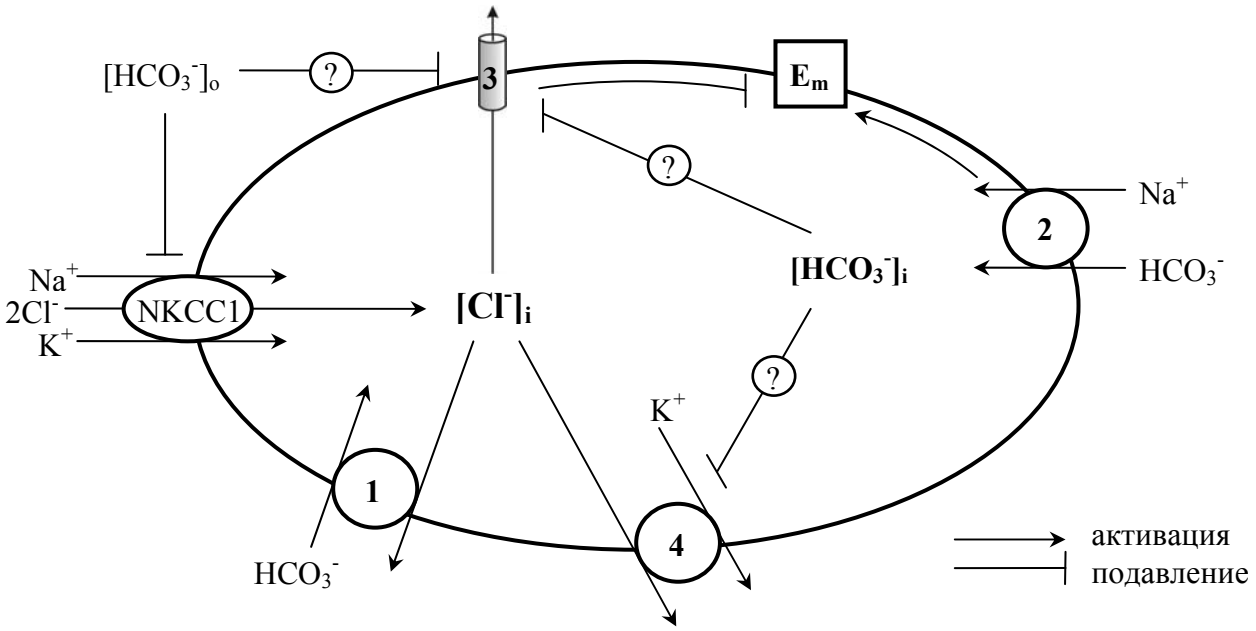

Рис. 8. Схема возможного механизма вовлечения бикарбонат ионов в регуляцию $[Cl^-]_i$, мембранного потенциала (E_m) и Na^+,K^+,$2Cl^-$ котранспорта в гладкомышечных клетках сосудов. 1 – анионный обменник, 2 – Na^+, HCO_3^- котранспорт, 3 – Cl^- каналы; 4 – K^+, Cl^- котранспорт.

Бикарбонат значительно уменьшал гиперполяризацию ГМК, вызванную буметанидом, а также ингибирующее действие этого ингибитора NKCC на ФЭ-индуцированную деполяризацию ГМК (табл. 1) которая, по-видимому, обусловлена активацией $Ca^{2+}{}_i$-чувствительных анионных каналов. Буметанид не оказал влияния ни на базальный уровень $[Ca^{2+}]_i$, ни на максимальный прирост (Δ_1), вызванный ФЭ (табл. 2). В отличие от буметанид-нечувствительной быстрой фазы Ca^{2+} сигнала, которая опосредована активацией фосфолипазы С, продукцией инозитол-1,4,5-трифосфата и освобождением Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, буметанид резко уменьшал никардипин-чувствительную фазу повышения $[Ca^{2+}]_i$ (Δ_2, табл. 2), вызванную деполяризацией сарколеммы и входом Ca^{2+} через потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа (Goyal et al., 2008). В соответствии с рассматриваемой моделью, добавление HCO_3^- не влияло на действие никардипина, но практически полностью устраняло действие буметанида на никардипин-чувствительную фазу повышения $[Ca^{2+}]_i$ (табл. 2).

