

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ

На правах рукописи



Биличенко Андрей Сергеевич

Влияние активации двух различных центров связывания растворимой гуанилатциклазы, реализующих NO-зависимый и NO-независимый механизмы, на регуляцию активируемых растяжением ионных каналов кардиомиоцитов желудочков сердца крыс

Специальность: 1.5.5 – Физиология человека и животных

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Камкин Андрей Глебович

Москва 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	13
1.1. Механоэлектрическая обратная связь в сердце.....	13
1.1.1. Роль механоэлектрической обратной связи в физиологии и патофизиологии сердца.....	13
1.1.2. Изменение потенциалов при растяжении кардиомиоцитов.....	14
1.1.3. Каналы, обеспечивающие механоэлектрическую обратную связь в сердце.....	16
1.1.4. Механосенситивные токи в кардиомиоцитах.....	22
1.2. Оксид азота (NO) в сердце.....	25
1.2.1. Источники NO в сердце.....	26
1.2.2. Эффекты NO в сердце.....	27
1.2.3. Молекулярные механизмы NO-вызванных эффектов.....	31
1.2.4. Влияние растяжения на активность NO-синтаз и содержания NO в кардиомиоците.....	31
1.2.5. NO и механоэлектрическая обратная связь.....	35
1.2.6. Характер и механизм влияния NO на различные токи в кардиомиоцитах.....	39
1.2.7. NO-независимый путь активации sGC.....	44
1.2.8. Заключение.....	45
2. Материалы и методы.....	47
2.1. Объект исследований.....	47
2.2. Растворы.....	47
2.3. Биологически активные вещества.....	48
2.4. Изоляция кардиомиоцитов из желудочков крыс.....	49
2.5. Метод растяжения клеток.....	50
2.6. Метод измерения токов.....	52
2.7. Выделение и очистка мРНК.....	53
2.8. Секвенирование и анализ РНК.....	54
2.9. Методы обработки результатов.....	55
3. Результаты и обсуждение.....	56
3.1. Влияние локального растяжения на механосенситивные и механоуправляемые токи кардиомиоцитов.....	56
3.1.1. NO как потенциальный регулятор механосенситивных каналов.....	56
3.1.2. Локальное растяжение активирует суммарные входящие токи в кардиомиоцитах в K^+_{in}/K^+_{out} среде.....	57
3.1.3. Локальное растяжение активирует ток через неселективные катионные каналы ($I_{L,ns}$: time course и I/V-кривая) в кардиомиоцитах в Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде.....	61
3.2. Влияние NO на механосенситивные токи кардиомиоцита.....	63
3.2.1. Участие NO в модуляции мембранных токов $I_{L,ns}$ и I_{K1}	63
3.2.2. NO вызывает изменения зависимости I_L от потенциала в K^+_{in}/K^+_{out} среде.....	68
3.2.3. NO вызывает изменения зависимости I_L от потенциала в Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде.....	73
3.2.4. Обсуждение вопроса влияния NO на возможный I_{SAC} в отсутствие растяжения клеток.....	75
3.2.5. Обсуждение вопроса о необходимости базального уровня NO для работы SAC.....	79

3.2.6.	Обсуждение вопроса о возможности увеличения внутриклеточного уровня NO во время растяжения клетки.....	80
3.2.7.	NO устраняет суммарный ток, активируемый растяжением в K^+_{in}/K^+_{out} среде; (time course и I/V-кривая)	84
3.2.8.	NO устраняет суммарный ток, активируемый растяжением в CS^+_{in}/CS^+_{out} среде	88
3.2.9.	Растяжение открывает SAC, в то время как экзогенный NO вызывает закрытие этих каналов.....	89
3.3.	Влияние BAY 41-2272 на механосенситивные токи в кардиомиоците.....	90
3.3.1.	Участие BAY 41-2272 в модуляции мембранных токов $I_{L,ns}$ и I_{K1} в K^+_{in}/K^+_{out} среде	90
3.3.2.	BAY 41-2272 устраняет I_{SAC}	94
3.3.3.	Причины, ведущие к уменьшению $I_{L,ns}$ под действием BAY41-227 у нерастянутой клетки, и ведущие к устранению I_{SAC} , вызванного растяжением клетки	99
3.4.	Влияние ODQ на механосенситивные токи в кардиомиоците.....	100
3.4.1.	ODQ модулирует мембранные токи $I_{L,ns}$ и I_{K1} в K^+_{in}/K^+_{out} среде	101
3.4.2.	ODQ устраняет I_{SAC}	103
3.4.3.	Причины, по которым ODQ модулирует мембранные токи в нерастянутых и растянутых клетках	105
3.5.	Влияние KT-5823 на механосенситивные токи в кардиомиоците.....	106
3.5.1.	Участие KT-5823 в модуляции мембранных токов I_{ns} и I_{K1} в K^+_{in}/K^+_{out} средах	107
3.5.2.	KT-5823 уменьшает I_{SAC}	110
3.5.3.	Причины, по которым KT-5823 ингибирует $I_{L,ns}$ у нерастянутой клетки и I_{SAC} у растянутой и не влияет на I_{K1}	110
3.6.	Влияние 8Br-cGMP на механосенситивные токи в кардиомиоците.....	114
3.6.1.	Участие 8Br-cGMP в модуляции мембранных токов I_{ns} и I_{K1} в K^+_{in}/K^+_{out} средах	114
3.6.2.	8Br-cGMP уменьшает I_{SAC}	115
3.6.3.	Причины ингибирования $I_{L,ns}$ под действием 8Br-cGMP у нерастянутой клетки, но уменьшение I_{SAC} у растянутой	122
3.7.	Влияние аскорбиновой кислоты на механосенситивные токи в кардиомиоците	123
3.7.1.	Участие аскорбиновой кислоты в модуляции мембранных токов I_{ns} и I_{K1} в K^+_{in}/K^+_{out} средах.....	123
3.7.2.	Аскорбиновая кислота ингибирует I_{SAC}	124
3.7.3.	Почему ингибитор S-нитрозилирования SACs, аскорбиновая кислота устраняет I_{SAC}	127
3.8.	Добавление L-Arginine не меняет I_L ток.....	129
3.9.	Другие способы активации $I_{L,ns}$ и модулирования SAC.....	131
3.10.	Определение транскрипции генов катионнеселективных SAC кардиомиоцитов желудочков крыс.....	133
	Заключение	134
	Выводы	138
	Список сокращений.....	140
	Список литературы	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Одним из ключевых аспектов работы сердечной мышцы является электромеханическое сопряжение. Однако еще в 1967 году Ursula Theophile (позднее Ursula Ravens) и R. Kaufmann упомянули в своей статье, что в сердце может быть и обратное отношение между электрическими и механическими процессами, то есть преобразование механического сигнала в электрический (Kaufmann et Theophile, 1967). Год спустя, в 1968 году, британский ученый Max J. Lab высказал предположение о существовании механоэлектрической обратной связи в сердце и допустил возможность того, что механические изменения ткани при работе сердца может менять форму потенциалов клеток сердца (Lab, 1968). Позднее, в 1971 году, M.J.Lab опубликовал статью на эту тему с R. Kaufmann, R. Hennekes, H. Krause, показав, что механическое воздействие на сердечную ткань может менять форму монофазного потенциала кардиомиоцита (Kaufmann et al., 1971). Хотя M.J.Lab и его соавторы опубликовали достаточно много статей, эти представления не нашли поддержки у специалистов потому, что в своих работах ученые регистрировали монофазные потенциалы, а эксперты считали, что они регистрируют изменения потенциала в результате изменения контакта между внеклеточным электродом и тканью, поскольку переходное сопротивление под внеклеточным электродом (электродом-присоской) спонтанно меняется при сокращениях сердца и эти изменения практически неотличимы от самого эффекта.

Ситуация кардинально изменилась после того, как А.Г.Камкин с соавторами начиная с 1982 года опубликовали ряд работ, где при помощи внутриклеточных микроэлектродов на фоне дозированного растяжения фрагментов сокращающейся ткани сердца убедительно показали изменения формы потенциалов действия при растяжении ткани. Именно они напрямую доказали факт наличия в сердце механоэлектрической обратной связи и в

сокращающейся ткани сердца в норме и при патологии и смогли предварительно продемонстрировать механизмы этого явления (Kamkin et al., 1988). Позднее, начиная с 1998 года, под руководством А.Г.Камкина методом patch-clamp, позволяющим исследовать ионные токи и каналы на изолированных клетках и разработанной уникальной методики аксиального растяжения клеток в сочетании с измерением whole-cell токов и/или single channels токов, были получены данные о том, что в основе механоэлектрической обратной связи лежит работа катион неселективных механоуправляемых ионных каналов (MGCh), а ток через них вызывает изменения потенциалов действия (Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2003a).

Механоэлектрическая обратная связь играет значительную роль в регуляции нормальной активности сердца, обеспечивая его адекватный ответ на изменяющееся механическое воздействие среды. В частности, механоэлектрическая обратная связь является одним из компонентов таких классических адаптивных эффектов сердца, как эффект Франка-Старлинга и эффект Анрепа (Jiang et al., 2021). Возможно, еще более важным фактом является то, что при патологических изменениях сердечной мышцы именно нарушения механоэлектрической обратной связи могут вызывать критические последствия, например, такие как аритмии (Камкин и др., 2003). Так было показано, что чувствительность к растяжению особенно высока у гипертрофированных кардиомиоцитов желудочков крыс со спонтанной гипертензией и у кардиомиоцитов желудочков пациентов с терминальной стадией сердечной недостаточности (Kamkin et al., 2003b). Подобно здоровым кардиомиоцитам желудочков сердца, механическая стимуляция патологической ткани при меньшем растяжении также может вызывать нарушения ритма, включая фибрилляцию мышц. Таким образом, механоуправляемые каналы кардиомиоцитов играют важную роль не только в работе здорового сердца, но, прежде всего, при патологических состояниях, и изучение регуляторных механизмов этого явления представляется одной из ключевых задач, как для

фундаментальной физиологии, так и для прикладных областей, в частности фармакологии и медицины.

Вместе с тем, механизмы этой регуляции еще практически не изучены. Одним из таких механизмов, а реально, первым из найденных, является регуляция проводимости MGCh оксидом азота (NO), описанная А.Г.Камкиным и соавторами в 2010 году и в более поздних работах (Kamkin et al., 2010). При этом, за счет наличия в клетке NO синтаз (NOS), продукция NO которыми возрастает при растяжении клеток, этот механизм может быть центральным клеточным механизмом, регулирующим проводимость MGCh. Обычно NO связывается с сайтом в β -субъединице растворимой гуанилилциклазы (sGC) что ведет к ее активации (Cary et al., 2005; Fernhoff et al., 2009; Martin et al., 2012). Хорошо известно, что NO-чувствительная sGC, катализирует образование внутриклеточного мессенджера циклического гуанозинмонофосфата (cGMP) и считается основным рецептором внутриклеточного NO, продуцируемого NOS в клетках (Boycott et al., 2020; Seddon et al., 2007). В то же время, в $\alpha 1$ -субъединице sGC были определены другие участки в качестве целевых мест для другого типа стимулятора sGC. Этот стимулятор sGC, BAY 41-2272, работает по NO-независимому механизму, но также вызывает продукцию внутриклеточного мессенджера cGMP (Stasch et al., 2001). Помимо этих механизмов возможно и прямое S-нитрозилирование MGCh при помощи NO.

Вместе с тем этот круг вопросов до настоящего времени был совершенно не исследован.

Цель и задачи исследования

Цель работы – исследовать влияние активации двух различных центров связывания растворимой гуанилатциклазы, реализующих NO-зависимый и NO-независимый механизмы, на регуляцию активируемых растяжением ионных каналов кардиомиоцитов желудочков сердца крыс.

Для выполнения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние донора NO SNAP – стимулятора NO-зависимого регуляторного места связывания в β -субъединице sGC на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 (V_{rev}) в отсутствие растяжения и при растяжении клетки в K^+_{in}/K^+_{out} и Cs^+_{in}/Cs^+_{out} средах.

2. Изучить влияние BAY 41-2272 – стимулятора NO-независимого регуляторного места связывания в $\alpha 1$ -субъединице sGC, на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 в отсутствие растяжения и при растяжении клетки, и оценить влияние донора NO SNAP на данные параметры на фоне действия BAY 41-2272.

3. Изучить влияние ингибитора sGC ODQ на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 в отсутствие растяжения и при растяжении клетки и оценить влияние донора NO SNAP на данные параметры на фоне действия ODQ.

4. Изучить влияние ингибитора cGMP-зависимой протеинкиназы KT5823 на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 в отсутствие растяжения и при растяжении клетки и оценить влияние донора NO SNAP на данные параметры на фоне действия KT5823.

5. Изучить влияние активатора cGMP-зависимой протеинкиназы 8Br-cGMP на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 в отсутствие растяжения и при растяжении клетки и оценить влияние донора NO SNAP на данные параметры на фоне действия 8Br-cGMP.

6. Изучить влияние ингибитора S-нитрозилирования аскорбиновой кислоты на механосенситивные токи и мембранный потенциал V_0 в отсутствие растяжения и при растяжении клетки и оценить влияние донора NO SNAP на данные параметры на фоне действия аскорбиновой кислоты.

7. Изучить уровень экспрессии генов известных SAC в кардиомиоцитах желудочков сердца крысы.

Научная новизна

В рамках данной работы впервые было изучено влияние второго, NO-независимого механизма активации sGC у изолированных кардиомиоцитов, осуществляемый через активацию ее NO-независимого активного центра, с помощью BAY 41-2272 на механосенситивные токи.

Впервые в динамике времени были исследованы изменения позднего тока в K^+_{in}/K^+_{out} растворах под действием разных концентраций BAY 41-2272 совместно с донором NO SNAP. Кроме того, в работе впервые были показаны эффекты растяжения клеток в K^+_{in}/K^+_{out} и Cs^+_{in}/Cs^+_{out} растворах на фоне BAY 41-2272 и на фоне BAY 41-2272 с последующим добавлением SNAP.

Впервые было изучено влияние ODQ, селективного ингибитора sGC, в динамике времени на поздние токи изолированных кардиомиоцитов, характеризующие работу SAC, продемонстрированы изменения позднего тока в K^+_{in}/K^+_{out} растворах под действием ODQ, совместно с донором NO SNAP при отсутствии и наличии растяжения клетки.

Впервые было изучено влияние KT-5823, селективного ингибитора PKG, в динамике времени на поздние токи изолированных кардиомиоцитов, характеризующие работу SAC, продемонстрированы изменения позднего тока в K^+_{in}/K^+_{out} растворах под действием KT-5823, совместно с донором NO SNAP при отсутствии и наличии растяжения клетки.

Впервые было изучено влияние 8Br-cGMP, активатора PKG, в динамике времени на поздние токи изолированных кардиомиоцитов, характеризующие работу SAC, продемонстрированы изменения позднего тока в K^+_{in}/K^+_{out} растворах под действием 8Br-cGMP, совместно с донором NO SNAP при отсутствии и наличии растяжения клетки.

Впервые было изучено влияние аскорбиновой кислоты, ингибитора S-нитрозилирования, в динамике времени на поздние токи изолированных кардиомиоцитов, характеризующие работу SAC, продемонстрированы изменения

позднего тока в K^+_{in}/K^+_{out} растворах под действием аскорбиновой кислоты, совместно с донором NO SNAP при отсутствии и наличии растяжения клетки.

Впервые было показано значение двух различных путей регуляции SAC с помощью NO: путем S-нитрозилирования и через sGC-зависимый путь.

Впервые были продемонстрированы экспрессируемые в кардиомиоците желудочков крысы гены, отвечающие за синтез белков механоуправляемых каналов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты представленной работы развивают современные представления о функционировании сердца на клеточном уровне. Данная работа продолжает серию электрофизиологических исследований функционирования кардиомиоцитов в целом и роль механоуправляемых и механосенситивных каналов в частности. Впервые показана не только роль NO в регуляции механосенситивных токов, но и показан сложный характер такой регуляции: зависимость от концентрации, времени и состояния клетки. В ходе экспериментов выявлены неочевидные закономерности, которые ставят новые вопросы относительно дополнительных путей регуляции механосенситивных токов и открывают новые перспективы исследований в данной области.

Полученные теоретические данные имеют непосредственное практическое значение, так как могут стать базой для разработки фармакологических препаратов, направленных на регуляцию механосенситивных токов, которые, как известно, вносят большой вклад в развитие многих сердечных патологий, включая аритмии.

Принципиальные методы

В данной работе исследовали влияние растяжения, а также различных химических соединений на электрические параметры кардиомиоцитов. Ионные

токи изучали в изолированных кардиомиоцитах желудочков сердца крысы методом patch-clamp в конфигурации whole-cell. Растяжение проводили с помощью оплавленного стеклянного стилуса и микроманипулятора. Введение химических веществ производили с использованием перфузионной системы.

Положения, выносимые на защиту

1. NO вызывает двухфазный эффект при отсутствие растяжения клетки: I_{K1} сначала увеличивается, затем уменьшается, I_L и $I_{L,ns}$ в области более отрицательных потенциалов, чем V_0 , сначала увеличиваются, затем уменьшаются. При этом клетка претерпевает сначала деполяризацию, а затем – гиперполяризацию. Ионы Gd^{3+} устраняют развитие NO-индуцированных токов. Растяжение клетки вызывает I_{SAC} , который устраняется NO.

2. Стимуляция NO-независимого пути sGC, уменьшает механосенситивные токи в отсутствие растяжения клетки, а NO на этом фоне еще больше уменьшает эти токи. Активация NO-независимого пути sGC устраняет I_{SAC} , вызванный растяжением клеток. Дополнительное количество NO не приводит к значимым изменениям.

3. Ингибирование sGC уменьшает механосенситивные токи и вызывает гиперполяризацию мембраны. NO на этом фоне значительно увеличивает эти токи и уводит мембранный потенциал в сторону деполяризации. Ингибирование sGC устраняет механосенситивные токи при растяжении клетки и вызывает ее гиперполяризацию, а дополнительное введение NO снова увеличивает эти механосенситивные токи.

4. Ингибирование cGMP-зависимой протеинкиназы уменьшает I_L и вызывает гиперполяризацию клетки, а введение донора NO на его фоне не приводит к значимым изменениям. На фоне растяжения клетки ингибирование cGMP-зависимой протеинкиназы ингибирует I_{SAC} . Дополнительно введенный донор NO не оказывает эффекта.

5. Активация cGMP-зависимой протеинкиназы вызывает увеличение механосенситивных токов и деполяризацию клетки. NO устраняет этот ток и возвращает мембранный потенциал к исходным значениям. На фоне растяжения клетки активация cGMP-зависимой протеинкиназы или же непосредственное действие аналога cGMP 8Br-cGMP уменьшает механосенситивные токи, а дополнительное количество NO на этом фоне уменьшает их в еще большей степени.

6. В отсутствие растяжения клетки устранение S-нитрозилирования белков не влияет на механосенситивные токи, а NO на этом фоне уменьшает их. Однако на фоне растяжения устранение S-нитрозилирования полностью элиминирует токи вызванные растяжением клетки, а дополнительное введение донора NO не влияет на I_L .

7. В кардиомиоцитах желудочков сердца крысы экспрессируются гены белков каналов TRPC1, TRPM7, PKD1/TRPP1, PKD2/TRPP2, TMEM63A, TMEM63B, TRPV2, Piezo1.

Личный вклад автора

Личный вклад Биличенко А.С. присутствует на всех этапах выполнения настоящей работы: участие в планировании экспериментов, выделение изолированных кардиомиоцитов, проведение электрофизиологических экспериментов, выделение РНК, биоинформатический анализ, статистическая обработка данных, участие в обобщении результатов и подготовка публикаций.

Степень достоверности данных

Полученные в ходе работы данные достоверны, воспроизводимы и получены с использованием целесообразных современных экспериментальных методик и обработаны адекватным образом. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальных научных источников.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 4 печатные работы, в том числе 4 статьи в журналах индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Апробация результатов

Полученные результаты были представлены и обсуждены:

- Научный доклад о полученных результатах диссертационной работы на объединенном заседании кафедры физиологии медикобиологического факультета и лаборатории электрофизиологии ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова. МЗ Российской Федерации 26 октября 2022 года, протокол номер 2.

- На XXIV съезде Российского физиологического общества им. И.П. Павлова (11- 15 сентября 2023, г. Санкт-Петербург, Россия).

- Апробация по месту выполнения на объединенном заседании кафедры физиологии медикобиологического факультета и лаборатории электрофизиологии ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова. МЗ Российской Федерации 31 мая 2023 года, протокол номер 5.

- Доклад на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова 14 июня 2023.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Механоэлектрическая обратная связь в сердце

Механоэлектрическая обратная связь (МЭОС) (Contraction-excitation feedback, или mechanoelectric feedback) – известный сегодня и широко описанный в литературе феномен. В результате МЭОС механические изменения в миокарде приводят к изменению в нем электрических процессов. Как показано в основе МЭОС лежит работа механоуправляемых каналов. Нарушения МЭОС лежат в основе возникновения ряда аритмий вплоть до фибрилляции.

1.1.1. Роль механоэлектрической обратной связи в физиологии и патофизиологии сердца

С развитием представлений о физиологии сердца становится ясно, что механоэлектрическая обратная связь и механоуправляемые и механосенситивные каналы, как структурные основы этой связи, являются одними из ключевых факторов в регуляции сердечной деятельности, как в норме, так и при патологии (Камкин и др., 2003; Timmerman et al., 2017). Например, в последнее время было показано, что такие широкоизвестные миогенные эффекты сердца, как эффект Франка-Старлинга и эффект Анрепа, которые раньше объяснялись с точки зрения реорганизации структуры кардиомиоцита в результате механического воздействия, на самом деле зависят, в том числе и от влияния механоэлектрической обратной связи (Jiang et al., 2021; Boron et Boulaer, 2016). В основе такого влияния может лежать механочувствительный канал Piezo1 (Jiang et al., 2021). Было показано, что инотропные свойства кардиомиоцитов желудочков крыс зависят от каналов, обладающих механочувствительностью. Авторы работы установили, что при гипертрофии сердца увеличивается уровень экспрессии SAC, что ведет к увеличению сократимости миокарда (Chen et al., 2013).

Еще в начале XX века было продемонстрировано, что удар в область грудины способен восстанавливать сердечную деятельность у пациентов с синдромом Адамса-Стокса при внезапной остановке сердца (Schott, 1920). Позже был изобретен метод непрямого массажа сердца в качестве способа восстановления ритма сердца (Phillips et Burch, 1964; Portal et al., 1963). Также механическая стимуляция показала эффективность при устранении тахикардий, например при введении внутрисердечного катетора (Befeler et al., 1978).

Механоэлектрическая обратная связь является одним из ключевых факторов формирования аритмий при некоторых сердечных патологиях. Было показано, что развитие аритмии возможно не только в условиях хронического патологического растяжения ткани предсердия (Murgatroyd et Camm, 1993; Singer et al., 1973), но так же и при кратковременном механическом воздействии (введение катетора) на патологическую ткань предсердий, которая не испытывала хронического растяжения (Cownell et al., 1993). Развитие аритмий характерно для пациентов с гипертонией (Sideris, 1987), также известно, что у пациентов с гипертрофией сердца аритмии возникают чаще (Pye et Cobbe, 1992). Вероятно, острое механическое воздействие ведет скорее к появлению экстрасистолий, а хроническое – к постоянным аритмиям. Эти примеры, конечно, можно было бы рассматривать только с точки зрения воздействия различных рефлексов на сердце и не говорить о явлении МЭОС, однако, существует большое количество данных о наличии сходных изменений электрофизиологии не только целого сердца, но и отдельных кардиомиоцитов, о чем будет сказано ниже.

1.1.2. Изменение потенциалов при растяжении кардиомиоцитов

В настоящее время доказано, что растяжение сердечной ткани, как предсердий, так и желудочков вызывает выраженные изменения мембранного потенциала клеток и формы потенциала действия (Lab, 1968). Камкин и Киселева впервые разработали метод регистрации потенциалов во фрагменте сердечной ткани, который подвергался растяжению и при этом сокращался либо в

результате искусственной стимуляции, либо самопроизвольно (Камкин и др., 2003). Этот метод широко применялся не только в работах Камкина и Киселевой (Россия, Москва), но и J Günther и K-D Wagner (Германия, Берлин), MJ Lab (Великобритания, Лондон), D.Noble (Великобритания, Оксфорд). Во время регистрации фиксировалась величина предрастяжения (resting force) и величина активного растяжения в момент сокращения клетки (active force). Данные, которые подвергались анализу это величина потенциала покоя, амплитуда потенциала действия, а также APD25, APD50, APD90 (длительность потенциала действия на уровне 25%, 50% и 90% фазы реполяризации потенциала действия). Опыты проводили на сердечной ткани, выделенной из здоровых животных (крысы, мыши, морские свинки) и из животных, у которых с помощью перевязки коронарных артерий был вызван инфаркт миокарда. Изучение постинфарктных сердец особенно важно с клинической точки зрения в свете того, что, во-первых, сердечная ткань таких сердец подвергается постоянному повышенному растяжению как в области неподалеку от инфарктного рубца, так и во всем сердце как результат ремоделинга, во-вторых, так как в приведенных ниже экспериментах было показано, что кардиомиоциты этих сердец значительно более чувствительны к растяжению, чем здоровых, что может быть связано с повышенной экспрессией механосенситивных каналов (Kamkin et al., 2003).

Обобщая большое количество полученных результатов можно сказать, что главными эффектами растяжения сердечной ткани, как предсердий, так и желудочков являются значительное (часто более чем вдвое) увеличение времени реполяризации ПД на уровне APD90. Изменение длины APD90 оказалось следствием деполяризации, вызванной растяжением (Stretch Induced Depolarization, SID), причем было доказано, что эта деполяризация является реальным ответом клетки на растяжение, а не запускается предыдущим потенциалом действия, как в случае автодеполяризации. При увеличении силы растяжения на фоне этой деполяризации могли возникать дополнительные ПД, которые, как это обычно и бывает в случае дополнительных ПД, были меньше по амплитуде, чем стандартный ПД, что связано с нахождением части

потенциалзависимых каналов в состоянии инактивации. Эти дополнительные ПД могут вызывать тахикардию и фибрилляцию, что неоднократно было показано на предсердиях, особенно для постинфарктных сердец (Murgatroyd et Camm, 1993, Singer et al., 1973, Wit et al., 1984). Все эти электрические эффекты полностью исчезали при снятии растяжения. Такие показатели как амплитуда ПД и величина ПП не отличались значительно от показателей в отсутствие растяжения.

Участки ткани из постинфарктных, гипертрофированных сердец проявляли в целом такую же динамику реакции на растяжение, однако для достижения тех же эффектов требовалось значительно более слабое действие. Примечательно, что у ткани постинфарктных сердец наблюдалась гораздо большая гетерогенность форм ПД, что вероятно, связано с различным изменением ультраструктуры кардиомиоцитов при ремоделинге и как следствие изменения их электрических свойств (Kiseleva et al., 2000).

Важно отметить, что все электрические эффекты, вызванные растяжением сердечной ткани, полностью блокировались Gd^{3+} - блокатором механоуправляемых каналов, что демонстрирует участие механоуправляемых каналов (Hu et Sachs, 1997).

1.1.3. Каналы, обеспечивающие механоэлектрическую обратную связь в сердце

В настоящее время в литературе существует путаница с описанием ионных каналов, которые могут изменять свои свойства в зависимости от механического напряжения мембраны. Мы используем терминологию, в которой выделяем два типа таких каналов.

MGChs (Mechanically Gated Channels) или SAC (Stretch Activated Channels) – механоуправляемые каналы – выполняют роль механоэлектрических преобразователей, преобразовывающих механическую энергию в электрическую при помощи воротного механизма каналов. Для них механический стресс, реализуемый через изменение механического напряжения (tension) мембраны,

служит полноценным физиологическим раздражителем, открывающим каналы. Большинство MGCs являются катион неселективными, а часть имеют калиевую проводимость.

MSCs (Mechanically Sensitive Channels) – механочувствительные каналы – могут быть потенциал- или лиганд-управляемыми. Для них полноценным физиологическим раздражителем, активирующим каналы, служит изменение потенциала (при наличии в доменах сенсора напряжения – сегмента S4, например, Na_v , Ca_v , K_v каналы) или связывание с лигандом (при наличии рецептора). При механическом стрессе эти каналы меняют проводимость для «своих» ионов. Например, растяжение кардиомиоцита приводит к уменьшению Ca^{2+} -тока через L-тип Ca^{2+} -каналов $Ca_v1.2$, которые являются MSCs (Takahashi et al., 2019).

До настоящего момента подавляющее большинство механосенситивных каналов, описанных у млекопитающих, относится к каналам, пропускающим катионы, то есть являющихся катионными неселективными (SAC_{NS}), активируемым растяжением. Ток, который возникает при активации таких каналов обозначают $I_{SAC,NS}$ или $I_{MGCh,NS}$. Также описана более малочисленная группа каналов, которые при активации пропускают преимущественно катионы K^+ (SAC_K), ток через эти каналы обозначают как $I_{SAC,K}$.

Как показали исследования, механосенситивностью обладает большое количество ионных каналов, в том числе и те, что находятся в мембране клеток сердца. Несмотря на то, что первая работа, в которой было показано наличие механоиндуцированного тока у одиночных каналов в кардиомиоцитах новорожденных крыс методом patch-clamp в конфигурации cell-attached, относится ещё к 1988 году (Craelius et al., 1988), долгое время такие работы оставались единичными, выполненными на маленьких выборках, так как не было эффективного способа растяжения изолированных кардиомиоцитов. Впервые убедительные данные о возникновении неспецифического катионного тока ($I_{MGCh,NS}$) в ответ на растяжение изолированных кардиомиоцитов желудочков взрослых крыс были получены Kamkin A, Kiseleva I, Isenberg G в 2000 году

(Isenberg et al., 2003; Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2003; Kamkin et al., 2003). Это удалось им благодаря разработке оригинальной методики растяжения целого изолированного кардиомиоцита. Была показана связь этого тока с потенциалом действия и выявлено, что этот ток блокируется ионами Gd^{3+} . Позднее этими же авторами был описан этот ток в кардиомиоцитах желудочков морских свинок, мышей и человека, также он был найден не только в кардиомиоцитах желудочков, но и предсердий.

Несмотря на однозначное доказательство наличия SAC в клетках сердца до сих пор точно неизвестно какие именно представители и каких семейств каналов выполняют эту роль. Главными кандидатами на роль каналов, проводящих $I_{MGCh,NS}$ являются некоторые каналы TRP (Vennekens, 2011), широко представленные в клетках сердца млекопитающих, и особый вид каналов Piezo1 (Coste et al., 2010; Kawakubo et al., 1999). При формировании $I_{SAC,K}$ было показано участие таких каналов как: TREK-1, K_{ATP} , KCNQ, BK_{Ca} (Ma et al., 2018; Van Wagoner et Lamorgese, 1994; Vennekens, 2011).

Семейство TRP. Каналы TRP - представители суперсемейства потенциал-управляемых ионных каналов, среди которых есть K^+ , Na^+ и Ca^{2+} каналы, и родственные им каналы, управляемые циклическими нуклеотидами. Эти каналы являются гомотетрамерами (реже гетеротетрамерами), состоящими из четырех субъединиц, каждая из которых представлена полипептидной цепью, имеющей шесть трансмембранных спиралей (Cheng et al., 2010).

Подсемейство TRPC. По современным данным механосенситивностью обладают только каналы TRPC1 и TRPC6. TRPC1 является неселективным катионным каналом, активируемый рецептором. В клетке TRPC1 был найден в плазматической мембране, эндоплазматическом ретикулуме, внутриклеточных везикулах и т.д. Он обнаруживается практически во всех тканях человека (Nesin et Tsiokas, 2014). TRPC1 предназначен для модуляции входа Ca^{2+} , опосредованного каналами, отвечающими за вход Ca^{2+} в ответ на опустошение кальциевых депо

(Mori et al., 2002; Ong et al., 2013). С помощью анализа экспрессии мРНК было установлено, что TRPC1 присутствуют в сердце человека (Ricchio et al., 2002).

TRPC6 неселективный катионный канал в 6 раз более проницаемый для Ca^{2+} , чем для Na^+ . Гомотетрамерный канал непосредственно активируется вторичным мессенджером диацилглицеролом (DAG) (Dietrich et Gudermann, 2014). Механосенситивность данного канала при физиологических значениях механических воздействий ставятся некоторыми исследователями под сомнение (Gottlieb et al., 2008; Mederos y Schnitzler et al, 2008). С другой стороны была показана высокая вероятность того, что именно эти каналы обуславливают $I_{\text{MGCh,NS}}$ в желудочках кардиомиоцитов мышей (Dyachenko et al., 2009), где они, по-видимому, локализованы в Т-трубочках (Dyachenko et al., 2009). Белки этого канала активно экспрессируются в сердце человека (Ricchio et al., 2002).

Подсемейство TRPA. Представлено всего одним каналом TRPA1, являющимся неселективным катионным каналом. Было показано наличие данного канала в желудочковых кардиомиоцитах мышей (Andrei et al., 2017). Существует несколько причин, вызывающих интерес к TRPA1 млекопитающих как к механосенситивным каналам. Во-первых, наличие большого N-терминального домена анкириновых повторов, способная действовать как воротная пружина (Gaudet, 2008; Howard et Bechstedt, 2004), Во-вторых, экспрессия TRPA1 в волосковых клетках внутреннего уха (Corey et al., 2004). В-третьих, существующие сведения, что у беспозвоночных структурно сходные каналы с TRPA1 обеспечивают основополагающую роль в механотрансдукции (Sidi et al., 2003; Walker et al., 2000).

Подсемейство TRPM. Самое разнообразное семейство TRP каналов, у двух представителей которого обнаружены механосенситивные свойства, лишь один из которых обнаружен в клетках сердца.

TRPM7 является ионным каналом с достаточно необычными свойствами. При гиперполяризации он проводит двухвалентные катионы, при деполяризации - одновалентные (Fleig et Chubonov, 2014; , Nadler et al., 2001). Канал распространен

у млекопитающих повсеместно, в том числе и в сердце (Fonfria et al., 2006). Механосенситивность канала показана в первую очередь при растяжении в результате изменения объема содержащих его клеток (Bessac et Fleig, 2007; Filatova et al., 2019; Oancea et al., 2006).

Подсемейство TRPV. На настоящий момент известно два канала, обладающих механосенситивностью TRPV2 и TRPV4, представленных в различных тканях, включая сердце. Являются неселективными катионными каналами, обладающими более высокой проницаемостью для Ca^{2+} .

TRPV2 - катионный канал, проницаемый в первую очередь для Ca^{2+} . Активируется под действием высокой температуры, различных химических веществ и механического стресса (Kojima et Nagasawa, 2014). Было показано, что растяжение мембраны активирует TRPV2 в кардиомиоцитах (Iwata et al., 2003). Более того, растяжение мембраны индуцирует транслокацию TRPV2 из внутриклеточного пула в плазматическую мембрану, через активацию PI3-киназы (Kirpenberger et al., 2005). TRPV2 в значительной степени влияет на регуляцию Ca^{2+} в кардиомиоцитах.

TRPV4 - неселективный катионный канал более проницаемый для Ca^{2+} и Mg^{2+} , чем для Na^+ и обеспечивает приток Ca^{2+} в клетку после активации в нормальных физиологических условиях (Voets et al., 2002). Этот канал представлен повсеместно, в том числе и в сердце (Everaerts et al., 2010). Механосенситивность его проявляется чувствительностью к осмотическим изменениям, напряжению сдвига и нагрузке вязкостью (Andreade et al., 2005; Gao et al., 2003; Kohler et al., 2006; Liedtke et al., 2000; Strotmann et al., 2000, Wiessenbach et al., 2000).

Подсемейство TRPP. Судя по всему - самое древнее семейство TRP каналов (Palmer et al., 2005; Venkatachalam et Montell, 2007). Являются неселективными ионными каналами с повышенной проницаемостью для Ca^{2+} . Механосенситивность показана только для каналов TRPP2. Функциональный канал формируется только при взаимодействии TRPP2 с полицистином-1

(Hanaoka et al., 2000). Механическая активация данного комплекса, приводящая к запуску Ca^{2+} -цитозольного сигнала, осуществляется через ресничку (цилию) (Praetorius et Spring, 2005). В сердце данный комплекс не обнаружен.

Далее приводим краткую характеристику K^+ -каналов, обладающих механосенситивностью.

TREK-1 ($\text{K}_{2P2.1}$) ионные каналы. Каналы K_{2P} известны как каналы утечки, стабилизирующие мембранный потенциал. Это один из важнейших и интереснейших типов каналов, однако, его подробное рассмотрение выходит за рамки этого обзора. Механосенситивностью обладают члены подсемейств TREK-1, TREK-2 и TRAAK (Ma et al., 2018), экспрессируются они повсеместно в организме в том числе и в сердце (Koh et al., 2001; Niu et Sachs, 2003; Terrenoire et al., 2001). Растяжение мембраны клетки обратимо открывает каналы, амфипатичные соединения могут либо открыть, либо закрыть их (Patel et al., 1998). TREK-1 и TRAAK демонстрируют выраженную десенситизацию при растяжении мембраны в течение 100 мсек (Honore et al., 2006). На уровне ткани сердца экспрессия TREK-1 неоднородна, она увеличивается от клеток эпикарда к клеткам эндокарда, обеспечивая, очевидно, разный паттерн механоэлектрической обратной связи (Kelly et al., 2006). В сердце человека TREK-1 не выявлены, судя по всему их роль выполняют родственные каналы TRAAK (Duprat et al., 1997).

АТФ-управляемые K^+ -каналы. Важнейшие каналы, представленные в различных тканях, они связывают метаболизм клетки с её возбудимостью (Ashcroft, 2007; Miki et Seino, 2005). Снижение уровня АТФ в клетке, а также ишемия усиливает чувствительность канала к растяжению (Kohl et al., 2006; Van Wagoner et Lamorgese, 1994).

BK_{Ca} ионные каналы. Это Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы. Механосенситивность каналов BK_{Ca} (также SAKCA) была показана для клонированных из культуры кардиомиоцитов желудочков куриного эмбриона (Kawakubo et al., 1999). Было установлено, что Stress-Axis Regulated Exon (STREX) ответственен за чувствительность каналов к растяжению (Naruse et al.,

2009). Необычным фактом является то, что каналы $ВК_{Ca}$ содержащие STREX проявляют механочувствительность только у клеток цыплят и людей, но не у мышей и кроликов (Naruse et al., 2009). Очень интересно и двунаправленное взаимодействие между управлением ионами Ca^{2+} и механическим растяжением канала SACSA, так как его электрические свойства прямо регулируются как ионами Ca^{2+} так и механическими силами. К сожалению, непосредственная физиологическая роль канала SAKCA в сердце взрослого животного *in situ* пока остается не установленной (Iribe et al., 2010).

Отдельной обособленной разновидностью каналов являются **Piezo ионные каналы**. Открытая в 2010 году группа каналов совершенно не похожая по своей структуре на ранее известные (Coste et al., 2010). Это огромный белок, состоящий примерно из 2500 аминокислот, имеющий 24-32 трансмембранных сегментов, которые образуют тетрамер (Coste et al., 2012). Эта структура, имеющая очень большую поверхностную область, может быть хорошо приспособлена для восприятия изменения в кривизне и/или растяжении липидного бислоя мембраны. Piezo играет роль в объемном гомеостазе эритроцитов (Faucerre et al, 2014). Еще недавно данные относительно наличия и функционирования этих каналов в кардиомиоцитах отсутствовали, однако в 2021 году было показано, что Piezo1 каналы играют роль механического сенсора в кардиомиоцитах мышей (Jiang et al., 2021).

1.1.4. Механосенситивные токи в кардиомиоцитах

Выше в этом обзоре было описано влияние растяжения на изменение потенциала клетки, однако для более детального изучения вопроса, выяснения вклада отдельных каналов, было необходимо исследовать токи (I_{MGCh}), возникающие в клетке в результате её растяжения. Долгое время подобные исследования не проводились по причине технической сложности растяжения изолированного кардиомиоцита.

Проблема была решена в 1999-2000 годах Российско-Германской исследовательской группой в составе авторов А.Kamkin, I.Kiseleva (Россия), G.Isenberg (Германия) на изолированных клетках желудочков морской свинки, крысы, мыши и человека в норме и при сердечных патологиях (Kamkin et al., 2003; Kamkin et al., 2000). Независимо, в это же время научной группой под руководством Y.H.Zhang в Республике Корея были выполнены эксперименты по растяжению изолированных интактных кардиомиоцитов предсердий (Zhang et al., 2000).

Эксперименты рабочей группы под руководством А.Kamkin проводили с использованием метода patch-clamp в конфигурации whole-cell и разработанным принципом растяжения кардиомиоцитов, описанным в методике данной работы.

Первые же данные показали, что растяжение изолированного кардиомиоцита из желудочка здорового сердца вызывает появление суммарного мембранного тока (Kamkin et al., 2003). Негативный ток появлялся в кардиомиоците желудочка из сердца мыши при быстром растяжении на 6 мкм, с дальнейшим увеличением амплитуды при растяжении на 8, 10 и 12 мкм. Одинаковый по величине ответ длился в течении всего времени растяжения, то есть инактивации тока не происходило. Данный ответ был полностью обратимым и исчезал при снятии растяжения. У здоровых клеток электрический ответ на растяжение менее 4 мкм не наблюдался.

Важно сказать о том, как действует растяжение на фоне изменения мембранного потенциала. В эксперименте растягивали клетку и ступенчато меняли мембранный потенциал от уровня фиксации в -45 мВ длительностью ступени 140 мс, в диапазоне от -100 мВ до +100 мВ. Выяснилось, что растяжение клетки уменьшает I_{Ca-L} ток, но что еще более примечательно, что поздние токи – токи, измеренные в конце импульсов длительностью 140 мс, были уменьшены при негативных и увеличены при позитивных потенциалах (Kamkin et al., 2003). Вызванные растяжением изменения в поздних токах, характеризовались I-V кривой аномального выпрямления с током выходящего направления с

потенциалом реверсии -16 мВ. Изменения в суммарном токе через мембрану наблюдали во всех случаях при их растяжении. Это позволило сделать предположение, что растяжение модулирует не единичный компонент, а несколько компонентов ионных токов (Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2000).

Резюмируя исследования, проведенные на изолированных кардиомиоцитах крысы, морской свинки и мыши в K^+_{in}/K^+_{out} среде можно сказать, что растяжение клеток способно изменять суммарный мембранный ток путем модуляции как K^+ -токов (Dyachenko et al., 2006; Dyachenko et al., 2009; Inoue et al., 2006; Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2003a), так и тока через активируемые растяжением неселективные катионные каналы (I_{NS}) (Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2003a). В кардиомиоцитах механосенситивность была показана для разнообразных K^+ -каналов (см. информацию выше). Важно отметить, что также было обнаружено, что при растяжении вентрикулярных кардиомиоцитов происходит инактивация калиевых каналов аномального выпрямления с током входящего направления (I_{K1}) - калиевых $K_{ir2.3}$ каналов (Dyachenko et al., 2009).

