

ISSN 1607-419X  
ISSN 2411-8524 (Online)  
УДК 616.131

## Роль АТФ и транспортеров ионов $\text{Cl}^-$ в регуляции сократительной активности гладких мышц легочной артерии в гипоосмотической среде

Л. В. Смаглий, В. С. Гусакова,  
А. М. Горянова, Е. А. Голованов,  
Е. Е. Чибисов, Ю. Г. Бирулина, С. В. Гусакова  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Сибирский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Томск, Россия

### Контактная информация:

Смаглий Людмила Вячеславовна,  
ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава  
России,  
ул. Московский тракт, д. 2,  
Томск, Россия, 634050.  
E-mail: lud.smagly@yandex.ru

Статья поступила в редакцию  
18.11.19 и принята к печати 02.04.20.

### Резюме

**Цель исследования** — изучить роль хлорного транспорта в АТФ-зависимой регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток легочной артерии (ЛА). **Материалы и методы.** Исследование проводили на деэндоотелизированных кольцевых сегментах ЛА крыс-самцов линии Wistar методом механографии. Сократительные ответы сегментов ЛА вызывали инкубацией в гиперкалиевом растворе (30 мМ KCl), гипоосмотическом растворе (40 мМ NaCl), а также восстановлением осмолярности среды (120 мМ NaCl) после инкубации в гипоосмотической среде. Для исследований  $\text{Cl}^-$ -транспорта использовали ингибитор  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспорта (NKCC) буметанид (10 мкМ, предобработка 30 минут), неселективный блокатор  $\text{Cl}^-$ -каналов SITS (100 мкМ) и блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{Cl}^-$ -каналов нифлумовую кислоту (НК, 10 мкМ). **Результаты.** Добавление АТФ (10–500 мкМ) к сегментам, инкубируемым в растворе Кребса (120 мМ NaCl), не оказывало влияния на тонус сосудов, тогда как добавление 500 и 1000 мкМ АТФ приводило к развитию транзиторных сократительных ответов, амплитуда которых уменьшалась в присутствии буметанида, SITS и НК. Помещение сегментов ЛА в гипоосмотическую среду (40 мМ NaCl) вызывало развитие транзиторного сокращения, так же как и последующее восстановление осмолярности среды (120 мМ NaCl). АТФ (500 мкМ) устранял фазу расслабления гипоосмотической стрикции, но полностью подавлял развитие изоосмотической стрикции. Буметанид не влиял на действие АТФ при изоосмотической стрикции, но восстанавливал фазу расслабления гипоосмотической стрикции. SITS и НК устраняли действие АТФ на гипо- и изоосмотическую стрикцию. **Заключение.** Констрикторное действие АТФ на гладкомышечные клетки ЛА связано с активацией трансмембранных механизмов перераспределения  $\text{Cl}^-$ , в которые вовлечены NKCC и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые  $\text{Cl}^-$ -каналы.

**Ключевые слова:** легочная артерия, гладкомышечные клетки,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспорт,  $\text{Cl}^-$ -каналы, АТФ, гипоосмотическое сокращение

Для цитирования: Смаглий Л. В., Гусакова В. С., Горянова А. М., Голованов Е. А., Чибисов Е. Е., Бирулина Ю. Г., Гусакова С. В. Роль АТФ и транспортеров ионов  $\text{Cl}^-$  в регуляции сократительной активности гладких мышц легочной артерии в гипоосмотической среде. Артериальная гипертензия. 2020;26(5):573–580. doi:10.18705/1607-419X-2020-26-5-573-580

---

---

## Role of ATP and Cl<sup>-</sup> transporters in regulation of contractile activity of pulmonary artery smooth muscles in hyposmotic conditions

L. V. Smaglyi, V. S. Gusakova,  
A. M. Gorianova, E. A. Golovanov,  
E. E. Chibisov, J. G. Birulina, S. V. Gusakova  
Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

**Corresponding author:**  
Liudmila V. Smaglyi,  
Siberian State Medical University,  
2 Moskovskii trakt, Tomsk,  
634050 Russia.  
E-mail: lud.smagly@yandex.ru

*Received 18 November 2019;  
accepted 2 April 2020.*

---

---

### Abstract

**Objective.** The role of Cl<sup>-</sup>-transport in ATP-dependent regulation of contractile activity of rat pulmonary artery (PA) smooth muscle cells was studied. **Design and methods.** The study was performed on endothelium-denuded ring segments of the PA of male Wistar rats. Mechanical tension was measured using organ bath technique. Contractions of the PA segments were induced by high-potassium solution (30 mM KCl), hyposmotic solution (40 mM NaCl), as well as restoration of the medium osmolarity (120 mM NaCl) after incubation in hyposmotic solution. Inhibitor of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransport (NKCC) bumetanide (10 μM, 30 minutes preincubation), non-selective Cl<sup>-</sup>-channel blocker SITS (100 μM) and Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels blocker niflumic acid (NA, 10 μM) were used to modulate the Cl<sup>-</sup>-transport. **Results.** ATP (10–500 μM) did not affect vascular tone of PA segments incubated in Krebs solution (120 mM NaCl), while 500 and 1000 μM ATP led to the development of transient contractions, the amplitude of which decreased in the presence of bumetanide, SITS and NA. Incubation of PA segments in a hyposmotic medium (40 mM NaCl) caused the development of transient contraction. Subsequent recovery of the medium osmolarity (120 mM NaCl) induced another transient contraction — isosmotic striction. ATP (500 μM) eliminated the relaxation phase of hyposmotic striction, and completely suppressed the development of isosmotic striction. Bumetanide did not affect the action of ATP during isosmotic striction, but restored the relaxation phase of hyposmotic striction. SITS and NA eliminated the effect of ATP on hypo- and isosmotic striction. **Conclusions.** The constrictive effect of ATP on the smooth muscle cells of the PA is associated with the activation of mechanisms of transmembrane Cl<sup>-</sup>-redistribution, in which NKCC and Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels are involved.