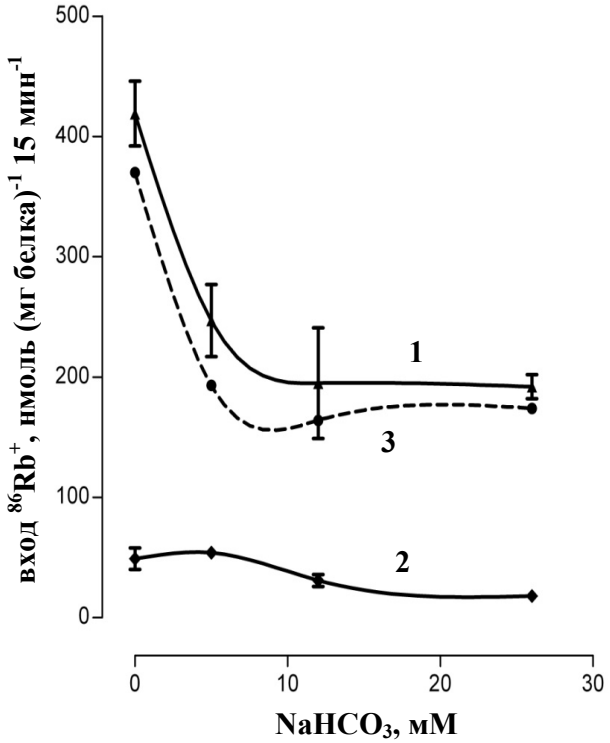

Рис. 9. Концентрационная зависимость действия $NaHCO_3$ на вход ^{86}Rb в присутствии 5 мМ уабаина (1), 5 мМ уабаина + 100 мкМ буметанида (2). Активность NKCC (3) была измерена как буметанид-чувствительный компонент входа радиоактивного рубидия. Клетки промывали раствором PBS и инкубировали 1 час в средах с различной концентрацией $NaHCO_3$, а затем проводили измерение входа ^{86}Rb. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, полученные в 4 параллельных пробах.

Таблица 1. Действие буметанида и бикарбоната на мембранный потенциал покоя ($E_{m/base}$) ГМК аорты крысы и максимальное значение деполяризации, вызванной добавлением ФЭ (ΔE).

Буметанид, мкМ	**$NaHCO_3$, мМ**	**$E_{m/base}$, мВ**	**ΔE, мВ**
1. – (контроль)	–	-41±3	15±3
2. 100	–	-58±4	5±2
3. – (контроль)	25	-44±5	18±4
4. 100	25	-49±6	13±3
$P_{1,3}$		NS	NS
$P_{1,2}$		<0,01	<0,02
$P_{3,4}$		NS	NS

Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, полученные в 5 независимых экспериментах. NS – значения не являющиеся статистически значимыми.

Таблица 2. Влияние буметанида и бикарбоната на $[Ca^{2+}]_i$ в состоянии покоя ($[Ca^{2+}]_{i\text{-}base}$), транзиторную ($\Delta_1$) и поддерживаемую ($\Delta_2$) фазы Ca^{2+} ответа, вызванного аппликацией 10 мкМ ФЭ в культуре ГМК аорты крысы.

Ингибитор, мкМ	**$NaHCO_3$, мМ**	**$[Ca^{2+}]_{i\text{-}base}$, мкМ**	**Δ_1, мкМ**	**Δ_2, мкМ**
1. – (контроль)	–	84±7	801±90	106±23
2. Буметанид, 100	–	79±6	707±99	4±16
3. Никардипин, 0.1	–	82±8	781±102	7±18
4. – (контроль)	25	106±12	789±104	221±22
5. Буметанид, 100	25	97±6	777±83	101±21
6. Никардипин, 0.1	25	104±13	723±88	16±23
$P_{1,4}$		NS	NS	<0,02
$P_{1,2}$		NS	NS	<0,01
$P_{1,3}$		NS	NS	<0,02
$P_{4,5}$		NS	NS	<0,01
$P_{4,6}$		NS	NS	<0,001

Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, полученные в 4 независимых экспериментах. NS – значения не являющиеся статистически значимыми.