Известными блокаторами I_{MGCh} являются Gd^{3+} (Yang et Sachs, 1989) и яд тарантула пептид GsMTx-4, которые, однако, не обладают полной специфичностью к SAC (Spasova et al., 2006; Suchyna et al., 2000).

Важным с точки зрения изучения природы I_{MGCh} является доказательство, что он не является Ca^{2+} -индуцируемым. Это было показано при применении хелатора Ca^{2+} ВАРТА, который вводился в клетку через пэтч-пипетку. Величина I_{MGCh} на фоне ВАРТА не изменялась (Kamkin et al., 2003).

Ещё одним важным вопросом, который хотелось бы затронуть в рамках этого обзора относительно $I_{NS, MGCh}$, это ионная природа входящей компоненты данного тока. Исследования с использованием различных блокаторов и замены ионов в растворах показали, что входящий $I_{NS, MGCh}$ в физиологических условиях переносится ионами Na^+ , а не Ca^{2+} (Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2003a).

При патологии в случае гипертрофии сердца для I_{MGCh} наблюдается та же тенденция, что и для изменений потенциалов, изученных на сердечной ткани:

увеличение чувствительности к растяжению больных клеток в виде появления токов с большей амплитудой при меньших значениях растяжения. Такие различия скорее всего обусловлены повышенной экспрессией MGCh у гипертрофированных клеток (Kiseleva et al., 1999).

1.2. Оксид азота (NO) в сердце

Оксид азота (NO) - одна из самых важных сигнальных молекул в организме человека. NO впервые был обнаружен в 1987 году как биологический мессенджер, полученный из эндотелия, вызывающий дилатацию кровеносных сосудов (Ignarro et al., 1987). Более того, некоторые авторы считают NO одной из ключевых молекул в регуляции сердца как в нормальном, так и в патологическом состояниях (Sears et al., 2004).

NO имеет преимущества по сравнению с большинством биологических регуляторов, такие как отсутствие заряда и небольшая молекулярная масса, что дает ему возможность быстро диффундировать и беспрепятственно проникать через плотные клеточные слои и внутриклеточное пространство (Hughes, 2008). Проходя через мембрану клетки, NO действует не только как межклеточный трансмиттер, но также как часть внутриклеточных эффекторных систем, таких как другие известные вторичные мессенджеры. За счет неспаренного электрона NO является высокоактивным химическим соединением, легко вступая в реакции с различными молекулярными компонентами клетки (Hughes, 2008), что является причиной огромного количества биологических эффектов, которые способна вызывать эта молекула. При этом нельзя забывать, что, обладая регуляторной функцией в низких концентрациях, в высоких – этот газ является высокотоксичным (для обзоров см.: (Butler et al., 1995; Marletta, 1994; Nathan et Xie, 1994; Schmidt et Walter, 1994; Stamler, 1994; Liaudet et al., 2000; Bruckdorfer, 2005). В исследованиях применялась различная концентрация доноров NO, детальное обсуждение этого вопроса приводится в разделе 3.2.1.

1.2.1. Источники NO в сердце

Основными источниками NO в организме млекопитающих являются особые комплексы ферментов - NO-синтазы (NOS). Существует три типа NOS, две конститутивных (или кальций-зависимых): нейрональная NOS (nNOS или NOS1) и эндотелиальная NOS (eNOS или NOS3) и одна кальций-независимая изоформа: индуцибельная NOS (iNOS, NOS2).

NOS продуцирует NO, активируя реакцию между L-аргинином, кислородом, H^+ и NADPH (Knowles et Moncada, 1994).

В сердце основная доля NO синтезируется конститутивными NO-синтазами. NOS1 экспрессируется в кардиомиоцитах (Xu et al., 1999; Papapetropoulos et al., 1999; Damy et al., 2003; Ziolo et al., 2008) и в преганглионарных и постганглионарных волокнах, иннервирующих синоатриальный и атриовентрикулярный узлы, субэпикардальных и эндокардиальных нервных клетках. NOS3 в основном встречается в сосудах сердца и эндокардиальных эндотелиоцитах. В меньшей степени эта изоформа представлена в рабочих кардиомиоцитах и кардиомиоцитах синоатриального и атриовентрикулярного узлов, однако существует ряд исследований, где показаны ее важные функции в этих клетках, о чем будет сказано ниже (Papapetropoulos et al., 1999; Shah et MacCarthy, 2000; Ziolo et al., 2008). Локализация NOS1 и NOS3 в кардиомиоците также различается. NOS1 расположена в перимембранной области саркоплазматического ретикулума кардиомиоцита, NOS3 была найдена в кавеолах (Feron et al., 1996 Xu et al., 1999; Williams et al., 2006; Ziolo et al., 2008). Эти молекулы играют важную роль в предотвращении диффузии NO в клетках сердца, где концентрация миоглобина высока. Миоглобин связывается с NO с высокой аффинностью, и это ограничивает биологическую активность NO. В патологических условиях, таких как высокая концентрация супероксид анионов, NO может реагировать с ними и ограничивать свою биологическую активность. (Casadei et Sears, 2003)

Индуцируемая NOS2 также была обнаружена в различных клетках сердца – ее появление сопряжено с локальным увеличением концентрации провоспалительных цитокинов. Помимо кардиомиоцитов эта изоформа была найдена в микрососудах, эндокардиальных эндотелиоцитах, сосудистых гладкомышечных клетках и фибробластах (Papademetriou et al., 1999; 1999; Shah et MacCarthy, 2000; Casadei et Sears, 2003).

1.2.2. Эффекты NO в сердце

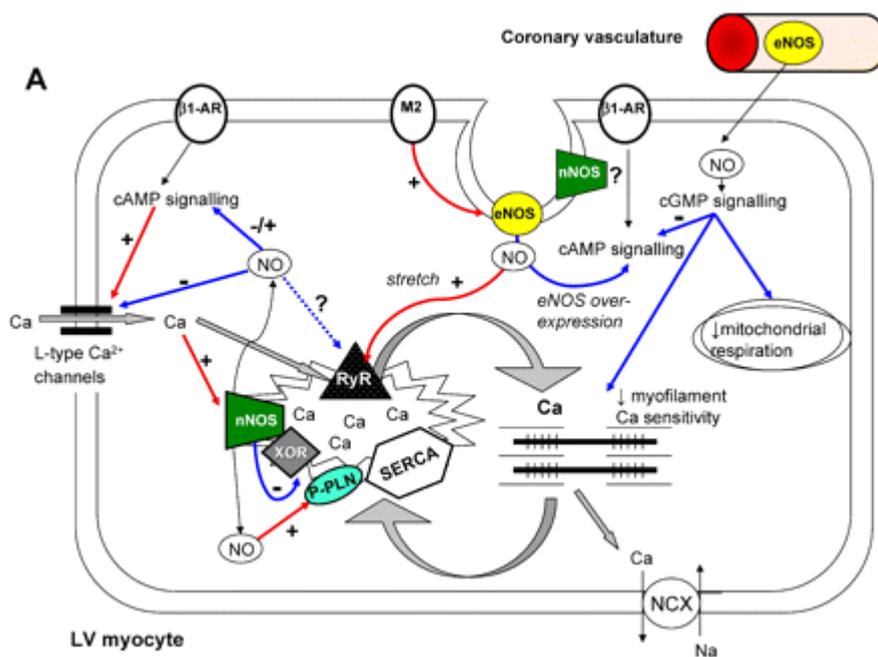


Рисунок 1. Стимуляторы выделения, источники и мишени NO в кардиомиоците (Seddon et al., 2007).

Показано влияние NO практически на все аспекты деятельности сердца: развитие, сократимость, сердечный ритм, энергопотребление, ответ на нейротрансмиттеры, гормоны, паракринные вещества и цитокины. NO имеет выраженный эффект на сократимость и сердечный ритм. Интересно, что этот эффект - двухфазный и зависит от концентрации. Низкие концентрации доноров NO, (0.1–10 мкМ), оказывают позитивные инотропный и хронотропный эффекты, действуя, как было показано, преимущественно через s-нитрозилирование (Ziolo,

2008) высокие (более 100 мкМ) - отрицательные, через cGMP-путь. (Vila-Petroff et al., 1999; Brady et al., 1993; Shah et MacCarthy, 2000; Casadei et Sears, 2003).

Вероятно, NO принимает участие в авторегуляции сердечного цикла, так как его концентрация циклически меняется на его протяжении. Её максимум приходится на период наполнения (Pinsky et al. 1997). Увеличение концентрации NO, по всей видимости, связано с растяжением сердечной мышцы, такая зависимость была показана в некоторых работах (Vila-Petroff et al, 1999; Shim et al., 2017; Pinsky et al. 1997).

Эндогенный NO влияет на зависимость связи сила – частота в кардиомиоцитах. И, хотя направление и выраженность этих эффектов зависят от экспериментальных условий, в целом можно сказать, что положительное соотношение сила-частота в миокарде подавляется эндогенным NO. Было установлено, что данное соотношение значительно возрастает после введения NOS1-ингибитора, например, у кардиомиоцитов крыс. Сходный эффект наблюдается *in vivo* у нокаутных NOS1^{-/-} мышей. Это доказывает, что NOS1 синтезирует NO, усиливающий эффект силы-частоты (более подробно см.: (Shah et MacCarthy, 2000, Casadei et Sears, 2003).

Молекула NO способна регулировать ответ сердечной мышцы на адренергическую и холинергическую стимуляцию. β -адренергический инотропный эффект модулируется донорами NO, которые уменьшают его в малых дозах и увеличивают в высоких (Kelly et al., 1996; Shah et MacCarthy, 2000; Massion et Balligand, 2003). Также существуют данные об ингибировании β -адренергической реактивности при повышенной экспрессии миокардиальной NOS3 в патофизиологических условиях (Casadei et Sears, 2003). Существуют данные, что у некоторых животных умеренная оверэкспрессия NOS3 приводит к ингибированию α -адренергических ответов (Casadei et Sears, 2003). NO также опосредует эффекты холинергической стимуляции сердца (Balligand et al., 1995). Приведенные выше данные были подтверждены позже в экспериментах, где использовали ингибиторы NOS или NOS^{-/-} мышей (Shah et MacCarthy, 2000).

Помимо прочего, NO способен регулировать энергетические и метаболические свойства миокарда. Например, выделение NO из эндотелия микрососудов паракринно вызывает обратимое ингибирование потребления кислорода в сердечной мышце (Shen et al., 1994; Trochu et al., 2000). Таким образом, стимуляция высвобождения NO, например, посредством брадикинина, снижает уровень митохондриального дыхания, в свою очередь добавление ингибиторов NO-синтазы приводит к увеличению общего потребления кислорода в сердце без сопутствующих изменений гемодинамики и сократительной активности (Shen et al., 1994; Shen et al., 1997). Также показано ингибирование гликолиза посредством NO (Zhang et Snyder, 1992).

Молекула NO играет важную роль в процессах, связанных с клеточной смертью, причем она может, как стимулировать гибель клетки, так и предотвращать ее. Какой из эффектов будет реализовываться, зависит от концентрации оксида внутри клетки и взаимодействия с другими биологическими молекулами, например, с кислородом и супероксидными радикалами (супероксидные анионы), т.е. ионами молекул кислорода с неспаренным электроном (Tsang et al., 2004; Calabrese et al., 2009). В низких концентрациях NO обладает кардиопротекторным, анти-апоптотическим, анти-гипертрофическим эффектами, защищающими клетки сердца от повреждений, вызванных патологическими состояниями, такими как, например, ишемия. В высоких концентрациях NO чрезвычайно опасен. Когда концентрация NO становится избыточной, он оказывает на кардиомиоциты про-некротический и про-апоптотический эффекты (Casadei et Sears, 2003; Strijdom et al., 2009; Calabrese et al., 2009).

Оксид азота (NO) принимает участие в регуляции деятельности сердечной мышцы не только в условиях нормы, но и при патологических состояниях. Экспрессия и активность NO-синтаз увеличивается в миокарде крыс и мышей, у которых был вызван инфаркт в эксперименте, а также у людей с различными заболеваниями сердца (Wildhirt et al., 1995; Casadei et Sears, 2003). NOS1 и NOS3

продуцируют NO, влияющий на сократимость, энергетический баланс и экспрессию генов в миокарде (например, с кардиомиопатиями, инфарктами), что может быть адаптивным эффектом, защищающим поврежденное сердце от вредных воздействий чрезмерной стимуляции катехоламином, а также от свободных радикалов. (Michel et Smith, 1993; Paulus, 2001). NOS2, в отличие от NOS1 и NOS3, обладает токсическим действием на кардиомиоциты, вызывая апоптоз и участвуя в воспалительных процессах при функциональной патологии сердца. (Michel et Smith, 1993; Wildhirt et al., 1995).

Регуляция деятельности сердца с помощью NO реализуется в первую очередь за счёт действия на кардиомиоциты (хотя так же имеет значение действие на эндотелий коронарных сосудов и, вероятно, на фибробласты). Источником NO может быть как NO выделяющийся из соседних клеток, в первую очередь эндотелиоцитов, так и эндогенный NO а также, в какой-то степени, NO, образующийся не ферментативным путём, например из нитратов пищевого происхождения (Zweier et al., 1995).

Как видно из вышесказанного, NO может оказывать множество разнообразных, порой противоположных эффектов на самые разные функции и системы сердца. Подводя итог, можно сказать, что конечный эффект действия NO на сердце зависит от следующего: (1) клеточного источника NO, (2) количества освобожденного NO, (3) преобладающего окислительно-восстановительного баланса и антиоксидантного статуса, (4) стимулов, таких как коронарный поток и сердечный ритм, (5) мишени ткани, (6) взаимодействия с нейрогуморальными и другими стимулами, (7) уровень активности иммунной системы или заболевания и (8) активации внутриклеточных цГМФ-зависимых и независимых субклеточных каскадов (Shah et MacCarthy, 2000).

1.2.3. Молекулярные механизмы NO-вызванных эффектов.

NO может действовать двумя основными молекулярными путями: активацией растворимой GMP-циклазы и дальнейшая активация PKG и других активных молекул и S-нитрозилированием метиониновых остатков белков (Lima et al., 2010). Существует работа, в которой показано, что s-нитрозилирование чаще осуществляется с помощью nNOS, а sGMP-зависимый путь в большей степени находится под влиянием eNOS (Ziolo, 2008). Также следует отметить, что NO – не единственный возможный продукт NOS. В отсутствие L-аргинина и при изменении редокс-потенциала клетки, NOS может образовывать активные формы кислорода, так называемые ROX, способные оказывать токсическое действие на клетку (Förstermann et Münzel, 2006).

1.2.4. Влияние растяжения на активность NO-синтаз и содержания NO в кардиомиоците.

NO принимает участие в регуляции ионных токов кардиомиоцита, в том числе через механоуправляемые каналы (Boycott et al., 2020). В то же время и сами NOS чувствительны к растяжению клетки. Такая сложная реакция на механические воздействия не кажется удивительной в такой структуре как сердце, которое находится в постоянной смене сокращения и расслабления и, как следствие, постоянно подвергается растяжению.

Действительно, в различных типах тканей мы можем наблюдать активацию NOS при некотором механическом воздействии на эти ткани, и NO действует как вторичный посредник в формировании клеточного ответа. Наиболее известная и впервые обнаруженная роль NO как вещества, которое реагирует на механическое воздействие, а именно на напряжение сдвига, - это роль сосудорасширяющего средства в сердечно-сосудистой системе (Ignarro et al., 1987).

Позже появилось сообщение о механически индуцированной эмиссии NO в других тканях, кроме эндотелия. NO оказался важным фактором наряду с фактором роста гепатоцитов в стимуляции стволовых клеток скелетных мышц,

так называемых сателлитных клеток, после травмы или механического воздействия, которые вызывают регенерацию мышц и развитие новых миофибрилл. (Tatsumi et al., 2002). Более того, было показано, что NO действует как протектор во время мышечной перегрузки, участвуя в регуляции роста мышц, включая регуляцию транскрипции скелетного альфа-актина и тяжелой цепи миозина типа I (Sellman et al., 2006). Другой пример протекторной роли NO был показан в капиллярах почечных клубочков, где NO через cGMP действует на RhoA, что предотвращает индуцированное растяжением образование актиновых стрессовых волокон и активацию Erk в этих клетках (Krepinsky et al., 2003).

Изменение концентрации NO в ответ на механическое воздействие было показано не только для мышц, но и для костей (Bacabas et al., 2004), соединительной ткани (Rannou et al., 2003), зрительного нерва (Liu et Neufeld, 2001).

По-видимому, роль NO в защите от механического стресса еще более глобальна: было показано, что eNOS входит в комплекс белков кавеол, который является важной структурой в ответе клетки на различные типы стимулов, включая механические (Shaul et al., 1996; Shvets et al., 2014).

Итак, как мы видим, NO - хорошо известная регуляторная молекула, выделяющаяся в ответ на растяжение в гладких и скелетных мышцах, поэтому мы можем предположить, что она выполняет сходные функции и в сердце, где растяжение является обычным процессом как в норме (преднагрузка сердечной мышцы) так и при патологических состояниях (гипертрофия, рубцы после инфарктов), когда этим клеткам приходится адаптироваться к этим изменениям.

Действительно, есть свидетельства того, что NO может играть важную роль в таких адаптационных процессах. Убедительное доказательство того, что молекула NO может служить сигналом механического воздействия на сердечные клетки, было обнаружено в работе Pinsky и его коллег, где они показали изменение концентрации NO в целом сердце кролика во время нормального

сердцебиения *in vivo* при увеличении или уменьшении преднагрузки желудочков (Pinsky et al., 1997).

Было убедительно показано увеличение концентрации NO в кардиомиоцитах при их растяжении (Liao et al., 2006; Petroff et al., 2001; Shim et al., 2017).

Растяжение может влиять на NOS двумя различными путями, с одной стороны, активируя этот белковый комплекс непосредственно, что было описано выше, с другой, влияя на экспрессию генов, отвечающих за синтез белков NOS, таким образом вызывая долгосрочные увеличения экспрессии NO. Так было выявлено долговременное изменение концентрации NO у пациентов с дилатационной кардиомиопатией. Это изменение может быть вызвано увеличением эндомиокардиальной экспрессии NOS2 и NOS3 (Heymes et al., 1999). Было продемонстрировано, что искусственная оверэкспрессия NOS3 у мышей уменьшают последствия инфаркта миокарда, а, как известно, растяжение сердечной ткани всегда имеет место при образовании инфарктного рубца (Jones et al., 2003; Janssens et al., 2004). В то же время другая группа исследователей показала, что фибрилляция предсердий вызывает подавление экспрессии эндокардиальной NOS и продукции NO, что приводит к снижению базального уровня оксида азота (Cai et al., 2002).

Отдельным вопросом является вопрос о том, какие молекулярные механизмы приводят к активации NOS в кардиомиоцитах через растяжение.

В отличие от молекулярных механизмов, приводящих к активации eNOS у эндотелиоцитов в результате напряжения сдвига, которые хорошо и подробно изучены, работ относительно активации NOS через растяжение для кардиомиоцитов гораздо меньше. В уже упомянутой выше статье, Petroff утверждает, что растяжение клеток индуцирует зависимое от PtdIns-3-ОН киназы (PI(3)K) фосфорилирование как Akt, так и эндотелиальной изоформы синтазы оксида азота (eNOS), что приводит к ее активации (Petroff et al., 2001, Angelone et al., 2015).

Сейчас предполагается, что молекула дистрофина может играть центральную роль в передаче механического растяжения на NOS. Так было показано, что разрушение дистрофина приводит к снижению синтеза NO более чем на 70%, что приводит к таким изменениям как укорочение ПД и усилению K^+ -токов (Reilly et al., 2016), эти изменения связывают с разобщением nNOS и сарколеммы, что было показано для скелетной мышцы (Brenman et al., 1995). Это подтверждает и другое исследование, в котором было продемонстрировано, что nNOS может быть активирован посредством фосфорилирования S1412-участка с помощью комплекса дистрофин-гликопротеин и протеинкиназы, активируемой AMP (Garbincius et Michele, 2015). Также было показано, что активация интегрин стимулирует NO-зависимый выброс Ca^{2+} из ретикулума. Вероятно, сигнал с интегринов передается на NOS через киназу фокальной адгезии (ФАК) (Van der Wees et al., 2006). Любопытно, что показан и обратный эффект: влияние NO на экспрессию интегрин $\beta 1$ через cGMP путь (Zhan et al., 2018).

В недавнем исследовании было продемонстрировано, что у мышей с геном *cavin-1* $-/-$ (*cavin-1* – это белок, который участвует в построении кавеол) eNOS проявляет чрезмерную активность, которая вызывает неадекватные реакции на механическое растяжение. В нормальном состоянии eNOS находится под ингибирующим влиянием со стороны комплекса Cav1/3 и Cavin-1 (Kaakinen et al., 2017).

В последние годы было продемонстрировано, что механоуправляемый канал Piezo1 принимает участие в регуляции экспрессии eNOS в клетках сердца, подвергшихся чрезмерной преднагрузке (Wong et al., 2018), однако характер такого влияния оказывается различным при различных степенях этой преднагрузки.

Механическое воздействие не только активирует синтез NO, но и сам NO играет важную роль в регуляции механосенситивности кардиомиоцитов. Так было показано, что взаимодействие NO с цитоскелетом регулирует и

стабилизирует механосенситивность кардиомиоцита. Речь идет о взаимодействии с интегринами, комплексом дистрофин-гликопротеин, тайтином и LIM-доменом.

Как уже было сказано, активация интегрин стимулирует NO-зависимый выброс Ca^{2+} из ретикулума, был упомянут и обратный эффект: влияние NO на экспрессию интегрин $\beta 1$ через cGMP путь (Zhan et al., 2018). Талин и винкулин - два белка цитоскелета ассоциированных с интегрином и актином, так же способны модулироваться NO. Это было напрямую показано для скелетных мышц и предполагается для кардиомиоцитов (Zhang et al., 2004).

Известны два белка цитоскелета с LIM-доменами, которые модулируются NO - это LIM Protein (MLP) и Lipoma Preferred Partner (LPP). MLP локализован в Z-дисках саркомеров и выполняет различные стабилизирующие функции для цитоскелета сократительного аппарата, в том числе, отвечает за его механочувствительность (Knöll et al., 2002). Более того, показано, что ингибирование продукции NO с помощью L-NAME индуцирует переход MLP-комплекса из цитоплазмы в ядро и в дальнейшем, механическое воздействие на клетку вызывает её гипертрофию (Boateng et al., 2009).

Также в литературе имеются данные, что NO способен регулировать эластичность белка тайтина как через PKG-зависимый путь так и путем s-нитрозилирования (Figueiredo-Freitas et al., 2015; Leite-Moreira et al., 2018).

1.2.5. NO и механоэлектрическая обратная связь

Оксид азота выполняет важную функцию в регуляции реакции миокарда в ответ на механические стимулы такие как, например, растяжение. Реакция миокарда на растяжение может быть представлена двумя видами: значительное и быстрое увеличение силы сокращений (закон Франка-Старлинга) и более медленное и менее выраженное увеличение сократимости (эффект Анрепа). Было показано, что NO способен принимать участие в реализации обоих эффектов. Эндогенный NO усиливает реакцию Франка-Старлинга, вероятно, за счет

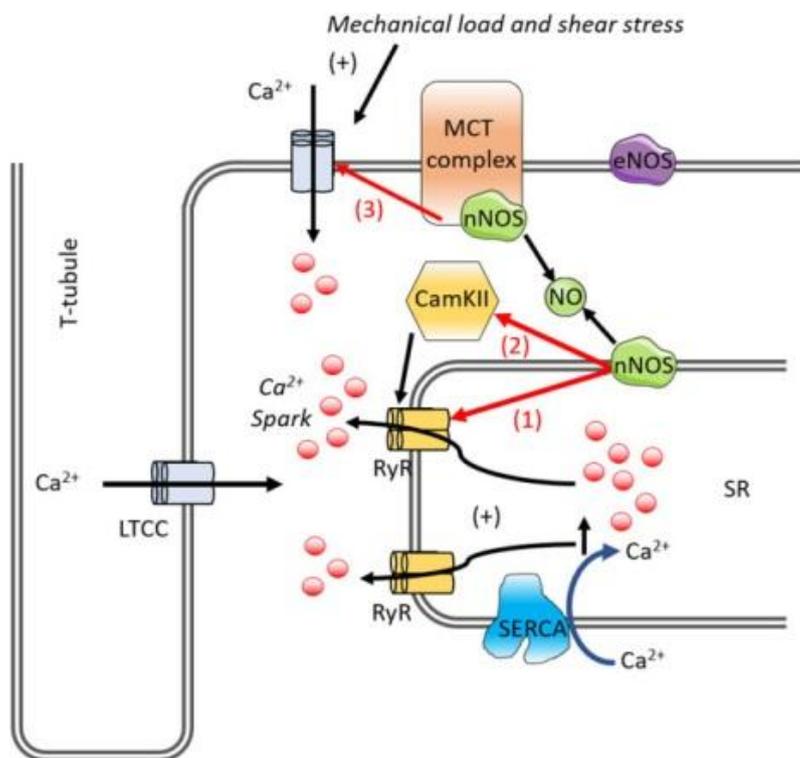


Рисунок 2. Возможная схема путей механо-хемотрансдукции в кардиомиоците, включающая активацию NOS. В кардиомиоцитах механическая нагрузка и напряжение сдвига вызывают приток Ca^{2+} , Ca^{2+} связывается с лежащим в основе RyR и активирует его. Это увеличивает спонтанный выброс Ca^{2+} через RyR. nNOS и CaMKII активируются, способствуя утечке Ca^{2+} через фосфорилированные RyR. nNOS увеличивает утечку Ca^{2+} через RyR либо (1) непосредственно через S-нитрозилирование, либо (2) косвенно через CaMKII. На (3) канал LTCC влияет NO, который блокирует канал. LTCC, кальциевый ток L-типа; NO, оксид азота; nNOS, нейрональная синтаза оксида азота; RyR, рианодиновый рецептор; SERCA, Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматического ретикулума; SR, саркоплазматический ретикулум; CaMKII, Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа II. (Boycott et al., 2020)

увеличения диастолической растяжимости (Shah et MacCarthy, 2000; Casadei et Sears, 2003; Zhang et al., 2009). Было обнаружено, что увеличение производства оксида азота в эндотелиальных клетках коронарных артерий или внутривенное введение доноров оксида азота вызывает быстрое расслабление левого желудочка, что приводит к снижению конечного диастолического давления, что может повлиять на реализацию механизма Франка-Старлинга путем увеличения конечного диастолического объёма и длины миоцитов. (Paulus et al., 1995). Напротив, ингибирование производства оксида азота в кардиомиоцитах

предотвращает увеличение сердечного выброса при увеличении левого желудочка в изолированном сердце. Это указывает на то, что производство оксида азота в результате растяжения миокарда играет важную роль в регулировании сердечного выброса (Prendergast et al., 1997). Эффект Анрепа представляет собой альтернативный аутокринный механизм, который может быть связан с выделением оксида азота и увеличением сократимости при растяжении. Выработка оксида азота внутри кардиомиоцитов коррелирует с увеличением внутриклеточной концентрации кальция и вызывает положительный инотропный эффект при растяжении миокарда. Этот положительный инотропный эффект связан с активацией NOS3 и может быть подавлен ингибированием NOS3. (Petroff et al., 2001).

В данном исследовании нас в первую очередь интересует влияние механических изменений на электрические свойства сердца через воздействие на ионные каналы. В настоящее время между исследователями нет согласия, активируются ли ионные каналы механическим стимулом напрямую (Zhang et al., 2000) или главную роль в изменении их активности играет индукция сигнальных каскадов, активируемая механическим путем (Lammerding et al., 2004). В последнем случае наибольший интерес вызывает NO синтаза, так как активность этого внутриклеточного фермента, значительно возрастает при растяжении сердечных миоцитов (Casadei et Sears, 2003). Доноры оксида азота усиливают активацию механосенситивных каналов кардиомиоцита в состоянии покоя. Однако, у растянутых миоцитов, содержащих активированные MGCh, оксид азота снижает их проводимость. Обнаружено, что hump-like деполяризация и другие формы электрических аномалий, вызываемых растяжением миоцитов, зависят от эффективной работы MGCh и регулируются синтезом оксида азота (Kazanski et al., 2010).

Исследовалось влияние донора оксида азота SNAP на электрическую активность ткани предсердий. Изучались биоэлектрические и механические

параметры фрагмента правого предсердия крысы при перфузии препаратом, содержащем донор оксида азота - SNAP.

Целью было выяснить, возникнет ли hump-like деполяризация и аритмия при увеличении концентрации оксида азота без растяжения тканей. В таком случае увеличение концентрации оксида азота вследствие применения донора оксида азота должно приводить к изменениям в генерации импульсов с последующим появлением hump-like деполяризации и аритмии.

Для подтверждения этого были проведены эксперименты, в которых в течение эксперимента (регистрация контрольной записи) без каких-либо предварительных изменений в преднагрузке проводилась перфузия тканей физиологическим раствором с добавлением SNAP в концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Эксперименты показывают, что добавление SNAP действительно вызывает изменение APD90 и увеличение SID, что приводит к выраженным аритмиям. Таким образом, SNAP приводит к изменениям AP типа hump-like деполяризации (Abramochkin et al., 2012).

Возникает вопрос, являются ли изменения AP, вызванные SNAP и имеющие горбообразную деполяризацию, аналогичными механоиндуцированным изменениям (SID)? Может ли SNAP вызвать механоиндуцируемую аритмию?

Чтобы ответить на этот вопрос, были проведены эксперименты по блокированию MGCh ионами Gd^{3+} , которые ингибировали электрофизиологические эффекты SNAP до изменений механической активности. На основе этих данных, было установлено, что hump-like деполяризация и аритмия вызваны SNAP определяются активацией MGCh, и, следовательно, являются аналогичны механоиндуцируемой hump-like деполяризации или механоиндуцируемой аритмии. В результате проведенных экспериментов было установлено, что SNAP при преднагрузке увеличивает внутриклеточную концентрацию NO, что, в свою очередь, способствует активации MGCh, что приводит к изменениям генерации AP. (Abramochkin et al., 2012).

В результате исследований было обнаружено, что hump-like деполяризация, возникающая при применении SNAP без растяжения ткани, аналогична механоиндуцированному типу деполяризации. Аритмия, вызванная применением SNAP без преднагрузки, является механоиндуцируемым типом аритмии (Abramochkin et al., 2012).

Однако связь между SNAP и механочувствительными каналами оказалась неоднозначной: было показано, что при низких концентрациях оксида азота механочувствительные каналы активируются, тогда как при удвоении дозы оксида азота ($6 \cdot 10^{-4}$ моль/л) он, наоборот, инактивирует механочувствительный канал. Более того, оксид азота в низкой концентрации (когда он активирует механочувствительный канал в интактных клетках) может полностью устранить электрический эффект при длительном растяжении (Abramochkin et al., 2012).

1.2.6. Характер и механизм влияния NO на различные токи в кардиомиоцитах

Влияние NO на ионные каналы сердца хорошо известно и описано в большом количестве исследований. Ниже мы приводим основные сведения относительно такого влияния, особо подчеркивая ситуацию, когда существуют сведения о механосенситивности данного канала.

Na⁺-токи.

Растяжение мембраны кардиомиоцита приводит к увеличению пиковых значений тока через Na_v1.5-каналы и ускоряет их инактивацию (Boycott et al., 2020). В исследовании Ahern и коллег было показано, что NO устраняет инактивацию потенциалуправляемых Na⁺-каналов кардиомиоцитов желудочков крыс и это происходит по механизму независимому от cGMP (Ahern et al., 2000). Эти данные были подтверждены и другими исследованиями, показывающими, что роль источника NO играет nNOS, а действие осуществляется благодаря нитрозилированию (Cheng et al., 2013). В другом исследовании, напротив, было показано, что NO уменьшает ток через эти каналы в кардиомиоцитах желудочков

морских свинок и мышей, причём действие происходит через cGMP и cAMP системы (Ahmmed et al., 2001). Второе - особенно необычно, так как cAMP не считается классическим вторичным мессенджером для NO. Сходный результат получен в недавнем исследовании на кардиомиоцитах желудочков сердца крыс (Wang et al., 2021). Было показано, что долговременная аппликация донора NO NOC-18 снижает Na-ток в дозозависимой манере, действие на каналы происходит за счет s-нитрозилирования. Эффект сопровождается снижением количества мРНК и белков Na-каналов.

L-Ca²⁺-токи.

Механосенситивность LTCC (L-type Calcium Current) в кардиомиоцитах крыс была продемонстрирована в недавних исследованиях (Takahashi et al., 2019). Относительно действия NO на L-Ca²⁺-токи существует некоторое количество исследований, отмечающих возможность разных путей действия NO и разных конечных его эффектов. В исследовании Wang и коллег показано, что NO увеличивает I_{Ca2+} через торможение PDE3 с помощью cGMP, образующуюся при стимуляции sGC, что приводит к повышению концентрации cAMP в кардиомиоцитах предсердия кролика (Wang et al., 2000). Сходные данные прежде были получены и на кардиомиоцитах предсердия человека с предложением того же механизма, кроме того, подчеркивалось, что максимальный эффект достигается при концентрации донора NO 1нМ, а при увеличении концентрации больше 1мкМ идёт снижение эффективности действия (Kirstein et al., 1995). Однако в своей работе Wang и коллеги указывают и приводят в доказательство большое количество других работ, что действие NO через cGMP может быть и иным в случае, если оно реализуется по пути стимуляции PDE2 или PKG. Зависеть это может как от вида животного, так и от региона сердца и связано с различной экспрессией разных компонентов этих цепочек. Например, было показано ослабление I_{Ca2+} при стимуляции eNOS в кардиомиоцитах синоатриального узла кролика через cGMP стимулируемую PDE2, которая

уменьшает концентрацию cAMP (Wang et al., 2000) или ингибирование $I_{Ca^{2+}}$ по cGMP-зависимому механизму в кардиомиоцитах сердца морской свинки при действии NO (Bai et al., 2004). Также было показано тоническое торможение $I_{Ca^{2+}}$ оксидом азота (Boycott et al., 2020).

Так же NO может действовать через sGC-независимый путь, а именно путём s-нитрозилирования тиоловых групп белков. Так было показано, что s-нитрозилирование LTCC в кардиомиоцитах сердца хорька приводит к увеличению $I_{Ca^{2+}}$, хотя, авторы подчеркивают, что эффект может меняться в зависимости от редокс-состояния клетки (Abi-Gerges et al., 2002). NO может оказывать и модулирующее влияние на LTCC: в кардиомиоцитах желудочков крыс оксид азота оказывал мощное потенцирующее влияние на $I_{Ca^{2+}}$ при бета-адренергической стимуляции (Abi-Gerges et al., 2002). Однако и здесь ситуация оказывается более сложной: в других работах было показано, что nNOS способен как потенцировать (Barouch et al., 2002), так и ослаблять действие бета-адренергической стимуляции (Burkard et al., 2007), а ингибирование - с помощью eNOS же ассоциируют только с ослаблением действия бета-адренергической стимуляции (Barouch et al., 2002; Wang et al., 2008). Такое положение дел может быть частично объяснено тем, что действия двух ферментных комплексов, синтезирующих одно и то же вещество в одной и той же клетке различаются, так как эти комплексы находятся в различных компартментах клетки (Barouch et al., 2002). Действительно, было показано, путем его ко-иммунореципитирования с кавеолином-1, что eNOS ассоциируется с кавеолами, (García-Cardena et al., 1997), а nNOS - с саркоплазматическим ретикулумом (Jian et al., 2014).

K⁺-токи.

NO уменьшает быстро проходящий ток I_{to} , обуславливающий фазу ранней реполяризации кардиомиоцита, действуя на каналы $K_{v4.3}$, которые были экспрессированы в ооцитах китайского хомячка. Такой же эффект был показан на ток I_{to1} в кардиомиоцитах предсердия человека (Gómez et al., 2008). Интересно,

что в данном случае действие NO идет не по классическому пути через sGC или s-нитрозилирование, а через активацию AC, PKA и PP2A.

NO также блокирует $K_v1.5$ -каналы (I_{Kur} -ток) в кардиомиоцитах предсердий человека и желудочков крысы (Núñez et al., 2006) и $K_v11.1$ -каналы (I_{Kr} -ток) (Taglialatela et al., 1999), экспрессированных в ооците шпорцевой лягушки. Эффект на $K_v1.5$ -каналы достигается за счет активации sGC-cGMP-PKG пути и путем s-нитрозилирования цистеиновых остатков белков канала в районе сегмента S2. Действие на $K_v11.1$ -каналы осуществляется по cGMP-независимому пути.

NO усиливает I_{Ks} -ток путем s-нитрозилирования альфа-субъединицы $K_v7.1$ -канала (Bai et al., 2004; Tamargo et al., 2004). Было показано, что физиологическим источником NO в этом случае может служить eNOS (Bai et al., 2004).

Ток аномального выпрямления I_{K1} является особенно важным током для данного исследования, так как он доминирует среди поздних токов в диапазоне -60 - -30 мВ (максимум около -45 мВ) и, как уже отмечалось, модулируется растяжением. Как показывают исследования, NO также оказывает на этот ток влияние. В физиологических концентрациях NO приводит к увеличению тока I_{K1} в кардиомиоцитах желудочков человека за счет увеличения вероятности открытия каналов $Kir2.1$, что вызывается их s-нитрозилированием по cys76 (Gómez et al., 2009). Было показано, что этот процесс зависит от кавеолина-3, то есть, вероятно, связан с NOS3 (Vaidyanathan et al., 2013).

SNAP, при концентрации 200 мкМ, заметно повышает ток через каналы $Kir2.1$, экспрессированные в клетках яичников китайского хомяка. Сходные результаты были получены при использовании DEA-NO, 3мкМ и насыщенного раствора NO. Также было обнаружено, что SNAP повышает как входящий, так и выходящий ток I_{K1} в изолированных кардиомиоцитах предсердий человека. Основываясь на различных исследованиях, авторы считают, что NO может способствовать переходу канала из закрытого состояния в открытое, а также ускоряет кинетику его закрытия. (Gómez et al., 2009).

В научных источниках есть лишь одно упоминание о том, как оксид азота влияет на каналы утечки. Согласно авторам, в условиях, вызванных цианидом натрия, вызывающее ишемическое состояние, NO модулирует K₂P каналы в изолированных желудочках морской свинки, увеличивая ток через TALK-1 (K₂P16.1) и TALK-2 (K₂P17.1) каналы. Добавление L-аргинина повышает уровень оксида азота, а ингибитор NO-синтазы L-NAME снижает ток через эти каналы, что может играть важную роль в защитной функции клеток сердца при длительной ишемии (Lu et al., 2007).

Существуют данные об участии в NO-сигаллинге некоторых катионнеселективные каналов, из которых для нас наиболее интересными представляются семейства TRP и Piezo, так как оба эти типа показали вклад в механосенситивность кардиомиоцитов, как уже было упомянуто ранее.

Показано, что в кардиомиоците из сердца мышей канал TRPC6 может быть ингибирован в следствие активации PKG-пути, который в свою очередь активируется NO (Seo et al., 2014).

Нам не известно о наличии работ, где говорилось бы о модулирующем влиянии NO на семейство Piezo каналов, однако, как указано выше, показана возможность регуляции выделения NO при изменении тока через данный тип каналов.

Отдельно стоит отметить, что NO способен влиять на Na⁺/K⁺-АТФ-азу. Показано, что в сердце NO активирует Na⁺/K⁺-АТФ-азу (William et al., 2005 Pavlovic et al., 2013), воздействуя на PKC, которая в свою очередь фосфорелирует белок фосфолеманн, способный активировать работу Na⁺/K⁺-АТФ-азы (Pavlovic et al., 2013). С другой стороны, в других тканях, было, показано как активирующее действие NO на Na⁺/K⁺-АТФ-азу, например, в гладкой мускулатуре аорты кролика (Gupta et al., 1994), так и тормозное действие NO на Na⁺/K⁺-АТФ-азу через sGC-cGMP-PKG путь, например, в цилиарном эпителии свиньи (Shahidullah et Delamere, 2006), а также отсутствие действия NO на Na⁺/K⁺-АТФ-азу, например, в эпителии толстой части восходящей петли Генле нефрона

крысы (Ortiz et al., 2001). Остается вопросом, является ли такая разнонаправленность эффектов лишь тканевой специфичностью, или же ситуация может объясняться также сложностью влияний, которые могут оказываться NO в зависимости от дозы или же условий, в которых способен активироваться тот или иной внутриклеточный путь.

1.2.7. NO-независимый путь активации sGC

Как уже было сказано, существуют два основных пути воздействия NO на клетку: sGC зависимый и через s-нитрозилирование тиоловых групп различных белков. Ситуация осложняется тем, что между двумя этими путями существует cross talk, так, например, s-нитрозилирование ингибирует активность sGC и фосфодиэстеразы 5 разрушающей cGMP, eNOS, а также белок теплового шока 90 и Akt/PKB - белки участвующие в регуляции eNOS. Так же регуляции через s-нитрозилирование подвергается PKG. Кроме того, активация s-нитрозилирования аргиназы и ингибирующее s-нитрозилирование диметиларгининдиметиламиногидролазы будет снижать уровни субстрата NOS и повышать уровни эндогенных метиларгининовых ингибиторов NOS, соответственно (Lima et al., 2010).

Таким образом, очень непросто в исследовании действия NO на клетку отделить процессы, связанные с первым и со вторым путем. Несколько облегчает задачу тот факт, что sGC имеет два сайта активации: NO-зависимый и NO-независимый, который наиболее эффективно может активироваться с помощью разных веществ, в том числе BAY 41-2272 (Stasch et al., 2002).

Оксид азот (NO)–чувствительная s-гуанилилциклаза (sGC) катализирует образование внутриклеточного мессенджера cGMP и обычно считается наиболее важным рецептором для сигнальных молекул NO (Mullershausen et al., 2001; Rybalkin et al., 2002), которые в клетках продуцируются NO-синтазами (NOS) (Seddon et al., 2007). Тот факт, что основным рецептором для внутриклеточного NO является sGC широко известен и в результате этого взаимодействия

включается NO-sGC система (Seddon et al., 2007). Показано, что первичным шагом активации sGC является связывание NO с шестым участком гемового железа в домене HNOX ее β субъединицы и последующее разрушение связи с His105. Однако это не весь механизм, так как связывание одной молекулы NO приводит только к умеренной активации, которая усиливается в несколько раз за счет связывания дополнительной молекулы (молекул) NO с сайтами с более низким сродством (Cary et al., 2006; Cary et al., 2005; Fernhoff et al., 2009; Martin et al., 2012); расположение этих дополнительных сайтов неясно, и может быть либо у гемового железа, либо в белке у цистеинового остатка (Gileadi, 2014). Вместе с тем, используя фотоаффинное мечение, была определена область цистеина 238 и цистеина 243 в $\alpha 1$ -субъединице sGC в качестве мишени для стимулятора sGC нового типа, по NO независимому механизму, но с образованием внутриклеточного мессенджера cGMP через активацию sGC, и им является соединение BAY 41-2272 (Stasch et al., 2001).