**Key words:** pulmonary artery, smooth muscle cells, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransport, Cl<sup>-</sup>-channels, ATP, hyposmotic contraction

*For citation: Smaglyi LV, Gusakova VS, Goryanova AM, Golovanov EA, Chibisov EE, Birulina JG, Gusakova SV. Role of ATP and Cl<sup>-</sup> transporters in regulation of contractile activity of pulmonary artery smooth muscles in hyposmotic conditions. Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension. 2020;25(6):573–580. doi:10.18705/1607-419X-2020-26-5-573-580*

## Введение

Хроническая гипоксия, вызываемая констрикцией сосудов малого круга кровообращения, играет ключевую роль в патогенезе легочной гипертензии, ассоциированной с патологией дыхательной системы и/или гипоксемией [1, 2]. На изолированных гладкомышечных клетках (ГМК) легочной артерии (ЛА) крысы показано, что гипоксия сопровождается ингибированием потенциал-зависимых  $K^+$  каналов ( $K_v$ ) и частичной деполяризацией ГМК, вследствие чего повышается тонус легочных сосудов [3]. Наряду с  $K_v$ , деполяризацию в ГМК легочных сосудов при гипоксии вызывает активация  $Ca^{2+}$ -чувствительных  $Cl^-$ -каналов [4]. Показано, что легочная гипертензия связана с увеличением  $Ca^{2+}$ -активируемых хлорных токов [5]. Так, у крыс с легочной гипертензией ингибитор кальций-активируемых хлорных каналов нифлумовая кислота снижала выраженность гипертрофических изменений в сосудах и сердце [6, 7]. Помимо  $Cl^-$ -каналов, в трансмембранном переносе  $Cl^-$  в ГМК участвуют котранспортеры, осуществляющие совместный транспорт  $Cl^-$  и катионов  $Na^+$  и  $K^+$ . Показано, что активность  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$ -котранспорта (NKCC 1) возрастает при первичной гипертензии у мышей, в то время как нокаутирование по гену, кодирующему NKCC 1, приводило к снижению сосудистого тонуса и кровяного давления [8].

Помимо ионных транспортеров, в регуляции тонуса легочных сосудов участвуют сигнальные молекулы, к числу которых относится внеклеточный АТФ. Основными источниками АТФ в кровеносном русле служат эритроциты, эндотелиальные клетки и симпатические нервные окончания [9]. Особую роль играет высвобождение АТФ из эритроцитов при гипоксии, что вносит существенный вклад в повышение его концентрации в кровотоке [10–13]. По данным Sprague и соавторов, повышение концентрации внеклеточного АТФ сопровождается усилением продукции NO эндотелиальными клетками и последующим расслаблением ГМК сосудов [14]. Этот механизм нарушен у пациентов с первичной легочной гипертензией, характеризующейся ростом внутрисосудистого сопротивления в малом круге кровообращения [14].

Взаимодействие АТФ с пуриnergическими рецепторами сопровождается активацией  $Cl^-$  токов. Так,  $Ca^{2+}$ -зависимые  $Cl^-$ -каналы принимают участие в АТФ-зависимой регуляции секреторных клеток эпителия дыхательных путей [15–17], слезных желез [18]. Объем-чувствительные  $Cl^-$ -каналы участвуют в регуляции объема астроцитов [19] и гепатоцитов [20]. Транзиторная активация объем-чувствительного  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  котранспорта (NKCC 1) показана в клетках собирательных канальцев почки собак

Madin-Darby [21]. Вклад  $Cl^-$  токов в действие АТФ на ГМК легочной артерии практически не изучен.