Во-вторых, мы обратили внимание на то, что повышение концентрации $NaHCO_3$ от 5 до 25 мМ приводит к более чем двукратному снижению $[Cl^-]_i$ (рис. 10А). Принимая во внимание, что бикарбонат в этом диапазоне концентраций не оказал достоверного влияния на активность $Na^+,K^+,2Cl^-$ котранспорта ГМК аорты крысы (рис. 9), можно предположить, что уменьшение $[Cl^-]_i$ вызвано активацией Cl^-/HCO_3^- обменника, повышающего $[HCO_3^-]_i$. Следует отметить, что наряду с электронейтральным анионным обменником, повышение $[HCO_3^-]_i$ может быть также опосредованно электрогенным Na^+,HCO_3^- котранспортом и HCO_3^- проницаемыми анионными каналами, а также через регуляцию $[Cl^-]_i$ направленным из клетки Na^+-независимым K^+,Cl^- котранспортом (KCC) (Рис. 8). Все эти транспортеры были обнаружены в ГМК сосудов (O'Donnell, Owen, 1994; Mount, Romero, 2004; Sterling, Casey, 2002; Adragna et al., 2000). В самом деле, повышение концентрации HCO_3^- в эритроцитах приводит к ингибированию KCC, причем значение IC_{50} для HCO_3^-, полученное в этой работе ~35 мМ (Lauf, 1984), что существенно ниже значений IC_{50}, определенных нами для $Na^+,K^+,2Cl^-$ котранспорта ГМК <5 мМ (рис. 9).

3. Регуляция миогенного ответа буметанидом

Как видно из рисунка 11А, повышение внутрисосудистого давления с 10 до 80 мм рт. ст. приводило к быстрому увеличению диаметра сосудов с частичной нормализацией этого параметра в течение последующих 10-15 минут. Медленная кинетика развития МО, наблюдаемая в наших экспериментах, согласуется с данными, полученными на брыжеечных артериях мыши другими исследователями (Lucchesi et al., 2004) и контрастирует с чрезвычайно быстрым МО афферентных артериол, возникающим меньше чем за 1 секунду после повышения давления (Loutzenhiser et al., 2006) (рис. 11А). Развивающийся МО оставался поддерживаемым и не претерпевал существенных изменений в течение последующих 40 минут. Удаление $NaHCO_3$ из раствора вызывало резкое снижение величины МО. В связи с этим все эксперименты по исследованию МО были выполнены с использованием физиологического раствора, содержащего 25 мМ $NaHCO_3$.