Таким образом, мы можем рассматривать NO как потенциальный регулятор проводимости SAC.

1.2.8. Заключение

Таким образом, сегодня известно, что помимо ЭМС в сердце присутствует МЭОС, в основе механизмов которой лежит работа SAC. Показано что этими каналами с катионеспецифической проводимостью являются каналы TRP и Pex, которые изучены. Однако регуляторные механизмы их неизвестны. Известно только, что, как важнейший внутриклеточный регулятор клеточных процессов кардиомиоцитов, NO участвует и в регуляции механочувствительных токов. В исследованиях было показано, что электрофизиологические эффекты, вызванные растяжением, снимаются NO, а NO, в свою очередь, вызывает электрофизиологический эффект у интактной клетки, аналогичный эффекту, вызванному растяжением.

От механочувствительных токов зависят и форма, и длительность потенциала действия клетки, которые в свою очередь влияют на нормальное распространение возбуждения по целому сердцу и процессы электро-механического и электро-химического сопряжения, которые, в свою очередь, ответственны за нормальное функционирование сердца как органа. К сожалению, конкретный характер этой регуляции и ее механизмы остаются по большей части неизвестными, так что данная работа ставит своей целью исследовать влияние активации двух различных центров связывания растворимой гуанилатциклазы, реализующих NO-зависимый и NO-независимый механизмы, на регуляцию активируемых растяжением ионных каналов кардиомиоцитов желудочков сердца крыс.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследований

Данная работа была выполнена на кардиомиоцитах, выделенных из желудочков сердца самцов крыс линии Вистар. Крысы линии Вистар были выбраны нами как объект исследования, так как их сердца имеют следующие преимущества:

1. Используемая методика изоляции кардиомиоцитов мало влияет на его работу и функционирование клеток (Камкин и др., 2003).
2. Хорошо известны методы растяжения клеток, которые не приводят к патологическим изменениям, а дают реверсильный эффект (Камкин и др., 2003).
3. Множество работ по исследованию изолированных кардиомиоцитов выполнено с использованием сердец крыс линии Вистар (Calaghan et al., 2001; Leblanc et al., 1998; Howlett et al., 2022), что позволяет более адекватно сравнивать полученные данные экспериментов.

В работе использовали крыс линии Вистар в возрасте от 6 до 9 недель с весом в пределах 220 гр (49 шт.). Перед экспериментом крыс содержали в виварии в течение 4 недель при соотношении освещенного и темного периода 12:12 ч в стандартных клетках Т4, корм и вода предоставлялись без ограничения.

2.2. Растворы

Перфузионный раствор для изоляции кардиомиоцитов из желудочка сердца крысы. При выделении использовали раствор, содержащий в мМ: NaCl 118, KCl 4, MgCl₂ 1, NaHPO₄ 1.6, NaHCO₃ 24, пируват натрия 5, таурин 20 и глюкозу 10, pH 7.4±0.02.

Раствор для выдерживания кардиомиоцитов. Для выдерживания кардиомиоцитов применяли раствор KB («Kraftbrühe»), содержащей (ммоль/л):

глутаминовую кислоту 50, KCl 30, KH_2PO_4 , таурин 20, глюкозу 10, MgSO_4 3, EGTA 0.1, HEPES 10 с pH 7.3 (доведенной KOH).

Перфузионный раствор, используемый для исследований методом *patch clamp*. Для исследования изолированных кардиомиоцитов желудочков сердца крысы методом *patch clamp* использовали следующий раствор: NaCl 150 мМ, KCl 5.4 мМ, CaCl_2 1.8 мМ, MgCl_2 1.2 мМ, HEPES 5 мМ, глюкоза 20 мМ (pH 7.4). В качестве внутрипипеточного раствора использовали следующий раствор: KCl 140 мМ, MgCl_2 5.5 мМ, Na_2ATP 5 мМ, EGTA 0.01 мМ, HEPES 10 мМ (pH 7.2). В ряде экспериментов с целью устранения калиевых токов в перфузионном растворе заменяли KCl 5.4 мМ на CsCl 5.4 мМ, а во внутрипипеточном растворе – KCl 140 мМ на CsCl 140 мМ.

2.3. Биологически активные вещества

Растворы биологически активных веществ, действия которых на клетки изучали, вводили в камеру с помощью перфузионной системы состоящей из перистальтических насосов и силиконовых или полипропиленовых трубок.

Были использованы следующие растворы. В качестве донора NO использовали SNAP (S-Nitroso-N-acetylpenicillamine или 5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine) в концентрациях 50-400 мкмоль/л. SNAP вызывает активацию sGC и образование cGMP по NO-зависимому пути, и, как показано в обсуждении, оптимальная концентрация для такой активации равна 200 мкмоль/л.

Для стимуляции sGC использовали ее активатор BAY 41-2272 или 5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine, в концентрации 10 мкмоль/л, применяемую в сходных исследованиях (Chen et al., 2020; Mujoo et al., 2008).

Для инактивации sGC использовали ингибитор ODQ или 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one в концентрациях 10 и 5 мкмоль/л, соответственно, и которые эффективно блокируют sGC (Sips et al., 2011).

Для инактивации cGMP-зависимой протеинкиназы использовали ингибитор KT5823 или (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-methoxy-2,9-dimethyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocine-10-carboxylic acid, methyl ester в концентрации 1 мкмоль/л – эффективной для ингибирования протеинкиназы, что показано ранее в сходных работах (Maas et al., 2008; Vila-Petroff et al., 1999).

Для активации cGMP-зависимой протеинкиназы использовали ее активатор 8Br-cGMP или 8-bromo-cGMP в концентрации 200 мкмоль/л, которая обычно применяется в исследованиях токов кардиомиоцитов (Koitabashi et al., 2010).

Использовали блокатор S-нитрозилирования L-аскорбиновую кислоту или 3-Oxo-L-gulofuranolactone в концентрации 10 мкмоль/л (Ohtani et al., 2012).

Как субстрат для синтеза NO с помощью NOS вводили L-Arginine в концентрациях 50 и 100 мкмоль/л.

2.4. Изоляция кардиомиоцитов из желудочков крыс

Кардиомиоциты желудочков изолировали, используя стандартную технику диссоциации при помощи коллагеназы (Gödecke et al., 2001). Анестезию животных проводили с помощью инъекции 2% раствора рометара внутримышечно из расчета 0,2 мл/кг. Животным перед вскрытием внутрибрюшинно вводили гепарин (5000 U kg⁻¹ I.P.), после чего через 15 мин начинали процедуру. Вскрывали грудную клетку и очищали аорту от соединительной ткани. Сердце вырезали, и аорту надевали на жестко зафиксированную пластиковую канюлю диаметром около 2 мм. На аорту накладывали лигатуру у начала канюли так, чтобы не перекрывался вход в коронарные артерии. Затем включали систему перфузии, заполненную раствором

для изоляции кардиомиоцитов, на скорости 5 мл/мин и температуре раствора 37 °С. В течение 5 мин сердце (коронарные сосуды) промывались данным раствором.

Затем перфузия переключалась на такой же раствор, в который были предварительно добавлены 0.1% коллагеназы типа II (Worthington, Lakewood, N. J., США) и 20 мкМ CaCl₂. Перфузия шла в пределах 22 мин.

После завершения ретроградной перфузии с ферментом сердце промывали в течение 5 мин раствором KB («Kraftbrühe»). После завершения отмывания сердца раствором KB желудочки отделяли, резали на полоски в чашке Петри в растворе KB и затем, в пластиковом стаканчике их аккуратно встряхивали, чтобы освободить клетки в раствор KB. Полученную суспензию клеток фильтровали, и выдерживали в среде KB при комнатной температуре 2 ч. Затем пипетировали содержимое и 1 - 2 капли помещали в перфузионную камеру объемом 1 мл, закрепленную на предметном столике микроскопа и включали перфузионную систему, содержащую исходно перфузионный раствор, используемый для исследований методом patch clamp с Ca²⁺, состав которого описан выше. После отмывания от KB и адаптации клеток к новой среде в течение 10 мин начинали электрофизиологические эксперименты.

2.5. Метод растяжения клеток

Локальное осевое растяжение при помощи оплавленной patch-пипетки (стилуса). Помещенные в раствор клетки оседают на дно камеры и одной из своих, обычно концевых частей, адгезируют к стеклянной поверхности дна. Именно в этой области подводится patch-пипетка, которая используется для whole-cell регистрации и одновременно для дополнительной фиксации клетки. Для растяжения клетки применяли слегка оплавленную со стороны кончика patch-пипетку (стеклянный стилус), которая эффективно прилипает к поверхности клетки. Стилус фиксировали на расстоянии 40 мкм от patch-пипетки. Для локального растяжения проводили, как это принято многими авторами, смещение

стеклянного стилуса, что и приводило к растяжению части клетки на участке между patch-пипеткой и стеклянным стилусом (Kamkin et al., 2000). При этом как видно из рис. 3 увеличивается длина саркомеров.

Клетки растягивали на одну треть их длины, для чего фиксировали расстояние между patch-пипеткой и стеклянным стилусом примерно в 40 мкм.

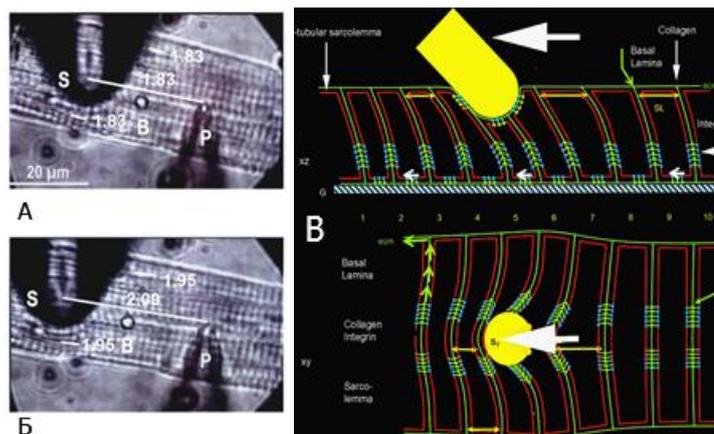


Рисунок 3. Локальное осевое растяжение. Механическая стимуляция: локальный участок миоцитов желудочков морской свинки. (А) до растяжения, (Б) во время растяжения (Kamkin et al., 2000). Стеклянный стилус обозначен как S, микробусинка, прикрепленная к клеточной поверхности как B, patch-пипетка как P, а линия – это расстояние от S через B до P. Увеличение расстояния S–P на 7 мкм (Соединительная линия от 31 до 38 мкм или на 22%) увеличивает расстояние S–B и B–P на одинаковую величину в 22%. В. Взаимодействие стеклянного стилуса и клеточной мембраны.

Смещение стилуса и, как следствие, растяжение клетки по оси X и, следующий за этим, сдвиг по оси Y, перемещают верхнюю часть клетки по отношению к нижней части клетки, которая остается прикрепленной к покровному стеклу, являющемуся дном перфузионной камеры. Такая механическая стимуляция может модулировать активность механоуправляемых каналов, или же запускать механоиндуцированные сигнальные каскады, связанные с ионными каналами.

2.6. Метод измерения токов

Изучение токов кардиомиоцитов проводили с использованием метода *patch clamp* в конфигурации *whole-cell*.

Запись K^+ и Ca^{2+} *patch-clamp* токов в конфигурации *whole-cell* выполняли с использованием усилителя Axopatch 200B и программного обеспечения pClamp 10 (Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния, США). Данные были отфильтрованы на частоте 2 кГц, отображены на частоте 5 кГц и оценены с помощью программного обеспечения. Миоциты перфузировали в небольшой записывающей камере (RC-26; Warner Instrument Corp, Брансуик, Коннектикут, США; объем 150 мкл), установленной на инвертированном микроскопе с внешним раствором K^+ _{out} или раствором Cs^+ _{out}.

Электроды с накладными зажимами из боросиликатного стекла имели концевое сопротивление от 1,5 до 2,5 МОм при заполнении. После образования контакта *whole-cell* конфигурацию достигали путем разрыва мембраны. Импульсы (140 мс) применяли с частотой 1 Гц, от фиксированного потенциала -45 мВ, что вызывало инактивацию чувствительных к тетродотоксину (ТТХ) токов Na^+ . Токи в ответ на серии коротких (5 мВ) импульсов, подаваемых при -45 мВ, брали для оценки емкости мембраны и сопротивления, при этом компенсацию емкостных токов и токов утечки не применяли. Поскольку амплитуда токов зависит от длины и диаметра клеток (диаметр кардиомиоцитов у контрольных крыс составлял около 25 ± 6 мкм), всегда отбирали клетки одинаковой геометрии; в среднем эти клетки имели емкость мембраны 150 ± 16 пФ. В экспериментальных клетках входное сопротивление составляло около 58 ± 5 МОм. Влияние разного размера растянутой мембраны было сведено к минимуму путем регулировки стеклянных инструментов на одинаковое расстояние S-P в 40 мкм перед применением растяжения. Поскольку механическое растяжение клетки было ограничено небольшой неизвестной областью между S и P, мы не делили индуцированные растяжением токи на общую емкость мембраны. Измерения обычно длились около 30 минут, в течение которых входное сопротивление и

емкостной ток были стабильными. Отношения ток/потенциал (кривые I/V) были получены путем подачи серии из 20 импульсов длительностью 140 мс каждый, начиная с фиксированного потенциала -45 мВ с шагом 10 мВ. Мембранные токи в конце импульса («поздние токи») наносили на график в зависимости от потенциала соответствующего шага зажима. Сопротивление контакта оставалось постоянным, т.е. составляло от $1,5 \pm 0,3$ ГОм до и $1,4 \pm 0,4$ ГОм во время растяжения. Кроме того, входное сопротивление и емкость мембраны были неизменными. Следовательно, входящий ток, вызванный растяжением, следует отнести к реальному каналному ионному току, а не к току утечки вокруг контакта. Пересечение полученной кривой I/V с осью потенциала определило нулевой потенциал тока (E_0), который соответствовал мембранному потенциалу в покое клетки вне экспериментальной ситуации (между -70 и -80 мВ). Также осуществляли онлайн-запись общего мембранного тока на уровне фиксированного потенциала -45 мВ (time course).

Значения дифференциального тока, рассчитанные как разница между значениями контрольного тока и значениями тока на фоне растяжения клеток или на фоне введения веществ при -45 или -80 мВ (^{C-S}DI), обозначают как $I_{SAC(-45)}$ и $I_{SAC(-80)}$.

2.7. Выделение и очистка мРНК

Уровень экспрессии РНК изучался при помощи технологии секвенирования РНК-транскриптома.

мРНК выделяли непосредственно из кардиомиоцитов с использованием гранул Oligo-dT25 Dyna® (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Гранулы, связанные с мРНК, промывали трис-буферным раствором, содержащим додецилсульфат лития (LiDS) 10 ммоль/л TrisHCl (pH 7,5); 0,15 М LiCl; 1 ммоль/л EDTA; 0,1% LiDS. Гранулы ресуспендировали в воде, не содержащей РНКазы (Sigma, Дорсет, Великобритания), и мРНК подвергали обратной транскрипции с использованием клонированной обратной транскриптазы AMV (Invitrogen,

Карлсбад, Калифорния, США). Полученную кДНК хранили при -80°C до тех пор, пока она не потребуется.

2.8. Секвенирование и анализ РНК

Полученные библиотеки анализировали на концентрацию, распределение по размерам и качество с использованием высокочувствительного набора двухцепочечной ДНК (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), флуорометра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Драйих, Германия) и высокочувствительного анализатора набор D5000 (Agilent, Санта-Клара, Калифорния, США) на TapeStation 4200. Библиотеки нормализовали на основе их молярности, объединяли, а затем количественно определяли с помощью набора для количественного определения библиотек для платформ Illumina (Roche, Базель, Швейцария) с использованием устройства для количественной ПЦР StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Inc., Dreieich, Германия). Полученные объединенные библиотеки загружали при 350 пМ с 1% PhiX в ячейку S2 FlowCell и секвенировали в трех экземплярах с использованием секвенатора нового поколения NovaSeq 6000 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) с чтением парных концов 2 x 150 п.н.

Сырые данные в формате FASTQ сначала оценивали на качество с использованием FastQC v0.11.5 (доступно онлайн по адресу <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (Andrews, 2010). Затем данные были обработаны Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014) для обрезки адапторных последовательностей. Далее обработанные данные анализировали с помощью Fastp (Chen et al., 2018) для удаления хвостов поли-G и артефактов, специфичных для Novaseq/Nextseq. После указанной первичной обработки данные снова оценивались с использованием FastQC. После QC секвенированные данные выравнивали по отношению к эталонному геному человека GRCh38.p4 с использованием HISAT2 (Kim et al., 2015) с параметрами по умолчанию, а полученные выравнивания SAM были затем преобразованы в формат BAM и

отсортированы по координатам с помощью SAM Tools v1. 3.1 (Li et al., 2009). Наконец, отсортированные файлы выравнивания были проанализированы с помощью HTSeq-count v0.6.1p1 (Anders et al., 2015) с использованием опций (-s по -t exon -I gene_id) для генерации исходного подсчета.

2.9. Методы обработки результатов

Данные, полученные методом patch-clamp, обрабатывали с помощью пакета коммерческих программ *Molecular Devices Axon pClamp 10.2*. Значимые различия были обнаружены с помощью однофакторного дисперсионного анализа для повторных измерений (ANOVA for RM) с тестом Хольма-Сидака в качестве post-hoc теста. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представляли в виде: среднее \pm ошибка среднего, n – количество экспериментов. Нормальность распределения выборок в работе проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилкса.

Данные секвенирования и анализа ДНК: все эксперименты проводились не менее чем в трех повторениях, а данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Электрофизиологическая работа была выполнена на 188 клетках, которые были получены от 49 крыс. Крысы и клетки, для которых срывался эксперимент (например, не удавалось выделение, не получалось образовать whole-cell конфигурацию patch) в данное количество не включались.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние локального растяжения на механосенситивные и механоуправляемые токи кардиомиоцитов

3.1.1. NO как потенциальный регулятор механосенситивных каналов

Отправной точкой для основной нашей работы по изучению путей влияния NO на работу SAC стало исследование влияния интерлейкинов на механосенситивные L-Ca²⁺ токи. Было показано, что добавление IFN-γ (гамма-интерферон) в концентрации 2 нг/мл уменьшает на 47.6 ± 7.4% ток через Ca²⁺ каналы L-типа (рис. 4), чья механосенситивность была доказана (Takahashi et al., 2019). Анализ литературы показал, что такое влияние, вероятно, может реализовываться через влияние на механосенситивные и механоуправляемые каналы NO посредством влияния на NOS (Green et al., 1994; Singh et al., 1996). Это поставило вопрос о том, как именно может передаваться влияние NO на механосенситивные и механоуправляемые каналы.

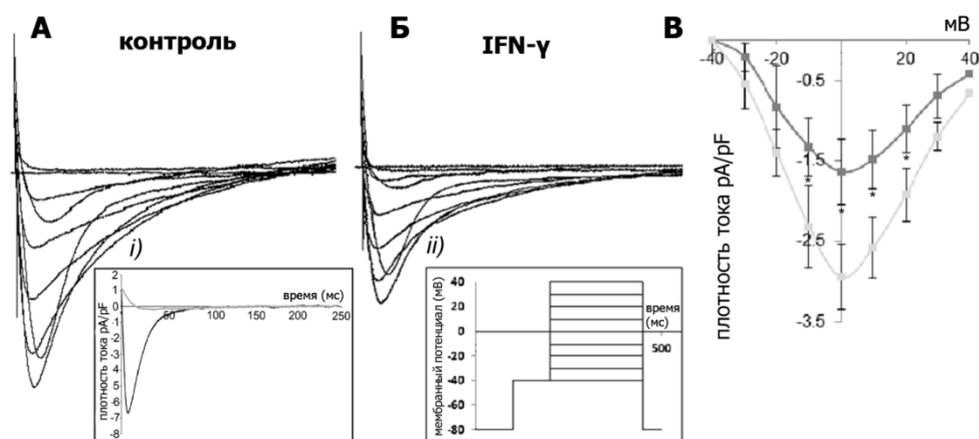


Рисунок 4. Изменения I_{CaL} , индуцированные кратковременной инкубацией с IFN-γ (2 нг/мл) в кардиомиоцитах желудочка крысы. А, Б. Исходные записи I_{CaL} регистрировались в контроле (А) и через 14–16 мин перфузии в среде Kraftbrühe с IFN-γ (2 нг/мл) (Б) (записи А и Б взяты от одной клетки). I_{CaL} вызывался деполяризующими тестовыми импульсами длительностью 250 мс для девяти различных потенциалов с шагом 10 мВ между -40 и +40 мВ, чему предшествовал деполяризующий предимпульс до -40 мВ от потенциала фиксации -80 мВ (см. вставку -ii). На вставке i) показана плотность тока при 0 мВ, в контрольных условиях и в присутствии нифедипина. В. I/V-кривая I_{CaL} в контроле (светлые квадраты, n = 6) и перфузируемом IFN-γ (темные квадраты, n = 7). Клетки были получены из сердец пяти крыс. Символ звездочки указывает на значимые различия между двумя группами, непарный t-критерий, p < 0,05.

3.1.2. Локальное растяжение активирует суммарные входящие токи в кардиомиоцитах в K^+_{in}/K^+_{out} среде

Эксперименты по локальному аксиальному растяжению кардиомиоцитов желудочков крыс, мышей и морских свинок на разную величину (от 2 мкм до 12 мкм) с одновременной регистрацией изменений $I_{L,ns}$ и I_{SAC} описаны в литературе (Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2003a), однако мы провели аналогичную серию исследования для получения контрольных данных в наших условиях и сравнению этих результатов с известными. Кроме того, для выполнения всех серий исследований, мы выбрали единую величину растяжения кардиомиоцитов желудочков сердец крыс, равную 6 мкм, поскольку при этой величине растяжения результаты изменений $I_{L,ns}$ и значения I_{SAC} с одной стороны, наиболее показательны, а с другой стороны, нет сомнений в данных, полученных при минимальных (4 мкм) или максимальных (12 мкм) значениях растяжения клеток.

В этой части контрольной серии эксперименты выполняли в условиях, когда K^+ -токи были не ингибированы, а входящий Na^+ -ток был ингибирован величиной поддерживаемого потенциала, равного -45 мВ. В базовом перфузионном растворе находилось 5.4 mM KCl (внеклеточный K^+_{out} раствор) и в растворе для patch-пипеток присутствовало 140 mM KCl (внутриклеточный K^+_{in} раствор). Это соотношение растворов, когда K^+ -ток не был ингибирован дальше в тексте мы будем называть « K^+_{in}/K^+_{out} среды». Эксперименты выполняли в K^+_{in}/K^+_{out} конфигурации растворов, взяв за основу тот факт, что эти среды являются физиологическими для работы клеток. На рис. 5А показаны суммарные мембранные токи в K^+_{in}/K^+_{out} среде с использованием онлайн-записей (динамика изменений во времени). Растяжение кардиомиоцитов желудочков сердец крыс на 6 мкм при поддерживаемом потенциале, равном -45 мВ, вызывает смещение суммарного тока в более отрицательную область (показано стрелкой на рис.5А) по сравнению с исходными значениями, т.е. ведет к появлению дифференциального тока ($I_{SAC(-45)}$) равного -0.195 ± 0.009 нА (табл.1 – ряд А). Во время непрерывного растяжения входящий ток оставался постоянным, инактивации со временем не наблюдалось. Влияние растяжения на ток было

обратимым - ток возвращался к значению до растяжения, когда оно устранялось путем возврата стилуса в его исходное положение.

Часть экспериментов заканчивали добавлением 5 мкмоль/л Gd^{3+} в перфузионный раствор на фоне непрерывного растяжения. Gd^{3+} через 1,5-2 мин после его применения всегда вызывал сдвиг индуцированного растяжением входящего тока в положительную сторону по сравнению с контрольным током до растяжения.

Данные для I/V-кривых измеряли в конце ступеньки импульса длиной 140 мс (поздний ток I_L). Точка пересечения I/V-кривой с осью нулевого тока представляет собой потенциал нулевого тока V_0 , который эквивалентен диастолическому мембранному потенциалу при фиксированном токе или, иначе, потенциалу покоя неклямпированной клетки. Чтобы проанализировать лежащие в основе данного процесса механизмы, I/V кривые общего и дифференциального тока были разделены на компоненты. Общий ток описывался наложением $I_{L,ns}$ (ток через активированные растяжением неселективные катионные каналы), I_{K1} (калиевый ток входящего аномального выпрямления – inwardly rectifying potassium current) и I_{oth} (предположительно сумма нескольких токов выходящего аномального выпрямления – outwardly rectifying currents, например K^+ токов через калиевый канал с двухпоровым доменом (TREK) (Li et al., 2006; Patel et Honoré, 2005)). Главным объектом интереса в этой работе для нас был именно $I_{L,ns}$, так как именно он отражает изучаемые нами токи через катионнеспецифичные каналы, активируемые растяжением. Данные для I_{K1} приводятся нами в качестве своеобразного контроля адекватности полученных измерений.

В наших экспериментах в K^+_{in}/K^+_{out} среде у нерастянутой клетки I/V-кривые пересекали ось потенциала при $V_0 = -74,3 \pm 0,4$ мВ, что соответствует потенциалу покоя изолированного кардиомиоцита. При V_0 калиевый ток I_K был равен нулю. Следовательно, вызванный растяжением отрицательный ток $I(E_K)$ следует отнести к активируемой растяжением G_{ns} . Между -100 и $-74,3 \pm 0,4$ мВ растяжение

уменьшало наклон I/V кривой, что было связано с инактивацией G_{K1} при растяжении (Dyachenko et al., 2009).

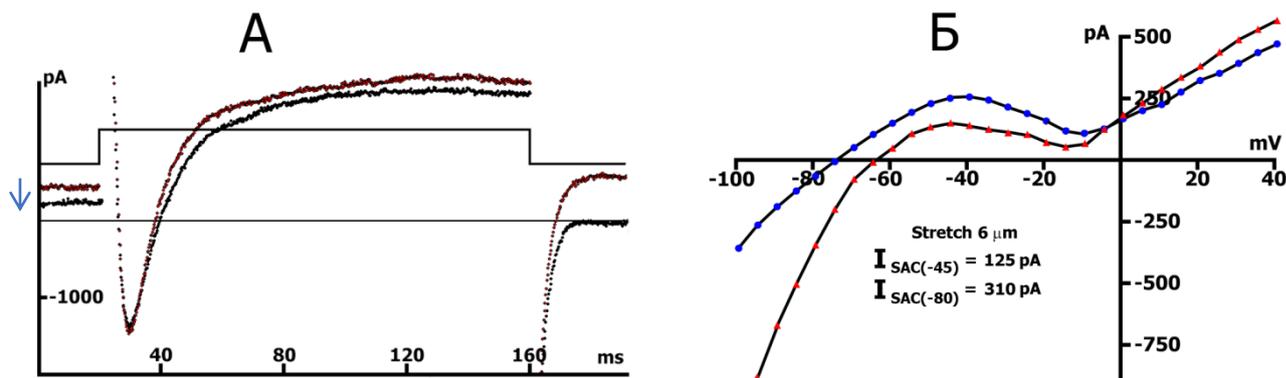


Рисунок 5. А. Online запись (time course) мембранного тока, K^+_{in}/K^+_{out} среда. V_m фиксирован на уровне поддерживаемого потенциала, равного -45 mV. красная линия – контроль, черная – растяжение клетки на 6 мкм. (стрелка показывает смещение тока) Б. Индукция суммарных входящих токов локальным растяжением на 6 мкм; I/V -кривые до (синие кружки) и во время растяжения (красные треугольники). Оригинальная кривая (статистически обработанные данные см. в таблице 1).

При растяжении на 6 мкм отрицательный $I_{L,ns}$ увеличивалась. Значение дифференциального тока рассчитывали как разницу между контрольными (C: Control) значениями тока $I_{L,ns}$ и значениями тока $I_{L,ns}$ на фоне растяжения (Stretch: S) клетки (т.е. C/S) или другого воздействия (результаты отмечены Δ) при -45 и -80 мВ ($^{C/S}\Delta I_{(-45)}$ и $^{C/S}\Delta I_{(-80)}$), обозначаемые как $I_{SAC(-45)}$ и $I_{SAC(-80)}$ (таблица 1 - ряд Б). Зависимость I_L от потенциала и его модуляция растяжением на 6 мкм показаны на I/V -кривой на рис.5Б. До растяжения (кружки) I/V -кривая имела N-образную форму и пересекала ось потенциала (нулевой потенциал тока V_0) при -75 мВ ($-74,3 \pm 0,4$ мВ; эквивалентно к потенциалу покоя неклямпированной клетки). Растяжение (рис. 5Б, табл. 1 — ряд Б) сместило суммарные токи в сторону более отрицательных значений, а V_0 изменился до -61.5 ± 2.8 мВ (табл. 2 — ряд А). Знак минус (-) для $I_{SAC(-45)}$ подчеркивает, что растяжение клетки приводит к более отрицательным значениям начального суммарного тока на уровне фиксированного потенциала $V_h = -45$ мВ, а для $I_{SAC(-80)}$ указывает на увеличение

суммарного тока в ответ на растяжение. Вблизи -5 мВ I/V-кривые, записанные до и во время растяжения, пересекались, и при положительных потенциалах, поздний ток увеличивался по мере растяжения.

Таблица 1. Амплитуда токов через активируемые растяжением неселективные катионные каналы I_{SAC} (ΔI_{ns} , в нА) при -45 и -80 мВ, зависимость от степени локального растяжения (в мкм) и от ионного состава. Среднее значение \pm стандартное отклонение, n = количество экспериментов. Ряды А-Г: А – Суммарный ток через мембрану при растяжении, сделанный с помощью он-лайн записей (time-course). Потенциал фиксации (V_h) -45 мВ. K^+ токи не заблокированы, K^+_{in}/K^+_{out} среда. Б – Разность суммарного тока I_{SAC} , описанная по I/V-кривым (I_L) до и во время растяжения. K^+_{in}/K^+_{out} среда. В – I_{SAC} во время растяжения (time-course). $V_h = -45$ мВ, Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среда (токи K^+ блокируются Cs^+ , электродный раствор и перфузионный раствор, содержит CsCl вместо KCl). Г – Разность суммарного тока I_{SAC} , описанная по I/V-кривым (I_L) до и во время растяжения. Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среда. Во всех случаях $P < 0,01$.

Растяжение, мкм		6			
Среда		m	n	$I_{SAC(-45)}$, (нА)	$I_{SAC(-80)}$, (нА)
А	K^+_{in}/K^+_{out}	7	36	-0.195±0.009	-
Б	K^+_{in}/K^+_{out}	7	31	-0.176±0.019	-0.29±0.08
В	Cs^+_{in}/Cs^+_{out}	2	5	-0.082±0.011	-
Г	Cs^+_{in}/Cs^+_{out}	3	6	-0.078±0.012	-0.14±0.01

Таблица 2. Потенциал при нулевом токе (V_0) – точка пересечения кривых I/V с осью при нулевом токе до и во время растяжения на 6 мкм в различной ионной среде. Среднее значение \pm стандартное отклонение, n = количество экспериментов, m = количество животных. Ряды А и Б: А -, K^+_{in}/K^+_{out} среда (K^+ -токи не заблокированы). Б - Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среда. $P < 0,01$.

среда		Контроль			Растяжение, мкм 6	
		n	m	V_0 , (мВ)	n	V_0 , (мВ)
А	K^+_{in}/K^+_{out}	95	20	-74.3 ± 0.4	31	-61.5 ± 2.8
Б	Cs^+_{in}/Cs^+_{out}	11	4	-39.6 ± 1.4	6	-35.1 ± 1.3

Таким образом, эксперименты по локальному аксиальному растяжению кардиомиоцитов желудочков крыс на 6 мкм в K^+_{in}/K^+_{out} среде с одновременной регистрацией изменений $I_{L,ns}$ и I_{SAC} принципиально соответствуют известным данным, представленным в литературе для этой величины растяжения у мышей, молодых крыс и морских свинок (Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2003a). Полученные нами данные показывают, что результаты для кардиомиоцитов крыс и мышей, на которых эти опыты проводили ранее, сходны. В дальнейшей работе мы применяем растяжение на 6 мкм, и полученные данные можно воспринимать в качестве контрольных в K^+_{in}/K^+_{out} среде.

3.1.3. Локальное растяжение активирует ток через неселективные катионные каналы ($I_{L,ns}$: time course и I/V -кривая) в кардиомиоцитах в Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде

В этой части контрольной серии эксперименты выполняли в условиях, когда K^+ -токи ингибировали ионами Cs^+ , для чего в базовом перфузионном растворе 5.4 mM KCl меняли на 5.4 mM CsCl (внеклеточный Cs^+_{out} раствор), а в растворе для patch-пипеток 140 mM KCl меняли на 140 mM CsCl (внутриклеточный Cs^+_{in} раствор). Это соотношение растворов, когда K^+ -ток был ингибирован ионами Cs^+ , а в перфузионном растворе и patch-пипетке находились ионы Cs^+ , дальше в тексте мы будем называть « Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среды».

На рис. 6А показаны мембранные токи в $\text{Cs}^+_{\text{in}}/\text{Cs}^+_{\text{out}}$ среде с использованием онлайн-записей (динамика во времени). Растяжение кардиомиоцитов желудочков сердца крыс на 6 мкм при поддерживаемом потенциале, равном -45 мВ, вызывает смещение тока в более отрицательную область (показано стрелкой на рис.6А) по сравнению с исходными значениями, т.е. появлению дифференциального тока ($I_{\text{SAC}(-45)}$) равного (-0.082 ± 0.011) нА (Табл.1 – ряд В).

В $\text{Cs}^+_{\text{in}}/\text{Cs}^+_{\text{out}}$ среде до растяжения I/V кривая поздних токов была плоской с V_0 около -40 мВ (таблица 2 - ряд Б). Дискретное растяжение клеток на 6 мкм также смещало V_0 в сторону деполяризации до -35.1 ± 1.3 (таблица 2 - ряд Б). $I_{\text{SAC}(-45)}$ и $I_{\text{SAC}(-80)}$ также увеличивались (-0.078 ± 0.012 нА и -0.14 ± 0.01 соответственно) (таблица 1 - ряд Г, рис. 6Б). Дифференциальный ток I_{SAC} , активируемый растяжением, имел почти линейную зависимость от потенциала и реверсировался при -5 мВ. При положительных ступеньках потенциала токи изменялись на выходящие. Более отрицательный мембранный потенциал увеличивал амплитуду I_{SAC} , как и можно было ожидать, если большую движущую силу (разницу между мембранным потенциалом V_m и потенциалом реверсии E_{rev}) умножить на независимую от потенциала проводимость G_{SAC} .

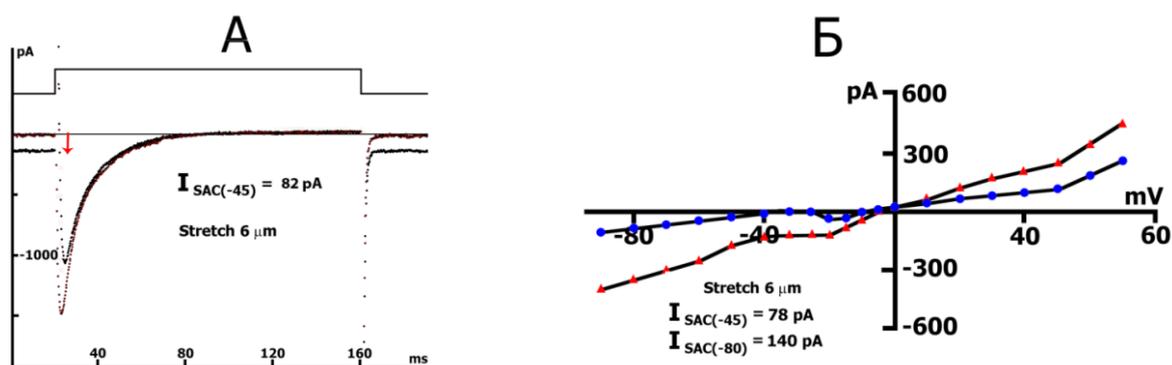


Рисунок 6. K^+ -токи подавлены в $\text{Cs}^+_{\text{in}}/\text{Cs}^+_{\text{out}}$ среде А. On-line запись (time course) мембранного тока. V_m фиксирован на уровне поддерживаемого потенциала, равного -45 мВ. Красная линия – контроль, черная – растяжение клетки на 6 мкм (Стрелка показывает смещение тока). Б. Индукция суммарных входящих токов локальным растяжением на 6 мкм; I/V-кривые до (синие кружки) и во время растяжения (красные треугольники). Оригинальная кривая (статистически обработанные данные см. в таблице 1).

Таким образом, эксперименты по локальному аксиальному растяжению кардиомиоцитов желудочков крыс на 6 мкм в Cs^{+}_{in}/Cs^{+}_{out} среде с одновременной регистрацией изменений $I_{L,ns}$ и I_{SAC} принципиально соответствуют известным данным, представленным в литературе для этой величины растяжения у мышей, молодых крыс и морских свинок (Kamkin et al., 2000)

3.2. Влияние NO на механосенситивные токи кардиомиоцита

3.2.1. Участие NO в модуляции мембранных токов $I_{L,ns}$ и I_{K1}

Функциональные свойства некоторых ионных каналов могут быть изменены NO (Liao et al., 2006; Kazanski et al., 2010) (см. обзор (Boycott et al., 2020; Kazanski et al., 2011)). Кроме того, продукция NO и активация NOS участвует в регуляции каждого этапа механоэлектрической обратной связи: от начальной индукции механических сигналов через комплексы интегрин/цитоскелет, контроля потенциала действия путем модулирования активности SAC и других ионных каналов, до регуляции механизмов увеличения и уменьшения концентрации Ca^{2+} , лежащей в основе сердечного сокращения (Boycott et al., 2020). Понимание дисфункции этих процессов при патологических состояниях, сопровождающихся сложностью регуляции концентрации NO, необходимо для оптимизации эффективности терапии, основанной на замещении NO.

Для детального изучения участия NO в регуляции I_{SAC} использовали NO-донор SNAP или S-Nitroso-N-acetylpenicillamine. Для анализа электрофизиологических реакций изолированных кардиомиоцитов желудочков сердца разные авторы применяют разные концентрации SNAP в перфузионных растворах от минимальных в пределах 1 пмоль/л, 1 нмоль/л, 1 мкмоль/л (Abi-Gerges et al., 2002; Tastan et al., 2007) до максимальных в пределах 1 ммоль/л (Abi-Gerges et al., 2001; Yoshida et al., 2020). Однако в большинстве случаев используют концентрацию SNAP, равную 100 мкмоль/л (Vulcu et al. 2000; Tastan et al., 2007; Pravdic et al., 2012; Zawieja et al., 2016). При анализе

электрофизиологических реакций изолированных кардиомиоцитов желудочков ранее в нашей лаборатории было показано, что эффект SNAP на суммарный ток реализуется в наибольшей степени при применении вещества в концентрации 200 мкмоль/л. Именно эта концентрация донора NO была взята нами для выполнения настоящей работы.

Уменьшение концентрации до 100 мкмоль/л и до 50 мкмоль/л приводит к менее выраженному эффекту, как по амплитуде тока, так и по времени развития реакции клетки, а увеличение концентрации до 300 мкмоль/л и выше его устраняет. При применении на ткани предсердий крыс эффективная концентрация SNAP, которая вызывала патологическую механоиндуцированную деполяризацию, приводящую к экстрасистолии с дальнейшим развитием высокочастотного разряда потенциалов действия, была выше и равнялась 300 мкмоль/л (Abramochkin et al., 2012).

Данные о выделении NO из SNAP в литературе разные. Известно, что 100 мкмоль/л SNAP высвобождает 1,4 мкмоль/л NO в минуту при 37°C, и эта зависимость линейна в широком диапазоне концентраций (Feelisch et al., 1991). В этом случае 200 мкмоль/л SNAP высвобождает 2,8 мкмоль/л NO в минуту. При использовании оксигемоглобинового метода определения было показано, что 5 ммоль/л SNAP в течение 45 мин поддерживают концентрацию NO в растворе в районе 30 мкмоль/л NO (Ioannidis et al., 1996). В этом случае 200 мкмоль/л SNAP будет поддерживать в растворе концентрацию NO, равную 1.2 мкмоль/л. Кроме того, при определении концентрации NO с использованием хелитропные ловушки NO (NOCT-44) было показано, что 5 ммоль/л SNAP поддерживают в растворе концентрацию SNAP в районе 16 мкмоль/л в течение 60 мин (Ioannidis et al., 1996). При концентрации SNAP, равной 200 мкмоль/л в растворе будет поддерживаться концентрация NO около 0.64 мкмоль/л.

В попытке сопоставить приведенные выше данные о применяемых концентрациях NO с реальным количеством NO в клетке возникли определенные сложности. Ряд авторов в работах на эту тему обращают внимание, что данные,

полученные непрямым методом с использованием флюоресцентных красителей чувствительных к NO (например, DAF-2, DAF-FM) по многим причинам являются неточными, а на методы прямой электрохимической детекции концентрации NO на поверхности клетки (которая предполагается равной внутриклеточной, так как мембрана не является преградой для распространения NO) едва ли можно полагаться, так как метод в разных исследованиях дает разброс данных на 6 порядков (Hall et Garthwaite, 2009). Эти электрохимические методы, наряду с новым подходом, основанным на биосенсорах, постоянно совершенствуются, однако, все еще не являются полностью адекватными для выполнения анализов (Deng et al., 2022, Gomes et al., 2019).

Сложности в определении концентрации NO связаны еще и с тем, что большинство исследователей измеряют общую клеточную концентрацию NO, которая существенно меньше реальной т.к. с учетом компартментации эукариотической клетки (Barouch et al., 2002; García-Cardena et al., 1997; Jian et al., 2014) концентрация NO в отдельных компартментах может быть существенно выше.