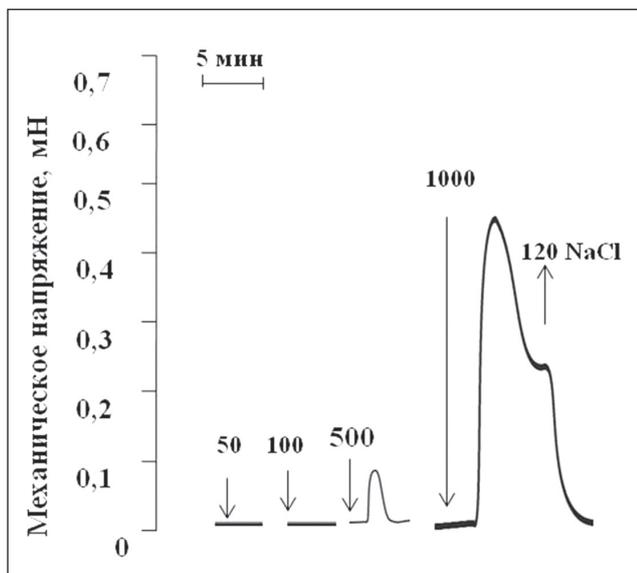
Транспортеры  $Cl^-$  и пуриnergические рецепторы являются важными регуляторами объема клеток, что было показано в различных исследованиях [22–25]. В работе X. Z. Sun и соавторов (2014) продемонстрировано набухание ГМК легочных сосудов при легочной гипертензии [26]. С другой стороны, помещение эпителиальных клеток в гипотоническую среду увеличивало высвобождение АТФ из клеток [27–31]. Исходя из приведенных данных, мы предполагаем, что АТФ и  $Cl^-$  токи могут вносить вклад в изменение сократительной активности ГМК и тонуса сосудов при набухании клеток.

**Цель исследования** — изучить вклад транспортеров  $Cl^-$  в регуляцию сократительной активности гладкомышечных клеток ЛА пуриnergическими рецепторами в гипоосмотических условиях.

## Материалы и методы

Объектом исследования служили изолированные кольцевые сегменты ЛА крыс-самцов линии Wistar (весом 180–250 г) с удаленным эндотелием. ЛА после выделения помещали в раствор Кребса: 120,4 NaCl, 5,9 KCl, 2,5  $CaCl_2$ , 1,2  $MgCl_2$ , 5,5 глюкозы, 15  $NH_2C(CH_2OH)_3$  [tris(hydroxymethyl)-aminomethane] (pH 7,4; осмолярность 316,4 мосМ). После удаления жировой и соединительной ткани артерию нарезали на кольцевые сегменты шириной 2–3 мм. Чтобы исследовать влияние АТФ на сократительную активность ГМК при набухании клеток и исключить влияние эндотелиальных факторов, эндотелий удаляли непосредственно перед экспериментом, вращая деревянный шпатель в просвете сегмента в течение 1 минуты [32–34]. Далее в экспериментах использовали сегменты, у которых отсутствовала реакция расслабления на добавление ацетилхолина (1–100 мкМ), что свидетельствует об отсутствии функционирующего эндотелия. Для измерения механического напряжения (МН) сегменты ЛА фиксировали в термостатируемых камерах механографической установки Myobath II (WPI, Германия), заполненных раствором Кребса (37 °С, pH = 7,4), и растягивали нагрузкой 500 мг. Через 60 минут инкубации дважды вызывали сокращение сосудистых сегментов гиперкалиевым раствором Кребса, содержащим 15 мМ KCl. Для исследования сократительной активности ГМК при набухании клеток использовали модель, предложенную в данных некоторых работ [35, 36], согласно которой набухание ГМК вызывают путем помещения сосудистых сегментов в раствор Кребса, содержащий 40 мМ NaCl [35, 36]. Ранее в исследованиях с мочевиной, меченной  $^{14}C$ , было показано

**Рисунок 1. Влияние АТФ (10–1000 мкМ) на базальный тонус деэндотелизированных сегментов легочной артерии крысы**



**Примечание:** по оси ординат — механическое напряжение (мН); стрелками показано добавление и удаление АТФ (50–1000 мкМ).

набухание клеток, сопровождающееся максимальным вовлечением механизмов перераспределения внутриклеточных осмолитов и регуляции клеточного объема [35, 37]. В предварительных экспериментах измеряли амплитуду гипоосмотической стрикции при модуляции содержания NaCl в растворе Кребса от 70 до 40 мМ. Максимальная амплитуда стрикции наблюдалась в растворе, содержащем 40 мМ NaCl. При использовании раствора, содержащего 40 мМ NaCl, сегменты сохраняли жизнеспособность и полностью восстанавливали нормальную сократительную активность после инкубации в нормальном растворе Кребса (120 NaCl). Амплитуду сократительных ответов на действие АТФ и гипоосмотического раствора рассчитывали в процентах от амплитуды гиперкалиевого сокращения, которое принимали за 100%.

Для исследования транспорта ионов Cl<sup>-</sup> использовали ингибитор Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> котранспорта (NKCC 1) буметанид (Sigma–Aldrich, США), неселективный блокатор хлорных каналов SITS (Sigma–Aldrich, США), блокатор Ca<sup>2+</sup>-чувствительных Cl<sup>-</sup>-каналов, нифлумовую кислоту (Sigma–Aldrich, США). Матричные растворы буметанида (10 мМ) и SITS (10 мМ) готовили разведением в ДМСО. Концентрации ДМСО, создаваемые в камере при добавлении тестируемых соединений, не оказывали статистически значимого влияния на сократительную активность ГМК ЛА.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0 for Windows (Statsoft), используя U-критерий Манна–Уитни (для независимых выборок) и T-критерий Уилкоксона (для зависимых выборок). Данные представлены как «медиана ± квартильный интервал (Q25–Q75)». Статистически значимыми считали различия при значении  $p < 0,05$ .