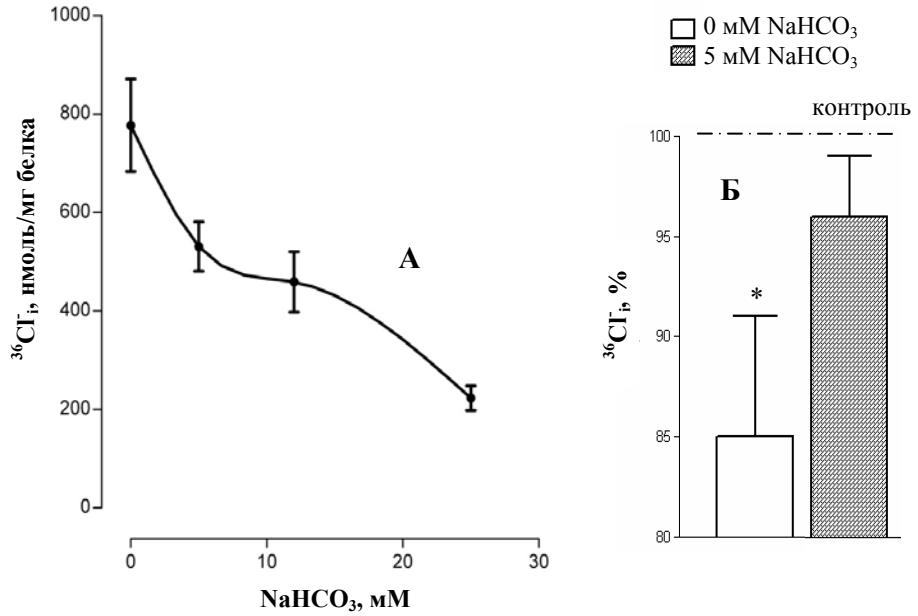

Рис. 10. Эффект бикарбоната на концентрацию Cl^- в гладкомышечных клетках. А. Концентрационная зависимость влияния $NaHCO_3$ на $[Cl^-]_i$ в отсутствие буметанида и уабаина. **Б.** Эффект буметанида на $[Cl^-]_i$ в бескарбонатном растворе и растворе, содержащем 5 мМ $NaHCO_3$. * - $p < 0,05$ в сравнении с $[Cl^-]_i$ в среде без буметанида (контроль).

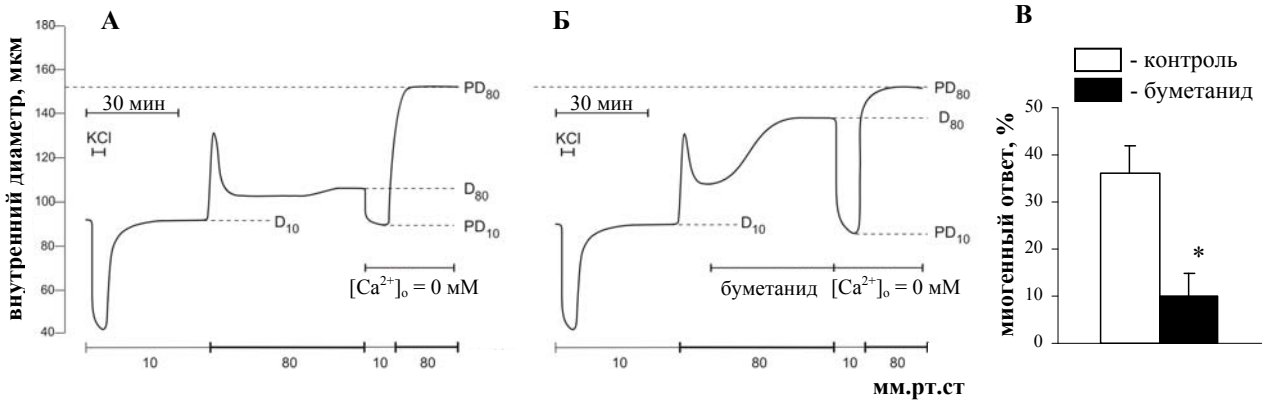

Рис. 11. Влияние внутрипросветного давления на внутренний диаметр брыжеечной артерии мыши в отсутствие (**А**) и присутствии (**Б**) буметанида. PD_{80} и PD_{10} - пассивный диаметр сосудов при давлении 80 и 10 мм рт. ст. соответственно, измеренный после 10 минут инкубации брыжеечных артерий в бескальциевом физиологическом растворе, содержащем 2 мМ ЭГТА, D_{80} и D_{10} – исходный диаметр, измеренный при 80 и 10 мм рт. ст. соответственно. На диаграмме **В** данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, полученные в 4 независимых экспериментах. * - $p < 0,05$ в сравнении контролем.

Добавление 100 мкМ буметанида привело к увеличению внутреннего диаметра сосудов в течение 10-20 минут (рис. 11Б) и вызвало снижение величины МО по отношению к контролю с 36±6 до 10±5 % от величины пассивного диаметра сосудов, измеренного в бескальциевом физиологическом растворе (рис. 11В).