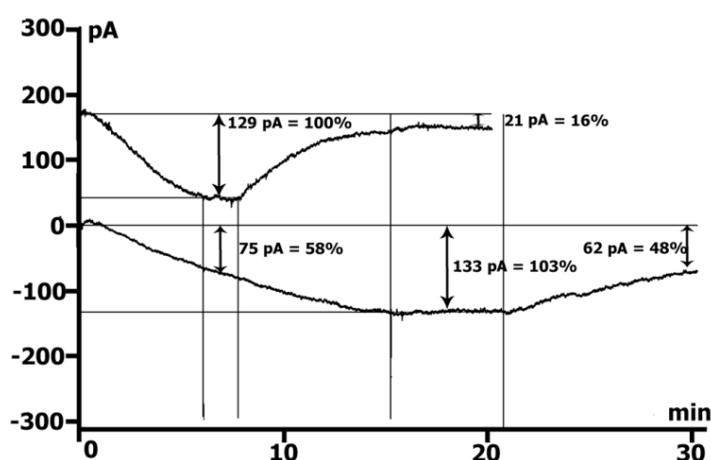


Рисунок 7. Изменения суммарных токов при действии SNAP. Запись time course при мембранном потенциале (V_m) фиксированном на уровне -45 мВ. Сравнение действия SNAP в концентрации 200 мкмоль/л в K^+_{in}/K^+_{out} (верхняя кривая) среде и Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде (нижняя кривая).

В этой серии экспериментов мы изучали как в K^+_{in}/K^+_{out} и Cs^+_{in}/Cs^+_{out} средах SNAP в концентрации 200 мкмоль/л влияет на изменение суммарных токов в течение длительного времени регистрации.

При поддерживаемом потенциале величиной -45 mV суммарный мембранный ток в K^+_{in}/K^+_{out} среде составил $+0.198 \pm 0.006$ нА (рис. 7). Аналогичное значение было получено на уровне -45 мВ, равное $+0.196 \pm 0.007$ нА, на основании анализа I/V I_L тока, при этом максимальное значение деактивируемого растяжением калиевого тока входящего аномального выпрямления (ΔI_{K1}) было равно $+0.212 \pm 0.006$ нА при $V_0 = -74.3 \pm 0.4$ мВ.

Изменения во времени (time course) суммарного мембранного тока при $V_{hp} = -45$ mV под действием SNAP в концентрации 200 мкмоль/л в K^+_{in}/K^+_{out} среде представлены в табл. 3 и на рис. 7. Показано, что в K^+_{in}/K^+_{out} среде время максимального развития эффекта SNAP (t_{max}) не зависит от концентрации. При 200 мкмоль/л SNAP максимальный пик (ΔI_{max}) суммарного тока смещался в сторону более отрицательных значений и его максимальная величина была равна 0.156 ± 0.01 нА (таблица 3). При этом суммарный ток не только смещался в сторону более отрицательных значений, но и приобретал достаточно часто отрицательные характеристики. Величина t_{max} на этом уровне была равна 7.8 ± 0.4 мин (таблица 3, рис.7). После достижения ΔI_{max} суммарные токи, вызванные SNAP, начинали снижаться и выходили на устойчивый уровень (steady-state) через 11–15 мин ($t_{s-s} = 13.6 \pm 1.1$ мин). (табл. 3 и рис. 7). Следовательно, можно предположить, что зарегистрированный суммарный ток определяется калиевым током через K^+ -каналы аномального выпрямления (inwardly rectifying potassium current – K_{ir}), деактивируемым SNAP (ΔI_{K1}), и входящим током через активируемые растяжением неселективные катионные каналы ($I_{L,ns}$).

Чтобы вычленить влияние NO на $I_{L,ns}$, мы заблокировали калиевый ток входящего аномального выпрямления, заменив внеклеточный K^+ на Cs^+ , в то время как калиевый ток выходящего аномального выпрямления (outwardly rectifying potassium current) был подавлен путем замены K^+ на Cs^+ во внутриклеточном растворе

При регистрации time course в среде Cs^+_{in}/Cs^+_{out} (рис. 7) в контрольных опытах $I_{L,ns}$ при $V_h = -45$ мВ составила $-0,003 \pm 0,001$ нА, а по I/V-кривым зависимость для I_L была $-0,004 \pm 0,002$ нА, $n = 11$, и $V_0 = -39,6 \pm 1,44$ мВ (табл. 2).

В Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде при концентрации SNAP 200 мкмоль/л во время time course на уровне -45 мВ появляется индуцированный SNAP суммарный входящий ток, и максимальное значение этого входящего тока (ΔI_{max}) устанавливается через $12,5 \pm 1,0$ мин. Эффект развивается примерно вдвое дольше, чем в среде K^+_{in}/K^+_{out} при той же концентрации донора NO. В этот период индуцированный SNAP входящий ток ΔI_{max} становится равным $0,108 \pm 0,01$ нА (табл. 3 и рис. 7). Напомним, что при той же концентрации SNAP в K^+_{in}/K^+_{out} среде ΔI_{max} составил $0,156 \pm 0,01$ нА, $t_{max} 7,8 \pm 0,4$ мин (см. рис. 7 и табл. 3).

Таблица 3. Эффект SNAP в концентрации 200 мкмоль/л в K^+_{in}/K^+_{out} и Cs^+_{in}/Cs^+_{out} средах на суммарный ток и дифференциальный ток индуцированный SNAP (ΔI_{max}). Данные получены при регистрации time course при мембранном потенциале (V_m) фиксированном на уровне -45 мВ. Среднее значение \pm стандартное отклонение, $n =$ количество экспериментов, $m =$ количество животных. Для всех значений ΔI_{max} и ts-s, $P < 0,01$.

	K^+_{in}/K^+_{out} среда	Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среда
n	26	15
m	6	5
t_{max} , (МИН)	7.8 ± 0.4	12.5 ± 1.0
ΔI_{max} , (НА)	0.156 ± 0.01	0.108 ± 0.01
t_{s-s} , (МИН)	13.6 ± 1.1	25.1 ± 1.8
ΔI_{s-s} , (НА)	0.085 ± 0.01	0.055 ± 0.008

В итоге этих экспериментов можно полагать, что поскольку в Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде мы регистрируем появление индуцированного SNAP отрицательного (относительно нуля) входящего тока, который по своей величине существенно меньше направленного в отрицательную область индуцированного SNAP

суммарного тока в K^+_{in}/K^+_{out} среде, этот, последний, является наложением появляющегося входящего, вероятно, неселективного тока, и уменьшением выходящего калиевого тока.

3.2.2. NO вызывает изменения зависимости I_L от потенциала в

K^+_{in}/K^+_{out} среде

Для этой серии экспериментов, также как и для предыдущей, мы использовали наиболее эффективную концентрацию SNAP, равную 200 мкмоль/л. Зависимость I_L от потенциала показана на I/V кривой на рис. 8 и в табл. 4. До применения SNAP I/V кривая имела N-образную форму и пересекала ось потенциала (потенциал нулевого тока V_0) в районе от -75 до -80 мВ (эквивалентно потенциалу покоя клетки, $V_0 = -70,1 \pm 1,6$ мВ (табл. 5)). Концентрация SNAP 200 мкмоль/л в первые 3 мин приводила к смещению суммарных токов в сторону более отрицательных значений (табл. 4.), а V_0 смещалась в сторону деполяризации. Дифференциальный ток при -45 мВ (${}^3/C \Delta I_{SNAP(-45)}$) составил (-)0,069±0,02 нА. Поздний ток I_L увеличивался при отрицательном потенциале -80 мВ при действии SNAP в концентрации 200 мкмоль/л, ${}^3/C \Delta I_{SNAP}$ и составлял (-)0,194±0,04 нА. Вызванные SNAP изменения поздних токов (ΔI_{SNAP}) при этой концентрации следовали выходящей выпрямляющей зависимости потенциала с реверсивным потенциалом (E_{rev}) - 30 мВ (рис. 4А,В). Эти изменения предполагают, что SNAP модулирует не один, а несколько компонентов ионного тока (см. ниже). Через 6 минут значения ${}^6/C \Delta I_{SNAP}$ как на уровне -45, так и на уровне -80 мВ менялись ((-)0,070±0,02 и (-)0,073±0,03 нА соответственно) (табл. 4). При этом значения V_0 оставались на том же уровне (табл. 5). Однако через 9 мин значения ${}^9/C \Delta I_{SNAP}$ при -45 мВ снижались, становясь равными (-)0,035±0,01 нА. Что еще более важно, поздние токи I_L снижались при отрицательных потенциалах -80 мВ, ${}^9/C \Delta I_{SNAP}$ составлял (+)0,049±0,02 нА (табл. 4) Знак (+) показывает, что через 10 мин SNAP вызывает торможение даже в фоновом $I_{L,ns}$. Значения V_0

начинают смещаться в сторону гиперполяризации, к исходным значениям (табл. 5).

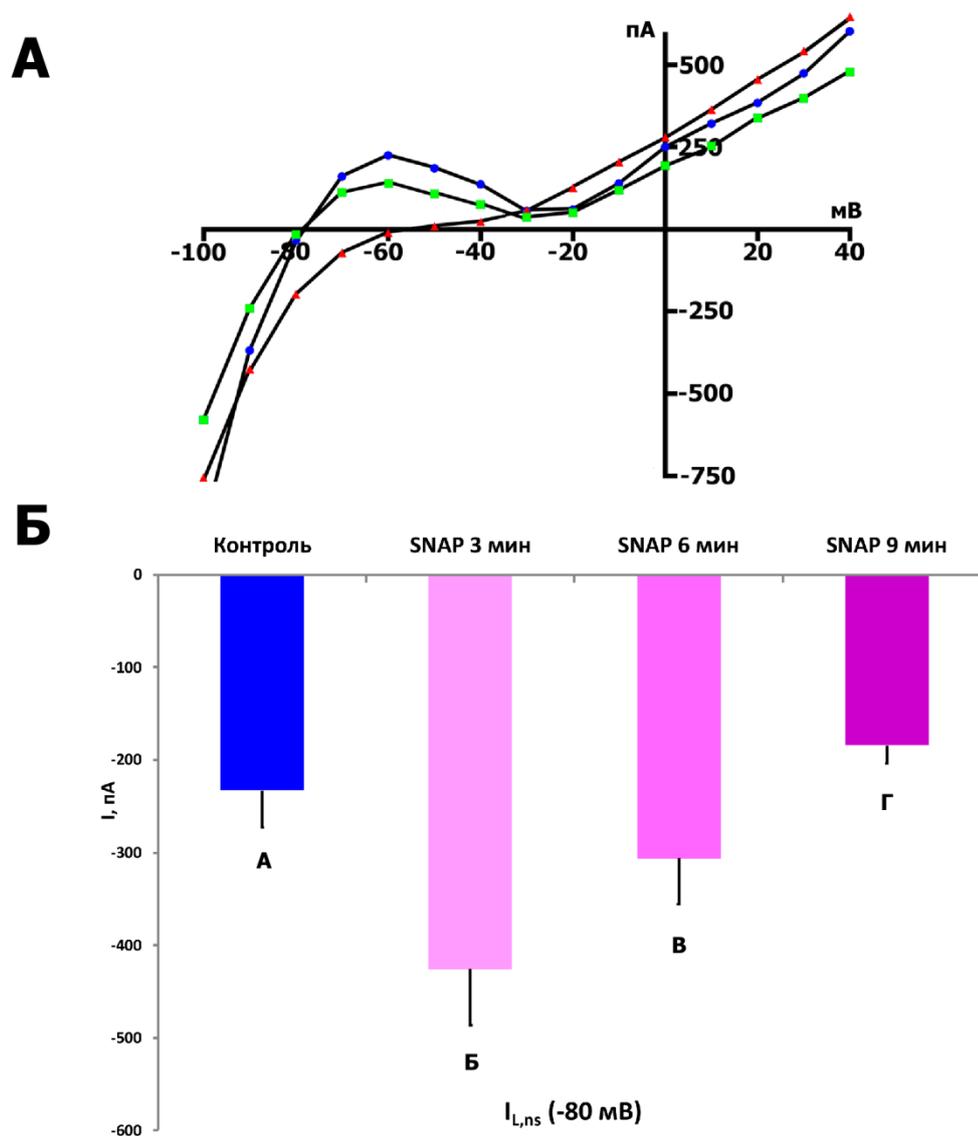


Рисунок 8. Влияние SNAP (200 мкмоль/л) на I/V кривые позднего тока (I_L) у нерастянутой клетки. А – Изменение I_L в K^+_{in}/K^+_{out} среде при добавлении SNAP. Синие круги – контроль, красные треугольники – 3 минуты перфузии SNAP, зеленые квадраты – 9 минут перфузии SNAP. Оригинальная кривая. Б – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80 \text{ мВ})$ у нерастянутой клетки при последовательном добавлении в раствор BAY 41-2272 и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=10$, $m=6$.

Таким образом, мы наблюдали двухфазный эффект – уменьшение с последующим возвратом к близким к исходным значениям положительного горба I/V-кривой (от -55 до -60 мВ) и величины деполяризации (изменение нулевого текущего потенциала V_0) с последующей гиперполяризацией. Таким образом, по-видимому, в отсутствие растяжения донор NO SNAP сначала вызывал инактивацию калиевого тока входящего выпрямления, инактивируемого растяжением (ΔI_{K1}), а затем устранение инактивации. Более важно, что высвобождаемый NO вызывал активацию $I_{L,ns}$ с последующей деполяризацией мембраны, а затем ингибирование $I_{L,ns}$ с последующей гиперполяризацией мембраны.

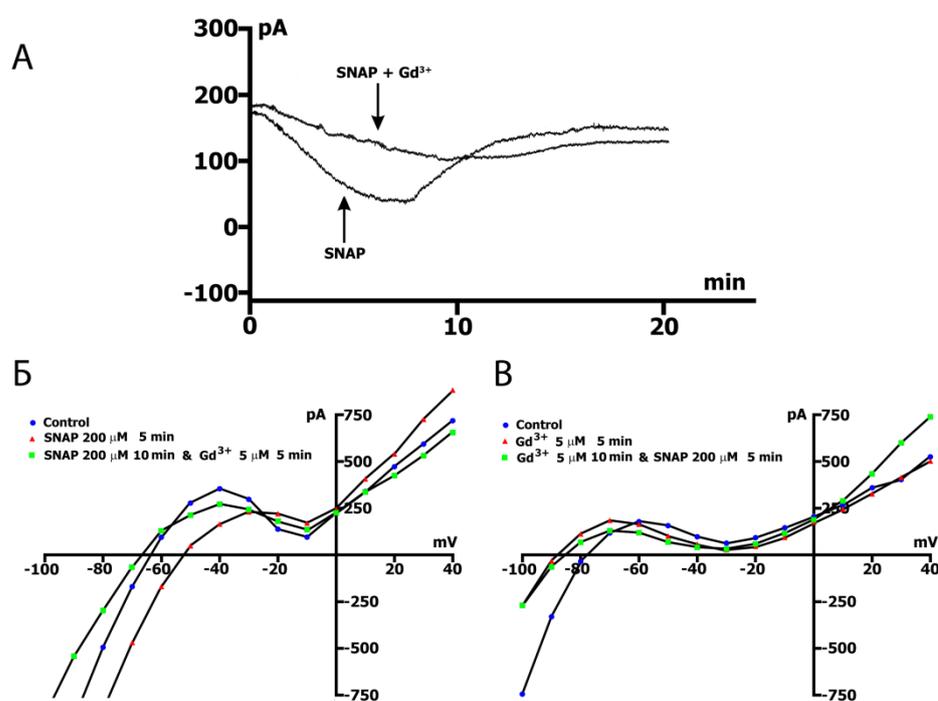


Рисунок 9. Изменение суммарных токов и I_L в K_{in}^+/K_{out}^+ среде при действии SNAP и Gd^{3+} . А. запись time course, SNAP и SNAP с Gd^{3+} . Б. I/V-кривая, действие Gd^{3+} на фоне SNAP. Синие круги – контроль, красные треугольники – 5 минут перфузии SNAP, зеленые квадраты – 15 минут перфузии SNAP и 5 минут перфузии Gd^{3+} . В. I/V-кривая, действие SNAP на фоне Gd^{3+} . Синие круги – контроль, красные треугольники – 5 минут перфузии Gd^{3+} , зеленые квадраты – 15 минут перфузии Gd^{3+} и 5 минут перфузии SNAP. Оригинальные кривые (статистически обработанные данные см. в таблице 6).

При регистрации time course в K^+_{in}/K^+_{out} среде с одновременной перфузией SNAP в концентрации 200 мкмоль/л и Gd^{3+} в концентрации 5 мкмоль/л (рис. 9А и табл. 6) максимальное пиковое отклонение полного тока от контрольных значений $\Delta I_{max} = 0,067 \pm 0,009$ нА и появляется через $10,5 \pm 0,7$ мин после введения соединений (напомним, что SNAP в той же концентрации без Gd^{3+} вызывает $\Delta I_{max} = 0,156 \pm 0,01$ нА за $7,8 \pm 0,4$ мин).

Зависимость $I_{L,ns}$ от потенциала, ее модуляция при добавлении 200 мкмоль/л SNAP и чувствительность к Gd^{3+} показаны на I/V-кривой на рис. 9Б. SNAP, как показано выше, деполяризует клетку примерно на 20 мВ с $-72,5 \pm 0,9$ до $-55,3 \pm 3,4$, фактически в первые 5 мин уменьшает положительный горб I/V-кривой, $^{5/C}\Delta I_{SNAP} = (-)0,107 \pm 0,01$ и заметно увеличивает $I_{L,ns}$ при -80 мВ, $^{5/C}\Delta I_{SNAP} = (-)0,122 \pm 0,03$ (рис. 9В). Последующее введение в среду 5 мкмоль/л Gd^{3+} вызывает гиперполяризацию мембраны ($V_0 = -76,8 \pm 0,1$) и снижает $\Delta I_{SNAP,Gd}$ при -45 мВ до $(-)0,050 \pm 0,01$ и ингибирует $\Delta I_{SNAP,Gd}$ при -80 мВ до $(+)0,196 \pm 0,02$ (рис. 9В). На основании всего вышеизложенного следует, что Gd^{3+} ингибирует SNAP-индуцированный $I_{L,ns}$ таким же образом, как и $I_{L,ns}$, индуцированный растяжением.

В случаях, когда мы начинали эксперимент с добавления 5 мкмоль/л Gd^{3+} , после пятой минуты от начала аппликации положительный горб I/V-кривой смещается в сторону более отрицательных потенциалов -73 ± 2 мВ, (ср. -55 до -60 мВ в контроле), но амплитуда положительного горба не меняется, и наблюдается гиперполяризация, при которой V_0 равняется $-92 \pm 4,6$ мВ (сравните с V_0 в контроле, равный $-74,3 \pm 0,4$ мВ). При этом наблюдалось выраженное ингибирование $I_{L,ns}$ на уровне -80 мВ. В этом случае $^{5/C}\Delta I_{Gd^{3+}}$ составил $(+)0,176 \pm 0,02$ нА. Последующее введение 200 мкмоль/л SNAP в перфузионный раствор не приводила к существенным изменениям I_L (рис. 9В).

В нашем случае индуцированный SNAP ток $I_{L,ns}$ описывался как произведение движущей силы ($V - E_{ns}$) на независящую от потенциала

проводимость G_{ns} . Согласно литературным данным, потенциал реверсии $E_{ns} = -10$ мВ, независимая от потенциала проводимость и блокирование G_{ns} при помощи 5 мкмоль/л Gd^{3+} в совокупности указывают на то, что активируемый растяжением и SNAP-индуцированный $I_{L,ns}$ тот же неселективный катионный ток (Kamkin et al., 2003; Hu et Sachs, 1997).

Таблица 4. Амплитуда токов (I_{SNAP}) и дифференциальных токов ΔI_{SNAP} индуцированных SNAP в концентрации 200 кмк/л, описанные по I/V-кривым (IL) при -45 и -80 мВ после 3, 6 и 9 минут перфузии. Среднее значение \pm стандартное отклонение, n = количество экспериментов, m = количество животных. Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

V, (мВ)	n	m	Контроль	3 минуты перфузии		6 минут перфузии	
			I_L (нА)	${}^3I_{L,SNAP}$ (нА)	${}^{3/C}\Delta I_{SNAP}$ (нА)	${}^6I_{L,SNAP}$ (нА)	${}^{6/C}\Delta I_{SNAP}$ (нА)
-45	10	6	+0.151 \pm 0.03 ^a	+0.083 \pm 0.01 ^б	(-)0.069 \pm 0.02	+0.082 \pm 0.03 ^б	(-)0.070 \pm 0.02
-80	10	6	-0.233 \pm 0.04 ^a	-0.426 \pm 0.06 ^б	(-)0.194 \pm 0.04	-0.306 \pm 0.05 ^б	(-)0.073 \pm 0.03

V, (мВ)	n	m	9 минут перфузии	
			${}^9I_{L,SNAP}$ (нА)	${}^{9/C}\Delta I_{SNAP}$ (нА)
-	-	-		
-45	10	6	+0.116 \pm 0.02 ^б	(-)0.035 \pm 0.01
-80	10	6	- 0.184 \pm 0.02 ^г	(+)0.049 \pm 0.02

Таблица 5. Потенциал нулевого тока (V_0) – пересечение I/V-кривых с осью абсцисс до и во время перфузии SNAP в течение 9-ти минут. K_{in}^+/K_{out}^+ среда. Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

n	m	Контроль	3 минуты перфузии	6 минут перфузии	9 минут перфузии
		V_0 , (мВ)	V_0 , (мВ)	V_0 , (мВ)	V_0 , (мВ)
10	6	-70.1 \pm 1.6 ^a	-55.9 \pm 7.1 ^б	-57.3 \pm 7.3 ^б	-71.1 \pm 1.3 ^a

Таблица 6. Эффект SNAP в концентрации 200 мкмоль/л и Gd^{3+} в концентрации 5 мкмоль/л в K^+_{in}/K^+_{out} и Cs^+_{in}/Cs^+_{out} средах на суммарный ток и дифференциальный ток индуцированный SNAP (ΔI_{max}). Данные получены при регистрации time course при мембранном потенциале (V_m) фиксированном на уровне -45 мВ. Среднее значение \pm стандартное отклонение, n = количество экспериментов, m = количество животных. Для всех значений ΔI_{max} и t_{s-s} . Для всех достоверных различий $P < 0,01$.

Параметры	K^+_{in}/K^+_{out} и Gd^{3+}	Cs^+_{in}/Cs^+_{out} и Gd^{3+}
n	11	6
m	4	3
t_{max} , (МИН)	10.5 ± 0.7	15.0 ± 2.3
ΔI_{max} , (нА)	0.067 ± 0.009	0.040 ± 0.01
t_{s-s} , (МИН)	16.8 ± 0.5	27.2 ± 1.0
ΔI_{s-s} , (нА)	0.053 ± 0.01	0.043 ± 0.01

Помимо всего вышесказанного, определение $I_{L,ns}$ по его блокаде ионами Gd^{3+} вызывает вопросы, поскольку Gd^{3+} взаимодействует также с Ca^{2+} - и K^+ -токами (Hongo et al., 1997; Belus et White, 2002).

3.2.3. NO вызывает изменения зависимости I_L от потенциала в

Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде

В табл. 7 показаны изменения I_L в зависимости от времени регистрации I/V-кривой в присутствии 200 мкмоль/л SNAP в растворах Cs^+_{in}/Cs^+_{out} , а на рис. 10А показан пример контрольной кривой и ее изменения через 5 и 25 минут записи. Показано, что через 5 мин перфузии входящий ток $I_{L,ns,SNAP}(-45)$ увеличился, а результирующий дифференциальный ток $^{5/C} \Delta I_{SNAP}(-45)$ был равен (-) $0,080 \pm 0,01$ нА. Кроме того, до 10-й минуты $\Delta I_{SNAP}(-45)$ незначительно увеличивался и не изменялся на 15-й минуте, так что $^{10/C} \Delta I_{SNAP}(-45)$ практически не отличался от $^{15/C} \Delta I_{SNAP}(-45)$. В дальнейшем $^{20/C} \Delta I_{SNAP}(-45)$ и $^{25/C} \Delta I_{SNAP}(-45)$ уменьшались и были близки друг к другу (табл. 7). $I_{SNAP}(-80)$

также значительно увеличился в первые 5 мин, при этом ${}^{5/C}\Delta I_{\text{SNAP}}(-80)$ стал равным $(-)0,156\pm 0,04$ нА. Более того, через 10 минут от начала перфузии $I_{\text{SNAP}}(-80)$ снизился. На 15-й, 20-й и 25-й минутах $\Delta I_{\text{SNAP}}(-80)$ продолжал снижаться (табл. 7). В целом мы сначала наблюдали активацию, а затем торможение $I_{L,ns}$, хотя и не до исходных значений. Как правило, V_0 смещается в сторону деполяризации в первые 5 минут и остается стабильным на протяжении всего периода регистрации (табл. 8). SNAP-индуцированный $I_{L,ns}$ сначала увеличивается, а затем снижается, не достигая исходных значений.

Первоначально введенный Gd^{3+} в концентрации 5 мкмоль/л индуцировал гиперполяризацию мембраны от $-35,4\pm 2,2$ до $-47\pm 2,8$ мВ, но мало влиял на I_L и начальный $I_{L,ns}$ ($p>0,05$). Последующее введение в среду SNAP в концентрации 200 мкмоль/л не вызывало существенных изменений I_L (рис. 10Б).

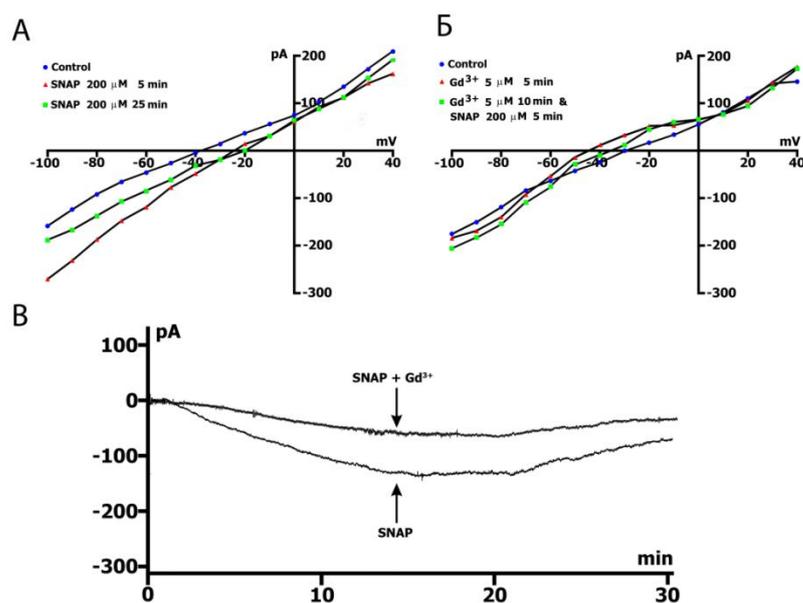


Рисунок 10. Изменение суммарных токов и I_L в $\text{Cs}^+_{\text{in}}/\text{Cs}^+_{\text{out}}$ среде при действии SNAP и Gd^{3+} . А. I/V-кривая, действие Gd^{3+} на фоне SNAP. Синие круги – контроль, красные треугольники – 5 минут перфузии SNAP, зеленые квадраты – 15 минут перфузии SNAP и 5 минут перфузии Gd^{3+} . Б. I/V-кривая, действие SNAP на фоне Gd^{3+} . Синие круги – контроль, красные треугольники – 5 минут перфузии Gd^{3+} , зеленые квадраты – 15 минут перфузии Gd^{3+} и 5 минут перфузии SNAP. Оригинальные кривые (статистически обработанные данные см. в таблице 7). В. запись time course, SNAP и SNAP с Gd^{3+} .

Эти данные коррелируют с данными, полученными в текущих экспериментах по регистрации, при этом в условиях регистрации time course V_h равнялась -45 мВ (рис. 10B). Введение 5 мкмоль/л Gd^{3+} в среду Cs^+_{in}/Cs^+_{out} одновременно с 200 мкмоль/л SNAP (табл. 6) вызывало снижение SNAP-индуцированного тока на уровне -45 мВ примерно в 2,7 раза (табл. 3 по сравнению с табл. 6). Таким образом, в среде Cs^+_{in}/Cs^+_{out} присутствие Gd^{3+} предотвращает развитие SNAP-индуцированных токов, так как SNAP-индуцированный $I_{L,ns}$ представляет собой известный нам $I_{L,ns}$, активируемый растяжением.

3.2.4. Обсуждение вопроса влияния NO на возможный I_{SAC} в отсутствие растяжения клеток.

Таким образом, как показано в двух предыдущих параграфах и ранее, NO влияет на возможный I_{SAC} в условии отсутствия растяжения.

В интактной клетке по протоколу регистрации тока I_L мы регистрируем типичные для желудочковых кардиомиоцитов I/V кривые. Хорошо известно, что наряду со многими факторами активность ионных каналов определяется и механизмами, связанными с продукцией и использованием NO. Таким образом, NO-синтазы осуществляют основную продукцию NO, который связывается с участком в heme nitric oxide/oxygen связывающем домене (HNOX) в β -субъединице sGC, что вызывает активацию каталитического домена C-конца этой субъединицы и приводит к продукции cGMP и, следовательно, к NO-зависимым механизмам регуляции активности ионного канала.

В наших экспериментах при отсутствии растяжения кардиомиоцитов на фоне базального уровня $[NO]_{in}$ экзогенный NO обратимо повышает I_L .

Таблица 7. Амплитуда SNAP-индуцированного дифференциального тока ΔI_{SNAP} описанного по I/V-кривым (I_L) при -45 и -80 мВ и 200 мкмоль/л SNAP после 5, 10, 15, 20, 25 минут перфузии. Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среда. Среднее значение \pm стандартное отклонение, n = количество экспериментов, m = количество животных. I (нА) – измеренное значение тока. Дифференциальный ток ΔI_{SNAP} (нА), возникающий, когда значения I_L смещены к более отрицательным значениям относительно контрольных значений, обозначается знаком минус (-). Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

V, (мВ)	n	m	Контроль	5 мин перфузии		10 мин перфузии		15 мин перфузии	
			I_L (нА)	$^5I_{L,SNAP}$ (нА)	$^{5/C}\Delta I_{SNAP}$ (нА)	$^{10}I_{L,SNAP}$ (нА)	$^{10/C}\Delta I_{SNAP}$ (нА)	$^{15}I_{L,SNAP}$ (нА)	$^{15/C}\Delta I_{SNAP}$ (нА)
-45	21	7	-0.004 \pm 0.002	-0.069 \pm 0.01	(-)0.080 \pm 0.01	-0.077 \pm 0.01	(-)0.087 \pm 0.01	-0.072 \pm 0.01	(-)0.085 \pm 0.02
-80	19	6	-0.06 \pm 0.01 ^a	-0.203 \pm 0.01 ^б	(-)0.156 \pm 0.04	-179 \pm 0.02 ^{бв}	(-)0.136 \pm 0.01	-0.155 \pm 0.01 ^б	(-)0.132 \pm 0.03

V, (мВ)	n	m	20 мин перфузии		25 мин перфузии	
			$^{20}I_{L,SNAP}$ (нА)	$^{20/C}\Delta I_{SNAP}$ (нА)	$^{25}I_{L,SNAP}$ (нА)	$^{25/C}\Delta I_{SNAP}$ (нА)
-45	21	7	-0.060 \pm 0.007	(-)0.055 \pm 0.01	-0.054 \pm 0.01	(-)0.054 \pm 0.01
-80	19	6	-0.159 \pm 0.02 ^б	(-)0.108 \pm 0.02	-0.143 \pm 0.01 ^г	(-)0.084 \pm 0.01

Таблица 8. Потенциал нулевого тока (V_0) - пересечение I/V-кривых с осью нулевого тока до и во время перфузии 200 мкмоль/л SNAP в течение 25 мин. Токи K^+ заблокированы, Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среда. V_0 - Измеренное значение потенциала. Среднее значение \pm стандартное отклонение, n = количество экспериментов, m = количество животных. Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

n	m	Контроль	5 мин перфузии	10 мин перфузии	15 мин перфузии	20 мин перфузии	25 мин перфузии
		V_0 , (мВ)					
14	5	-35.4 \pm 2.2 ^a	-20.4 \pm 1.3 ^б	-20.3 \pm 3.9 ^б	-18.7 \pm 3.9 ^б	-17.4 \pm 3.1 ^б	-16.4 \pm 2.8 ^б

Ранее нами были получены данные о повышении I_L при действии 200 мкмоль/л SNAP в первые минуты после введения (Kazanski et al., 2010). Другая группа ученых (Dyachenko et al., 2009) сообщила об отсутствии значимого увеличения I_L , (G_{ns}) под влиянием той же концентрации SNAP. В этом наборе данных нет противоречия, поскольку, в том числе, мы сообщали о двухфазном действии SNAP в концентрациях, близких к 200 мкмоль/л, в динамике во времени, а не в случайно выбранные моменты времени, как это делали авторы ранее (Kazanski et al., 2010; Dyachenko et al., 2009).

Следует отметить, что активация тока в диапазоне от -80 до -100 мВ наблюдалась в первые минуты перфузии кардиомиоцитов с донором NO SNAP, как в K^+_{in}/K^+_{out} среде, так и в Cs^+_{in}/Cs^+_{out} . Принимая во внимание настоящие и предыдущие данные (Kamkin et al., 2003; Kamkin et al., 2000), I_{SNAP} , индуцированный NO, является активируемым растяжением I_L , поскольку Gd^{3+} в концентрации 5 мкмоль/л в K^+_{in}/K^+_{out} и Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде не только устраняет этот ток, но и вызывают ингибирование фонового I_L в диапазоне от -80 до -100 мВ, сдвигая V_0 в сторону гиперполяризации, что характерно для активируемого растяжением тока. Напротив, предварительное введение Gd^{3+} заметно ингибирует фоновый I_L в диапазоне от -80 до -100 мВ, сдвигая V_0 в сторону гиперполяризации и предотвращая развитие I_{SNAP} . В совокупности это позволяет заключить, что экзогенный NO активирует SAC, вызывая появление $I_{SAC,ns}$ без растяжения клеток. Регистрация открытия механочувствительных каналов под действием экзогенного NO без растяжения клетки показана, например, для рианодиновых рецепторов. Введенный извне NO увеличивает частоту Ca^{2+} -sparks без растяжения клеток (Petroff et al., 2001).

Как в K^+_{in}/K^+_{out} среде, так и в Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде двухфазный эффект экзогенного NO регистрировался при концентрациях SNAP, близких к 200 мкмоль/л – сначала увеличение $I_{SAC,ns}$ без растяжения клеток, затем его снижение до исходных значений и последующее ингибирование, в ряде случаев сопровождающееся изменением V_0 в сторону гиперполяризации. Двухфазные или

обратимые эффекты NO хорошо известны. Например, аналогичный обратимый эффект экзогенного NO был обнаружен и при регистрации освобождения Ca^{2+} через Ca^{2+} -зависимые Ca^{2+} -каналы, связанные с рианодиновыми рецепторами (ryanodine-receptor Ca^{2+} -release channels), которые модулируются растяжением клеток. Экзогенно добавленный NO, как уже упоминалось, обратимо увеличивает частоту Ca^{2+} -sparks (Petroff et al., 2001). Двухфазный эффект отсутствовал при значительном повышении концентрации экзогенного NO до 400 мкмоль/л SNAP. При этом угнетение $I_{\text{SAC,ns}}$ наблюдалось с первых минут. В наших экспериментах этот обратимый эффект после длительного применения SNAP в низких концентрациях или при применении SNAP высоких концентрациях сводился к уменьшению входящих катион неселективных токов, описываемых I_L кривой. Величины I_L токов либо возвращались к исходным значениям, либо были меньше исходных. Причина ингибирования I_L в области отрицательных потенциалов не ясна, хотя существует много данных о бифазных эффектах экзогенного NO и, в том числе, приведенные выше (Petroff et al., 2001). Ниже мы пытаемся обсудить причину бифазного ответа. Недавно было показано, что NO, в зависимости от концентрации, модулирует работу натрий/водородного обменника-1 (NHE1) посредством двухфазного эффекта: NHE1 активируется при низком [NO], но ингибируется при высоком [NO]. Эти ответы вероятнее реализовывались через cGMP-зависимую передачу сигналов, чем через S-нитрозилирование (Richards et al., 2020). Кроме того, было показано, что активация NHE1-зависимого Na^+ тока при помощи низких концентраций NO также увеличивает частоту спонтанных волн Ca^{2+} , в то время как высокий уровень концентрации NO подавлял эти aberrantные формы Ca^{2+} сигналинга. В этом случае было установлено, что cGMP активирует NHE1, а cAMP ингибирует, что объясняет двухфазную регуляцию с помощью NO (Richards et al., 2020). Ранее также было показано, что высокие уровни NO вызывают значительное увеличение уровня cGMP и отрицательный инотропный эффект, опосредованный PKG-зависимым снижением чувствительности миофиламентов к Ca^{2+} . Низкие уровни NO увеличивают концентрацию cAMP, по крайней мере частично, за счет cGMP-независимой

активации аденилатциклазы и вызывают положительный инотропный ответ (Vila-Petroff et al., 1999). Подобные эффекты были показаны для нескольких ионных каналов кардиомиоцитов. Некоторые из этих эффектов опосредуются сGMP посредством активности трех основных белков: сGMP-зависимой протеинкиназы (PKG), сGMP-стимулируемой фосфодиэстеразы 2 (PDE2) и сGMP-ингибируемой PDE3. Другие эффекты проявляются независимо от сGMP, такие как, например, модуляция NO guanine-receptor Ca^{2+} -channels. Следует отметить, что в случае тока через L-тип Ca^{2+} каналов ($I_{Ca,L}$) сообщалось как о зависимых от сGMP, так и о независимых от сGMP эффектах с важной тканевой и видовой специфичностью (Fischmeister et al., 2005). Что касается потенциальной роли S-нитрозилирования в двухфазных ответах, то этот вопрос будет рассматриваться ниже. Двухфазный эффект с точки зрения ингибирования I_L можно было бы рассматривать с точки зрения некоторых токсических побочных эффектов SNAP (Vejlstrup et al., 1998). Однако мы не склонны рассматривать эту возможность применительно к нашим экспериментам из-за низких концентраций SNAP и короткого времени действия SNAP для проявления побочного действия NO.

3.2.5. Обсуждение вопроса о необходимости базального уровня NO для работы SAC.

Исходя из данных, представленных в данном разделе, а также из данных полученных ранее (Kazanski et al., 2010) мы полагаем, что базальный уровень NO необходим для работы SAC. Как показано выше, для активации I_{SAC} необходимо присутствие внутриклеточного NO, который образуется в результате активности NOS. Специфический поглотитель NO PTIO (Dyachenko et al., 2009; Kazanski et al., 2010) (см. обзор (Kazanski et al., 2010)), а также ингибиторы NO-синтазы L-NMMA (Dyachenko et al., 2009) или L-NAME (Kazanski et al., 2010) (см. обзор (Kazanski et al., 2011)) вызывает полное угнетение I_{SAC} . Кроме того, для идентификации изоформы NO-синтазы, генерирующей NO, необходимый для активации MSCh, анализировали I_{SAC} в кардиомиоцитах мышей $NOS^{-/-}$ (Dyachenko

et al., 2009). В то время как у NOS1^{-/-} и NOS2^{-/-} кардиомиоциты дикого типа реагировали на растяжение нормальным I_{SAC}, в кардиомиоцитах мышей NOS3^{-/-} I_{SAC} отсутствовал (Kazanski et al., 2010) (см. обзор (Kazanski et al., 2011a)). Это указывает на то, что NOS3 является доминирующим источником NO, участвующим в I_{SAC}, что согласуется с исследованиями, показывающими, что NOS3 активируется растяжением в кардиомиоцитах мышцы (Petroff et al., 2001).

3.2.6. Обсуждение вопроса о возможности увеличения

внутриклеточного уровня NO во время растяжения клетки

Согласно современным данным внутриклеточный уровень NO увеличивается во время клеточного растяжения. Представленное исследование не относится к исследованиям, связанным с вопросом об изменении количества NO при растяжении клеток. В этом разделе мы сосредоточились только на возможности модулирования функций SAC под действием NO, концентрация которого может увеличиваться при растяжении кардиомиоцитов, например, за счет тока Ca²⁺ и Na⁺ и деполяризации мембран, что может способствовать активации NO-синтаз (Suárez et al., 1999). Существуют и другие способы активации NO-синтаз (Dimmeler et al., 1999; Ishida et al., 1997). Здесь мы показали, что NO, в случае увеличения его концентрации при растяжении, вызывает модуляцию SAC, и, имея это в виду, мы пытаемся понять механизмы этой модуляции. Чтобы иметь возможность контролировать концентрацию NO внутри клетки, мы используем донор NO SNAP. Вкратце, растяжение клеток активирует SAC, что приводит к увеличению уровня NO, что, в свою очередь, приводит к модуляции SAC.

Растяжение не только открывает SAC, но и активирует NOS. Продукция NO увеличивается в ответ на различные механические воздействия, что имеет особое значение для сердечно-сосудистой функции. Например, исследования с использованием NO-чувствительных красителей показали, что растяжение желудочковых кардиомиоцитов вызывает высвобождение NO (Petroff et al., 2001;

Boycott et al., 2020; Shim et al., 2017a). На уровне потенциала действия сообщалось, что растяжение кардиомиоцитов крысы, выделенных из синоатриального узла, удлиняет его продолжительность (APD) и приводит к фибрилляции. Мы также обнаружили, что экзогенное применение NO с использованием донора NO SNAP усугубляет фибрилляцию и предотвращает возвращение к контролю APD после прекращения растяжения. Отсюда мы пришли к выводу, что повышенный уровень NO во время растяжения отвечает за открытие механически управляемых каналов и что в присутствии донора NO это приводит к неразрешимой фибрилляции (Shim et al., 2017b). В некоторых работах было показано, что длительное растяжение на 20% вызывает увеличение $[NO]_{in}$ в течение 5 мин. Это индуцированное растяжением повышение $[NO]_{in}$ является специфичным для кардиомиоцитов, поскольку в сердечных фибробластах не обнаруживается заметного изменения концентрации $[NO]_{in}$ (Liao et al., 2006). Количественное определение $[NO]_{in}$ показывает быстрое и значительное вызванное растяжением повышение $[NO]_{in}$ (135% через 5 минут, 121% через 10 минут по сравнению со 100% через 20 минут) в кардиомиоцитах желудочков новорожденных крыс. После начального кратковременного повышения уровень $[NO]$ имел тенденцию к восстановлению, но оставался на более высоком уровне, чем в контрольных клетках (Liao et al., 2006). По некоторым данным (Petroff et al., 2001), растяжение кардиомиоцитов увеличивает флуоресценцию, индуцированную DAF-2, в среднем примерно на 11%, что в два раза выше, чем 6%, в растянутых клетках обработанных L-NAME. Увеличение флуоресценции данного вещества говорит о возрастании концентрации NO. Эти данные показывают, что активность NOS и эндогенная продукция NO определяются растяжением (Petroff et al., 2001).