**Результаты**  
1. Влияние АТФ и Cl<sup>-</sup> транспорта на механическое напряжение сегментов легочной артерии крысы в изоосмотическом растворе

Добавление 10–100 мкМ АТФ к сегментам, инкубируемым в нормальном растворе Кребса, не влияло на тонус сегментов. АТФ в концентрации 500 мкМ вызывал развитие транзиторного сократительного ответа амплитудой 3,1 (1,9; 4,0) % ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) от контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (15 мМ KCl) с последующим снижением МН до исходного уровня.

В ответ на добавление 1000 мкМ АТФ наблюдалось развитие сократительного ответа амплитудой 20,2 (16,9; 28,5) % ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) от контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (15 мМ KCl) с последующим снижением до 7,6 (0,4; 22,0) % ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) (рис. 1). Далее при исследовании базального тонуса сегментов использовали АТФ в концентрации 1000 мкМ.

Предобработка сегментов ЛА в течение 30 минут ингибитором НКСС буметанидом (10 мкМ) статистически значимо снижала амплитуду сократительного ответа на действие 1000 мкМ АТФ до 7,6 (7,5; 8,4) % ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) от контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (30 мМ KCl)

Таблица

**ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ Cl<sup>-</sup>-КАНАЛОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ ОТВЕТЫ СЕГМЕНТОВ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ КРЫСЫ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ АТФ (1000 МКМ)**

| Добавки                       | Механическое напряжение, % |
|-------------------------------|----------------------------|
| АТФ (1000 мкМ) (контроль)     | 20,2 (16,9; 28,5)          |
| + буметанид (100 мкМ)         | 7,6 (7,5; 8,4)*            |
| + SITS (100 мкМ)              | 10,4 (9,2; 14,5)*          |
| + нифлумовая кислота (10 мкМ) | 5,7 (3,0; 12,0)*           |

**Примечание:** \* — статистически значимые отличия действия АТФ в присутствии ингибиторов в сравнении с контролем,  $p < 0,05$  ( $n = 6$ ).

с последующим снижением до 3,8 (2,3; 4,8) % ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

Неселективный блокатор хлорных каналов SITS (100 мкМ) и блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых хлорных каналов, нифлумовая кислота (10 мкМ) также снижали амплитуду сократительного ответа, вызванного АТФ (1000 мкМ) (табл.).

### 2. Влияние АТФ и транспортеров $\text{Cl}^-$ на сократительную активность гладкомышечных клеток легочной артерии крысы в гипоосмотической среде

Инкубация сегментов ЛА в среде, содержащей 40 мМ NaCl (156,4 мосМ), вызвала развитие транзиторного сокращения амплитудой 69,5 (65,3; 85,4)% и длительностью 32,5 (30,0; 39,0) минут ( $n = 11$ ) от контрольного гиперкалиевого сокращения (15 мМ KCl). АТФ (500 мкМ) не оказывал статистически значимого влияния на амплитуду гипоосмотической стрикции (80,5 (74,9; 86,0) % ( $p > 0,05$ ,  $n = 6$ ), однако подавлял фазу расслабления: в присутствии АТФ гипоосмотическая стрикция приобретала подерживаемый характер (рис. 2А).

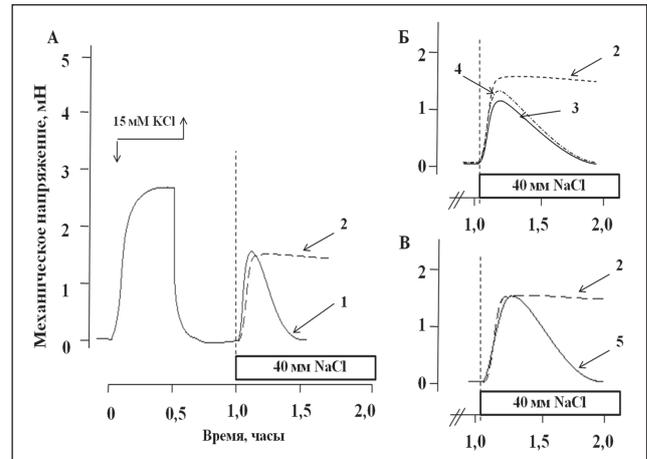
Ингибитор НКСС буметанид (100 мкМ, предобработка 30 минут) не оказывал статистически значимого влияния на амплитуду гипоосмотической стрикции в присутствии АТФ (500 мкМ), однако восстанавливал транзиторный характер сокращения: максимальная амплитуда сокращения составила 72,3 (70,4; 74,1) % ( $n = 6$ ,  $p > 0,05$ ) от контрольного сокращения в гиперкалиевом растворе Кребса (15 мМ KCl) с последующим снижением до 3,3 (1,4; 5,2) % ( $n = 6$ ,  $p > 0,05$ ). Однако длительность сокращения в этих условиях превышала контрольные значения и составила 60,0 (57,2; 61,5) минут ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 2В).