4. Роль NKCC1 гладкомышечных клеток и эндотелия

Известно, что активность NKCC в клетках эндотелия сопоставима или даже выше, чем активность этого переносчика в ГМК сосудов (Yerby et al, 1997). В связи с этим можно предположить, что ингибирующее действие петлевых диуретиков на сокращение сосудов обусловлено их взаимодействием с NKCC1, локализованном как в ГМК, так и в клетках эндотелия. Мы показали, что ингибирование эндотелиальных NO-синтаз путем добавления L-NAME не оказало влияния на подавление буметанидом миогенного ответа брыжеечных артерий (рис. 12) и на ингибирующее действие буметанида на сокращения вызванные 30 мМ KCl, 10 мкМ ФЭ и 100 мкМ UTP (рис. 13).

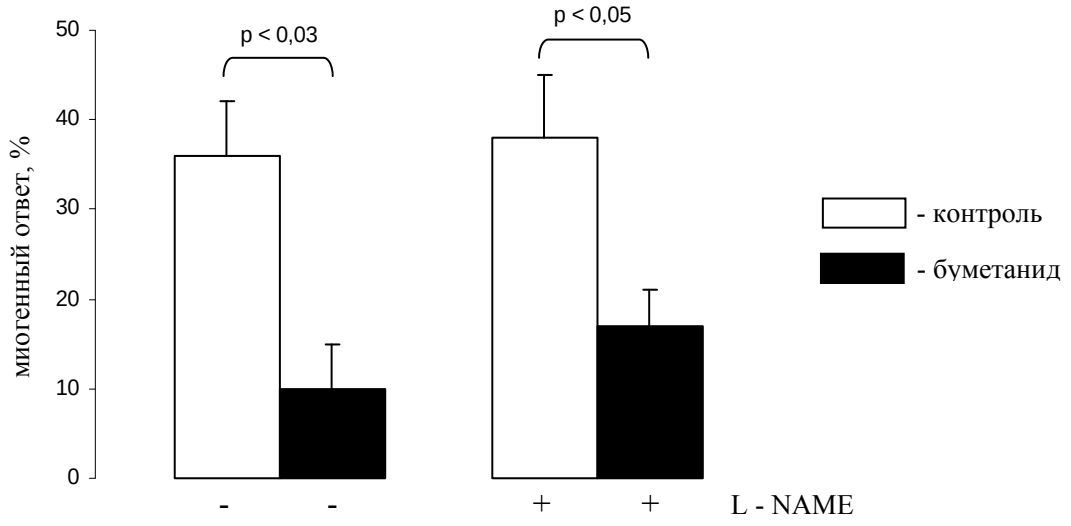

Рис. 12. Эффект 30 минутной предварительной обработки буметанидом (100 мкМ) и L-NAME (100 мкМ) на миогенный ответ брыжеечных артерий мыши. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, измеренные в 4 экспериментах.