Представляют интерес работы, в которых авторы показали, что усиление коронарного кровотока стимулировало выделение NO потокозависимым образом, в то же время добавление $GdCl_3$ снижало выделение NO при базальном потоке и ингибировало индуцированное потоком выделение NO. Увеличение высвобождения NO включает активацию NO-синтазы за счет увеличения

содержания кальция/кальмодулина (Suárez et al., 1999). Авторы предположили, что открытие SAC вызывает приток Ca^{2+} и Na^+ и деполяризацию мембраны, что может способствовать активации NO-синтазы с сопутствующим увеличением выделения NO (Suárez et al., 1999). Позже были строго доказаны приток Ca^{2+} и Na^+ через SAC и деполяризацию мембраны при растяжении изолированных желудочковых кардиомиоцитов (Kamkin et al., 2003; Kamkin et al., 2000). Однако в аналогичных экспериментах другие авторы пришли к выводу, что кратковременное, повторяющееся или устойчивое увеличение коронарной перфузии увеличивает сократительную способность сердца за счет активации SAC, в то время как эндотелиальное высвобождение NO не затрагивается (Lamberts et al., 2002). В других исследованиях, проведенных на одиночных кардиомиоцитах, растянутых углеродными волокнами, авторы не обнаружили каких-либо доказательств передачи сигналов NO в медленном инотропном ответе на растяжение (Calaghan et White, 2004), хотя одно существующее свидетельство предполагает, что высвобождение NO при растяжении вызывает медленное увеличение частоты кальциевых вспышек (Ca^{2+} -sparks) в желудочковых миоцитах крыс, растянутых в агарозном геле (Petroff et al., 2001). В частности, хорошо известно, что механический стимул, такой как напряжение сдвига, активирует NO-синтазу через PtdIns-3-OH киназу (Dimmeler et al., 1999). Однако механизмы механотрансдукции были тщательно изучены в эндотелиальных (Dimmeler et al., 1999) и гладкомышечных клетках (Ji et al., 2002), где считается, что поток жидкости активирует сигнальный путь кавеолин/NOS, что приводит к кратковременному повышению концентраций NO, IP_3 и Ca^{2+} и длительной транскрипции генов eNOS (Ishida et al., 1997; Belmonte et Morad, 2008). Одно исследование показало, что рецептор TRPV1 и SAC сходным образом реагируют на механические стимулы, вызванные напряжением сдвига, увеличивая высвобождение NO в изолированном сердце (Torres-Narváez et al., 2012). Другие авторы предположили, что напряжение сдвига может также активировать серин/треонин-протеинкиназу Akt/PKB, которая опосредует активацию eNOS, приводя к увеличению продукции NO Ca^{2+} -независимым образом (Dimmeler et al.,

1999; Ishida et al., 1997). Поскольку высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (SR) в сердечных миоцитах регулируется через сигнальный путь NOS/NO, независимо от притока Ca^{2+} , было высказано предположение, что продольное растяжение миоцитов на ~18% индуцирует активацию NO, достаточную для значительного увеличения появления спонтанных Ca^{2+} -sparks и сопряжения усиления выброса Ca^{2+} с усилением сократимости (Petroff et al., 2001; Barouch et al., 2002). Сердечные миоциты, подвергнутые в растворе воздействию импульсов «давление-поток», генерируют временное увеличение цитозольного Ca^{2+} посредством Ca^{2+} -индуцированного высвобождения Ca^{2+} (CICR)-независимого механического сигнального пути. Результаты показывают, что активация этого хранилища Ca^{2+} не требует притока Ca^{2+} через Ca^{2+} -каналы, SAC или NCX, а также не играет значительной роли для вовлечения NO/NOS или IP_3R -воротного сигналинга (Belmonte et Morad, 2008). Последние работы в этой области не связаны с растяжением клеток. Например, в исследованиях изолированных кардиомиоцитов мышей, нагруженных высокоспецифичным медным красителем для NO, авторы наблюдали одиночный кратковременный выброс NO после каждого случая электрической стимуляции (Mosqueira et al., 2021). Специфические блокаторы изоформ NOS или поглотители NO значительно ингибировали такие выбросы. Эндогенный NOS-зависимый NO вырабатывается кратковременно после Ca^{2+} выброса при электрической стимуляции.

В целом, на сегодняшний день остается открытым вопрос о том, увеличивается ли количество внутриклеточного NO при прямом растяжении кардиомиоцитов. В условиях значительного количества противоречивых данных, представленных разными авторами, найти однозначное объяснение затруднительно. Возможно, дело в том, что авторы изучали разные состояния клетки на применяемые воздействия, при которых включаются разные механизмы. Тем не менее, необходимо изучить и проанализировать различные звенья путей NO-зависимой и NO-независимой модуляции SAC. Ниже мы представим эти данные.

3.2.7. NO устраняет суммарный ток, активируемый растяжением в K^+_{in}/K^+_{out} среде; (time course и I/V-кривая)

С одной стороны, записи time course во время растяжения в присутствии калия показали возникновение результирующего входящего тока, который увеличивается с увеличением степени растяжения. Во время непрерывного растяжения входящий ток оставался постоянным. Gd^{3+} устраняет этот эффект (см. раздел 3.1.2.). Растяжение также изменило соотношение I/V в сторону более отрицательных токов и деполяризовало V_0 . Полученные результирующие токи (рис. 5) показали, что растяжение уменьшило горб выходящего тока и вызвало уменьшение наклона между -80 и -100 мВ. С другой стороны, например, при концентрации SNAP 200 мкмоль/л мы регистрировали результирующие токи, индуцированные SNAP при -45 мВ, которые сначала увеличивались, а затем уменьшались. Эти суммарные токи являются инактивируемыми SNAP: калиевым током входящего выпрямления (ΔI_{K1}) и входящим током через активируемые растяжением неселективные катионные каналы ($I_{L,ns}$), которые оба могут быть заблокированы Gd^{3+} (см. раздел 3.2 рис. 8, 9, 10).

В этом исследовании мы продемонстрировали устранение результирующих токов, вызванных растяжением, путем изначальной перфузии 200 мкмоль/л SNAP в K^+_{in}/K^+_{out} среде. Time course (рис. 11A) продемонстрировал появление индуцированного растяжением тока -0,338 нА ($0,392 \pm 0,03$ нА против $-0,441 \pm 0,017$ нА в контроле) при растяжении клетки на 6 мкм на фоне суммарных токов, индуцированных SNAP, (ΔI_{max} через t_{max} равно $7,8 \pm 0,4$ мин). Этот ток сохраняется не более 2 мин и спонтанно исчезает в течение 3 мин, несмотря на еще сохраняющееся растяжение клеток. При этом динамика развития эффекта SNAP сохраняется.

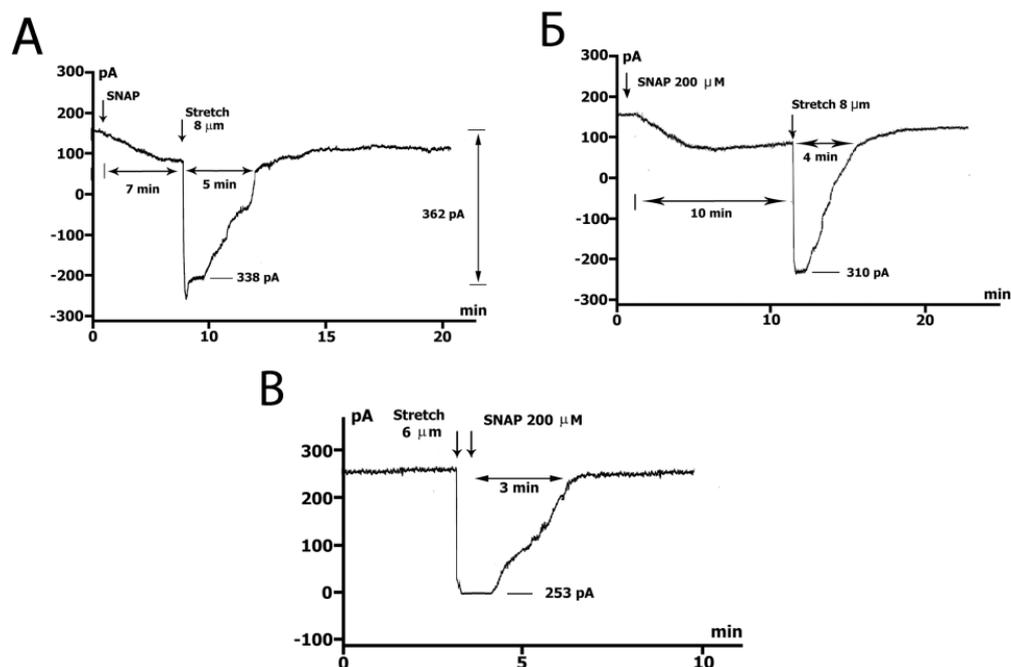


Рисунок 11. SNAP в концентрации 200 мкмоль/л устраняет индуцированный растяжением суммарный ток в K^+_{in}/K^+_{out} среде: зависимость от времени и потенциала. Потенциал фиксации V_m -45 мВ. А – time course мембранного тока. Растяжение применяли на уровне ΔI_{max} во время перфузии с помощью SNAP. Указано значение растяжения (8 мкм) и количество индуцированного растяжением входящего тока при -45 мВ. Б - То же, что и в А, но растяжение приложено на ΔI_s -s. В - изменение time course во времени. SNAP применяли после растяжения клетки на 6 мкм.

Аналогичный эффект вызывало приложение растяжения 6 мкм на уровне $t_{s-s} = 13,6 \pm 1,1$ мин на фоне ΔI_{s-s} . Растяжение на 6 мкм вызвало индуцированный растяжением ток величиной -0,310 нА (-0,398 \pm 0,012 нА) (см. табл. 1, ряд Б), который длился не более 1,5 мин и самопроизвольно исчезал через 2,5 мин, несмотря на наличие растяжения клетки. Динамика развития эффекта SNAP сохранялась (рис. 11Б). Следовательно, независимо от степени развития SNAP-индуцированных результирующих токов, растяжение клетки на определенную величину вызывает индуцированный растяжением ток на уровне -45 мВ, со значением, близким к величине SNAP-индуцированного тока (из time course: -0,441 \pm 0,017 нА, по сравнению с I/V-кривой: -0,398 \pm 0,012

нА, см. табл. 1). Индуцированный растяжением ток в присутствии SNAP не остается постоянным, как в отсутствие SNAP.

Зависимость I_L от потенциала и ее модуляция с помощью SNAP и растяжения показаны на кривых I/V на рис. 12. Через 5 минут SNAP увеличивает I_L при -80 мВ с $-0,375 \pm 0,05$ в контроле до $-0,651 \pm 0,05$ ($^{5/C} \Delta I_{SNAP} = (-)287 \pm 0,03$). Этот эффект мгновенно снимается растяжением, так как ток возвращается к значениям близким к исходным и становится равным $-0,322 \pm 0,06$. В отсутствие растяжения при продолжении перфузии SNAP через 10 минут (рис. 12), как сообщалось ранее, I_L возвращается к значениям, близким к исходным, при этом $^{10/C} \Delta I_{SNAP}$ при -45 и -80 мВ был равен $(-)0,054$ нА, то есть $I_L = -0,064 \pm 0,01$ и $(+)0,054$ нА, то есть $I_L = 0,083 \pm 0,02$ соответственно. При этом V_0 несколько смещался в отрицательную сторону. Растяжение на 6 мкм, приложенное на фоне SNAP, вызывало появление тока I_{SAC} , значения которого при -45 и -80 мВ были равны $(-)0,153$ нА ($-0,176 \pm 0,019$ нА) и $(-)0,180$ нА ($-0,290 \pm 0,08$ нА) соответственно, тогда как V_0 , как и ожидалось, значительно смещался в сторону деполяризации. Однако еще через 5 мин на фоне растяжения зависимость I_L от потенциала смещается в сторону значений, близких к исходным. Кроме того, V_0 приобретает исходное значение. На основании всего вышеизложенного представляется, что на фоне SNAP растяжение приводит к характерному клеточному ответу, который спонтанно исчезает и, вероятно, связан с избытком NO.

Если мы применяли начальное растяжение в 6 мкм (рис. 11B), индуцированный растяжением результирующий ток при $V_h = -45$ мВ составлял $-0,195 \pm 0,009$ нА. Последующее введение SNAP в концентрации 200 мкмоль/л всего через 3 минуты вызвала устранение результирующего тока, вызванного растяжением, несмотря на продолжающееся растяжение.

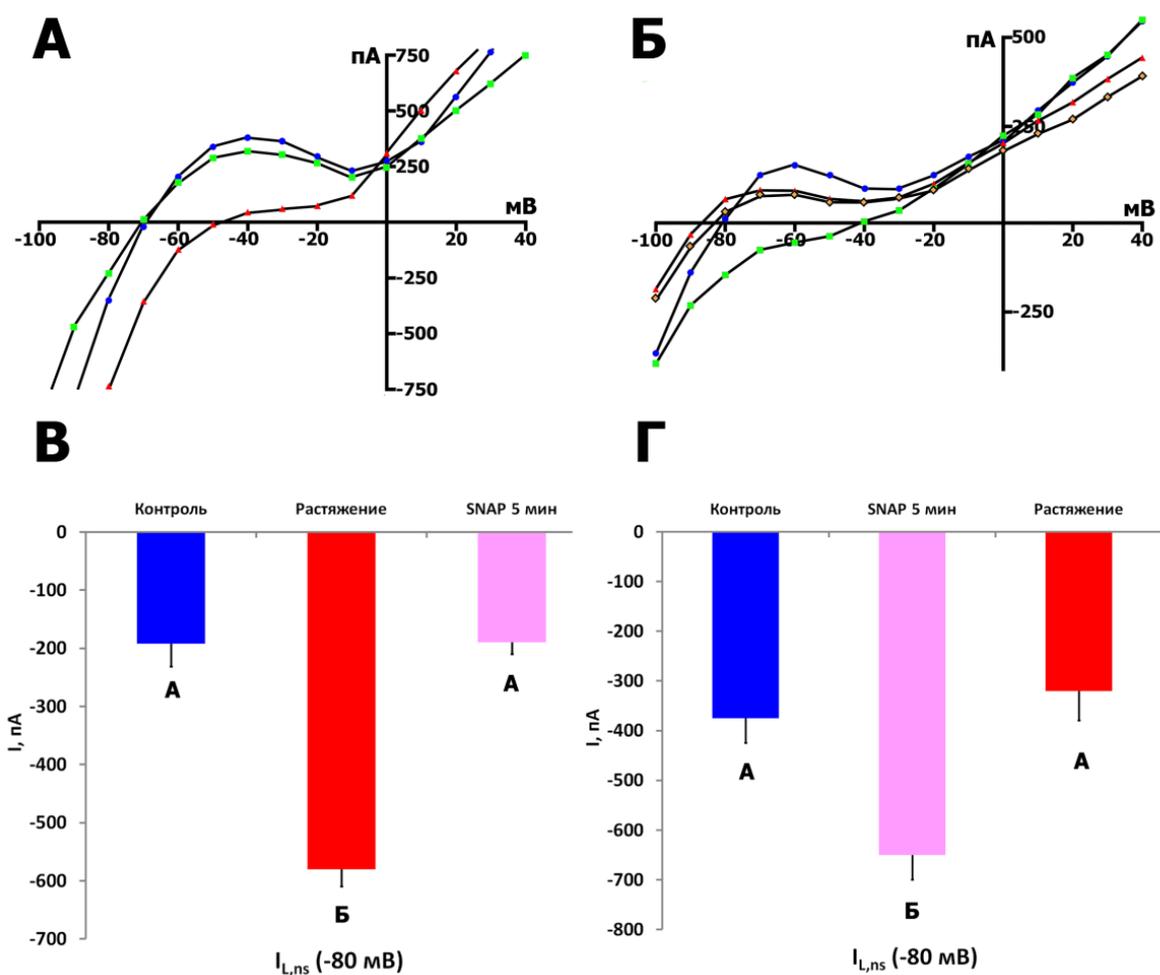


Рисунок 12. Влияние SNAP (200 мкмоль/л) в комбинации с растяжением на 6 мкм на I/V кривые позднего тока (I_L). А – Изменения I_L в клетке при действии SNAP на фоне ее растяжения в контроле (синие кружки), после растяжения (красные треугольники) и через 5 мин постоянной перфузии SNAP (зеленые квадраты). Б - изменение I_L под действием SNAP с последующим растяжением клетки. Синие кружки – контроль, красные треугольники – 10 мин перфузии клеток со SNAP, зеленые квадраты – растяжение клетки на фоне 10 мин перфузии клеток со SNAP, оранжевые ромбы – 15 мин перфузии со SNAP на фоне продолжающегося растяжения. Оригинальные кривые. В – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ при растяжении и последующем добавлении в раствор SNAP на фоне продолжающегося растяжения. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=7$, $m=6$. Г – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ при добавлении в раствор SNAP и последующем растяжении. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=7$, $m=6$.

Зависимость I_L от потенциала и ее модуляция растяжением и SNAP показаны кривыми I/V на рис. 12А. Растяжение на 6 мкм вызывает уменьшение положительного горба кривой I/V (от -55 до -60 мВ) и сдвигает V_0 в сторону деполяризации (рис. 12А). На уровне -45 и -80 мВ I_{SAC} имеют значение (-)0,347 (-0,398±0,012 нА) и (-)0,388 нА (-0,580±0,03 нА), в то время как последующее введение 200 мкмоль/л SNAP возвращает кривую I_L к исходным значениям всего за 5 минут.

Таким образом, введение NO в среду на фоне растяжения вызывает элиминацию I_{SAC} , несмотря на продолжающееся растяжение клетки.

3.2.8. NO устраняет суммарный ток, активируемый растяжением в Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде

Устранение I_{SAC} было продемонстрировано при изначальном добавлении 200 мкмоль/л SNAP в Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде. На рис. 13А показано появление $I_{SAC}(-45)$ со значением -0,125 нА (-0,155 ± 0,024 нА в контроле) вблизи ΔI_{max} при растяжении клетки на 6 мкм на фоне SNAP-индуцированного тока. Этот ток длится не более 2 мин и спонтанно исчезает, несмотря на сохраняющееся растяжение клетки. При этом сохраняется динамика развития эффекта SNAP. На рис. 13Б показан $I_{SAC}(-45)$, генерируемый растяжением на 6 мкм, который индуцирует ток, равный -0,071 нА (-0,082 ± 0,011 нА в контроле). Применение SNAP на фоне регистрируемого тока устраняет ток, несмотря на сохраняющееся растяжение клетки.

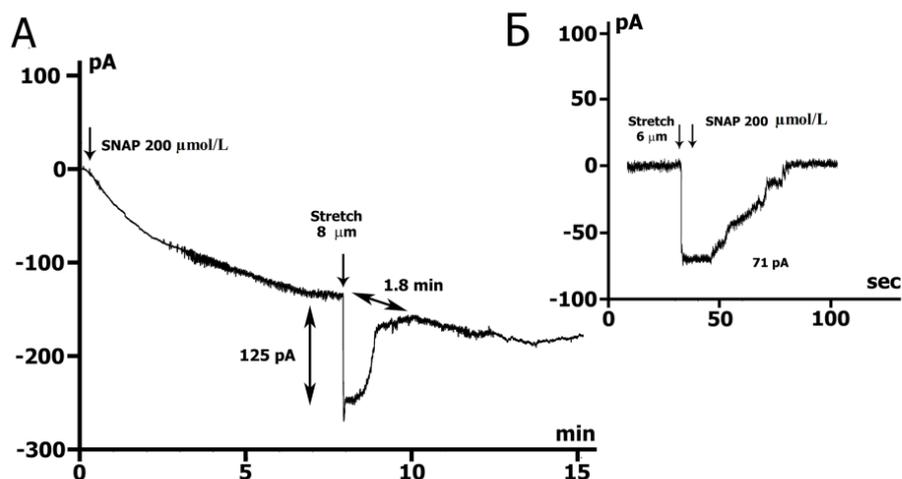


Рисунок 13. SNAP в концентрации 200 мкмоль/л устраняет вызванный растяжением ток I_{SAC} в Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде. K^+ токи инактивированы. А – time course мембранного тока, потенциал фиксации V_m -45 мВ. Растяжение применялось на уровне, близком к ΔI_{max} во время перфузии с помощью SNAP. Указаны величина растяжения (8 мкм) и величина индуцированного растяжением входящего тока при -45 мВ. Б – time course мембранного тока. SNAP применяли после растяжения клетки на 6 мкм.

3.2.9. Растяжение открывает SAC, в то время как экзогенный NO вызывает закрытие этих каналов

Ранее было показано (Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2003a), что растяжение вызывало открытие SAC и увеличение $I_{SAC,ns}$, но последующее введение экзогенного NO вызывало ингибирование $I_{SAC,ns}$ уже через 5 мин. Напротив, экзогенный NO вызывал активацию SAC и появление $I_{SAC,ns}$ в условиях без растяжения, причем последующее растяжение приводит к ингибированию $I_{SAC,ns}$. Если после применения SNAP клетку растягивали на фоне начавшегося ингибирования $I_{SAC,ns}$, например, через 10 мин, то это приводит к временной активации $I_{SAC,ns}$, которая через 10 мин возвращается к исходному значению. Эти эффекты проявляются как в K^+_{in}/K^+_{out} среде, так и в Cs^+_{in}/Cs^+_{out} среде. В совокупности в этих экспериментах прослеживается зависимость ответа SAC от общей концентрации NO, и полученные данные хорошо коррелируют с данными, относящимися к влиянию различных концентраций SNAP на $I_{SAC,ns}$ без

растяжения клеток. Именно для понимания механизмов модуляции SACs при помощи NO, помимо прямого применения SNAP для активации NO-зависимого пути sGC, были проведены эксперименты с изучением влияния на интактную и растянутую клетки активатора NO-независимого пути sGC – BAY41-2272, специфического блокатора sGC – ODQ, ингибитора cGMP-зависимой протеинкиназы в NO–sGC–cGMP–PKG пути – KT-5823, аналога cGMP – 8Br-cGMP и ингибитора S-нитрозилирования – аскорбиновая кислота. При этом во всех случаях на фоне этих соединений добавляли SNAP для активации NO-зависимого пути sGC или(и) S-нитрозилирования. Эти результаты представлены ниже.

3.3. Влияние BAY 41-2272 на механосенситивные токи в кардиомиоците

Поскольку донор NO SNAP, действие которого описано выше, активирует β -субъединицу sGS и запускает NO-зависимый путь cGMP-PKG или индуцирует S-нитрозилирование SAC, мы исследовали участие NO-независимого пути cGMP-PKG в модуляции мембранных токов $I_{L,ns}$. Для этого использовали стимулятор растворимой гуанилатциклазы (sGC) [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine], известный как BAY 41-2272, который действует на NO-независимый регуляторный сайт связывания в $\alpha 1$ -субъединице sGS (Stasch et al., 2001; Becker et al., 2001).

3.3.1. Участие BAY 41-2272 в модуляции мембранных токов $I_{L,ns}$ и I_{K1} в K^+_{in}/K^+_{out} среде

На рисунке 14 представлены измеренные I/V кривые поздних токов I_L в контроле и токов через неселективные катионные каналы $I_{L,BAY}$ через 3 и 6 мин перфузии BAY 41-2272 (10 мкмоль/л). В таблице 9 приведены значения токов I_L , $I_{L,BAY}$ и индуцированного BAY 41-2272 дифференциального тока (ΔI_{BAY}), описанные по I/V кривым, (I_L) при -45, -80 и +40 мВ через 3 и 6 минут

перфузии. До применения ВАУ 41-2272 (рис.14А,В) I/V-кривая имела N-образную форму и пересекала ось потенциала при -70 ± 2 мВ (табл.9). 10 мкмоль/л ВАУ 41-2272 уже течение первых 3 мин вызывали уменьшение положительного горба I/V кривой (приблизительно при -50 мВ) (рис. 14А,В, табл. 9), к 6 мин перфузии эти изменения становились достоверными. V_0 несколько смещался к более отрицательному потенциалу. При -80 мВ значение ${}^6I_{L,BAU}$ было достоверно ниже контрольных значений (${}^6C\Delta I_{BAU}$ равнялось $(+)0.067 \pm 0.01$ нА). ВАУ 41-2272 практически не влиял на выходящие токи при +40 мВ.

В последующих экспериментах при дальнейшей перфузии клеток ВАУ 41-2272 (10 мкмоль/л) через 6 минут к перфузионному раствору добавляли SNAP (200 мкмоль/л) (рис. 14Б,В). Начиная с первой минуты в течение следующих 3 минут наблюдали снижение ${}^3I_{L,BAU+SNAP}$ при -80 мВ, а через 6 минут это снижение становилось достоверным (${}^6C\Delta I_{BAU+SNAP}$ при -80 мВ равнялось $(+)0.135 \pm 0.004$ нА) (табл. 9).

Дальнейшего снижения токов во времени не наблюдали, а значения ${}^9I_{L,BAU+SNAP}$ изменялись незначительно по сравнению с ${}^6I_{L,BAU+SNAP}$. Дифференциальные токи ${}^6C\Delta I_{BAU+SNAP}$ и ${}^9C\Delta I_{BAU+SNAP}$ также незначительно изменялись при -80 мВ (табл. 9).

Так, ВАУ 41-2272 (10 мкмоль/л) в интактной нерастянутой клетке вызывал снижение тока на уровнях -45, -80 мВ и практически не влиял на выходящий ток при +40 мВ. SNAP, введенный в раствор через 6 мин после начала перфузии ВАУ 41-2272, вызывал снижение IK_1 только через 3 мин, но увеличивал $I_{L,ns}$. Через 6 минут применения смеси токи возвращаются к значениям несколько ниже контрольных.

Таблица 9. Амплитуда тока, индуцированного BAY41-2272 через неселективные катионные каналы $I_{L,BAY}$, дифференциальный ток ΔI_{BAY} , I_L и дифференциальный ток после дополнительного введения в раствор SNAP ($I_{L,BAY+SNAP}$ и $\Delta I_{BAY+SNAP}$, соответственно), описанная из I/V кривых позднего тока (I_L) при -45, -80 и +40 мВ при применении 10 мкмоль/л BAY41-2272 после 3 и 6 мин перфузии и последующего добавления SNAP на фоне продолжающейся перфузии BAY41-2272. Поддерживаемый потенциал (V_h) = -45 мВ. V_0 - пересечение результирующей I/V кривой с осью потенциала определяло потенциал нулевого тока, который соответствовал потенциалу покоящейся мембраны неклямпированной клетки (от -70 до -80 мВ). K_{in}^+/K_{out}^+ среда. Среднее значение \pm SD, n = количество экспериментов (клеток), m = количество крыс. I_L (нА) - измеренное значение тока по I/V кривым. Дифференциальный ток ΔI_{BAY} и $\Delta I_{BAY+SNAP}$, возникающий, когда значения I_L смещены в более отрицательном направлении относительно контрольных значений, условно обозначается знаком минус (-), а дифференциальный ток, когда значения I_L смещены в более положительном направлении, условно обозначается знаком плюс (+). Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

Наименование	V, (мВ)	n	m	Контроль		BAY41-2272 10 мкмоль/л, 3 мин перфузии			BAY41-2272 10 мкмоль/л, 6 мин перфузии		
				V_0 (мВ)	I_L (нА)	V_0 (мВ)	${}^3I_{L,BAY}$ (нА)	${}^3C\Delta I_{BAY}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,BAY}$ (нА)	${}^6C\Delta I_{BAY}$ (нА)
Колонки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ступеньки фиксации потенциала от V_h до	-45	7	6	-70 \pm 2 ^a	+0.263 \pm 0.02 ^a	-69 \pm 2 ^a	+0.234 \pm 0.02 ^{ab}	(-)0.019 \pm 0.008	-71 \pm 2 ^a	+0.230 \pm 0.01 ^b	(-)0.034 \pm 0.01
	-80	7	6		-0.256 \pm 0.02 ^a		-0.223 \pm 0.04 ^{ab}	(+)0.042 \pm 0.009		-0.213 \pm 0.03 ^{bb}	(+)0.067 \pm 0.01
	+40	7	6		+0.429 \pm 0.05 ^a		+0.387 \pm 0.03 ^a	(-)0.062 \pm 0.01		+0.382 \pm 0.03 ^a	(+)0.088 \pm 0.02

Продолжение BAY41-2272 10 мкмоль/л; SNAP, 200 мкмоль/л; 3 мин перфузии			Продолжение BAY41-2272 10 мкмоль/л; SNAP, 200 мкмоль/л; 6 мин перфузии			Продолжение BAY41-2272 10 мкмоль/л; SNAP, 200 мкмоль/л; 9 мин перфузии		
V_0 (мВ)	${}^3I_{L,BAY+SNAP}$ (нА)	${}^3C\Delta I_{BAY+SNAP}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,BAY+SNAP}$ (нА)	${}^6C\Delta I_{BAY+SNAP}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^9I_{L,BAY+SNAP}$ (нА)	${}^9C\Delta I_{BAY+SNAP}$ (нА)
15	16	17	18	19	20			
-70 \pm 2	+0.235 \pm 0.03 ^{ab}	(-)0.051 \pm 0.008	-72 \pm 3 ^a	+0.227 \pm 0.02 ^{ab}	(-)0.049 \pm 0.005	-72 \pm 4 ^a	+0.205 \pm 0.05 ^b	(-)0.061 \pm 0.04
	-0.174 \pm 0.02 ^{br}	(+)0.104 \pm 0.03		-0.138 \pm 0.04 ^r	(+)0.135 \pm 0.004		-0.129 \pm 0.05 ^r	(+)0.180 \pm 0.05
	+0.355 \pm 0.04 ^a	(-)0.094 \pm 0.03		+0.357 \pm 0.05 ^a	(-)0.127 \pm 0.04		+0.327 \pm 0.04 ^a	(-)0.102 \pm 0.05

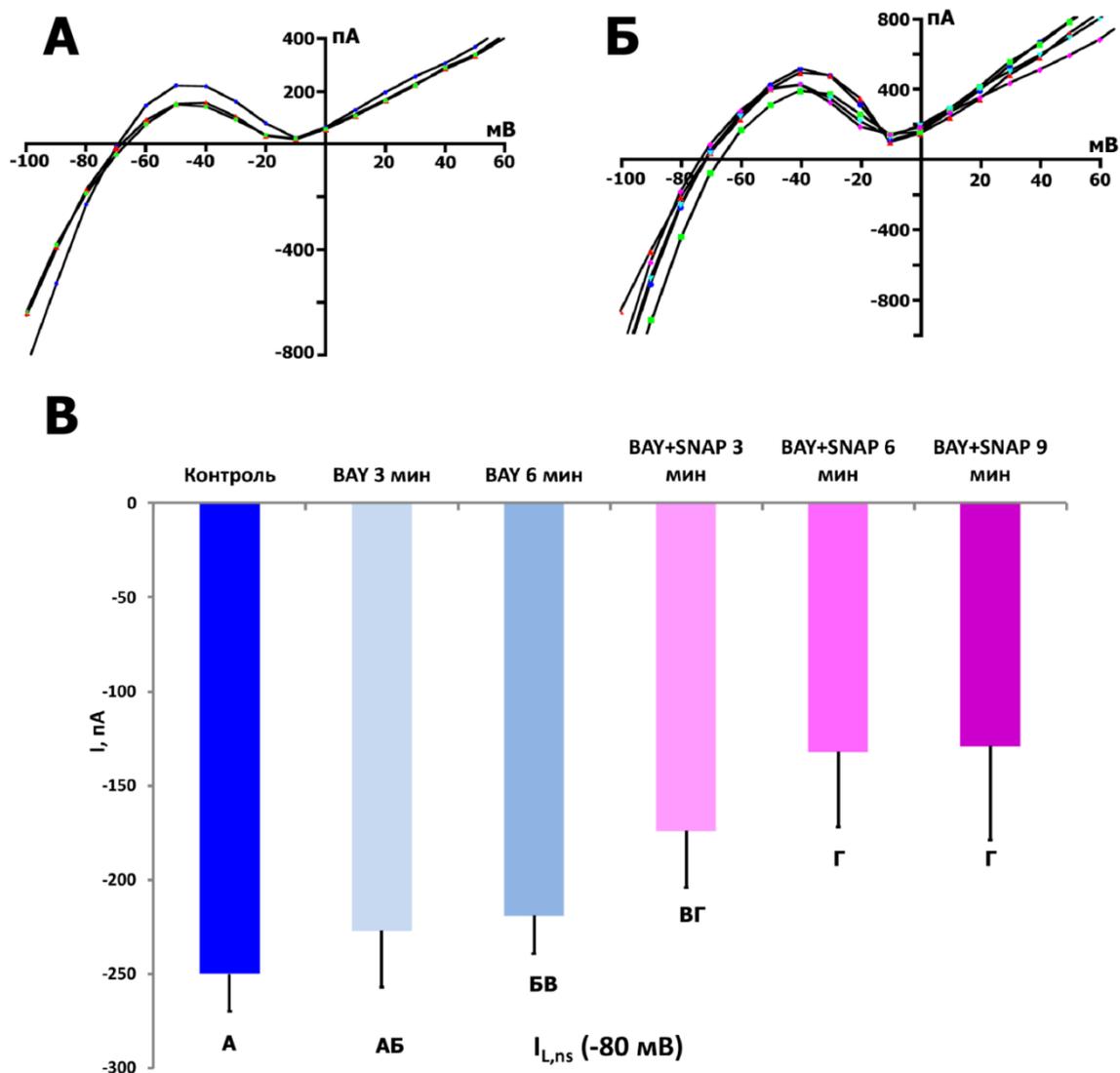


Рисунок 14. Влияние БАУ 41-2272 (10 мкмоль/л) и его комбинации со SNAP (200 мкмоль/л) на I/V кривые позднего тока (I_L) у нерастянутой клетки. А – Изменения I_L в интактной клетке на фоне постоянной перфузии БАУ 41-2272 в контроле (синие кружки), через 3 мин (красные треугольники) и через 6 мин (зеленые квадраты). Б - изменение I_L под действием БАУ 41-2272 с последующим добавлением в раствор SNAP. Синие кружки – контроль, красные треугольники – 6 мин перфузии клеток с БАУ 41-2272, зеленые квадраты – 3 мин перфузии после добавления к раствору SNAP, перевернутые голубые треугольники – 6 мин со SNAP, пурпурные ромбы – 9 мин со SNAP. Оригинальные кривые. В – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ у нерастянутой клетки при последовательном добавлении в раствор БАУ 41-2272 и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=7$, $m=6$.

3.3.2. BAY 41-2272 устраняет I_{SAC}

Добавление BAY 41-2272 в концентрации 10 мкмоль/л привело к устранению токов, вызванных растяжением. На рисунке 15А,В и в таблице 10 показано, что токи, вызванные растяжением клеток на 6 мкм, значительно уменьшаются после 6-минутной перфузии BAY 41-2272 (10 мкмоль/л). Через 6 мин I_{K1} при -45 мВ была близка к исходным значениям, а ${}^6I_{L,ns,BAY}$ при -80 мВ не отличалась от контрольных значений. Значения дифференциального тока после 6 мин ${}^6I_{SAC,BAY}$ при -80 мВ показывают аналогичный возврат к значениям ниже исходных (таблица 10). Дополнительное введение SNAP (200 мкмоль/л) на фоне BAY 41-2272 (10 мкмоль/л) и 6 мкм растяжения клеток не влияет значимо на токи (табл. 10, рис.15Б,Г).

Таким образом, BAY 41-2272 устраняет индуцированные растяжением входящие токи, которые при -45 и -80 мВ становятся ниже исходных, а дополнительное введение 200 мкмоль/л SNAP несколько увеличивает I_{K1} , но не влияет на $I_{L,ns}$.

Таким образом, BAY 41-2272 в NO-cGMP-PKG пути индуцирует фосфорилирование SACs, открываемых растяжением клеток, что приводит к полной элиминации индуцированного растяжением I_{SAC} . Последующее дополнительное введение SNAP не меняет ситуацию.

Таблица 10. Амплитуда тока через активируемые растяжением неселективные катионные каналы $I_{L,ns}$, дифференциальный ток через активируемые растяжением каналы I_{SAC} , $I_{L,ns}$ и I_{SAC} после применения BAY 41-2272 (10 мкмоль/л) на фоне растяжения клеток ($I_{L,ns,BAY}$ и $I_{SAC,BAY}$, соответственно) и после дополнительного применения SNAP (200 мкмоль/л) на фоне продолжающейся перфузии BAY41-2272 ($I_{L,ns,BAY+SNAP}$ и $I_{SAC,BAY+SNAP}$, соответственно), описанные из I/V кривых позднего тока (I_L) при - 45, - 80 и + 40 мВ. Поддерживаемый потенциал (V_{hp}) = -45 мВ. V_0 - пересечение результирующей I/V кривой с осью потенциала при нулевом токе представляло собой потенциал нулевого тока, который соответствовал потенциалу покоящейся мембраны неклямпированной клетки (от - 70 до - 80 мВ). K_{in}^+/K_{out}^+ среда. Среднее значение \pm SD, n = количество экспериментов (клеток), m = количество крыс. Дифференциальные токи I_{SAC} , $I_{SAC,BAY}$ и $I_{SAC,BAY+SNAP}$, которые возникают, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более отрицательное направление относительно контрольных значений, условно обозначаются знаком минус (-), а дифференциальные токи, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более положительное направление, условно обозначаются знаком плюс (+). Для всех достоверных различий $P < 0,05$

Наименование	V, (мВ)	n	m	Контроль		Растяжение 6 мкм			Растяжение 6 мкм + BAY41-2272 10 мкмоль/л, перфузия - 6 мин		
				V_0 (мВ)	I_L (нА)	V_0 (мВ)	$I_{L,ns}$ (нА)	I_{SAC} (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,ns,BAY}$ (нА)	${}^6I_{SAC,BAY}$ (нА)
Колонки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ступеньки фиксации потенциала от V_h до	-45	5	4	-78 ± 2^a	$+0.377 \pm 0.05^a$	-52 ± 2^b	$+0.179 \pm 0.04^b$	$(-)0.199 \pm 0.1$	-74 ± 3^a	$+0.280 \pm 0.08^b$	$(-)0.105 \pm 0.05$
	-80	5	4		-0.377 ± 0.02^a		-0.553 ± 0.08^b	$(-)0.176 \pm 0.09$		-0.376 ± 0.08^a	$(+)0.136 \pm 0.04$
	+40	5	4		$+0.493 \pm 0.09^a$		$+0.575 \pm 0.02^b$	$(+)0.132 \pm 0.09$		$+0.394 \pm 0.07^b$	$(-)0.097 \pm 0.02$

Продолжение перфузии растянутой клетки с BAY41-2272 10 мкмоль/л + SNAP 200 мкмоль/л, 3 мин			Продолжение перфузии растянутой клетки с BAY41-2272 10 мкмоль/л + SNAP 200 мкмоль/л, 6 мин		
V_0 (мВ)	${}^3I_{L,ns,BAY+SNAP}$ (нА)	${}^3I_{SAC,BAY+SNAP}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,ns,BAY+SNAP}$ (нА)	${}^6I_{SAC,BAY+SNAP}$ (нА)
12	13	14	15	16	17
-75 ± 3^a	$+0.295 \pm 0.06^{ab}$	$(-)0.082 \pm 0.03$	-76 ± 2^a	$+0.328 \pm 0.08^{ab}$	$(-)0.061 \pm 0.02$
	-0.306 ± 0.04^a	$(+)0.070 \pm 0.04$		-0.271 ± 0.04^a	$(+)0.106 \pm 0.03$
	$+0.375 \pm 0.06^b$	$(-)0.121 \pm 0.03$		$+0.408 \pm 0.02^b$	$(-)0.137 \pm 0.04$

Таблица 11. Амплитуда индуцированного ODQ позднего тока через неселективные катионные каналы $I_{L, ODQ}$, дифференциальный ток ΔI_{ODQ} , I_L и дифференциальный ток после добавления SNAP ($I_{L, ODQ+SNAP}$ и $\Delta I_{ODQ+SNAP}$, соответственно), описанные из I/V кривых позднего тока (I_L) при -45, -80 и +40 мВ при перфузии клеток с ODQ в концентрации 5 мкмоль/л через 3 и 6 мин перфузии и последующее добавление SNAP на фоне продолжающейся перфузии ODQ. Поддерживаемый потенциал (V_{hp}) = -45 мВ. V_0 - пересечение результирующей I/V кривой с осью потенциала при нулевом токе представляло собой потенциал нулевого тока, который соответствовал потенциалу покоящейся мембраны у клетки с нефиксированным потенциалом (от -70 до -80 мВ). K^+_{in}/K^+_{out} среда. Среднее значение \pm SD, n = количество экспериментов (клеток), m = количество крыс. I_L (нА) – измеренные из I/V кривых величины тока при указанных в таблице потенциалах. Дифференциальные токи ΔI_{ODQ} и $\Delta I_{ODQ+SNAP}$ которые возникают, когда значения I_L смещаются в более отрицательное направление относительно контрольных значений, условно обозначаются знаком минус (-), а дифференциальные токи, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более положительное направление, условно обозначаются знаком плюс (+). Для всех достоверных различий $P < 0,05$.