Ингибитор  $\text{Cl}^-$ -каналов SITS (100 мкМ, предобработка 30 минут) и ингибитор  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительных  $\text{Cl}^-$ -каналов нифлумовая кислота (10 мкМ) статистически значимо снижали амплитуду гипоосмотической стрикции до 52,5 (46,4; 58,2) % ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) и 67,2 (65,2; 74,8) % ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) соответственно, а также восстанавливали транзиторный характер сокращения, длительность которого превышала контрольные значения и составила 60,0 (56,8; 62,1) минут ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) и 60,0 (49,1; 64,5) минут ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 2Б).

### 3. Влияние АТФ и $\text{Cl}^-$ транспорта на механическое напряжение кольцевых сегментов легочной артерии крысы при изоосмотической стрикции

Замена гипоосмотического раствора (40 мМ NaCl) на нормоосмотический раствор Кребса (120 мМ NaCl) сопровождалась транзиторным сокращением сегментов — изоосмотической стрикцией.

**Рисунок 2. Влияние АТФ (500 мкМ) на гипоосмотическую стрикцию, вызванную инкубацией в растворе, содержащем 40 мМ NaCl**



**Примечание:** 1 — гипоосмотическое сокращение в отсутствие АТФ; 2 — гипоосмотическое сокращение в присутствии 500 мкМ АТФ; 3 — гипоосмотическое сокращение в присутствии 500 мкМ АТФ и 100 мкМ SITS; 4 — гипоосмотическое сокращение в присутствии 500 мкМ АТФ и 10 мкМ нифлумовой кислоты; 5 — гипоосмотическое сокращение в присутствии 500 мкМ АТФ и 100 мкМ буметанида (предобработка 30 минут). Стрелками показаны добавление и удаление растворов. По оси ординат — механическое напряжение (мН), по оси абсцисс — время (часы).

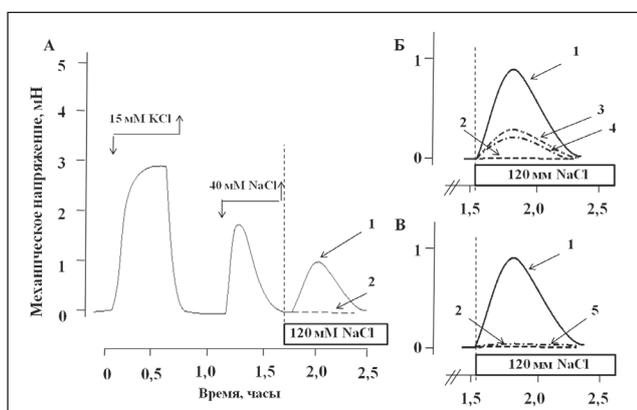
Амплитуда стрикции составила 59,6 (50,7; 67,3) % от контрольного гиперкалиевого (15 мМ KCl) сокращения длительностью 42,5 (35,8; 55,0) минут ( $n = 11$ ). АТФ (500 мкМ) полностью подавлял развитие изоосмотической стрикции (рис. 3А).

Ингибитор НКСС буметанид (100 мкМ) не оказывал статистически значимого влияния на действие АТФ при изоосмотической стрикции (рис. 3В). Однако ингибиторы  $\text{Cl}^-$ -каналов SITS (100 мкМ) и нифлумовая кислота (10 мкМ) устраняли ингибирующее действие АТФ на изоосмотическую стрикцию: наблюдалось увеличение МН напряжения сегментов до 19,4 (16,8; 21) % и 14,7 (13,2; 16,9) % соответственно. При этом длительность изоосмотической стрикции статистически значимо не изменялась ( $p > 0,05$ ), амплитуда была ниже таковой в отсутствие АТФ и блокаторов ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 3Б).

### Выводы

Мембраны ГМК артерий содержат пуринергические рецепторы как группы  $\text{P}_{2\text{X}}$ , так и  $\text{P}_{2\text{Y}}$ . Источником АТФ для этих рецепторов служат (1) окончания нервных волокон, иннервирующих гладкую мышцу сосуда [38, 39], (2) соседние ГМК [40], (3) эндотелиальные клетки [41], (4) эритроциты [13]. Последние служат важным источником АТФ при гипоксии [42]. АТФ, неселективно активируя как

**Рисунок 3. Влияние АТФ (500 мкМ) на изоосмотическую стрикцию, вызванную сменой гипоосмотического раствора (40 мМ NaCl) на нормоосмотический (120 мМ NaCl)**



**Примечание:** 1 — изоосмотическое сокращение в отсутствие АТФ и блокаторов; 2 — изоосмотическое сокращение в присутствии 500 мкМ АТФ; 3 — изоосмотическое сокращение в присутствии 500 мкМ АТФ и 100 мкМ SITS; 4 — изоосмотическое сокращение в присутствии 500 мкМ АТФ и 10 мкМ нифлумовой кислоты; 5 — изоосмотическое сокращение в присутствии 500 мкМ АТФ и 100 мкМ буметанида (предобработка 30 минут). Стрелками показаны добавление и удаление растворов. По оси ординат — механическое напряжение (мН), по оси абсцисс — время (часы).