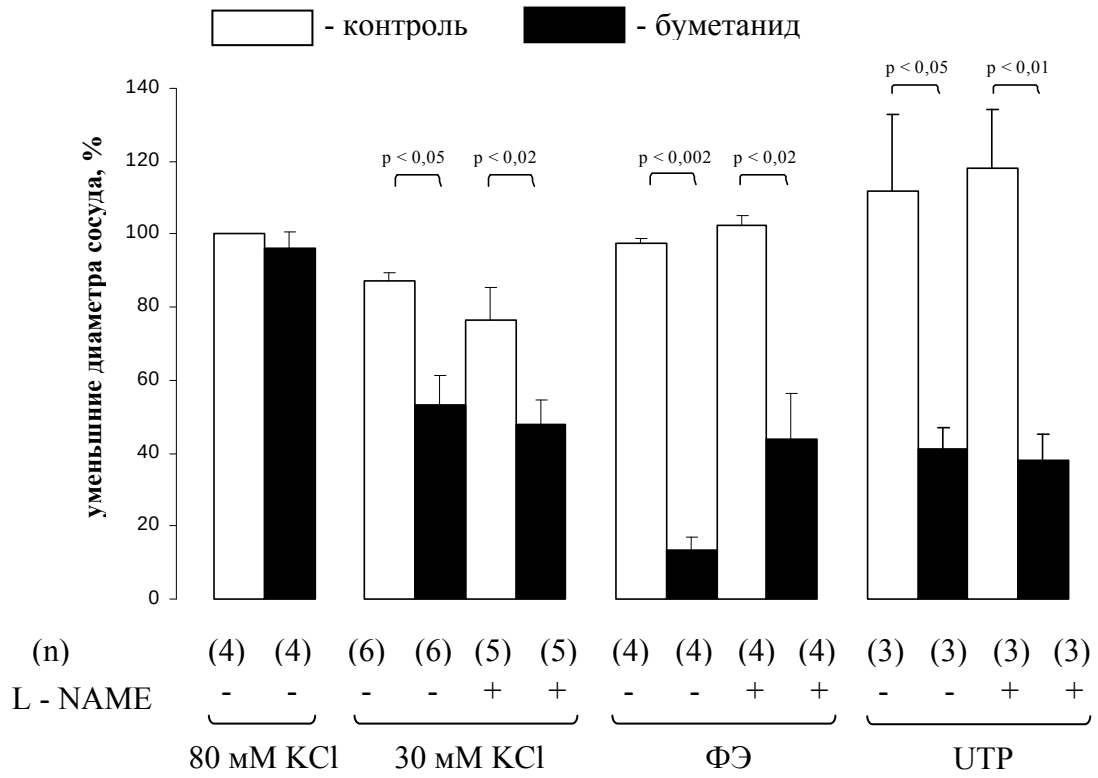

Рис. 13. Влияние 100 мкМ буметанида на сокращения брыжеечных артерий мыши, вызванные KCl (80 и 30 мМ), фенилэфрином (ФЭ, 10 мкМ) и UTP (100 мкМ), в отсутствие и присутствии 100 мкМ L-NAME. Гиперкалиевое сокращение вызывали путем эквимолярного замещения NaCl на 30 или 80 мМ KCl. Буметанид и L-NAME были добавлены за 30 минут до тестируемого сокращения. Максимальное уменьшение диаметра сосудов, вызванного гиперкалиевой деполяризацией 80 мМ KCl было взято за 100%. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка, измеренные в n экспериментах.

Полученные результаты указывают на то, что петлевые диуретики подавляют сокращения, вызванные умеренной деполяризацией, стимуляцией α_1-адренорецепторов и $P2Y_6$ рецепторов, а также МО артерий через взаимодействие с NKCC1 гладкомышечных клеток, нежели клеток эндотелия.

Как упоминалось выше, буметанид, известный как один из самых эффективных ингибиторов NKCC, подавляет МО (рис. 11В) и сокращения брыжеечных артерий, вызванные умеренной деполяризацией, ФЭ и UTP (рис. 6). Следует однако отметить, что буметанид и другие петлевые диуретики могут влиять на функционирование клетки не зависимо от ингибирования этого переносчика. Так, например, было установлено, что фуросемид блокирует

тромбоксановые A_2 рецепторы (Stanke-Labesque et al., 2000) и повышает активность cAMP фосфодиэстераз (Mozhayeva et al, 1994).

Учитывая эти данные мы исследовали регуляцию сокращения брыжеечных артерий, изолированных из контрольных животных, и животных, лишенных обоих аллелей гена NKCC1 (*NKCC1*$^{-/-}$). Было обнаружено, что у *NKCC1*$^{-/-}$ мышей полностью отсутствует ингибирующее действие буметанида на МО и сокращения брыжеечных артерий, вызванные умеренной деполяризацией, а также агонистами α_1-адренергических рецепторов (ФЭ) и P2Y рецепторов (UTP) (табл. 3). В отличие от буметанида, ингибирующее действие никардипина на МО артерий контрольных и *NKCC1*$^{-/-}$ мышей достоверно не отличалось (табл. 3).

Таким образом, полученные в этой части работы результаты впервые показывают ключевую роль NKCC1 в ингибирующем действии буметанида на сокращения и миогенный ответ ГМК сосудов.