Наименование	V, (мВ)	n	m	Контроль		ODQ 5 мкмоль/л, 3 мин перфузии			ODQ 5 мкмоль/л, 6 мин перфузии		
				V_0 (мВ)	I_L (нА)	V_0 (мВ)	${}^3I_{L,ODQ}$ (нА)	${}^3\Delta I_{ODQ}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,ODQ}$ (нА)	${}^6\Delta I_{ODQ}$ (нА)
Колонки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ступеньки фиксации потенциала от V_h до	-45	7	7	-75 \pm 2 ^a	+0.312 \pm 0.03 ^a	-80 \pm 2 ^б	+0.227 \pm 0.05 ^a	(-)0.087 \pm 0.01	-80 \pm 1 ^б	+0.228 \pm 0.05 ^a	(-)0.082 \pm 0.02
	-80	7	7		-0.105 \pm 0.02 ^a		-0.078 \pm 0.03 ^б	(+)0.094 \pm 0.06		-0.021 \pm 0.01 ^б	(+)0.084 \pm 0.05
	+40	7	7		+0.363 \pm 0.04 ^a		+0.188 \pm 0.05 ^б	(-)0.177 \pm 0.02		+0.185 \pm 0.05 ^б	(-)0.178 \pm 0.02

Продолжение перфузии ODQ 5 мкмоль/л; SNAP, 200 мкмоль/л; 3 мин перфузии			Продолжение перфузии ODQ 5 мкмоль/л; SNAP, 200 мкмоль/л; 6 мин перфузии		
V_0 (мВ)	${}^3I_{L,ODQ+SNAP}$ (нА)	${}^3\Delta I_{ODQ+SNAP}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,ODQ+SNAP}$ (нА)	${}^6\Delta I_{ODQ+SNAP}$ (нА)
12	13	14	15	16	17
-69 \pm 2 ^б	+0.205 \pm 0.04 ^б	(-)0.109 \pm 0.06	-68 \pm 1 ^б	+0.202 \pm 0.04 ^б	(-)0.110 \pm 0.06
	-0.189 \pm 0.01 ^г	(-)0.090 \pm 0.02		-0.198 \pm 0.01 ^г	(-)0.101 \pm 0.02
	+0.225 \pm 0.05 ^{бв}	(-)0.140 \pm 0.08		+0.258 \pm 0.06 ^б	(-)0.107 \pm 0.08

Таблица 12. Амплитуда тока через активируемые растяжением неселективные катионные каналы $I_{L,ns}$, дифференциальный ток через активируемые растяжением каналы I_{SAC} , $I_{L,ns}$ и I_{SAC} после применения ODQ (5 мкмоль/л) на фоне растяжения клеток ($I_{L,ns,ODQ}$ и $I_{SAC,ODQ}$, соответственно) и после дополнительного применения SNAP (200 мкмоль/л) на фоне продолжающейся перфузии ODQ ($I_{L,ns,ODQ+SNAP}$ и $I_{SAC,ODQ+SNAP}$, соответственно), описанной из I/V кривых позднего тока (I_L) при -45, -80 и +40 мВ. Поддерживаемый потенциал (V_{hp}) = -45 мВ. V_0 - пересечение результирующей I/V кривой с осью потенциала при нулевом токе представляло собой потенциал нулевого тока, который соответствовал потенциалу покоящейся мембраны неклампированной клетки (от -70 до -80 мВ). K_{in}^+/K_{out}^+ среда. Среднее значение \pm SD, n = количество экспериментов (клеток), m = количество крыс. Дифференциальные токи I_{SAC} , $I_{SAC,ODQ}$ и $I_{SAC,ODQ+SNAP}$, которые возникают, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более отрицательное направление относительно контрольных значений, условно обозначаются знаком минус (-), а дифференциальные токи, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более положительное направление, условно обозначаются знаком плюс (+). Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

Наименование	V, (мВ)	n	m	Контроль		Растяжение 6 мкм			Растяжение 6 мкм + ODQ 5 мкмоль/л, перфузия – 6 мин		
				V_0 (мВ)	I_L (нА)	V_0 (мВ)	$I_{L,ns}$ (нА)	I_{SAC} (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,ns,ODQ}$ (нА)	${}^6I_{SAC,ODQ}$ (нА)
Колонки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ступеньки фиксации потенциала от V_h до	-45	5	5	-75 \pm 4 ^a	+0.317 \pm 0.06 ^a	-65 \pm 6 ^b	+0.196 \pm 0.07 ^b	(-)0.121 \pm 0.04	-80 \pm 2 ^a	+0.167 \pm 0.02 ^b	(-)0.150 \pm 0.03
	-80	5	5		-0.341 \pm 0.05 ^a		-0.483 \pm 0.05 ^b	(-)0.139 \pm 0.04		-0.124 \pm 0.04 ^b	(+)0.217 \pm 0.04
	+40	5	5		+0.495 \pm 0.08 ^a		+0.475 \pm 0.08 ^a	(+)0.018 \pm 0.04		+0.320 \pm 0.04 ^b	(-)0.185 \pm 0.03

Продолжение перфузии растянутой клетки с ODQ 5 мкмоль/л + SNAP, 200 мкмоль/л, 3 мин			Продолжение перфузии растянутой клетки с ODQ 5 мкмоль/л + SNAP, 200 мкмоль/л, 6 мин		
V_0 (мВ)	${}^3I_{L,ns,ODQ+SNAP}$ (нА)	${}^3I_{SAC,ODQ+SNAP}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,ns,ODQ+SNAP}$ (нА)	${}^6I_{SAC,ODQ+SNAP}$ (нА)
12	13	14	15	16	17
-75 \pm 4 ^a	0.129 \pm 0.02 ^b	(-)0.188 \pm 0.04	-74 \pm 3 ^a	+0.047 \pm 0.01 ^b	(-)0.210 \pm 0.03
	-0.247 \pm 0.05 ^r	(+)0.094 \pm 0.02		-0.347 \pm 0.08 ^a	(+)0.006 \pm 0.03
	+0.246 \pm 0.03 ^b	(-)0.179 \pm 0.02		+0.339 \pm 0.01 ^b	(-)0.168 \pm 0.03

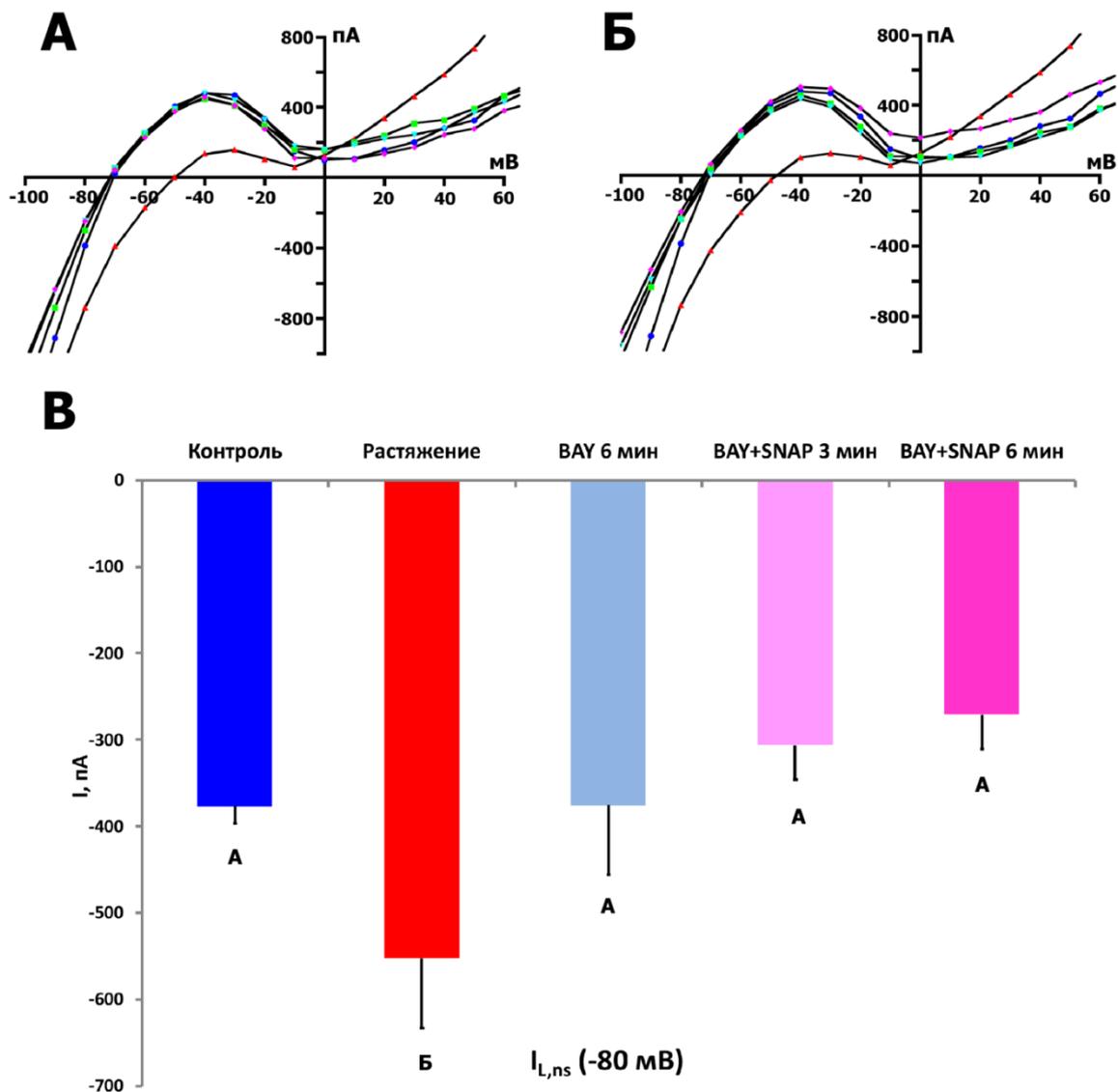


Рисунок 15. Влияние ВАУ 41-2272 (10 мкмоль/л) и его комбинации со SNAP (200 мкмоль/л) на активируемый растяжением неселективный катионный ток ($I_{L,ns}$). А – Зависимость I_L от потенциала у нерастянутой клетке (в контроле – синие кружки) и I_{SAC} после растяжения клетки на 6 мкм (красные треугольники), через 3 мин (зеленые квадраты), через 6 мин (перевернутые голубые треугольники) и через 9 мин (пурпурные ромбы) постоянной перфузии ВАУ 41-2272 на фоне растяжения. Б – зависимость I_L от потенциала в контроле (синие кружки), после растяжения клетки на 6 мкм (красные треугольники), через 6 (зеленые квадраты) минут перфузии ВАУ 41-2272, через 3 (перевернутые голубые треугольники) и 6 (пурпурные ромбы) минут перфузии после дополнительного применения SNAP. В – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ на фоне растяжения клетки при последовательном добавлении в раствор ВАУ 41-2272 и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=5$, $m=4$.

3.3.3. Причины, ведущие к уменьшению $I_{L,ns}$ под действием BAY41-2272 у нерастянутой клетки, и ведущие к устранению I_{SAC} , вызванного растяжением клетки

В наших экспериментах у нерастянутой клетки 10 мкмоль/л BAY41-2272 уменьшает величины токов на уровнях -45 и -80 и не влияет на выходящий ток при $+40 \text{ мВ}$. Входящий катион неселективный ток, регистрируемый в отрицательном диапазоне токов и при потенциалах, более гиперполяризованных, чем V_0 , вносит основной вклад в I_{SAC} . Именно он и уменьшался. SNAP, введенный на фоне BAY41-2272 вызывал бифазный эффект – увеличение $I_{L,ns}$, с последующим его ингибированием.

В отличие от NO, который связывается с сайтом в β -субъединице, что активирует ее каталитический домен С-конца и ведет к продукции cGMP и, следовательно, к работе NO-зависимых NO-sGC-cGMP-PKG путей регуляции активности каналов, механизм действия BAY 41-2272 иной. BAY 41-2272, связываясь с NO-независимым регуляторным местом в субъединице $\alpha 1$ sGC, вызывает активацию каталитического домена С-конца этой субъединицы, что ведет к дополнительной продукции cGMP (Stasch et al., 2001) и, в конечном счете, к активации PKG и вероятному фосфорилированию SACs по пути sGC-cGMP-PKG.

Если исходить из классического sGC-cGMP-PKG пути, то в приведенных экспериментах NO-независимый путь активации cGMP приводил к фосфорилированию SACs, что вызывало ингибирование $I_{L,ns}$, а введение SNAP временно активировало $I_{L,ns}$. В этом случае возникают два варианта развития событий, и на сегодня нет однозначного ответа, какой путь будет задействован. Во-первых, BAY 41-2272 уже связан с сайтом в $\alpha 1$ субъединице. Если NO может дополнительно связаться с сайтом в β субъединице и это связывание приведет к дополнительному увеличению cGMP, то временный эффект SNAP можно объяснить sGC-cGMP-PKG путем. Такой ход событий кажется возможным в случае применения BAY 58-

2667. В комбинации BAY 58-2667 и DEA/NO во всем диапазоне концентраций наблюдалось аддитивное действие на активность sGC (аддитивное действие, т.е. случай, когда значение величины, соответствующее целому объекту, равно сумме значений величин, соответствующих его частям). Эти наблюдения повторялись с более высокими и более низкими концентрациями DEA/NO и оставались аддитивными (Stasch et al., 2002). Однако нет никаких данных, позволяющих допустить аналогичную ситуацию для BAY 41-2272. Во-вторых, если на фоне BAY 41-2272, NO не может дополнительно связаться со “своим” сайтом в β субъединице, тогда можно предполагать временное увеличение $I_{L,ns}$ в результате S-нитрозилирования каналов.

Однако наиболее важно, что BAY41-2272 устраняет индуцированные растяжением токи I_{SAC} , а дополнительное введение SNAP принципиально не изменяет ситуации. Мы предполагаем, что BAY41-2272 по NO-cGMP-PKG пути может фосфорилировать SACs, открытые путем растяжения клетки, или же влиять на них посредством другого вторичного мессенджера (например, непосредственно cGMP), и это приводит к полному устранению вызванного растяжением I_{SAC} . Последующее дополнительное введение SNAP не меняло $I_{L,ns}$, и это понятно с учетом ранее полученных данных о том, что введение SNAP на фоне растянутой клетки полностью устраняет I_{SAC} .

3.4. Влияние ODQ на механосенситивные токи в кардиомиоците

Принимая во внимание, что донор NO вызывает активацию β -субъединицы sGC и запускает NO-зависимые пути NO-cGMP-PKG, а BAY 41-2272 индуцирует активацию sGC по NO-независимому пути, логично, что их смесь будет модулировать $I_{L,ns}$ и I_{SAC} через путь (sGC β 1 и sGC α 1)-cGMP-PKG. Мы исследовали эффекты блокирования sGC с помощью специфического блокатора ODQ или 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one. Из двух гетеродимерных изоформ sGC sGC α 1 β 1, по-видимому, является

преобладающей формой, экспрессируемой в желудочковых кардиомиоцитах (Cawley et al., 2011), а ODQ в концентрации 5–10 мкмоль/л ингибирует активацию всех изоформ sGC (Sips et al., 2011).

3.4.1. ODQ модулирует мембранные токи $I_{L,ns}$ и I_{K1} в K^+_{in}/K^+_{out} среде

В наших экспериментах мы не наблюдали отличий в величине токов при всех значениях потенциалов на фоне перфузии клеток 5 и 10 мкмоль/л ODQ. На рис.16А,В показаны изменения I/V кривой поздних токов I_L в контроле и во время действия ODQ (5 мкмоль/л), в течение 3 и 6 мин, а в табл.11 показаны значения этих токов и значения ODQ-индуцированного дифференциального тока (ΔI_{ODQ}), описанные по I/V-кривым, (I_L) при -45, -80 и +40 мВ после 3 и 6 минут перфузии. ODQ не изменяет N-образную форму I/V кривой, но вызывает уменьшение I_{K1} и $I_{L,ODQ}$ и сдвигает V_0 в сторону отрицательных потенциалов. Кроме того, после выраженного снижения в течение первых 3 минут ${}^6C\Delta I_{ODQ}$ не изменилась по сравнению с ${}^3C\Delta I_{ODQ}$ при +40 мВ (табл. 11).

В следующих экспериментах во время дальнейшей 6-минутной перфузии клеток с помощью ODQ (рис.16Б,В) в перфузионный раствор дополнительно вводили SNAP (200 мкмоль/л). Несмотря на непрерывную блокаду sGC при помощи ODQ, аппликация SNAP через 3 минуты вызывала значительное увеличение ${}^3I_{L,ODQ+SNAP}$ при -80 мВ, тогда как ${}^3C\Delta I_{ODQ+SNAP}$ становится равным (-)0,090±0,02 нА, т.е. несколько больше, чем при растяжении клетки на 6 мкм, и сдвигала V_0 до -68±1 мВ. При этом эта смесь практически не меняла ток при -45 и +40 мВ. Эти изменения были стойкими, через 6 минут кривая I_L на I/V зависимости была практически аналогична предыдущей кривой, (рис.16Б, таблица 11).

Таким образом, применение как 5, так и 10 мкмоль/л ODQ в интактной клетке уже через 3 мин снижает входящий катионный

неселективный ток $I_{L,ODQ}$ при -80 мВ. I_{K1} при -45 мВ, и выходящий ток при $+40$ мВ также были снижены. SNAP, введенный в раствор через 6 мин после перфузии ODQ, резко повышает I_L при -80 , деполяризуя V_0 , но незначительно изменяя токи при -45 и $+40$ мВ.

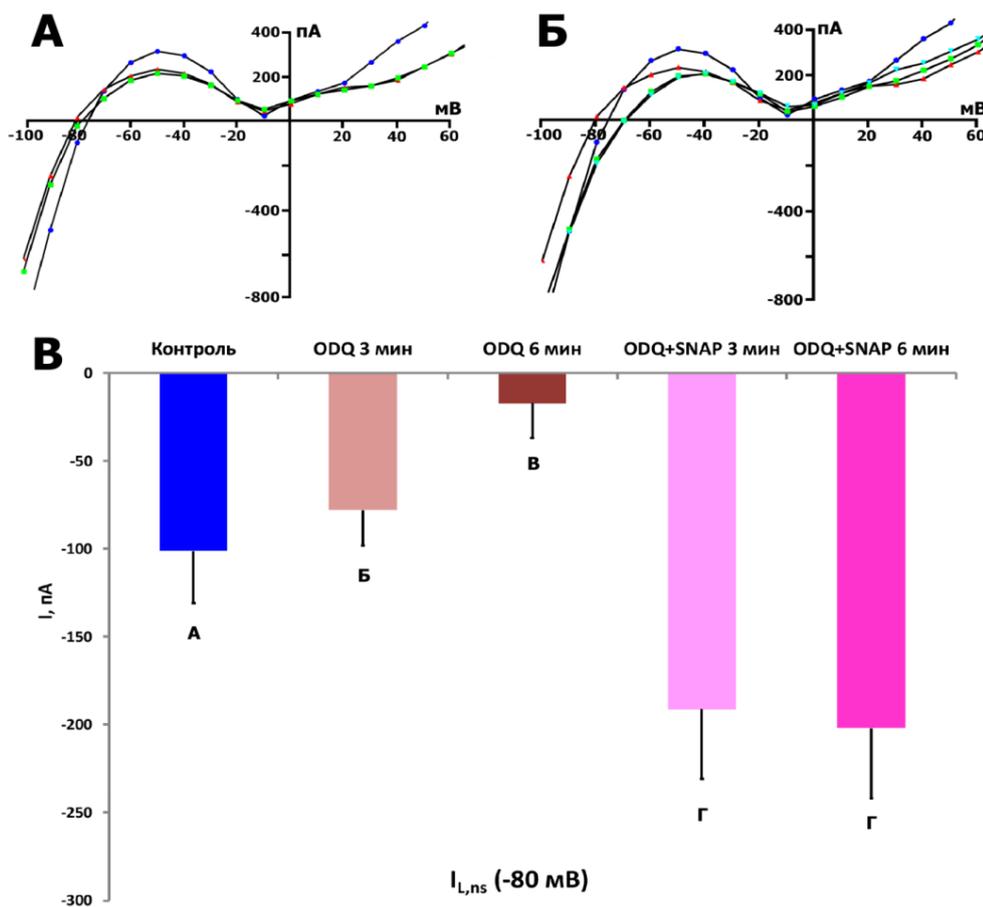


Рисунок 16. Влияние ODQ (5 мкмоль/л) и его комбинации со SNAP (200 мкмоль/л) на I/V кривые позднего тока (I_L) у нерастянутой клетки. А – Изменения I_L в интактной клетке на фоне постоянной перфузии ODQ в контроле (синие кружки), через 3 мин (красные треугольники) и через 6 мин (зеленые квадраты). Б - изменение I_L под действием ODQ с последующим добавлением в раствор SNAP. Синие кружки – контроль, красные треугольники – 6 мин перфузии клеток с ODQ, зеленые квадраты – 3 мин перфузии после добавления к раствору SNAP, перевернутые голубые треугольники – 6 мин со SNAP. Оригинальные кривые. В – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ у нерастянутой клетки при последовательном добавлении в раствор ODQ и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=6$, $m=4$.

3.4.2. ODQ устраняет I_{SAC}

На рис.17А,В показано появление I_{SAC} при растяжении клеток на 6 мкм. Последующее введение ODQ (5 мкмоль/л) в течение 3 минут не только устраняет I_{SAC} , но и значительно снижает исходный ток $I_{L,ns}$. При этом наблюдались существенные сдвиги кривой в сторону гиперполяризации. Значения V_0 , $I_{L,ns,ODQ}$ и I_{SAC} в разные моменты времени показаны в таблице 12.

На рис. 17Б,В и в таблице 12 продемонстрировано, что дополнительное введение SNAP (200 мкмоль/л) на фоне исходного растяжения клеток на 6 мкм и после 6 минут перфузии ODQ (5 мкмоль/л), еще в большей степени уменьшает $I_{L,ns,ODQ+SNAP}$ при -45 мВ, но увеличивает $I_{L,ns,ODQ+SNAP}$ при -80, который через 6 мин перфузии достигает контрольных значений.

Таким образом, ODQ полностью устраняет вызванные растяжением клетки $I_{L,ns}$, причем токи на уровне -45 и -80 мВ становятся существенно меньше исходных, а дополнительное введение 200 мкмоль/л SNAP их увеличивает, но на уровне -45 мВ не до контрольных значений, а -80 мВ – до контрольных.

Что касается тока I_{K1} , то в разных экспериментах мы получали разную его реакцию на введение ODQ, это может связано с его неоднозначным действием на внутренние системы клетки, что обсуждается ниже.

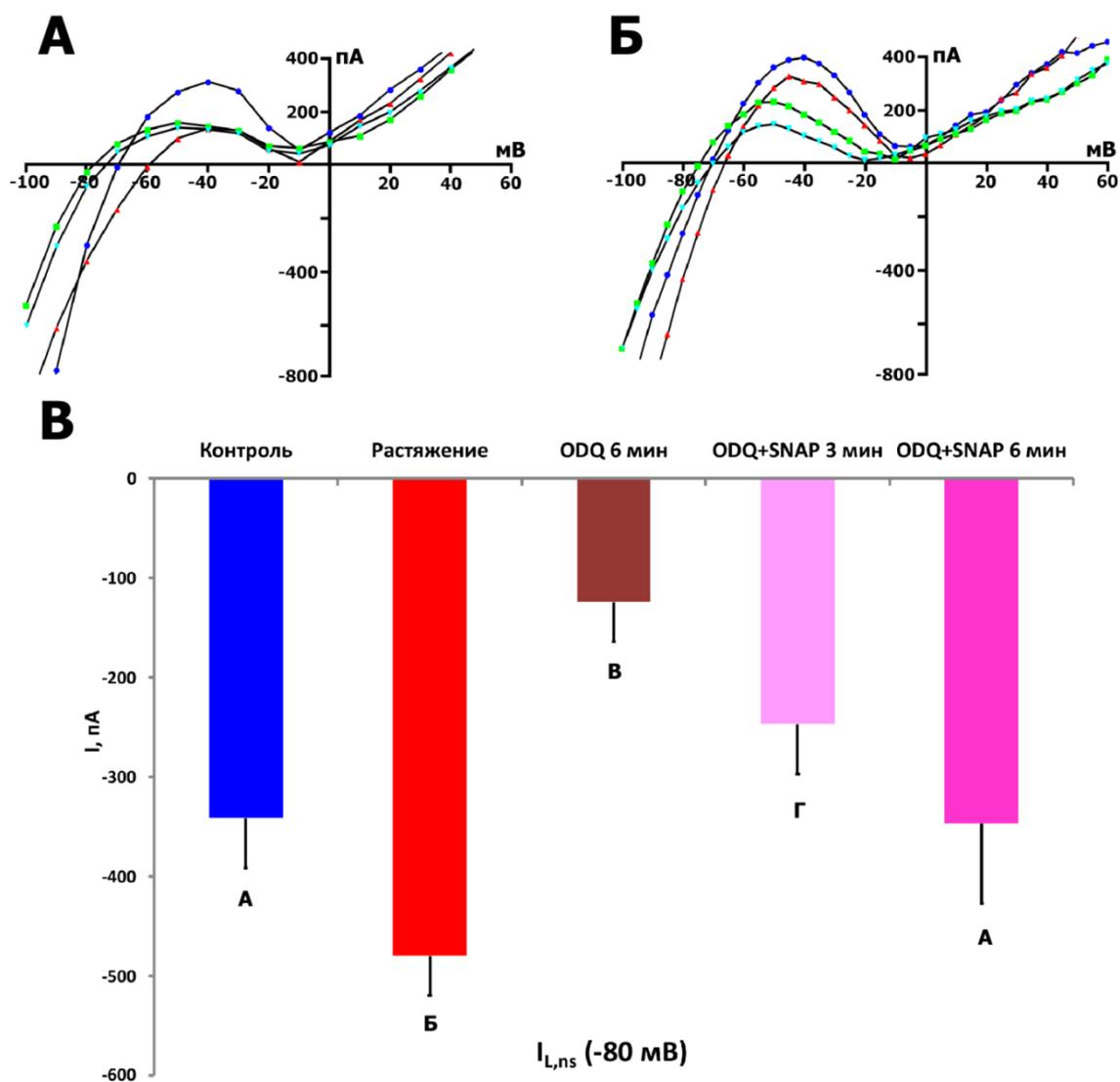


Рисунок 17. Влияние ODQ (5 мкмоль/л) и его комбинации со SNAP (200 мкмоль/л) на активируемый растяжением неселективный катионный ток ($I_{L,ns}$). А – Зависимость I_L от потенциала у нерастянутой клетке (в контроле – синие кружки) и I_{SAC} после растяжения клетки на 6 мкм (красные треугольники), через 3 мин (зеленые квадраты) и через 6 мин (перевернутые голубые треугольники) постоянной перфузии ODQ на фоне растяжения. Б – I_L в нерастянутой клетке (в контроле – синие кружки) и I_{SAC} после растяжения клетки на 6 мкм (красные треугольники), через 6 мин непрерывной перфузии ODQ (зеленые квадраты) и через 6 мин перфузии после добавления к раствору SNAP на фоне продолжающегося растяжения (перевернутые голубые треугольники). Оригинальные кривые. В – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ на фоне растяжения клетки при последовательном добавлении в раствор ODQ и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=5$, $m=5$.

3.4.3. Причины, по которым ODQ модулирует мембранные токи в нерастянутых и растянутых клетках

В наших экспериментах ODQ у нерастянутой клетки уменьшает величины $I_{L,ns}$ и сдвигает V_0 в сторону гиперполяризации. SNAP, введенный в раствор в присутствии ODQ, увеличивает $I_{L,ns}$ гиперполяризуя V_0 . После этого SNAP не уменьшает $I_{L,ns}$, значения тока практически не изменяются. Таким образом, мы видим, что бифазная реакция характерная для контрольной ситуации не наблюдается, по-видимому, из-за заблокированного sGC-cGMP-PKG пути. Главное, что ODQ полностью устраняет вызванный растяжением клетки I_{SAC} , а дополнительное введение SNAP его вновь увеличивает.

В интактной клетке блокада sGC должна устранять регуляцию канальной активности через NO-cGMP-PKG путь, который работает благодаря базовой продукции NO синтазами NO. Но есть один нюанс. Хотя имеется существенное количество работ, выполненных с применением ODQ как блокатора sGC и, следовательно, NO-cGMP-PKG пути, к результатам использования этого соединения стоит относиться с осторожностью, поскольку известно, что помимо действия на sGC, ODQ обладает способностью действовать на органические нитраты и оказывает влияние на ферментную систему цитохрома P-450. Более важно, что ODQ блокирует sGC, но при этом, благодаря его метаболическому преобразованию, превращается в ингибитор NOS (Feelisch et al., 1999).

Однако для нашей задачи параллельное блокирование NOS преобразованным ODQ даже более интересно. В этом случае, в наших экспериментах перфузия клеток ODQ выключает не только NO-cGMP-PKG сигналинг, но и, вероятно, работу NOS, т.е. образование NO. В этих условиях выраженная активация $I_{L,ns}$ с помощью SNAP на фоне фармакологической блокады sGC с ODQ достаточно убедительно демонстрирует превалирующую роль нитрозилирования SACs.

Растяжение клетки вызывает открытие SACs и появление индуцированного растяжением тока $I_{L,ns}$, величина которого I_{SAC} при данном уровне растяжения остается на постоянном уровне, т.е. без адаптации. Применение ODQ устраняет I_{SAC} и это было бы сложно объяснить только блокированием sGC–cGMP–PKG пути, поскольку в ряде публикаций показано, что работа SACs определяется наличием NO в клетке. Так использование РТЮ, связывающего NO, ингибитора NO-синтазы L-NAME (Dyachenko et al., 2009; Kazanski et al., 2010a) (см. для обзора (Kazanski et al., 2011)) и мышей с нокаутом $NOS3^{-/-}$ (Kazanski et al., 2011; Kazanski et al., 2010a) убедительно показало, что в отсутствие NO растяжение не может привести к возникновению I_{SAC} , с другой стороны, увеличение концентрации NO посредством введения в среду SNAP или DEA-NO на фоне растянутой клетки полностью устраняет I_{SAC} (Kazanski et al., 2010b).

Однако данные о том, что метаболическая трансформация ODQ превращает его в ингибитор NOS (Feelisch et al., 1999), позволяют сделать вывод, что ODQ полностью устраняет I_{SAC} не только или, не столько, за счет блокады sGC–cGMP–PKG пути, сколько за счет блокады NOS в результате чего снижается количество NO в клетке. Эту точку зрения подтверждает реакция растянутой клетки на SNAP, введенный на фоне предварительной обработки клетки ODQ, которая заключается в увеличении входящего катион неселективного тока. Таким образом, предположение о S-нитрозилировании SACs выглядит достаточно убедительным.

3.5. Влияние КТ-5823 на механосенситивные токи в кардиомиоците

В этой серии экспериментов интактные кардиомиоциты перфузировали КТ-5823 в концентрации 1 мкмоль/л, который известен как ингибитор cGMP-зависимой протеинкиназы в NO–sGC–cGMP–PKG пути.

3.5.1. Участие КТ-5823 в модуляции мембранных токов I_{ns} и I_{K1} в

K^+_{in}/K^+_{out} средах

На рис.18А представлены I/V кривая I_L тока в контроле в K^+_{in}/K^+_{out} среде и ее изменения при действии КТ-5823 через 3 мин и через 6 мин, а средние значения $I_{L,KT}$, I_{K1} и ΔI_{KT} сведены в таблицу 13. Из представленных данных следует, что перфузия клеток раствором КТ-5823 через 3 мин практически не меняла I_{K1} , т.е. ток на уровне -45 мВ, однако уменьшала $I_{L,KT}$ на уровне -80 мВ. Через 6 мин величины измеряемых токов не менялись. Дальнейших изменений параметров кривой I_L тока не было (не показано). Выходящий ток на уровне +40 мВ не менялся. Таким образом, под действием КТ-5823 происходило уменьшение только входящего катион неселективного тока.

В дальнейших экспериментах через 6 мин действия КТ-5823 в K^+_{in}/K^+_{out} среде дополнительно вводили 200 мкмоль/л SNAP. На рисунке 18Б,В представлено изменение I_L тока в контроле, через 6 мин перфузии КТ-5823 и еще через 3 и 6 мин после дополнительного введения SNAP, который вызывает уменьшение I_{K1} , но не влияет на входящий катион неселективного ток на уровне -80 мВ (таблица 13). Выходящие токи на уровне +40 мВ не менялись.

Таким образом, под действием КТ-5823 происходило уменьшение только входящего катион неселективного тока, а дальнейшее добавление SNAP значимо не изменяло $I_{L,ns}$.

Таблица 13. Амплитуда индуцированного КТ-5823 позднего тока, через неселективные катионные каналы $I_{L,KT}$, дифференциальный ток ΔI_{KT} , I_L и дифференциальный ток после дополнительного введения SNAP ($I_{L,KT+SNAP}$ и $\Delta I_{KT+SNAP}$, соответственно), описанная из I/V кривых позднего тока (I_L) при -45, -80 и +40 мВ при 1 мкмоль/л КТ-5823 после 3 и 6 мин перфузии и последующего добавления SNAP на фоне продолжающейся перфузии КТ-5823. Поддерживаемый потенциал (V_{hp}) = -45 мВ. V_0 - пересечение результирующей I/V кривой с осью потенциала при нулевом токе представляло собой потенциал нулевого тока, который соответствовал потенциалу покоящейся мембраны у клетки с нефиксированным потенциалом (от -70 до -80 мВ). K^+_{in}/K^+_{out} среда. Среднее значение \pm SD, n = количество экспериментов (клеток), m = количество крыс. I_L (нА) – измеренные из I/V кривых величины тока при указанных в таблице потенциалах. Дифференциальные токи ΔI_{KT} и $\Delta I_{KT+SNAP}$, которые возникают, когда значения I_L смещаются в более отрицательное направление относительно контрольных значений, условно обозначаются знаком минус (-), а дифференциальные токи, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более положительное направление, условно обозначаются знаком плюс (+). Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

Наименование	V, (мВ)	n	m	Контроль		КТ-5823 1 мкмоль/л, 3 мин перфузии			КТ-5823 1 мкмоль/л, 6 мин перфузии		
				V_0 (мВ)	I_L (нА)	V_0 (мВ)	$^3I_{L,KT}$ (нА)	$^{3/C}\Delta I_{KT}$ (нА)	V_0 (мВ)	$^6I_{L,KT}$ (нА)	$^{6/C}\Delta I_{KT}$ (нА)
Колонки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ступеньки фиксации потенциала от V_h до	-45	5	4	-75 ± 2^a	$+0.267 \pm 0.03^a$	-77 ± 1^a	$+0.255 \pm 0.03^a$	$(-)0.016 \pm 0.007$	-77 ± 1^a	$+0.245 \pm 0.05^a$	$(-)0.021 \pm 0.06$
	-80	5	4		-0.265 ± 0.05^a		-0.178 ± 0.05^b	$(+)0.121 \pm 0.01$		-0.197 ± 0.06^{ab}	$(+)0.019 \pm 0.01$
	+40	5	4		$+0.349 \pm 0.04^a$		$+0.367 \pm 0.05^a$	$(+)0.042 \pm 0.01$		$+0.369 \pm 0.04^a$	$(+)0.014 \pm 0.01$

Продолжение перфузии КТ-5823 1 мкмоль/л; SNAP, 200 мкмоль/л; 3 мин перфузии			Продолжение перфузии КТ-5823 1 мкмоль/л; SNAP, 200 мкмоль/л; 6 мин перфузии		
V_0 (мВ)	$^3I_{L,KT+SNAP}$ (нА)	$^{3/C}\Delta I_{KT+SNAP}$ (нА)	V_0 (мВ)	$^6I_{L,KT+SNAP}$ (нА)	$^{6/C}\Delta I_{KT+SNAP}$ (нА)
12	13	14	15	16	17
-65 ± 2^b	0.212 ± 0.05^a	$(-)0.069 \pm 0.02$	-73 ± 2^a	0.254 ± 0.05^a	$(-)0.054 \pm 0.008$
	-0.268 ± 0.04^{ab}	$(+)0.029 \pm 0.002$		-0.201 ± 0.06^{ab}	$(+)0.071 \pm 0.02$
	0.399 ± 0.06^a	$(-)0.066 \pm 0.006$		0.414 ± 0.02^a	$(-)0.038 \pm 0.03$

Таблица 14. Амплитуда тока через активируемые растяжением неселективные катионные каналы $I_{L,ns}$, дифференциальный ток через активируемые растяжением каналы I_{SAC} , $I_{L,ns}$ и I_{SAC} после применения КТ-5823 (1 мкмоль/л) на фоне растяжения клеток ($I_{L,ns,КТ}$ и $I_{SAC,КТ}$, соответственно) и после дополнительного введения SNAP (200 мкмоль/л) на фоне продолжающейся перфузии КТ-5823 ($I_{L,ns,КТ+SNAP}$ и $I_{SAC,КТ+SNAP}$, соответственно), описанные из I/V кривых позднего тока (I_L) при -45, -80 и +40 мВ. Поддерживаемый потенциал (V_{hp}) = -45 мВ. V_0 - пересечение результирующей I/V кривой с осью потенциала при нулевом токе представляло собой потенциал нулевого тока, который соответствовал потенциалу покоящейся мембраны неклампированной клетки (от -70 до -80 мВ). K^+_{in}/K^+_{out} среда. Среднее значение \pm SD, n = количество экспериментов (клеток), m = количество крыс. Дифференциальные токи I_{SAC} , $I_{SAC,КТ}$ и $I_{SAC,КТ+SNAP}$, которые возникают, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более отрицательное направление относительно контрольных значений, условно обозначаются знаком минус (-), а дифференциальные токи, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более положительное направление, условно обозначаются знаком плюс (+). Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

Наименование	V, (мВ)	n	m	Контроль		Растяжение 6 мкм			Растяжение 6 мкм + КТ-5823 1 мкмоль/л, перфузия - 6 мин		
				V_0 (мВ)	I_L (нА)	V_0 (мВ)	$I_{L,ns}$ (нА)	I_{SAC} (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,ns,КТ}$ (нА)	${}^6I_{SAC,КТ}$ (нА)
Колонки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ступеньки фиксации потенциала от V_h до	-45	5	4	-80 ± 3^a	$+0.238 \pm 0.02^a$	-67 ± 4^b	$+0.120 \pm 0.02^b$	$(-)0.114 \pm 0.02$	-85 ± 3^a	$+0.230 \pm 0.05^a$	$(+)0.021 \pm 0.02$
	-80	5	4		-0.251 ± 0.06^a		-0.353 ± 0.05^b	$(-)0.127 \pm 0.03$		-0.181 ± 0.04^{ab}	$(+)0.055 \pm 0.04$
	+40	5	4		$+0.260 \pm 0.01^a$		$+0.285 \pm 0.01^a$	$(+)0.025 \pm 0.02$		$+0.220 \pm 0.02^b$	$(-)0.031 \pm 0.02$

Продолжение перфузии растянутой клетки с КТ-5823 1 мкмоль/л + SNAP 200 мкмоль/л, 3 мин			Продолжение перфузии растянутой клетки с КТ-5823 1 мкмоль/л + SNAP 200 мкмоль/л, 6 мин		
V_0 (мВ)	${}^3I_{L,ns,КТ+SNAP}$ (нА)	${}^3I_{SAC,КТ+SNAP}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,ns,КТ+SNAP}$ (нА)	${}^6I_{SAC,КТ+SNAP}$ (нА)
12	13	14	15	16	17
-84 ± 2^a	$+0.210 \pm 0.03^a$	$(-)0.022 \pm 0.03$	-84 ± 2^a	$+0.205 \pm 0.02^a$	$(-)0.026 \pm 0.02$
	-0.162 ± 0.01^b	$(+)0.076 \pm 0.02$		-0.170 ± 0.01^b	$(+)0.079 \pm 0.02$
	$+0.203 \pm 0.02^b$	$(-)0.054 \pm 0.02$		$+0.208 \pm 0.02^b$	$(-)0.052 \pm 0.03$

3.5.2. КТ-5823 уменьшает I_{SAC}

Как продемонстрировано на рис. 19А,В растяжение клеток вызывает уменьшение I_{K1} и увеличение I_L , значения которого и значения ΔI_{SAC} приведены в таблице 14. Как это обычно происходит при растяжении, V_0 смещается в сторону деполяризации. На фоне растяжения клетки введение 1 мкмоль/л КТ-5823 через 6 мин перфузии I_{SAC} выраженно ингибировался и значения тока $I_{L,ns,KT}$, несмотря на продолжающееся растяжение, становились существенно меньше, чем в контроле. Полностью вернулся к контрольным значениям и I_{K1} . При этом V_0 смещалось в гиперполяризацию и его значения становились большими, чем в контроле.

В дальнейших экспериментах (рис.19Б,В и таблица 14) на фоне растяжения клетки через 6 мин действия КТ-5823 регистрировали выраженное ингибирование I_{SAC} , I_{K1} и смещение V_0 в сторону гиперполяризации. Дополнительно введенный в K^+_{in}/K^+_{out} среду 200 мкмоль/л SNAP значимо не влиял на величину токов (Рис. 19В).

Таким образом, КТ-5823 ингибировал индуцированный растяжением ток, а введенный дополнительно SNAP не оказывал существенного влияния на этот ток.

3.5.3. Причины, по которым КТ-5823 ингибирует $I_{L,ns}$ у

нерастянутой клетки и I_{SAC} у растянутой и не влияет на I_{K1}

КТ-5823, известный как ингибитор сGMP-зависимой протеинкиназы в пути sGC-cGMP-PKG, у нерастянутой клетки должен уменьшать фосфорилирование и, предположительно, вызывать увеличение тока, однако мы регистрировали уменьшение $I_{L,ns}$. В основе этого противоречия лежат, вероятно, иные механизмы, связанные с отличиями не только в воротных механизмах каналов, но и в принципах их регуляции, например, в потенциал-управляемых каналах или в каналах, активируемых растяжением. В

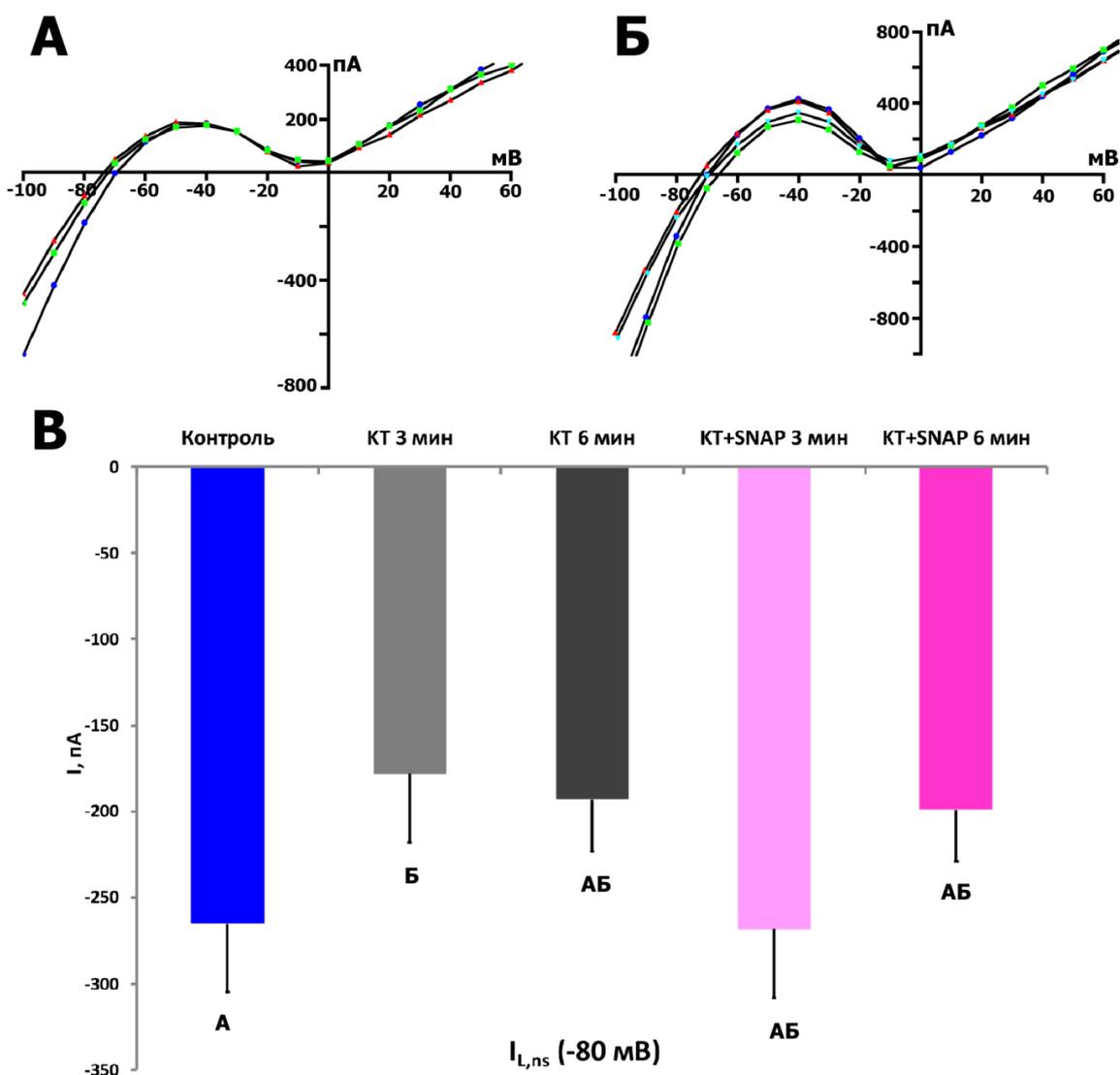


Рисунок 18. Влияние КТ-5823 (1 мкмоль/л) и его комбинации со SNAP (200 мкмоль/л) на I/V кривые позднего тока (I_L) у нерастянутой клетки. А – Изменения I_L в интактной клетке на фоне постоянной перфузии КТ-5823 в контроле (кружки), через 3 мин (треугольники) и через 6 мин (квадраты). Б – изменение I_L под действием КТ-5823 при последующем добавлении в раствор SNAP. Синие кружки – контроль, красные треугольники – 6 мин перфузии клеток КТ-5823, зеленые квадраты – 3 мин перфузии после добавления раствора SNAP, перевернутые голубые треугольники – 6 мин со SNAP. Оригинальные кривые. В – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ у нерастянутой клетки при последовательном добавлении в раствор КТ-5823 и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=6$, $m=4$.