P2X, так и P2Y пуриnergические рецепторы, оказывает как констрикторное, так и релаксирующее действие [22, 38, 43]. В артериях системного круга кровообращения эффекты АТФ зависят от целостности эндотелия, тонуса гладкой мышцы. Так, известно, что активация эндотелиальных пуриnergических рецепторов P<sub>2Y</sub> стимулирует синтез NO и простаглиннов и последующее расслабление сосуда [38, 44]. Действуя на P2X рецепторы ГМК, АТФ активирует входящие Ca<sup>2+</sup>-токи, приводя к сокращению ГМК [38, 44].

В сосудах легочного круга кровообращения АТФ, действуя на фоне тонуса покоя, вызывает констрикцию сосудов, что согласуется с данными [45, 46]. Однако на фоне повышенного тонуса и действия констрикторных факторов АТФ оказывает расслабляющее действие [47, 48]. С другой стороны, при легочной гипертензии на фоне повышения тонуса сосудов наблюдается усиление фильтрации воды из плазмы крови в интерстициальные ткани вследствие повышения гидростатического давления в легочных капиллярах [49, 50] и набухание ГМК, что было подтверждено в опытах [26]. Последнее активирует механизмы регуляторного снижения объема (Regulatory Volume Decrease, RVD), связанного с перераспределением Cl<sup>-</sup> [51] и сопровождающегося развитием транзиторного сократительного ответа. При исследовании влияния АТФ на гипеоосмотическую стрикцию сегментов ЛА обнаружено, что в присутствии АТФ транзиторный характер стрикции изменялся на поддерживаемый, и данный эффект устранялся в присутствии буметанида и SITS.

Полученные данные позволяют предположить, что в поддержание высокого тонуса ЛА при легочной гипертензии могут быть вовлечены Cl<sup>-</sup>-транспортирующие системы, активация которых приводит к накоплению Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме ГМК, а АТФ дополнительно стимулирует активность Cl<sup>-</sup>-транспортирующих систем при набухании клеток.

#### Финансирование / Funding

Работа выполнена при поддержке РФФИ (18-44-703008, 18-44-700009, 18-315-00296) и администрации Томской области (договор № 19-27). / The research work is supported by the grant of the Russian Foundation of Fundamental Studies (18-44-703008, 18-44-700009, 18-315-00296) and the administrations of Tomsk region (agreement № 19-27).

#### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

#### Список литературы / References

1. Pak O, Aldashev A, Welsh D, Peacock A. The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. *Eur Respir J*. 2007;30(2):364–372. doi:10.1183/09031936.00128706
2. Cahill E, Rowan SC, Sands M, Banahan M, Ryan D, Howell K et al. The pathophysiological basis of chronic hypoxic pulmonary hypertension in the mouse: vasoconstrictor and structural mechanisms contribute equally. *Exp Physiol*. 2012;97(6):796–806. doi:10.1113/expphysiol.2012.065474
3. Sweeney M, Jason XJY. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated potassium channels. *Respir Res*. 2000;1(1):40–48. doi:10.1186/rr11
4. Sun H, Xia Y, Paudel O, Yang XR, Sham JS. Chronic hypoxia-induced upregulation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel in pulmonary arterial myocytes: a mechanism contributing to enhanced vasoreactivity. *J Physiol*. 2012;590(15):3507–3521. doi:10.1113/jphysiol.2012.232520
5. Wang K, Chen C, Ma J, Lao J, Pang Y. Contribution of calcium-activated chloride channel to elevated pulmonary artery pressure in pulmonary arterial hypertension induced by high pulmonary blood flow. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):146–154.
6. Forrest AS, Joyce TC, Huebner ML, Ayon RJ, Wiwchar M, Joyce J et al. Increased TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channel activity is associated with pulmonary hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;303(12):C 1229–C 1243. doi:10.1152/ajpcell.00044.2012
7. Wang K, Ma J, Pang Y, Lao J, Pan X, Tang Q et al. Niflumic acid attenuated pulmonary artery tone and vascular structural remodeling of pulmonary arterial hypertension induced by high pulmonary blood flow in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;66(4):383–391. doi:10.1097/FJC.0000000000000291
8. Orlov SN, Koltsova SV, Kapilevich LV, Gusakova SV, Dulin NO. NKCC 1 and NKCC 2: the pathogenetic role of cation-