Таблица 3. Действие буметанида и никардипина на сокращения и миогенный ответ брыжеечных артерий контрольных мышей (C57Bl/6) и мышей, лишенных гена NKCC1 (*NKCC1*$^{-/-}$).

Ингибитор	**KCl, 30 мМ**		**ФЭ, 10 мкМ**		**UTP, 100 мкМ**		**МО**	
	C57Bl/6 (n=4)	***NKCC1*$^{-/-}$ (n=4)**	**C57Bl/6 (n=3)**	***NKCC1*$^{-/-}$ (n=3)**	**C57Bl/6 (n=3)**	***NKCC1*$^{-/-}$ (n=3)**	**C57Bl/6 (n=4)**	***NKCC1*$^{-/-}$ (n=4)**
– (контроль)	100	88±11	100	79±13	100	106±14	100	72±8
Буметанид	68±5*	91±8	28±14**	70±12	35±13*	99±14	37±7**	66±9
Никардипин	11±4**	8±5**	16±4**	23±11*	12±6**	19±11**	21±17*	18±6**

Сокращение инициировалось через 30 и 10 минут после обработки 100 мкМ буметанида или 0,1 мкМ никардипина соответственно. Уменьшение диаметра брыжеечных артерий контрольных мышей, индуцированное KCl, ФЭ и UTP в отсутствии буметанида и никардипина было взято за 100%. В экспериментах по исследованию миогенного ответа (МО) за 100% брали величину МО брыжеечных артерий мышей линии C57Bl/6 в отсутствие буметанида и никардипина. n – количество проведенных экспериментов. *, ** - $p<0.05$ и $p<0.01$ в сравнении с контролем соответственно.

Выводы

1. ATP и UTP вызывают транзиторное и поддерживаемое сокращения брыжеечной артерии мыши, действуя через $P2X_1$ и $P2Y_6$ пуринергические рецепторы соответственно.

2. Миогенный ответ брыжеечных артерий снижен в присутствии антагониста $P2Y_6$ рецепторов MRS2578 и не зависит от антагониста $P2X_1$ рецепторов NF023.

3. Петлевой диуретик буметанид подавляет миогенный ответ и сокращения брыжеечных артерий мыши, вызванные умеренной деполяризацией, а также активацией α_1-адренергических (фенилэфрин) и $P2Y_6$ рецепторов (UTP), не влияя на амплитуду транзиторных сокращений, вызванных активацией $P2X_1$ рецепторов (ATP).

4. Внеклеточный бикарбонат уменьшает величину буметанид-чувствительной компоненты сокращений брыжеечных артерий, вызванных умеренной деполяризацией и фенилэфрином. Ингибирующее действие HCO_3^- обусловлено снижением буметанид-чувствительной компоненты регуляции мембранного потенциала, внутриклеточных концентраций ионов Ca^{2+} и Cl^-, что частично связано с ингибирующим действием этого аниона на активность NKCC1.

5. Обработка брыжеечных артерий ингибитором NO-синтаз L-NAME не оказывает влияния на подавление буметанидом миогенного ответа и сокращений, вызванных умеренной деполяризацией, фенилэфрином и UTP.