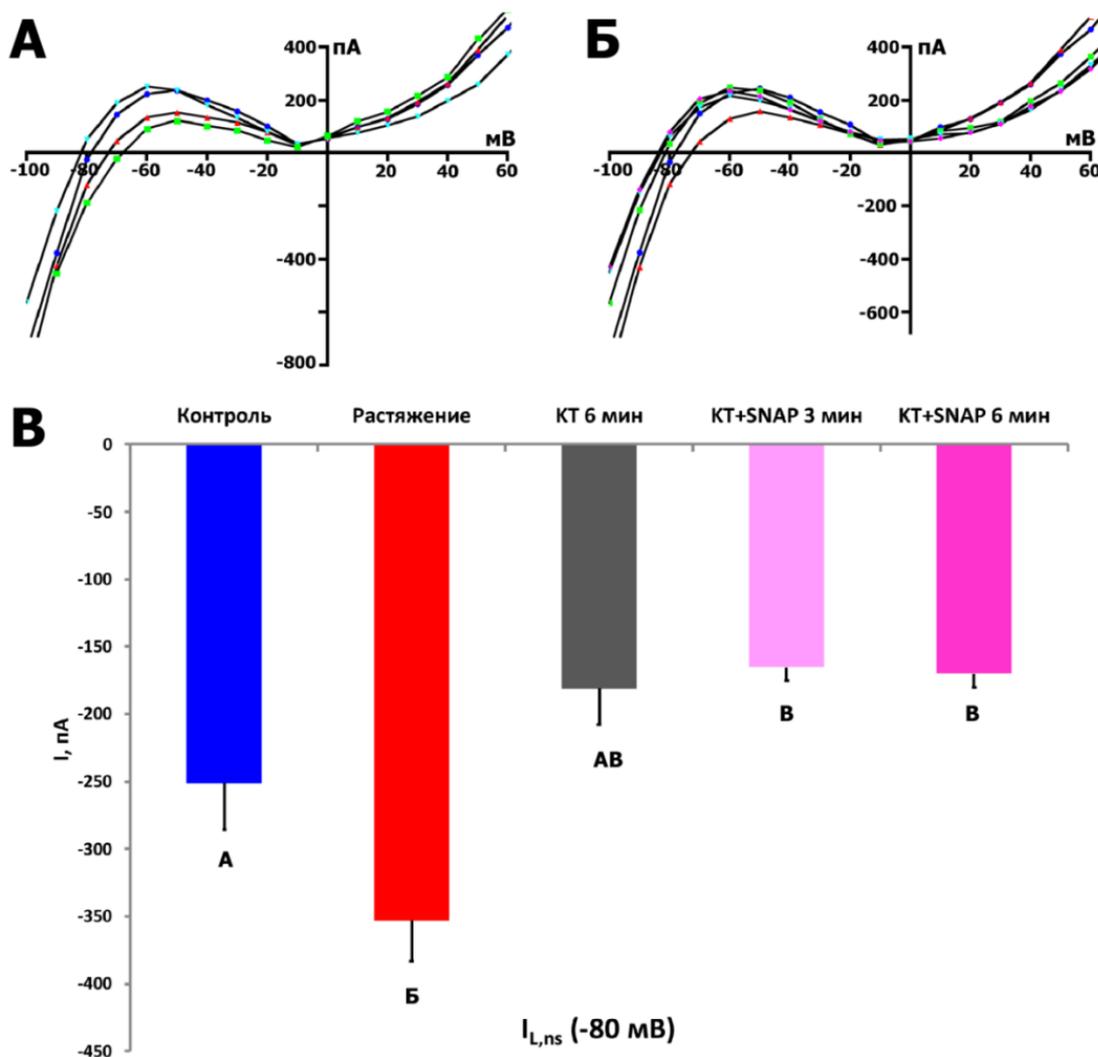


Рисунок 19. Влияние КТ-5823 (1 мкмоль/л) и его комбинации со SNAP (200 мкмоль/л) на активируемый растяжением катионный неселективный ток ($I_{L,ns}$). А – Зависимость I_{SAC} от потенциала у растянутой клетки (в контроле – синие кружки), после растяжения на 6 мкм (красные треугольники), через 3 мин (зеленые квадраты) и через 6 мин (перевернутые голубые треугольники) постоянной перфузии КТ5823 на фоне растяжения. Б – Зависимость I_{SAC} от потенциала у растянутой клетки (в контроле – синие кружки), после растяжения на 6 мкм (красные треугольники), через 6 мин постоянной перфузии КТ5823 (зеленые квадраты) и через 3 мин (перевернутые голубые треугольники) и 6 мин (пурпурные ромбы) перфузии после добавления к раствору SNAP на фоне продолжающегося растяжения. Оригинальные кривые. В – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ на фоне растяжения клетки при последовательном добавлении в раствор КТ-5823 и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=5$, $m=4$.

настоящее время показано, что многие ионные каналы проявляют механосенситивность и имеют соответствующий воротный механизм. К их числу относятся, например, TRPC1, TRPC5, и TRPC6 каналы, о которых также сообщалось, как о механочувствительных (Kerstein et al., 2013; Gomis et al., 2008; Sharif-Naeini et al., 2008). При этом, на примере одного и того же механосенситивного канала TRPC6 показана возможность увеличения и уменьшения его проводимости при фосфорилировании. Показано, что фосфорилирование потенцирует проводимость канала. Модификация может происходить в исходном состоянии или после активации TRPC6 (Hisatsune et al., 2004; Shi et al., 2013). С другой стороны, было показано, что фосфорилирование негативно регулирует TRPC6 посредством пути NO-cGMP-PKG (Takahashi et al., 2008). Как показано (Dyachenko et al., 2009a; Dyachenko et al., 2009b), каналы TRPC6 являются наиболее вероятными кандидатами, обеспечивающими $I_{L,ns}$ и формирование I_{SAC} кардиомиоцитов желудочков у мышей. В этих исследованиях авторы применили технологии растяжения изолированных кардиомиоцитов, которые мы описали в наших ранних работах (Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2003) и применяли в данном исследовании. Однако, как показано далее (раздел 3.10), в кардиомиоцитах желудочков крысы данный тип каналов не экспрессируется, так что, вероятно, сходными свойствами может обладать другой канал семейства TRP или Piezo.

Отсутствие влияния КТ-5823 на ток I_{K1} у нерастянутой клетки можно объяснить тем, что cGMP ингибирует его PKG-независимым образом. Подобный механизм регуляции данного тока был продемонстрирован, например, для K_{ir} эндотелиальных клеток легочных сосудов (Shimoda et al., 2002).

В наших экспериментах добавление SNAP на фоне КТ-5823 существенно не влияет на токи.

На первый взгляд может показаться, что уменьшение I_{ns} и I_{SAC} и увеличение I_{K1} у растянутой клетки, вызванное блокированием PKG находится в противоречии с нашей гипотезой о ингибирующей роли NO-sGC-cGMP-PKG пути, однако, есть работа, в которой показано, что активация тока через канал активируемый cGMP происходит еще эффективнее при заблокированной PKG, так как существует отрицательная обратная связь между количеством PKG и активацией sGC (Castro et al., 2010). Так что есть серьезные основания предполагать, что основная роль в этом каскаде, в случае нашего исследования, отводится именно cGMP, а не PKG.

3.6. Влияние 8Br-cGMP на механосенситивные токи в кардиомиоците

В этой серии экспериментов кардиомиоциты перфузировали аналогом cGMP – 8-bromo-cGMP (8Br-cGMP) в концентрации 200 мкмоль/л, используемой обычно для изучения токов изолированных кардиомиоцитов (Koitabashi et al., 2010).

3.6.1. Участие 8Br-cGMP в модуляции мембранных токов I_{ns} и I_{K1} в K^+_{in}/K^+_{out} средах

На рис.20А,В представлены I/V кривые I_L тока в контроле в K^+_{in}/K^+_{out} среде и ее изменения при действии 8Br-cGMP через 3 мин и через 6 мин, а средние значения $I_{L,8Br-cGMP}$, I_{K1} и $\Delta I_{8Br-cGMP}$ сведены в таблицу 15. Из представленных данных следует, что перфузия клеток раствором 8Br-cGMP через 3 мин уменьшала I_{K1} на уровне -45 мВ и увеличивала ${}^3I_{L, 8Br-cGMP}$ на уровне -80 мВ. Через 6 мин величины ${}^6I_{L,8Br-cGMP}$ не изменялись. При этом за время регистрации наблюдали смещение V_0 в сторону деполяризации. Далее во времени изменений I_L не было. Выходящий ток на уровне +40 мВ менялся незначительно.

В дальнейших экспериментах через 6 мин действия 8Br-cGMP в перфузионный раствор дополнительно вводили 200 мкмоль/л SNAP. На рис. 20Б,В представлено изменение I_L тока в контроле, через 6 мин перфузии 8Br-cGMP и еще через 3 и 6 мин после дополнительного введения SNAP. На фоне 8Br-cGMP введение SNAP через 3 и 6 мин не приводило к существенным изменениям I_{K1} , но ингибировало вызванный 8Br-cGMP входящий катион неселективный ток, возвращая его к контрольным значениям. Применение SNAP снимало вызванную 8Br-cGMP деполяризацию (Таблица 15). Выходящие токи на уровне +40 мВ не менялись.

Таким образом, под действием 8Br-cGMP в течение 6 мин происходило увеличение входящего катион неселективного тока и деполяризация V_0 , после чего изменений не наблюдали, а дальнейшее введение в перфузионный раствор SNAP устраняло этот 8Br-cGMP-индуцированный ток.

3.6.2. 8Br-cGMP уменьшает I_{SAC}

Как продемонстрировано на рисунке 21А растяжение клеток на 6 мкм вызывает индуцированное растяжением клеток смещение величины I_{K1} к более отрицательным значениям и увеличение $I_{L,ns}$, значения которого и значения I_{SAC} приведены в таблице 16. Показано характерное смещение V_0 в сторону деполяризации. На фоне растяжения клетки введение 200 мкмоль/л 8Br-cGMP уже через 3 мин вызывало восстановление до значений, близких к исходным I_{K1} и $I_{SAC,8Br-cGMP}$ на уровне -80 мВ, причем V_0 также возвращался к исходным значениям. Эти изменения сохранялись и через 6 мин регистрации.

В дальнейших экспериментах (Рис.21Б,В и таблица 17) на фоне растяжения клетки через 6 мин действия 8Br-cGMP регистрировали выше описанные изменения, после чего дополнительно вводили 200 мкмоль/л SNAP. Это приводило еще к большему ингибированию $I_{L,ns,8Br-cGMP+SNAP}$ и, соответственно, к уменьшению $I_{SAC,8Br-cGMP+SNAP}$ при -80 мВ, которое достигало достоверных значений к 6 минуте.

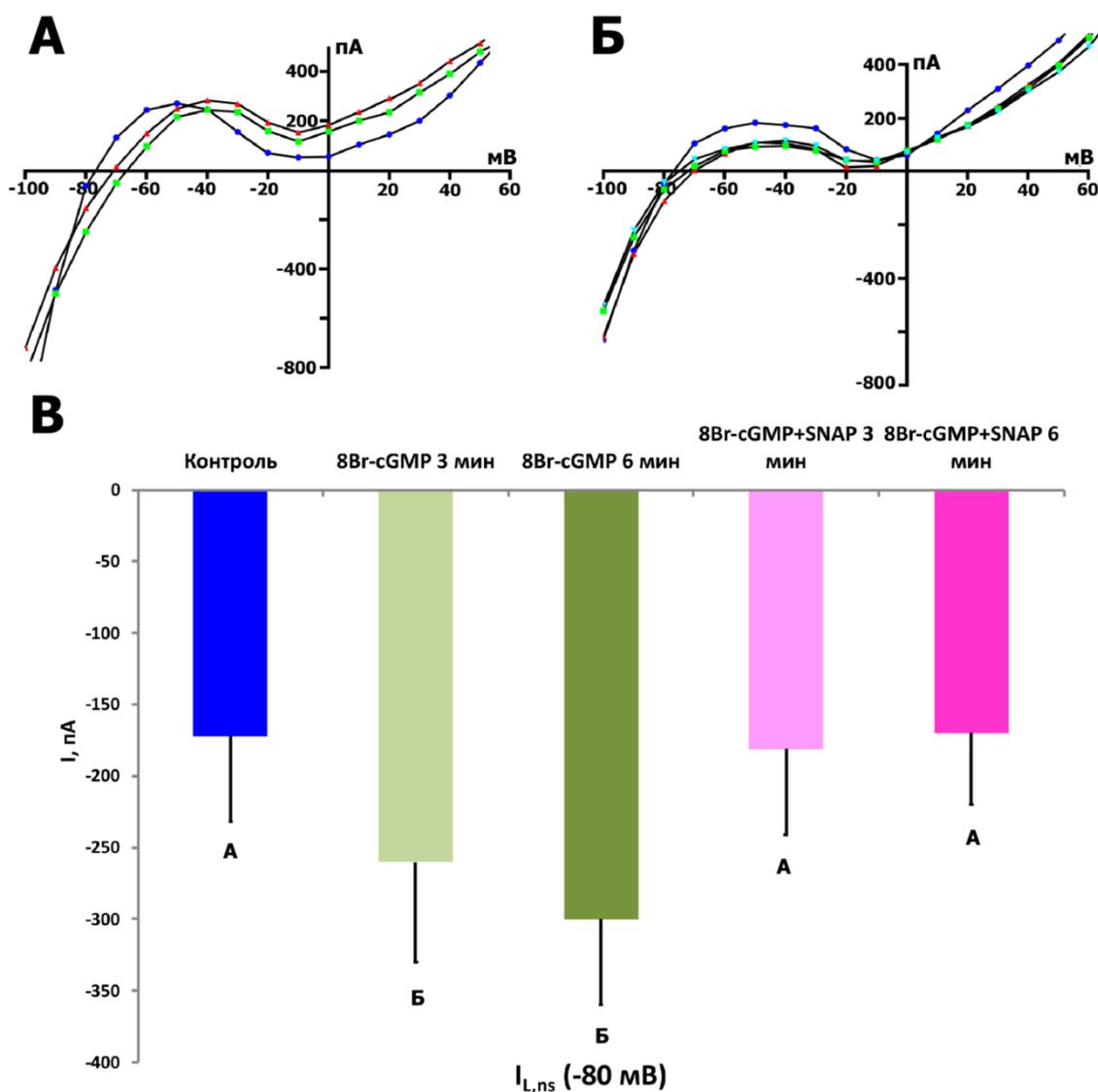


Рисунок 20. Влияние 8Br-cGMP в концентрации 200 мкмоль/л и сочетание его со SNAP в концентрации 200 мкмоль/л на I/V кривую позднего тока (I_L) нерастянутой клетки. А – изменения I_L у интактной клетки на фоне ее постоянной перфузии 8Br-cGMP в контроле (синие круги), через 3 мин (красные треугольники) и через 6 мин (зеленые квадраты). Оригинальная кривая. Б – изменения I_L под действием 8Br-cGMP с последующим добавлением в раствор SNAP. Синие круги – контроль, красные треугольники - 6 мин перфузии клетки с 8Br-cGMP, зеленые квадраты – 3 мин перфузии после добавления в раствор SNAP, перевернутые голубые треугольники – 6 мин со SNAP. Оригинальная кривая. В – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ у нерастянутой клетки при последовательном добавлении в раствор 8Br-cGMP и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=6$, $m=4$.

Таким образом, 8Br-cGMP ингибировал индуцированный растяжением ток I_{SAC} и частично устранял изменения I_{K1} , а дополнительное введение SNAP на фоне продолжающегося растяжения клетки еще в большей степени ингибировало $I_{L,ns}$ так, что его значения становились близкими к исходным.

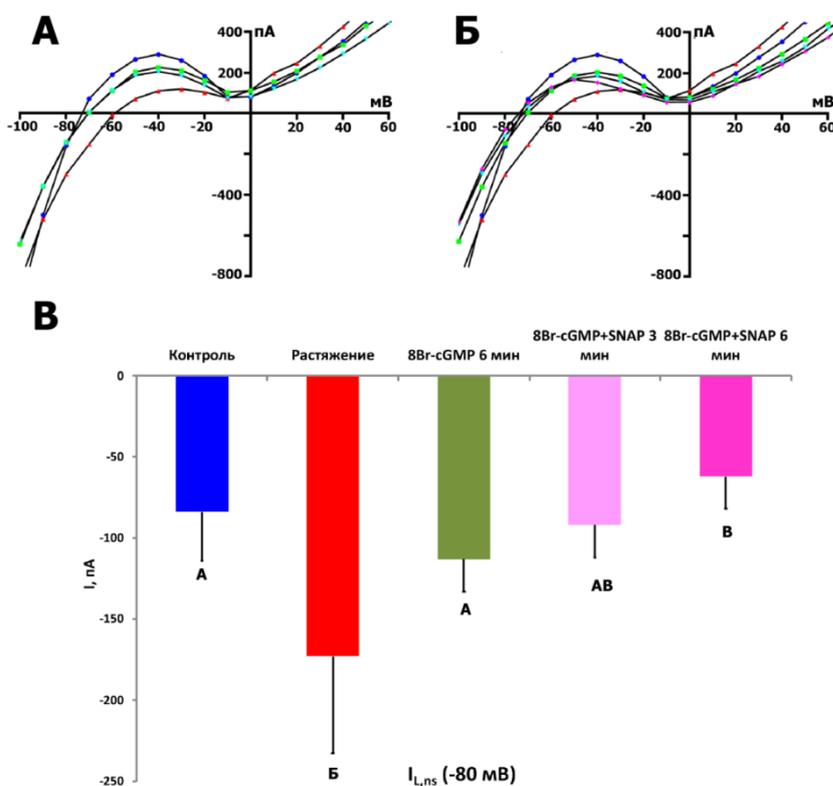


Рисунок 21. Влияние 8Br-cGMP в концентрации 200 мкмоль/л и сочетание его со SNAP в концентрации 200 мкмоль/л на активируемый растяжением клетки катион неселективный ток ($I_{L,ns}$). А – изменения I_{SAC} у растянутой клетки в контроле (синие круги), после растяжения на 6 мкм (красные треугольники), через 3 мин (зеленые квадраты) и через 6 мин (перевернутые голубые треугольники) постоянной перфузии 8Br-cGMP на фоне растяжения (оригинальная кривая). Б – изменения I_{SAC} у растянутой клетки в контроле (синие круги), после растяжения на 6 мкм (красные треугольники), через 6 мин постоянной перфузии 8Br-cGMP (зеленые квадраты) и через 3 мин (перевернутые голубые треугольники) и 6 мин (пурпурные ромбы) перфузии после добавления в раствор SNAP на фоне продолжающегося растяжения Оригинальная кривая. В – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ на фоне растяжения клетки при последовательном добавлении в раствор 8Br-cGMP и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=5$, $m=4$.

Таблица 15. Амплитуда индуцированного 8Br-cGMP позднего тока через неселективные катионные каналы $I_{L,8Br-cGMP}$, дифференциальный ток $\Delta I_{8Br-cGMP}$, I_L и дифференциальный ток после дополнительного введения SNAP ($I_{L,8Br-cGMP+SNAP}$ и $\Delta I_{8Br-cGMP+SNAP}$, соответственно), описанная из I/V кривых позднего тока (I_L) при -45, -80 и +40 мВ при 200 мкмоль/л 8Br-cGMP после 3 и 6 мин перфузии и последующего добавления SNAP на фоне продолжающейся перфузии 8Br-цГМФ. Поддерживаемый потенциал (V_{hp}) = -45 мВ. V_0 - пересечение результирующей I/V кривой с осью потенциала при нулевом токе представляло собой потенциал нулевого тока, который соответствовал потенциалу покоящейся мембраны у клетки с нефиксированным потенциалом (от - 70 до - 80 мВ). K_{in}^+/K_{out}^+ среда. Среднее значение \pm SD, n = количество экспериментов (клеток), m = количество крыс. I_L (нА) – измеренные из I/V кривых величины тока при указанных в таблице потенциалах. Дифференциальные токи $\Delta I_{8Br-cGMP}$ и $\Delta I_{8Br-cGMP+SNAP}$, которые возникают, когда значения I_L смещаются в более отрицательное направление относительно контрольных значений, условно обозначаются знаком минус (-), а дифференциальные токи, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более положительное направление, условно обозначаются знаком плюс (+). Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

Наименование	V, (мВ)	n	m	Контроль		8Br-cGMP 200 мкмоль/л, 3 мин перфузии			8Br-cGMP 200 мкмоль/л, 6 мин перфузии		
				V_0 (мВ)	I_L (нА)	V_0 (мВ)	${}^3I_{L,8Br-cGMP}$ (нА)	${}^{3/C}\Delta I_{8Br-cGMP}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,8Br-cGMP}$ (нА)	${}^{6/C}\Delta I_{8Br-cGMP}$ (нА)
Колонки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ступеньки фиксации потенциала от V_h до	-45	6	4	-78 ± 1^a	$+0.290 \pm 0.04^a$	70 ± 1^b	$+0.232 \pm 0.05^b$	$(-)0.061 \pm 0.02$	69 ± 1^b	$+0.212 \pm 0.05^{bB}$	$(-)0.088 \pm 0.02$
	-80	6	4		-0.172 ± 0.04^a		-0.260 ± 0.06^b	$(-)0.093 \pm 0.03$		-0.300 ± 0.06^b	$(-)0.135 \pm 0.05$
	+40	6	4		$+0.463 \pm 0.05^a$		$+0.477 \pm 0.05^a$	$(+)0.055 \pm 0.03$		$+0.478 \pm 0.05^a$	$(+)0.056 \pm 0.04$

Продолжение 8Br-cGMP 200 мкмоль/л; SNAP, 200 мкмоль/л; 3 мин перфузии			Продолжение 8Br-cGMP 200 мкмоль/л; SNAP, 200 мкмоль/л; 6 мин перфузии		
V_0 (мВ)	${}^3I_{L,8Br-cGMP+SNAP}$ (нА)	${}^{3/C}\Delta I_{8Br-cGMP+SNAP}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,8Br-cGMP+SNAP}$ (нА)	${}^{6/C}\Delta I_{8Br-cGMP+SNAP}$ (нА)
12	13	14	15	16	17
78 ± 1^a	$+0.203 \pm 0.04^B$	$(-)0.086 \pm 0.03$	78 ± 1^a	$+0.205 \pm 0.04^B$	$(-)0.081 \pm 0.01$
	-0.181 ± 0.05^a	$(-)0.022 \pm 0.02$		-0.170 ± 0.0^a	$(+)0.016 \pm 0.03$
	$+0.460 \pm 0.04^a$	$(-)0.027 \pm 0.04$		$+0.455 \pm 0.05^a$	$(-)0.038 \pm 0.02$

Таблица 16. Амплитуда тока через активированные растяжением неселективные катионные каналы $I_{L,ns}$, дифференциальный ток через активированные растяжением каналы I_{SAC} , $I_{L,ns}$ и I_{SAC} после применения 8Br-cGMP (200 мкмоль/л) на фоне растяжения клеток ($I_{L,ns,8Br-cGMP}$ и $I_{SAC,8Br-cGMP}$, соответственно) и после дополнительного применения SNAP (200 мкмоль/л) на фоне продолжающейся перфузии 8Br-cGMP ($I_{L,ns,8Br-cGMP+SNAP}$ и $I_{SAC,8Br-cGMP+SNAP}$, соответственно), описанные из I/V кривых позднего тока (I_L) при -45, -80 и +40 мВ. Поддерживаемый потенциал (V_{hp}) = -45 мВ. V_0 - пересечение результирующей I/V кривой с осью потенциала при нулевом токе представляло собой потенциал нулевого тока, который соответствовал потенциалу покоящейся мембраны неклямпированной клетки (от -70 до -80 мВ). K_{in}^+/K_{out}^+ среда. Среднее значение \pm SD, n = количество экспериментов (клеток), m = количество крыс. Дифференциальные токи I_{SAC} , $I_{SAC,8Br-cGMP}$ и $I_{SAC,8Br-cGMP+SNAP}$, которые возникают, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более отрицательное направление относительно контрольных значений, условно обозначаются знаком минус (-), а дифференциальные токи, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более положительное направление, условно обозначаются знаком плюс (+). Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

Наименование	V, (мВ)	n	m	Контроль		Растяжение 6 мкм			Растяжение 6 мкм + 8Br-cGMP 200 мкмоль/л, перфузия - 6 мин		
				V_0 (мВ)	I_L (нА)	V_0 (мВ)	$I_{L,ns}$ (нА)	I_{SAC} (нА)	V_0 (мВ)	${}^6C I_{L,ns,8Br-cGMP}$ (нА)	${}^6C I_{SAC,8Br-cGMP}$ (нА)
Колонки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ступеньки фиксации потенциала от V_h до	-45	5	4	-77 \pm 2 ^a	+0.218 \pm 0.05 ^a	-55 \pm 2 ^b	+0.102 \pm 0.03 ^b	(-)0.149 \pm 0.02	-75 \pm 2 ^a	+0.139 \pm 0.03 ^b	(-)0.079 \pm 0.01
	-80	5	4		-0.084 \pm 0.02 ^a		-0.173 \pm 0.04 ^b	(-)0.122 \pm 0.02		-0.113 \pm 0.02 ^a	(-)0.041 \pm 0.01
	+40	5	4		+0.389 \pm 0.02 ^a		+0.421 \pm 0.01 ^a	(+)0.036 \pm 0.02		+0.342 \pm 0.03 ^b	(-)0.047 \pm 0.02

Продолжение перфузии растянутой клетки с 8Br-cGMP 200 мкмоль/л + SNAP 200 мкмоль/л, 3 мин			Продолжение перфузии растянутой клетки с 8Br-cGMP 200 мкмоль/л + SNAP, 200 мкмоль/л, 6 мин		
V_0 (мВ)	${}^3C I_{L,ns,8Br-cGMP+SNAP}$ (нА)	${}^3C I_{SAC,8Br-cGMP+SNAP}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6C I_{L,ns,8Br-cGMP+SNAP}$ (нА)	${}^6C I_{SAC,8Br-cGMP+SNAP}$ (нА)
12	13	14	15	16	17
-75 \pm 2 ^a	+0.135 \pm 0.03 ^b	(-)0.094 \pm 0.01	-77 \pm 2 ^a	+0.137 \pm 0.01 ^b	(-)0.092 \pm 0.02
	-0.092 \pm 0.02 ^{ab}	(-)0.037 \pm 0.01		-0.062 \pm 0.02 ^b	(+)0.045 \pm 0.02
	+0.287 \pm 0.03 ^b	(-)0.092 \pm 0.01		+0.275 \pm 0.03 ^b	(-)0.104 \pm 0.01

Таблица 17. Амплитуда индуцированного аскорбиновой кислотой (AA) позднего тока через неселективные катионные каналы $I_{L,AA}$, дифференциальный ток ΔI_{AA} , I_L и дифференциальный ток после дополнительного введения SNAP ($I_{L,AA+SNAP}$ и $\Delta I_{AA+SNAP}$, соответственно), описанная из I/V кривых позднего тока (I_L) при -45, -80 и +40 мВ при применении 10 мкмоль/л аскорбиновой кислоты после 3 и 6 мин перфузии и последующего добавления SNAP на фоне продолжающейся перфузии аскорбиновой кислоты. Поддерживаемый потенциал (V_{hp}) = -45 мВ. V_0 - пересечение результирующей I/V кривой с осью потенциала при нулевом токе представляло собой потенциал нулевого тока, который соответствовал потенциалу покоящейся мембраны у клетки с нефиксированным потенциалом (от -70 до -80 мВ). K_{in}^+/K_{out}^+ среда. Среднее значение \pm SD, n = количество экспериментов (клеток), m = количество крыс. I_L (нА) – измеренные из I/V кривых величины тока при указанных в таблице потенциалах. Дифференциальные токи ΔI_{AA} и $\Delta I_{AA+SNAP}$, которые возникают, когда значения I_L смещаются в более отрицательное направление относительно контрольных значений, условно обозначаются знаком минус (-), а дифференциальные токи, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более положительное направление, условно обозначаются знаком плюс. Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

Наименование	V, (мВ)	n	m	Контроль		AA 10 мкмоль/л, 3 мин перфузии			AA 10 мкмоль/л, 6 мин перфузии		
				V_0 (мВ)	I_L (нА)	V_0 (мВ)	${}^3I_{L,AA}$ (нА)	${}^{3/C}\Delta I_{AA}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,AA}$ (нА)	${}^{6/C}\Delta I_{AA}$ (нА)
Колонки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ступеньк и фиксации потенциала от V_h до	-45	7	4	-76 \pm 1 ^a	+0.261 \pm 0.05 ^a	-75 \pm 3 ^a	+0.233 \pm 0.03 ^{ab}	(-)0.036 \pm 0.005	-77 \pm 4 ^a	+0.215 \pm 0.04 ^{ab}	(-)0.054 \pm 0.01
	-80	7	4		-0.204 \pm 0.03 ^a		-0.207 \pm 0.04 ^a	(-)0.018 \pm 0.007		-0.203 \pm 0.05 ^a	(-)0.012 \pm 0.004
	+40	7	4		+0.375 \pm 0.05 ^a		+0.337 \pm 0.07 ^a	(-)0.039 \pm 0.01		+0.322 \pm 0.07 ^a	(-)0.065 \pm 0.01

Продолжение AA 10 мкмоль/л; SNAP, 200 мкмоль/л; 3 мин перфузии			Продолжение AA 10 мкмоль/л; SNAP, 200 мкмоль/л; 6 мин перфузии		
V_0 (мВ)	${}^3I_{L,AA+SNAP}$ (нА)	${}^{3/C}\Delta I_{AA+SNAP}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,AA+SNAP}$ (нА)	${}^{6/C}\Delta I_{AA+SNAP}$ (нА)
12	13	14	15	16	17
-77 \pm 4 ^a	+0.206 \pm 0.03 ^b	(-)0.051 \pm 0.01	-77 \pm 3 ^a	+0.207 \pm 0.03 ^b	(-)0.046 \pm 0.003
	-0.152 \pm 0.03 ^{ab}	(+)0.045 \pm 0.02		-0.135 \pm 0.03 ^b	(+)0.063 \pm 0.05
	+0.323 \pm 0.06 ^a	(-)0.105 \pm 0.02		+0.319 \pm 0.05 ^a	(-)0.111 \pm 0.04

Таблица 18. Амплитуда тока через активированные растяжением неселективные катионные каналы $I_{L,ns}$, дифференциальный ток через активированные растяжением каналы I_{SAC} , $I_{L,ns}$ и I_{SAC} после применения аскорбиновой кислоты (AA) (10 мкмоль/л) на фоне растяжения клеток ($I_{L,ns,AA}$ и $I_{SAC,AA}$, соответственно) и после дополнительного введения в перфузионный раствор SNAP (200 мкмоль/л) на фоне продолжающейся перфузии аскорбиновой кислоты ($I_{L,ns,AA+SNAP}$ и $I_{SAC,AA+SNAP}$, соответственно), описанные из I/V кривых позднего тока (I_L) при -45, -80 и +40 мВ. Поддерживаемый потенциал (V_{hp}) = -45 мВ. V_0 - пересечение результирующей I/V кривой с осью потенциала при нулевом токе представляло собой потенциал нулевого тока, который соответствовал потенциалу покоящейся мембраны неклямпированной клетки (от -70 до -80 мВ). K^+_{in}/K^+_{out} среда. Среднее значение \pm SD, n = количество экспериментов (клеток), m = количество крыс. Дифференциальные токи I_{SAC} , $I_{SAC,AA}$ и $I_{SAC,AA+SNAP}$, которые возникают, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более отрицательное направление относительно контрольных значений, условно обозначаются знаком минус (-), а дифференциальные токи, когда значения $I_{L,ns}$ смещаются в более положительное направление, условно обозначаются знаком плюс (+). Одинаковые буквы в верхнем индексе значения обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками в строке ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$).

Наименование	V_0 (мВ)	n	m	Контроль		Растяжение 6 мкм			Растяжение 6 мкм + AA 10 мкмоль/л, перфузия - 6 мин		
				V_0 (мВ)	I_L (нА)	V_0 (мВ)	$I_{L,ns}$ (нА)	I_{SAC} (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,ns,AA}$ (нА)	${}^6I_{SAC,AA}$ (нА)
Колонки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ступеньки фиксации потенциала от V_h до	-45	5	4	-77 ± 1^a	$+0.326 \pm 0.04^a$	-55 ± 2^b	$+0.061 \pm 0.01^b$	$(-)0.255 \pm 0.02$	-75 ± 2^a	$+0.270 \pm 0.02^b$	$(-)0.052 \pm 0.01$
	-80	5	4		-0.198 ± 0.03^a		-0.458 ± 0.03^b	$(-)0.258 \pm 0.03$		-0.200 ± 0.03^a	$(-)0.003 \pm 0.01$
	+40	5	4		$+0.307 \pm 0.02^a$		$+0.523 \pm 0.03^b$	$(+)0.219 \pm 0.03$		$+0.319 \pm 0.04^a$	$(+)0.017 \pm 0.01$

Продолжение перфузии растянутой клетки с AA 10 мкмоль/л + SNAP 200 мкмоль/л, 3 мин			Продолжение перфузии растянутой клетки с AA 10 мкмоль/л + SNAP, 200 мкмоль/л, 6 мин		
V_0 (мВ)	${}^3I_{L,ns,AA+SNAP}$ (нА)	${}^3I_{SAC,AA+SNAP}$ (нА)	V_0 (мВ)	${}^6I_{L,ns,AA+SNAP}$ (нА)	${}^6I_{SAC,AA+SNAP}$ (нА)
12	13	14	15	16	17
-75 ± 2^a	$+0.295 \pm 0.03^{ab}$	$(-)0.029 \pm 0.006$	-77 ± 2^a	$+0.306 \pm 0.03^{ab}$	$(-)0.018 \pm 0.01$
	-0.196 ± 0.03^a	$(+)0.001 \pm 0.002$		-0.190 ± 0.02^a	$(+)0.007 \pm 0.002$
	$+0.310 \pm 0.03^a$	$(-)0.002 \pm 0.003$		$+0.308 \pm 0.03^a$	$(-)0.002 \pm 0.002$

3.6.3. Причины ингибирования $I_{L,ns}$ под действием 8Br-cGMP у нерастянутой клетки, но уменьшение I_{SAC} у растянутой

У нерастянутой клетки аналог cGMP, названный 8Br-cGMP, увеличивает входящий катион неселективный ток $I_{L,ns}$ на уровне -80 мВ, смещая V_0 в сторону деполяризации. Как было показано выше наиболее вероятными кандидатами, обеспечивающими $I_{L,ns}$ и формирование I_{SAC} в наших экспериментах являются каналы семейства TRP или Piezo, обладающие схожими свойствами с каналами TRPC6, экспрессируемыми в кардиомиоцитах желудочков мышей (Dyachenko et al., 2009a; Dyachenko et al., 2009b), для которых показана возможность увеличения и уменьшения их проводимости при фосфорилировании. По-видимому, эта особенность может быть связана с тем, что КТ-5823 уменьшал $I_{L,ns}$ у нерастянутой клетки, а 8Br-cGMP этот ток увеличивал. SNAP устраняет 8Br-cGMP-индуцированный ток, по аналогии с тем, как SNAP устраняет I_{SAC} .

Введение в перфузионный раствор 8Br-cGMP ингибирует индуцированный растяжением ток I_{SAC} , как это и должно происходить за счет активации PKG. Интересно, что ингибирование тока касалось только I_{SAC} , возникшего на фоне растяжения клетки. Таким образом, 8Br-cGMP оказывал характерное действие только на вызванный растяжением клеток I_{SAC} , действуя противоположным образом на $I_{L,ns}$, если он не был активирован растяжением клетки. При перфузии 8Br-cGMP на фоне растяжения клетки дополнительное введение SNAP еще в большей степени ингибировало $I_{L,ns}$ так, что его значения становились меньше исходных. Мы рассматриваем эту реакцию клетки, как типичную реакцию при ее растянутом состоянии и связываем либо с активацией дополнительного количества PKG, либо (скорее) с прямым действием 8-Br-cGMP на каналы, либо активацией какого-то побочного продукта действия cGMP. Учитывая отсутствие бифазного влияния 8Br-cGMP на I_{SAC} , которое мы наблюдали в случае КТ-5823 и связывали его с вероятной отрицательной обратной связью, оказываемую PKG на образование cGMP (Castro et al., 2010), мы склоняемся к версии, что

именно сам cGMP (либо его продукт отличный от PKG) принимает участие в ингибировании I_{SAC} .

3.7. Влияние аскорбиновой кислоты на механосенситивные токи в кардиомиоците

В этой серии экспериментов проверяли альтернативный механизм модуляции входящего катион неселективного тока, в обход пути, активируемого рецептором, при котором NO непосредственно модифицирует свободные сульфгидрильные группы, индуцирует S-нитрозилирование и открывает ворота канала (Liu et al., 2020). Для выявления NO-индуцированного S-нитрозилирования использовали ингибитор S-нитрозилирования аскорбиновую кислоту (Ohtani et al., 2012), который более специфично ингибирует S-нитрозилирование, чем дитиотреитол и мало влияет на формирование дисульфидных мостиков. Применялись концентрации 1 и 10 мкмоль/л, однако отличий в эффекте при этих концентрациях не наблюдалось.

3.7.1. Участие аскорбиновой кислоты в модуляции мембранных токов I_{ns} и I_{K1} в K^+_{in}/K^+_{out} средах

На рисунке 22А,В представлено изменение I_L тока в контроле в K^+_{in}/K^+_{out} среде и его изменения при действии аскорбиновой кислоты через 3 мин и через 6 мин, а средние значения $I_{L,AA}$, I_{K1} и ΔI_{AA} сведены в таблицу 17. Из представленных данных следует, что перфузия клеток раствором аскорбиновой кислоты через 3 и 6 мин практически не меняла ни форму N-образной кривой, ни величины токов I_{K1} , $I_{L,AA}$ или ΔI_{AA} , ни V_0 хотя мы регистрировали тенденцию к незначительному уменьшению этих токов (таблица 17). Данный феномен можно объяснить, приняв во внимание известный факт, что даже без механического воздействия на кардиомиоциты, за счет адгезии клетки к стеклу дна перфузионной камеры, небольшое –

фоновое количество SAC открыты и аскорбиновая кислота может ингибировать их S-нитрозилирование.

В следующей серии через 6 мин действия аскорбиновой кислоты дополнительно вводили 200 мкмоль/л SNAP. На рис.22Б,В представлены I/V кривые I_L тока в контроле, через 6 мин перфузии аскорбиновой кислотой и еще через 3 и 6 мин после дополнительного введения SNAP. Введение NO донора на фоне аскорбиновой кислоты через 3 минуты вызывает уменьшение величины $I_{L,AA+SNAP}$ и $\Delta I_{AA+SNAP}$ на уровне -80 мВ, которое достигает достоверных значений к 6 минуте, однако практически не затрагивает I_{K1} и выходящие токи на уровне +40 мВ (таблица 17).

Таким образом, под действием аскорбиновой кислоты не происходило значимого изменение входящего катион неселективного тока, а дальнейшее добавление SNAP вызывало его ингибирование.

3.7.2. Аскорбиновая кислота ингибирует I_{SAC}

Как продемонстрировано на рис.23А,В растяжение клеток на 6 мкм вызывает индуцированное растяжением клеток уменьшение I_{K1} и увеличение $I_{L,ns}$, значения которого и значения I_{SAC} приведены в таблице 18. При этом V_0 смещается в сторону деполяризации. На фоне растяжения клетки введение 10 мкмоль/л аскорбиновой кислоты через 6 мин значения токов ${}^6I_{L,ns,AA}$ и ${}^{6/C}\Delta I_{SAC,AA}$ достигали исходных значений. Также I_{K1} и V_0 возвращались в исходное состояние.

В дальнейших экспериментах (Рис.23Б,В и таблица 18) на фоне растяжения клетки через 6 мин действия аскорбиновой кислоты и регистрации устранения индуцированных растяжением токов, дополнительно вводили SNAP, который значимо не влиял на величины токов по сравнению с контрольными значениями.