- chloride cotransporters in hypertension. *Genes Dis.* 2015;2(2):186–196. doi:10.1016/j.gendis.2015.02.007
9. Burnstock G, Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2014;66(1):102–192. doi:10.1124/pr.113.008029
  10. Dietrich HH, Ellsworth ML, Sprague RS, Dacey RG. Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(4):H1294–H1298. doi:10.1152/ajpheart.2000.278.4.H1294
  11. Ellsworth ML, Ellis CG, Goldman D, Stephenson AH, Dietrich HH, Sprague RS. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. *Physiology.* 2008;24:107–116. doi:10.1152/physiol.00038.2008
  12. Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* 2006;580(1):239–244. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.004
  13. Sprague RS, Ellsworth ML. Erythrocyte derived ATP and perfusion distribution: role of intracellular and intracellular communication. *Microcirculation.* 2012;19(5):430–439. doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00158.x
  14. Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Lonigro AJ. Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281(4): C1158–C1164. doi:10.1152/ajpcell.2001.281.4.C1158
  15. Inglis SK, Olver RE, Wilson SM. Differential effects of UTP and ATP on ion transport in porcine tracheal epithelium. *Br J Pharmacol.* 2000;130(2):367–374. doi:10.1038/sj.bjp.0703324
  16. Paradiso AM, Ribeiro CM, Boucher RC. Polarized signaling via purinoceptors in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *J Gen Physiol.* 2001;117(1):53–67. doi:10.1085/jgp.117.1.53
  17. Kunzelmann K, Schreiber R, Cook D. Mechanisms for the inhibition of amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> absorption by extracellular nucleotides in mouse trachea. *Pflugers Arch.* 2002;444(1–2):220–226. doi:10.1007/s00424-002-0796-y
  18. Wong CH, Ko WH. Stimulation of Cl<sup>−</sup> secretion via membrane-restricted Ca<sup>2+</sup> signaling mediated by P2Y receptors in polarized epithelia. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9016–9021. doi:10.1074/jbc.M111917200
  19. Mongin AA, Kimelberg HK. ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca<sup>2+</sup>-sensitive mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(1):C204–C213. doi:10.1152/ajpcell.00330.2004
  20. Wang Y, Roman R, Lidofsky SD, Fitz JG. Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(21):12020–12025. doi:10.1073/pnas.93.21.12020
  21. Akimova OA, Grygorczyk A, Bunday RA, Bourcier N, Gekle M, Insel PA et al. Transient activation and delayed inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>−</sup> cotransport in ATP-treated C11-MDCK cells involve distinct P2Y receptor subtypes and signaling mechanisms. *J Biol Chem.* 2006;281(42):31317–31325. doi:10.1074/jbc.m602117200
  22. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 2007;87(2):659–797. doi:10.1152/physrev.00043.2006
  23. Fisher SK, Cheema TA, Foster DJ, Heacock AM. Volume-dependent osmolyte efflux from neuronal tissues: regulation by G-protein-coupled receptors. *J Neurochem.* 2008;106(5):1998–2014. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05510.x
  24. Franco R, Panayiotidis MI, de La Paz LD. Autocrine signaling involved in cell volume regulation: the role of released transmitters and plasma membrane receptors. *J Cell Physiol.* 2008;216(1):14–28. doi:10.1002/jcp.21406
  25. Vazquez-Juarez E, Ramos-Mandujano G, Hernandez-Benitez R, Pasantes-Morales H. On the role of G-protein-coupled receptors in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(1–3):1–14. doi:10.1159/000113742
  26. Sun XZ, Tian XY, Wang DW, Li J. Effects of fasudil on hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(7):959–964.
  27. Roman RM, Feranchak AP, Salter KD, Wang Y, Fitz JG. Endogenous ATP release regulates Cl<sup>−</sup> secretion in cultured human and rat biliary epithelial cells. *Am J Physiol.* 1999;276(6):G1391–G1400. doi:10.1152/ajpgi.1999.276.6.G1391
  28. Feranchak AP, Fitz JG, Roman RM. Volume-sensitive purinergic signaling in human hepatocytes. *J Hepatol.* 2000;33(2):174–182. doi:10.1016/s0168-8278(00)80357-8
  29. Sabirov RS, Okada Y. ATP release via anion channels. *Purinergic Signaling.* 2005;1(4):311–328. doi:10.1007/s11302-005-1557-0
  30. Gradilone SA, Masyuk AI, Splinter PL, Banales JM, Huang BQ, Tietz PS et al. Cholangiocyte cilia express TRPV4 and detect changes in luminal tonicity inducing bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(48):19138–19143. doi:10.1073/pnas.0705964104
  31. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev.* 2009;89(1):193–277. doi:10.1152/physrev.00037.2007
  32. Bang L, Boesgaard S, Nielsen-Kudsk JE, Vejlstrup NG, Aldershvile J. Nitroglycerin-mediated vasorelaxation is modulated by endothelial calcium-activated potassium channels. *Cardiovasc Res.* 1999;43(3):772–778.
  33. Gao YJ, Lee RMKW. Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. *Br J Pharmacol.* 2005;146(8):1061–1068. doi:10.1038/sj.bjp.0706423
  34. Li JR, Zhao YS, Chang Y, Yang SC, Guo YJ, Ji ES. Fasudil improves endothelial dysfunction in rats exposed to chronic intermittent hypoxia through RhoA/ROCK/NFATc3 pathway. *PLoS ONE.* 2018;13(4): e019560. doi:10.1371/journal.pone.0195604
  35. Anfinogenova YJ, Baskakov MB, Kovalev IV, Kilin AA, Dulin NO, Orlov SN. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>−</sup> cotransport, intracellular Cl<sup>−</sup> and L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Pflugers Arch.* 2004;449(1):42–55.
  36. Koltsova SV, Gusakova SV, Anfinogenova YJ, Baskakov MB, Orlov SN. Vascular smooth muscle contraction evoked by cell volume modulation: role of the cytoskeleton network. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(1–3):29–36.
  37. Orlov SN, Resink TJ, Bernhardt J, Buhler FR. Volume-dependent regulation of sodium and potassium fluxes in cultured vascular smooth muscle cells: dependence on medium osmolality and regulation by signalling systems. *J Membrane Biol.* 1992;129(2):199–210.
  38. Burnstock G. Purinergic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;603:1–17. doi:10.1111/j.1749-6632.1990.tb37657.x
  39. Inoue T, Kannan MS. Nonadrenergic and noncholinergic excitatory neurotransmission in rat intrapulmonary artery. *Am J Physiol.* 1988;254(6Pt2):H1142–H1144. doi:10.1152/ajpheart.1988.254.6.H1142
  40. Katsuragi T, Tokunaga T, Ogawa S, Soejima O, Sato C, Furukawa T. Existence of ATP-evoked ATP release system in smooth muscles. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;259(2):513–518.
  41. Pearson JD, Gordon JL. Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature.* 1979;281(5730):384–386.
  42. Grygorczyk R, Orlov SN. Effects of hypoxia on erythrocyte membrane properties — implications for intravascular hemolysis and purinergic control of blood flow. *Front Physiol.* 2017;8:1110.