6. Ингибирующее действие буметанида на миогенный ответ и сокращения брыжеечных артерий, вызванные умеренной деполяризацией, а также агонистами α_1-адренергических и P2Y рецепторов отсутствует у мышей, лишенных гена, кодирующего NKCC1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Koltsova SV,** Lavoie JL, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN. High-ceiling diuretics inhibit contraction or resistant mesenteric arteries. Abstract. Cardiac Arrhythmias Symposium, Montreal (Canada), 2008. p.26.
2. **Koltsova SV,** Lavoie JL, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN. High-ceiling diuretics inhibit contraction or resistant mesenteric arteries. Abstract. Canadian Cardiovascular Congress, Toronto (Canada), 2008. p. 121.
3. **Koltsova SV,** Lavoie JL, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN. Excitation-contraction coupling in resistance mesenteric arteries: evidence for NKCC1-mediated pathway. Abstract. 11^{e} Congrés annuel des étudiants, stagiaires et résidents du centre de recherche du CHUM, Montreal (Canada), 2009, p. 77
4. **Koltsova SV,** Maximov GV, Lavoie JL, Tremblay J, Grygorczyk R, Hamet P, Orlov SN. Myogenic tone in mouse mesenteric arteries: evidence for P2Y receptor-mediated, Na^+, K^+, $2Cl^-$ cotransport-dependent signaling. Abstract. 2^{iéme} réunion scientifique, Groupe d'étude des protéines membranaires, Université de Montréal/McGill University, Montreal (Canada), 2009.
5. Orlov SN, **Koltsova S**V, Kotelevtsev S, Tremblay J, Hamet P. Excitation-contraction coupling in resistance mesenteric arteries: evidence for NKCC1-mediated signaling. Abstract. XXXVI Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009), Kyoto (Japan), 2009, p. 176.
6. Orlov SN, **Koltsova SV**, Maximov G, Lavoie J, Tremblay J, Grygorczyk R, Hamet P. Myogenic tone in mouse mesenteric arteries: evidence for P2Y receptor-mediated, Na^+, K^+, $2Cl^-$ cotransport-dependent signaling. Abstract. XXXVI Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009), Kyoto (Japan), 2009, p. 211.
7. **Koltsova SV**, Kotelevtsev SV, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN. Excitation-contraction coupling in resistance mesenteric arteries: evidence for NKCC1-mediated pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 379(4): 1080-3.
8. **Koltsova SV**, Luneva OG, Lavoie JL, Tremblay J, Maksimov GV, Hamet P, Orlov SN. HCO_3^- - dependent impact of Na^+, K^+, $2Cl^-$ cotransport in vascular smooth muscle excitation-contraction coupling. Cell. Physiol. Biochem. 2009; 23 (4-6): 407-14.
9. **Koltsova SV**, Maksimov GV, Kotelevtsev SV, Lavoie JL, Tremblay J, Grygorczyk R, Hamet P, Orlov SN. (2009) Myogenic tone in mouse mesenteric arteries: evidence for P2Y receptor-mediated, Na^+, K^+, $2Cl^-$ cotransport-dependent signaling. Purinergic Signal. 2009; 5(3): 343-9.
10. **Koltsova SV**, Lavoie JL, Tremblay J, Grygorczyk R, Hamet P, Orlov SN. Myogenic tone in mesenteriv arteries involves P2Y receptor-mediated NKCC1-dependent signaling. Abstract. 3^{e} Journee Scientific du Groupe d'Etude des Proteins Membranaires Universite de Montreal/McGill University, Montreal (Canada), 2010.

11. **Koltsova SV**, Maximov GV, Lavoie JL, Kotelevtsev SV, Tremblay J, Grygorczyk R, Hamet P and Orlov SN. Myogenic tone in mesenteric arteries involves P2Y receptor-mediated, NKCC1-dependent signaling. Abstract. 6th International Congress of Pathophysiology, Montreal (Canada), 2010, p. 19.
12. Orlov SN, **Koltsova SV**, Platonova A, Akimova OA, Mongin A, Grygorczyk R. Tissue-specific impact of purinergic receptors on cell volume adjustment. Abstract. 6th International Congress of Pathophysiology, Montreal (Canada), 2010, p. 17.
13. **Koltsova SV**, Maximov GV, Lavoie JL, Kotelevtsev SV, Tremblay J, Grygorczyk R, Hamet P and Orlov SN. Myogenic tone in mesenteric arteries involves P2Y receptor-mediated, NKCC1-dependent signaling**.** Abstract. The 23rd scientific meeting of the international society of hypertension, Vancouver (Canada), 2010, p. 209.
14. **Кольцова С.В.** Баскаков М.Б., Орлов С.Н., Миогенный тонус сосудов в норме и патологии: роль пуринергической сигнальной системы и Na^+, K^+, $2Cl^-$ котранспорта. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2010; N 4.-С.3-10.