43. Hakim TS, Ferrario L, Freedman JC, Carlin RE, Camporesi EM. Segmental pulmonary vascular responses to ATP in rat lungs: role of nitric oxide. *J Appl Physiol.* 1997;82(3):852–858.

44. Boarder MR, Weisman GA, Turner JT, Wilkinson GF. G-protein-coupled P2purinoceptors: from molecular biology to functional responses. *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16(4):133–139. doi:10.1016/S0165-6147(00)89001-X

45. Liu SF, McCormack DG, Evans TW, Barnes PJ. Characterization and distribution of P2-purinoceptor subtypes in rat pulmonary vessels. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;251(3):1204–1210.

46. Liu SF, McCormack DG, Evans TW, Barnes PJ. Evidence for two P2-purinoceptor subtypes in human small pulmonary arteries. *Br J Pharmacol.* 1989;98(3):1014–1020.

47. Neely CF, Haile DM, Cahill BE, Kadowitz PJ. Adenosine and ATP produce vasoconstriction in the feline pulmonary vascular bed by different mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;258(3):753–761.

48. Neely CF, Kadowitz PJ, Lipperton H, Neiman M, Hyman AL. Adenosine does not mediate the pulmonary vasodilator response of adenosine 5'-triphosphate in the feline pulmonary vascular bed. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;250:170–176.

49. Souza R, Amato MBP, Demarzo SE, Deheinzelin D, Barbas CSV, Schettino GPP et al. Pulmonary capillary pressure in pulmonary hypertension. *Crit Care.* 2005;9(2):R132–R138.

50. Rackow EC, Alan Fein I, Leppo J. Colloid osmotic pressure as a prognostic indicator of pulmonary edema and mortality in the critically ill. *Chest.* 1977;72:709–713. doi:10.1378/chest.72.6.709

51. Perry PB, O'Neill WC. Swelling-activated K fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K-Cl cotransport and K channels. *Am J Physiol.* 1993;265(3Pt1): C763–C769. doi:10.1152/ajpcell.1993.265.3.C763

#### Информация об авторах

Смаглий Людмила Вячеславовна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры биофизики и функциональной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: lud.smagly@yandex.ru;

Гусакова Виктория Сергеевна — ассистент кафедры биофизики и функциональной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: ryd4enkoviktoriya@mail.ru;

Горянова Анна Михайловна — аспирант кафедры биофизики и функциональной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: asulita@mail.ru;

Голованов Егор Александрович — аспирант кафедры биофизики и функциональной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: golovanovbf@yandex.ru;

Чибисов Егор Евгеньевич — ординатор, ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: einmatik@mail.ru;

Бирулина Юлия Георгиевна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры биофизики и функциональной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: birulina20@yandex.ru;

Гусакова Светлана Валерьевна — доктор медицинских наук, заведующая кафедрой биофизики и функциональной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, e-mail: gusakova@yandex.ru.

#### Author information

Lyudmila V. Smaglyi, MD, PhD, Associate Professor, Biophysics and Functional Diagnostics Department, Siberian State Medical University, e-mail: lud.smagly@yandex.ru;

Viktoriya S. Gusakova, MD, Assistant Professor, Biophysics and Functional Diagnostics Department, Siberian State Medical University, e-mail: ryd4enkoviktoriya@mail.ru;

Anna M. Gorianova, Postgraduate Student, Biophysics and Functional Diagnostics Department, Siberian State Medical University, e-mail: asulita@mail.ru;

Egor A. Golovanov, Postgraduate Student, Biophysics and Functional Diagnostics Department, Siberian State Medical University, e-mail: golovanovbf@yandex.ru;

Egor E. Chibisov, Resident, Siberian State Medical University, e-mail: einmatik@mail.ru;

Juliya G. Birulina, MD, PhD, Associate Professor, Biophysics and Functional Diagnostics Department, Siberian State Medical University, e-mail: birulina20@yandex.ru;

Svetlana V. Gusakova, MD, PhD, DSc, Head, Biophysics and Functional Diagnostics Department, Siberian State Medical University, e-mail: gusakova@yandex.ru.