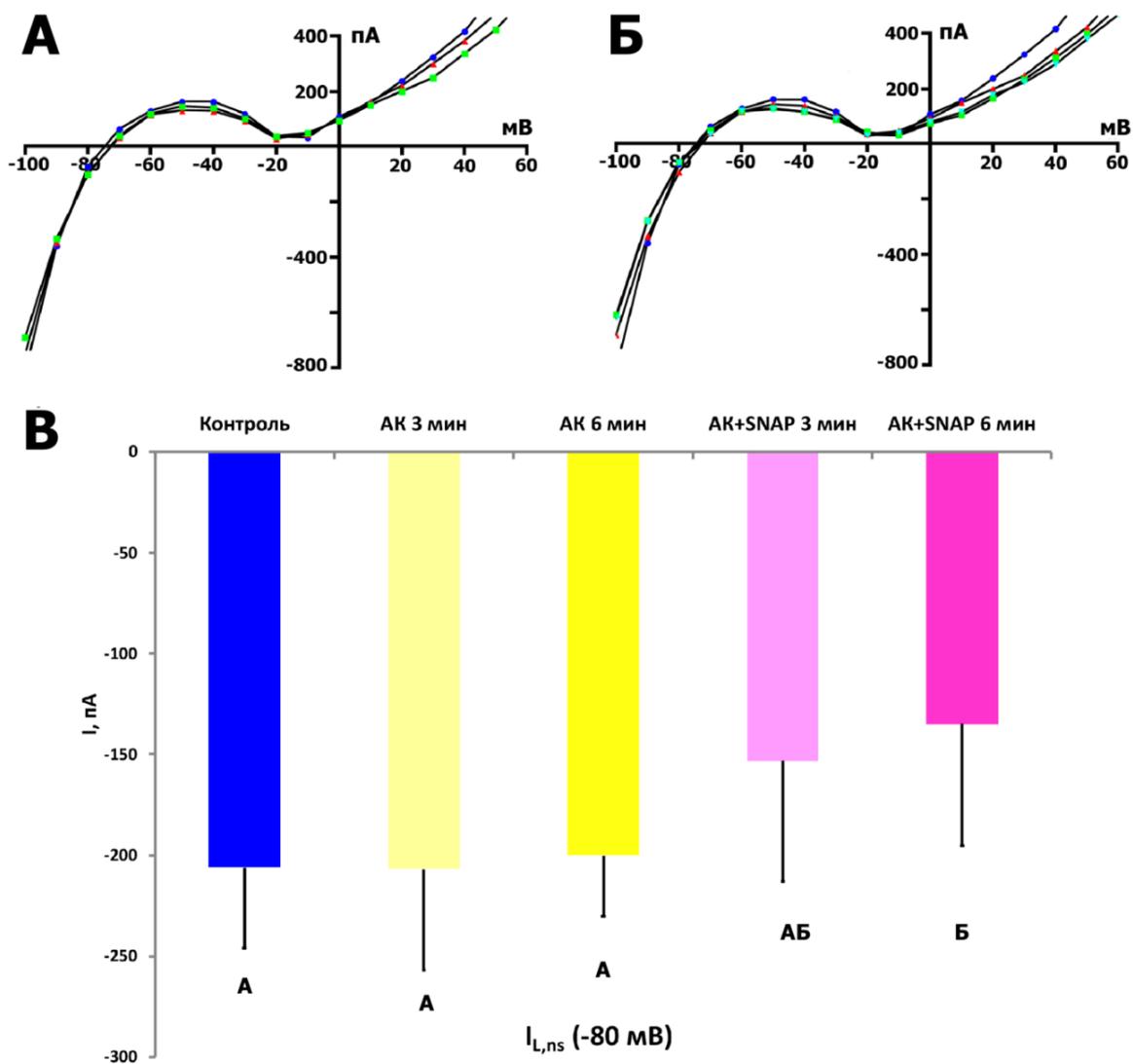


Рисунок 22. Влияние аскорбиновой кислоты (10 мкмоль/л) и ее комбинации со SNAP (200 мкмоль/л) на I_L (оригинальная кривая). А – изменение I_L в интактной клетке на фоне постоянной перфузии аскорбиновой кислотой в контроле (синие кружки), через 3 мин (красные треугольники) и через 6 мин (зеленые квадраты). Б – изменение I_L под действием аскорбиновой кислоты при последующем добавлении к раствору SNAP (оригинальная кривая). Синие кружки – контроль, красные треугольники – 6 мин перфузии клеток аскорбиновой кислотой, зеленые квадраты – 3 мин перфузии после добавления раствора SNAP, перевернутые голубые треугольники – 6 мин SNAP. В – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ у нерастянутой клетки при последовательном добавлении в раствор аскорбиновой кислоты (АК) и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=7$, $m=4$.

Таким образом, наши результаты демонстрируют, что ингибитор S-нитрозилирования – аскорбиновая кислота полностью устраняет I_{SAC} , вызванный растяжением кардиомиоцита, а дополнительно введенный в среду SNAP не влияет на токи.

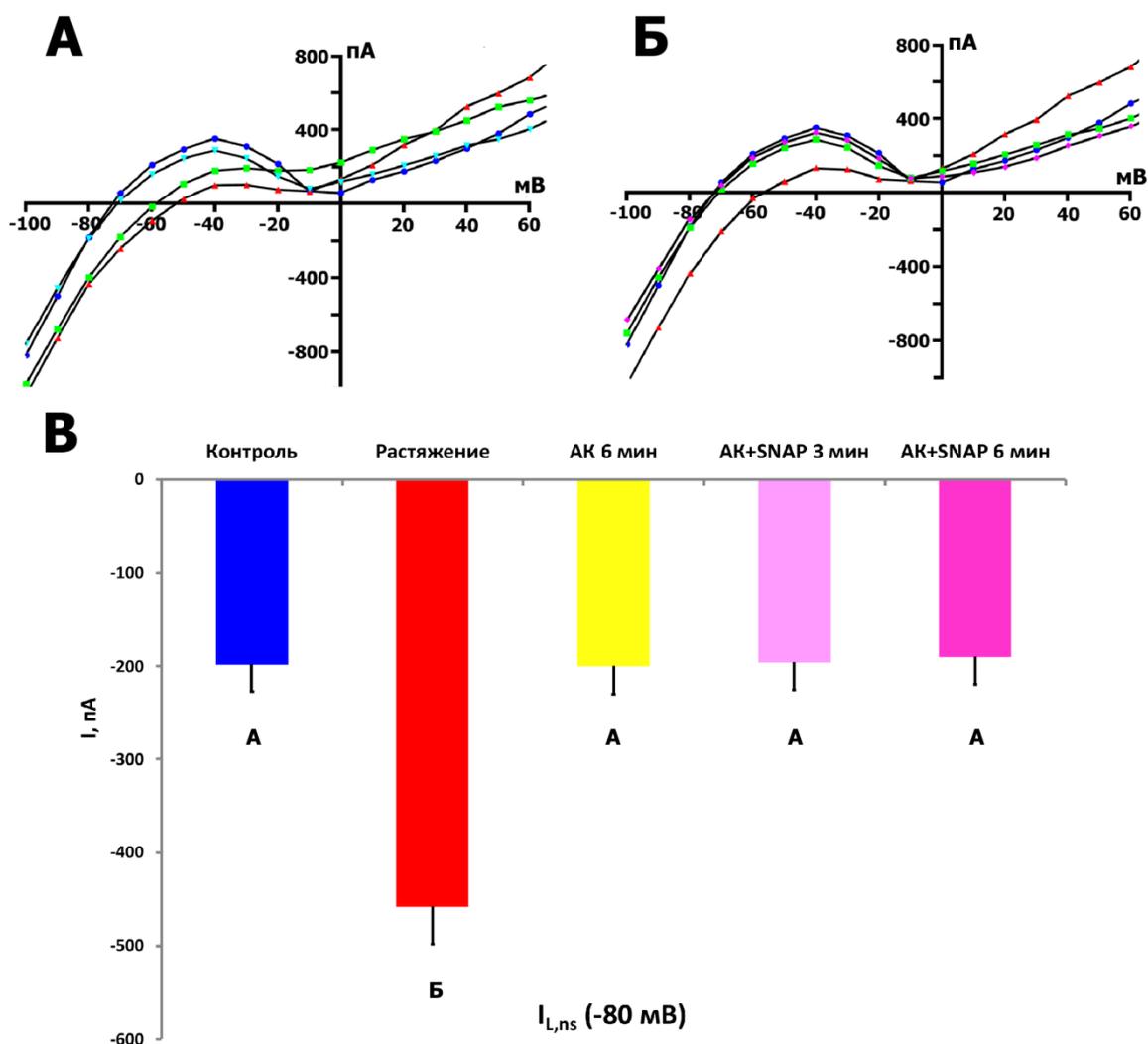


Рисунок 23. Влияние аскорбиновой кислоты (10 мкмоль/л) и ее комбинации со SNAP (200 мкмоль/л) на I_L у растянутой клетки. А – Изменения I_{SAC} в растянутой клетке (оригинальная кривая). Контроль (синие кружки), после растяжения клетки на 6 мкм (красные треугольники), через 3 мин (зеленые квадраты) и через 6 мин (перевернутые голубые треугольники) постоянной перфузии аскорбиновой кислотой на фоне растяжения. Б – Изменения I_{SAC} в растянутой клетке (оригинальная кривая). Контроль (синие кружки), после растяжения на 6 мкм (красные треугольники), через 6 мин постоянной перфузии аскорбиновой кислотой (зеленые квадраты) и через 6 мин

(пурпурные ромбы) перфузии после добавления к раствору SNAP на фоне продолжающегося растяжения. В – Диаграмма изменения тока $I_{L,ns}(-80)$ на фоне растяжения при последовательном добавлении в раствор аскорбиновой кислоты (АК) и SNAP. Одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий между столбиками ($p > 0,05$), разные – достоверные различия ($p < 0,05$). $n=5$, $m=4$.

3.7.3. Почему ингибитор S-нитрозилирования SACs, аскорбиновая кислота устраняет I_{SAC}

За последние 10 лет не было ясно, за счет чего NO, является модулятором путей механотрансдукции в сердце: посредством прямого нитрозилирования или активации PKG. В совокупности, приведенные выше результаты этой работы, показали, что эндогенная продукция NO сердечными миоцитами на фоне их растяжения, вызывает прямую модуляцию работы SAC. Можно полагать, что результирующая продукция NO оказывает свое действие независимо от cGMP, скорее всего, посредством S-нитрозилирования.

Это в большей степени подтверждают эксперименты, в которых у нерастянутой клетки ингибитор S-нитрозилирования – аскорбиновая кислота практически не менял входящий катион неселективный ток $I_{L,ns}$, и дальнейшее добавление SNAP вызывало его ингибирование с первой минуты. В этом случае мы можем предположить, что отсутствие эффекта SNAP связано, прежде всего, с блокадой S-нитрозилирования. Более того, двухфазный эффект SNAP может быть вызван S-нитрозилированием SACs, в результате чего временно появляется SNAP-индуцированный ток, который блокируется Gd^{3+} и является аналогом I_{SAC} . Во всяком случае, в основе этого тока лежит $I_{L,ns}$. Эффект ингибирования $I_{L,ns}$, возникающий через 3 – 5 мин после активации связан, по-видимому, с реализацией пути NO-sGC–cGMP–PKG, и фосфорилированием SACs, что приводит к уменьшению их проводимости. Однако главное, что ингибитор S-нитрозилирования полностью устраняет I_{SAC} , вызванный растяжением кардиомиоцита, а

дополнительно введенный в среду SNAP не влияет на $I_{L,ns}$ по сравнению с контролем. Очевидно, что полное устранение I_{SAC} с помощью аскорбиновой кислоты можно объяснить, прежде всего, блокадой нитрозилирования SAC. В этом случае SNAP не может проявить свой активирующий эффект.

NOS-производный NO оказывает различные эффекты. Например, NO может посттрансляционно модифицировать белки-мишени, прежде всего, за счет добавления нитрозогруппы к сульфгидрильной боковой цепи цистеина, что называется S-нитрозилированием (Kovacs et al., 2013). Такая модификация приводит к изменению функции целевого белка (Gonzalez et al., 2009). Эффекты прямой модификации белков – мишеней с помощью NO ограничены относительно коротким расстоянием диффузии молекулы. Следовательно, NO должен синтезироваться вблизи своих мишеней для передачи сигналов (т. е. путем S-нитрозилирования). Это также важно из-за его чрезвычайно короткого периода полураспада (микросекунды). В противном случае NO быстро удаляется миоглобином (Flogel et al., 2001) или окисляется до NO_2 . Клеточные молекулы-переносчики, такие как S-нитрозоглютатион, опосредуют дальнедействующую передачу сигналов NO, действуя как переносчик и донор, перенося NO к более отдаленным мишеням (Such-Miquel et al., 2018). Функциональные свойства некоторых ионных каналов могут быть модифицированы NO, что может происходить путем добавления нитрозогруппы к тиолу (Gonzalez et al., 2009), например, к остатку цистеина. Такое нитрозилирование может усиливать активность канала или ингибировать ее, в зависимости от канала. В частности, существует несколько каналов, которые проявляют и механическую чувствительность и чувствительность к NO и модулируются им, например, потенциалуправляемый K^+ -канал-1.5 ($K_v1.5$) (Nunez et al., 2006), потенциалуправляемый Ca^{2+} -канал-1.2 ($Ca_v1.2$) (Campbell et al., 1996) и потенциалуправляемый Na^+ -канал-1.5 ($Na_v1.5$) (Ueda et al., 2008). Некоторые ионные каналы, например, $K_v1.5$, могут модулироваться NO посредством

прямого нитрозилирования и пути PKG (Nunez et al., 2006) (см. обзор (Kazanski et al., 2011; Makarenko et al., 2012)).

3.8. Добавление L-Arginine не меняет I_L ток

Поскольку отсутствие или существенный недостаток количества L-Arginine в клетке может изменить пути регуляции SACs, мы вводили в перфузионный раствор L-Arginine. Добавление L-Arginine в концентрации 50 (Рис.24А) и 100 (Рис.24Б) мкмоль/л на протяжении 6 мин практически не меняло I/V кривые поздних токов I_L у интактных клеток. При этом не менялась реакция на дополнительное введение в среду 200 мкмоль/л SNAP (Рис.24В). В первые 3 мин SNAP увеличивал $I_{L,ns}$, а затем уменьшал этот ток до значений, близких к контрольным. Также не менялась и реакция клеток на растяжение.

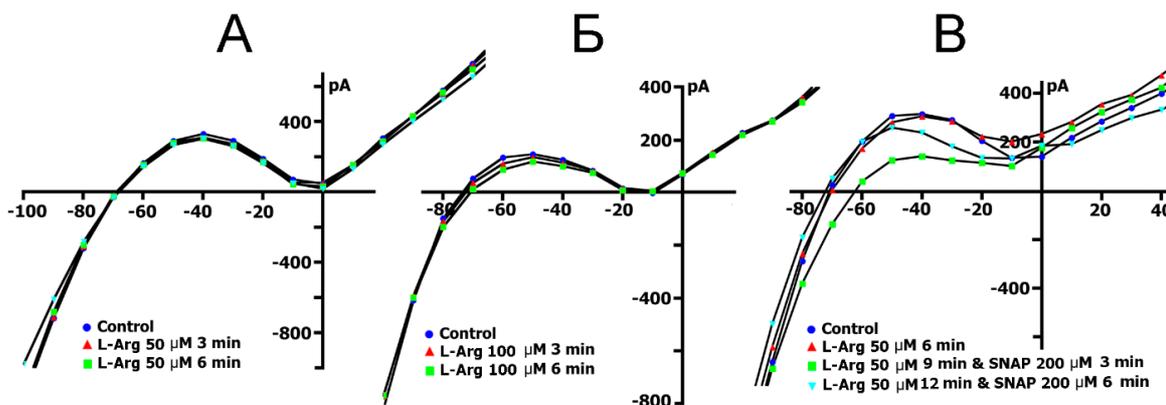


Рисунок 24. Влияние L-аргинина и его комбинации со SNAP на I/V-кривые позднего тока I_L . А – Изменения I_L в интактной клетке на фоне ее постоянной перфузии L-аргинином в концентрации 50 мкмоль/л в контроле (синие кружки), через 3 мин (красные треугольники) и через 6 мин (зеленые квадраты). Б – Изменения I_L на фоне перфузии L-Arginine в концентрации 100 мкмоль/л в контроле (синие кружки), через 3 мин (красные треугольники) и через 6 мин (зеленые квадраты). В – изменение I_L под действием L-Arginine в концентрации 50 мкмоль/л с последующим добавлением к раствору 200 мкмоль/л SNAP. Синие кружки – контроль, красные треугольники – 6 мин перфузии клеток L-Arginine, зеленые квадраты – 3 мин перфузии после добавления в раствор SNAP, перевернутые голубые треугольники – 6 мин перфузии со SNAP. Оригинальные кривые.

Как известно, L-Arginine является субстратом для NOS при продукции NO. В отличие от некоторых других тканей, кардиомиоциты не способны синтезировать L-Arginine (как, например печень или почки) (Hattori et al., 1995) или рециркулировать L-Arginine из цитруллина (как эндотелий) (Nagasaki et al., 1996). В сердечных миоцитах L-Arginine поступает из кровотока за счет функциональной системы – γ^+ катионных переносчиков аминокислот (Devés et Boyd, 1998; Ramachandran et Peluffo, 2017). Истощение L-Arginine приводит к разобщению NOS, и O_2 , а не L-Arginine становится конечным акцептором электронов, что приводит к образованию супероксидов. Активные формы кислорода – АФК (the reactive oxygen species – ROS) – супероксид ($O_2^{\cdot-}$), в сочетании с NO могут приводить к образованию активных форм азота – АФА (the reactive nitrogen species – RNS) пероксинитрита (peroxynitrite – $ONOO^-$) (Ramachandran et Peluffo, 2017). Было показано, что пероксинитрит индуцирует SAC-подобные изменения мембранных токов в изолированных кардиомиоцитах желудочков (Dyachenko et al., 2009b). С одной стороны, образование пероксинитритов может вызывать активацию фосфолипаз и образование амфипатов, которые модулируют функцию канала, изменяя кривизну окружающего липидного бислоя. С другой стороны, пероксинитрит может напрямую воздействовать на SAC, как это показано для TRPC6 (Dyachenko et al., 2009b). Было обнаружено, что уменьшение концентрации L-Arginine ниже порогового значения (~ 100 мкмоль/л) прогрессивно увеличивало флуоресценцию, индуцированную $ONOO^-/O_2^{\cdot-}$. Эти результаты позволяют оценить уровни циркулирующего L-Arginine, ниже которых в сердечной мышце возникают вредные эффекты, опосредованные ROS/RNS (Ramachandran et Peluffo, 2017). L-Arginine ведет к увеличению входящего тока в кардиомиоцитах. Однако при физиологических концентрациях (~ 100 мкмоль/л) этот ток трудно выделить из фонового шума и он едва ли может влиять на электрофизиологические параметры (Peluffo, 2007).

Интересно, что фоновая продукция NO наблюдается и в отсутствие аппликации L-Arginine, что, вероятно, объясняется наличием внутреннего пула L-Arginine в кардиомиоците (Peluffo, 2007). Действительно, константы Михаэлиса для NOS по L-Arginine (K_m для nNOS крысы по L-Arginine равна, по разным данным, 1,5 мкмоль/л (Bredt et Snyder, 1990) или 3,3 мкмоль/л (Schmidt et al., 1992), для eNOS у человека 1 мкмоль/л (Garvey et al., 1994)) подтверждают точку зрения о том, что для продукции NO достаточно микромолярных внутриклеточных концентраций L-Arginine.

Поскольку отсутствие или существенный недостаток количества L-Arginine может изменить пути регуляции SAC, L-Arginine вводили в перфузионный раствор в концентрации от 50 до 100 мкмоль/л. Добавление L-Arginine практически не меняло I/V кривые поздних токов I_L у интактных клеток. Также не менялась и реакция клеток на растяжение. Кроме того, в контрольных условиях всегда регистрировали стандартную I/V-кривую поздних токов I_L . Эта кривая должна была бы изменить N-форму или форму части кривой, отражающей входящие катион неселективные токи, если бы наблюдалось отсутствие или недостаточный уровень L-Arginine, что запускает продукцию ROS/RNS в сердечных миоцитах.

3.9. Другие способы активации $I_{L,ns}$ и модулирования SAC

Стоит обратить внимание, что PKG может быть активирована не только cGMP, но и различными окислителями, например, reactive oxygen species (ROS) (Burgoyne et al., 2007). В случае такой активации PKG переходит в дисульфидную форму и меняет субстрат своего действия. В частности, она перестает фосфорилировать и, следовательно, снижать активность RhoA (белок семейства малых GTP-аз) (Prysyazhna et al., 2016). cGMP увеличивает долю фосфорилированной RhoA.

Физиологическое растяжение быстро активирует восстановленную форму (reduced-form) nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)

oxidase 2 (NOX2) с образованием reactive oxygen species (ROS) (Prosser et al., 2011). NOX2 and NOX4 являются наиболее экспрессируемыми изоформами NOX в кардиомиоцитах взрослых животных (Byrne et al., 2003). NOX2 и NOX4 формируют супероксиды (reactive oxygen species) они могут напрямую влиять на $I_{Cl,swell}$, а могут взаимодействовать с NO из NOS3, образовывать peroхynitrite, которые могут влиять на SAC через PLC и PLA2 (Dyachenko et al., 2009b).

В целом это важно по двум причинам: во-первых, показано, что механическое растяжение кардиомиоцита может приводить к активации NADPH оксидазы-2 (NOX2), что ведет к увеличению реактивных форм кислорода и, как следствия, изменения редокс-состояния клетки (Prosser et al., 2011). Это может влиять на долю PKG активированной окислением, так как показано, что дисульфидное состояние PKG существует даже при нормальных условиях в клетке (Prysyazhna et al., 2016). Во-вторых, активаторы и ингибиторы sGC естественно влияют на концентрацию cGMP и, как следствие, могут влиять на баланс нормальной и дисульфидной формы PKG, особенно при измененном редокс-состоянии клетки.

Одним из основных ограничений этого исследования была невозможность учесть тот факт, что физиологическое растяжение быстро активирует восстановленную форму NOX2 для продукции ROS (АФК) в процессе, зависящем от микротрубочек (X-ROS сигналинг) (Prosser et al., 2011). Продукция ROS (АФК) происходит в мембранах сарколеммы и Т-трубочек, где локализуется NOX2, и сенсibiliзирует близлежащие рианодинновые рецепторы (RyR) в саркоплазматическом ретикулуме (SR). Мы полагаем, что происходит сближение между NOX2 и RyR, вместе с зависимой от растяжения «настройкой» RyR, и это обеспечивает механистическое объяснение механотрансдукции, связанной с X-ROS. Взаимосвязь между этими сигнальными путями и механизмами, связанными с sGC, вызванными растяжением, может быть особенно интересной и

заслуживает особого внимания. Исходя из всего вышеизложенного, выяснение молекулярного механизма данного процесса требует дальнейших исследований.

3.10. Определение транскрипции генов катионнеселективных SAC кардиомиоцитов желудочков крыс

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что вводимые нами вещества действуют на SAC, вместе с тем в литературе нет четкого понимания какие именно SAC, из числа известных на сегодняшний день, экспрессируются в кардиомиоцитах желудочков сердца крысы.

Мы провели анализ транскрипции генов SAC в кардиомиоцитах желудочков сердца крыс и показали в них наличие значительного количества транскриптов для генов каналов TRPC1, TRPM7, PKD1/TRPP1, PKD2/TRPP2, TMEM63A, TMEM63B, TRPV2, Piezo1 (рис.25). В то же время транскрипты генов других известных SAC, таких как TRPC3, TRPC5, TRPC6, TRPV1, TRPV4, TRPM3, TRPA1, Piezo2 присутствуют в единичных количествах.

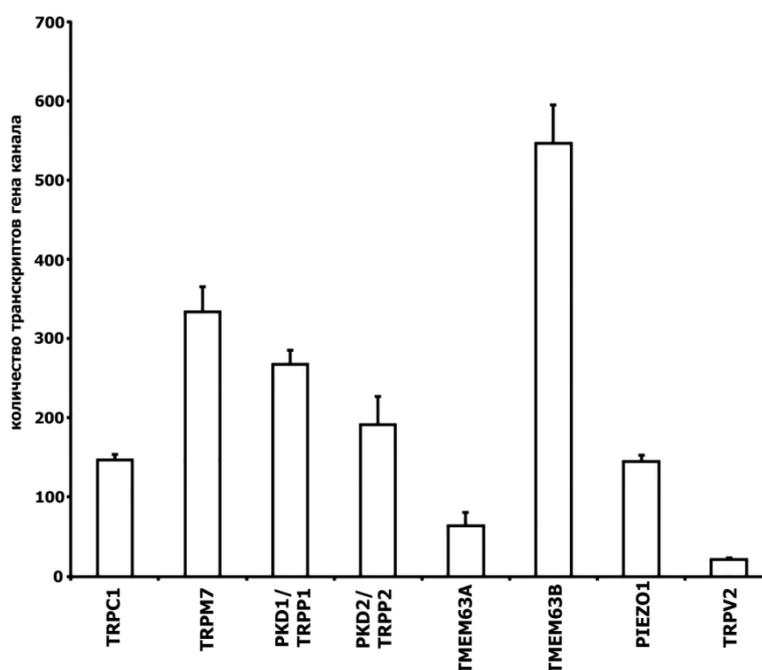


Рисунок 25. Механоуправляемые каналы, гены, которых экспрессируются в кардиомиоцитах желудочков сердца крысы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В предыдущих работах авторами было показано, что механическая стимуляция кардиомиоцитов желудочков сердца мыши в виде локального растяжения меняет мембранные токи $I_{L,ns}$ и I_{K1} за счет активации TRPC6 каналов ($I_{L,ns}$) или деактивации каналов $K_{ir2.3}$ (I_{K1}) (Dyachenko et al., 2009a; Dyachenko et al., 2009b). Однако мы продемонстрировали, что в кардиомиоцитах желудочков сердца крысы TRPC6 каналы не экспрессируются, так что $I_{L,ns}$, очевидно, возникает в результате активации одного или нескольких SAC из числа экспрессируемых (TRPC1, TRPM7, PKD1/TRPP1, PKD2/TRPP2, TMEM63A, TMEM63B, TRPV2, Piezo1). Было показано, что токи, активируемые растяжением клетки, способствуют деполяризации мембраны и вызывают экстрасистолы (Kamkin et al., 2000; Kamkin et al., 2003). Поэтому оценка возможного вклада NO в регуляцию канальной активности SAC, включая NO-зависимый и NO-независимый пути активации sGC и S-нитрозилирования, представляется крайне важной для решения широкого спектра прикладных задач. S-нитрозилирование является важным компонентом реализации механизмов механоэлектрической обратной связи в сердце. Кроме того, ионные каналы кардиомиоцитов, которые служат для реализации электромеханического сопряжения, потенциально регулируются S-нитрозилированием. Сигналинг S-нитрозилирования нарушается при патологических состояниях, при которых нарушается регуляция окислительно-восстановительного состояния клетки, включая ишемию, сердечную недостаточность, мерцательную аритмию и фибрилляцию (Gonzalez et al., 2009).

На основании полученных данных и анализа литературы можно сделать вывод, что физиологическая концентрация NO в клетке является обязательным условием работы SAC, так как связывание NO (Kazanski et al., 2011; Kazanski et al., 2010a), блокирование NOS (Kazanski et al., 2011; Dyachenko et al., 2009b; Kazanski et al., 2010a) или использование мышей

NOS3^{-/-} (Kazanski et al., 2011; Kazanski et al., 2010a) устраняло эффекты, вызванные растяжением клеток, или предотвращало их развитие (см. для обзора (Kazanski et al., 2011)). Повышение концентрации NO в результате экзогенного добавления доноров на фоне растяжения приводит к элиминации I_{SAC} (Kazanski et al., 2011; Kazanski et al., 2010b).

Экзогенный NO может включать не только NO-зависимый путь модуляции SAC, но и S-нитрозилирование SAC. В интактной клетке NO приводит к двухфазному эффекту: короткая фаза активации Gd³⁺-сенситивного катион неселективного тока I_{L,ns} и более длинная фаза ингибирования этого тока. Короткая фаза активации связана, вероятнее всего, с S-нитрозилованием SACs. А более длительная фаза ингибирования I_{L,ns} может определяться NO-зависимым путем регуляции канальной активности, при котором фосфорилирование SACs снижает их проводимости. Ингибитор S-нитрозилирования – аскорбиновая кислота устраняет вызванную донором NO короткую фазу активации I_{L,ns}, но сохраняет вторую фазу ингибирования I_{L,ns} по NO-зависимому пути: NO-sGC–cGMP–PKG. Более того, аскорбиновая кислота полностью устраняет I_{SAC}, вызванный растяжением клетки, и в этих условиях экзогенный NO не приводит к возникновению первой фазы.

Важно заметить, что доноры NO без растяжения клетки вызывают I_{L,ns}, который эквивалентен I_{SAC}, а на фоне растяжения клетки экзогенный NO устраняет I_{SAC}. Активация NO-независимого sGC–cGMP–PKG пути с помощью BAY41-2272 не могла вызвать исходного S-нитрозилирования SACs поскольку отсутствовал экзогенный NO, и первичной активации I_{L,ns} не было, но в результате активации PKG фосфорилирование SACs снижало I_{L,ns}. Экзогенный NO на фоне активатора sGC BAY41-2272 вызывает ингибирование I_{L,ns}, что, вероятно, объясняется дополнительной активацией sGC. BAY41-2272 устраняет I_{SAC}, вероятно, вследствие активации PKG и

фосфорилирования SACs. Но SNAP на фоне растяжения не может еще больше увеличить I_{SAC} .

Блокатор sGC ODQ выключает sGC–cGMP–PKG путь и это приводит к ингибированию $I_{L,ns}$. Однако, введенный в среду SNAP может вызывать S-нитрозилирование SACs и индуцировать первую фазу – увеличение $I_{L,ns}$. ODQ, блокируя sGC, уменьшает активность PKG и, следовательно фосфорилирование, однако $I_{L,ns}$ уменьшается, что связано, вероятно, с превращением ODQ в ингибитор NOS в результате метаболического преобразованием. ODQ устраняет также I_{SAC} . Но, введенный на фоне растяжения дополнительно к ODQ SNAP, увеличивает I_{SAC} , что может быть только в условиях недостатка NO в результате ингибирования NOS изменённым ODQ.

Ингибитор PKG KT-5823 снижает активность PKG, уменьшает фосфорилирование SACs, но увеличивает количество cGMP по механизму отрицательной обратной связи, и, по-видимому, именно это ведет к устранению I_{SAC} , а введение SNAP не влияет на $I_{L,ns}$. 8Br-cGMP уменьшает I_{SAC} , как это и должно происходить за счет активации cGMP-PKG и, следовательно, фосфорилирования или, что вероятнее, увеличении концентрации cGMP.

Наконец, результаты нашего исследования демонстрируют существенный вклад S-нитрозилирования в регуляцию работы SACs. Вместе с тем sGC–cGMP–PKG путь также играет роль в работе SAC, но, по-видимому, с некоторой временной задержкой. Несмотря на очевидный вклад двух этих путей в регуляцию работы механочувствительных каналов и приведенные в обсуждении возможные варианты такой регуляции, необходимы дополнительные исследования, чтоб определить однозначную роль этих путей.

Таким образом, убедительно показано значение оксида азота NO в регуляции механочувствительных токов и, как следствие, механоэлектрической

обратной связи, занимающей одно из ключевых мест в регуляции деятельности сердца в целом. Показана необходимость определенной концентрации NO в кардиомиоците для нормального функционирования механоэлектрической обратной связи. В то же время показана неоднозначность влияния NO на SAC. Связано это с обсуждаемой выше сложностью зависимости между регулируемой функцией и концентрацией NO, состоянием клетки, непосредственным фенотипом кардиомиоцита и т.п. Мы не исключаем также другие пути регуляции работы SAC в тех или иных условиях.

ВЫВОДЫ

1. В отсутствии растяжения кардиомиоцитов в стандартной среде и в среде с заблокированными калиевыми токами донор NO SNAP вызывает увеличение с последующим ингибированием позднего тока, отражающего активацию и инактивацию механоуправляемых каналов – SAC. В обеих средах неспецифический блокатор механоуправляемых каналов Gd^{3+} предотвращает или устраняет развитие NO индуцированного позднего тока. Растяжение клетки в обеих средах вызывает увеличение позднего тока за счет активации тока через механоуправляемые каналы I_{SAC} , а введение в среду донора NO возвращает его к исходным значениям, таким образом, полностью устраняя I_{SAC} .

2. Стимулятор NO-независимого места связывания растворимой гуанилатциклазы, в отсутствии растяжения клеток уменьшает поздний ток, а дополнительное введение донора NO еще в большей степени уменьшает этот ток до его выхода на постоянный уровень. На фоне растяжения кардиомиоцитов, которое вызывает увеличение позднего тока за счет появления I_{SAC} , VAY 41-2272 ингибирует этот ток, полностью устраняя, тем самым, I_{SAC} , а дополнительное введение донора NO не приводит к значимым изменениям.

3. Ингибитор растворимой гуанилатциклазы, в отсутствии растяжения клеток выражено уменьшает поздний ток, а введение донора NO на его фоне увеличивает поздний ток до значений, существенно выше исходных. На фоне растяжения клеток, вызывающего увеличение позднего тока за счет появления I_{SAC} , ODQ выражено уменьшает поздний ток, устраняя, тем самым, I_{SAC} , а дополнительное введение донора NO увеличивает поздний ток до исходных значений.

4. В отсутствии растяжения клеток ингибитор cGMP-зависимой протеинкиназы KT5823 уменьшает поздний ток, а дополнительное введение

донора NO вызывает его временное увеличение до исходного уровня с последующим ингибированием. В то же время активатор сGMP-зависимой протеинкиназы 8Br-cGMP вызывает выраженное увеличение позднего тока, а дальнейшее добавление донора NO сразу уменьшает этот ток до исходных значений. На фоне растяжения клеток KT5823 ингибирует поздний ток, устраняя I_{SAC} , а введенный дополнительно донор NO не меняет его. 8Br-cGMP также ингибирует поздний ток, уменьшая I_{SAC} , а дополнительное введение донора NO еще в большей степени ингибирует поздний ток.

5 Ингибитор S-нитрозилирования SAC – аскорбиновая кислота, в отсутствие растяжения клеток не вызывает изменений позднего тока, а дальнейшее добавление донора NO приводит к его ингибированию. На фоне растяжения клеток, которое вызывает увеличение позднего тока за счет появления I_{SAC} , аскорбиновая кислота уменьшает этот поздний ток до исходных значений, полностью устраняя I_{SAC} , а дополнительно введенный донор NO не вызывает изменений позднего тока по сравнению с контролем.

6. Установлена двойная роль NO в регуляции механоэлектрической обратной связи – одного из ключевых факторов работы сердца в норме и при патологии. Определенный внутриклеточный уровень NO необходим для работы SAC, но увеличение его концентрации приводит к ингибированию их работы. В кардиомиоцитах желудочков сердца крысы экспрессируются гены белков каналов TRPC1, TRPM7, PKD1/TRPP1, PKD2/TRPP2, TMEM63A, TMEM63B, TRPV2, Piezo1, опосредующие изменение позднего тока при растяжении клеток, и являющиеся потенциальными молекулярными мишенями для NO.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

APD	Action Potential Duration	длительность потенциала действия
BKCa	Big Potassium Ca ²⁺ -activated channels	большие калиевые каналы активируемые Ca ²⁺
cGMP	cyclic Guanosine Monophosphate	циклический гуанозин монофосфат
CICR	Calcium Induced Calcium Release	кальцийзависимое высвобождение кальция
DAG	Diacylglycerol	диацилглицерол
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase	внеклеточная сигнальнорегулируемая киназа
FAK	Focal Adhesion Kinase	киназа фокальной адгезии
IFN- γ	Interferon- γ	гамма-интерферон
KB	Kraftbrühe	раствор «Крепкий бульон»
LIM	LIN-11, Isl-1 and MEC-3	
LTCC	L-Type Calcium Current	кальциевый ток L-типа
MGCh	Mechanical-gated Channel	механоуправляемый канал
NO	Nitric Oxide (II)	оксид азота (II)
NOS	NO-synthase	NO-синтаза
NS	non-selective	неселективный
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	Фосфоинозитид 3-киназа
PKG	Proteine Kinase G	протеинкиназа G
PtdIns-3-OH	Phosphoinositide-3-OH kinase	фосфоинозитид 3-OH киназа
RhoA	"Rat Sarcoma Virus" homolog family member A	гомолог Ras A
ROX	Reactive Oxygen Species	реактивные формы кислорода
RNS	Reactive Nitrogen Species	реактивные формы азота

SAC	Stretch Activated Channel	канал растяжением	активируемый
SAKCa	Stretch-activated K ⁺ channel-calcium dependent	активируемый растяжением K ⁺ канал зависимый от Ca ²⁺	
sGC	soluble Guanylate Cyclase	растворимая гуанилатциклаза	
TRAAK	TWIK-related arachidonic acid-stimulated K ⁺ channel	относящийся к TWIK K ⁺ канал стимулируемый арахидоновой кислотой	
TREK	TWIK-Related K ⁺ Channel	каналы, относящиеся к TWIK	
TRP	Transient Receptor Potential	короткий потенциал	рецепторный
TWIK	The Weakly Inward Rectifying K ⁺ Channel	слабовыпрямляющие K-каналы	
МЭОС		Механоэлектрическая связь	обратная
ПД		Потенциал Действия	
ПП		Потенциал Покоя	
ЭМС		Электромеханическое сопряжение	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Камкин А.Г., Киселева И.С., Ярыгин В.Н. (2003). Механоэлектрическая обратная связь в сердце. Москва, Млесна. 351 стр.
2. Abi-Gerges, N., Fischmeister, R., & Méry, P. F. (2001). G protein-mediated inhibitory effect of a nitric oxide donor on the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. *The Journal of physiology*, 531(Pt 1), 117–130.
3. Abi-Gerges, N., Szabo, G., Otero, A. S., Fischmeister, R., & Méry, P. F. (2002). NO donors potentiate the beta-adrenergic stimulation of I(Ca,L) and the muscarinic activation of I(K,ACh) in rat cardiac myocytes. *The Journal of physiology*, 540(Pt 2), 411–424.
4. Abramochkin, D. V., Makarenko, E. Y., Mitrokhin, V. M., Tian, B., Kalugin, L. Y., Sutiagin, P. V., & Kamkin, A. (2012). Effect of nitric oxide on mechanoelectrical feedback. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 152(1), 45-48.
5. Ahern, G. P., Hsu, S. F., Klyachko, V. A., & Jackson, M. B. (2000). Induction of persistent sodium current by exogenous and endogenous nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 28810-28815.
6. Ahmmed, G. U., Xu, Y., Hong Dong, P., Zhang, Z., Eiserich, J., & Chiamvimonvat, N. (2001). Nitric oxide modulates cardiac Na⁺ channel via protein kinase A and protein kinase G. *Circulation research*, 89(11), 1005-1013.
7. Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *bioinformatics*, 31(2), 166-169.

8. Andrade, Y. N., Fernandes, J., Vázquez, E., Fernández-Fernández, J. M., Arniges, M., Sánchez, T. M., Villalón, M., & Valverde, M. A. (2005). TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity. *The Journal of cell biology*, 168(6), 869–874.
9. Andrei, S.R., Ghosh, M., Sinharoy, P., Dey, S., Bratz, I.N., & Damron, D.S. (2017). TRPA1 Ion Channel Stimulation Enhances Cardiomyocyte Contractile Function via a CaMKII-Dependent Pathway. *Channels (Austin, Tex.)*, 11(6), 587-603.
10. Andrews S. FASTQC. (2010). A quality control tool for high throughput sequence data.
11. Angelone, T., Quintieri, A. M., Pasqua, T., Filice, E., Cantafio, P., Scavello, F., ... & Cerra, M. C. (2015). The NO stimulator, Catestatin, improves the Frank–Starling response in normotensive and hypertensive rat hearts. *Nitric Oxide*, 50, 10-19.
12. Ashcroft F. M. (2007). The Walter B. Cannon Physiology in Perspective Lecture, 2007. ATP-sensitive K⁺ channels and disease: from molecule to malady. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 293(4), E880–E889.
13. Bacabac, R. G., Smit, T. H., Mullender, M. G., Dijcks, S. J., Van Loon, J. J., & Klein-Nulend, J. (2004). Nitric oxide production by bone cells is fluid shear stress rate dependent. *Biochemical and biophysical research communications*, 315(4), 823-829.
14. Bai, C. X., Takahashi, K., Masumiya, H., Sawanobori, T., & Furukawa, T. (2004). Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of Panax ginseng, in guinea-pig cardiomyocytes. *British journal of pharmacology*, 142(3), 567–575.

15. Balligand, J. L., Kobzik, L., Han, X., Kaye, D. M., Belhassen, L., O'Hara, D. S., Kelly, R. A., Smith, T. W., & Michel, T. (1995). Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry*, 270(24), 14582–14586.
16. Barouch, L. A., Harrison, R. W., Skaf, M. W., Rosas, G. O., Cappola, T. P., Kobeissi, Z. A., Hobai, I. A., Lemmon, C. A., Burnett, A. L., O'Rourke, B., Rodriguez, E. R., Huang, P. L., Lima, J. A., Berkowitz, D. E., & Hare, J. M. (2002). Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*, 416(6878), 337–339.
17. Becker, E. M., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Gerzer, R., Minuth, T., Pleiss, U., Schmidt, P., Schramm, M., Schröder, H., Schroeder, W., Steinke, W., Straub, A., & Stasch, J. P. (2001). NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC pharmacology*, 1, 13.
18. Befeler B. (1978). Mechanical stimulation of the heart: its therapeutic value in tachyarrhythmias. *Chest*, 73(6), 832–838.
19. Belmonte, S., & Morad, M. (2008). 'Pressure-flow'-triggered intracellular Ca²⁺ transients in rat cardiac myocytes: possible mechanisms and role of mitochondria. *The Journal of physiology*, 586(5), 1379–1397.
20. Belus, A., & White, E. (2002). Effects of streptomycin sulphate on ICaL, IKr and IKs in guinea-pig ventricular myocytes. *European journal of pharmacology*, 445(3), 171-178.
21. Bessac, B. F., & Fleig, A. (2007). TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells. *The Journal of physiology*, 582(Pt 3), 1073–1086.
22. Boateng, S. Y., Senyo, S. E., Qi, L., Goldspink, P. H., & Russell, B. (2009). Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires

- nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 47(4), 426-435.
23. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
24. Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2016). *Medical physiology E-book*. Elsevier Health Sciences.
25. Boycott, H. E., Nguyen, M. N., Vrellaku, B., Gehmlich, K., & Robinson, P. (2020). Nitric Oxide and Mechano-Electrical Transduction in Cardiomyocytes. *Frontiers in physiology*, 11, 606740.
26. Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(2), 682–685.
27. Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., & Bredt, D. S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 82(5), 743-752.
28. Bruckdorfer R. (2005). The basics about nitric oxide. *Molecular aspects of medicine*, 26(1-2), 3–31.
29. Burgoyne, J. R., Madhani, M., Cuello, F., Charles, R. L., Brennan, J. P., Schröder, E., Browning, D. D., & Eaton, P. (2007). Cysteine redox sensor in PKGI α enables oxidant-induced activation. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5843), 1393–1397.
30. Burkard, N., Rokita, A. G., Kaufmann, S. G., Hallhuber, M., Wu, R., Hu, K., Hofmann, U., Bonz, A., Frantz, S., Cartwright, E. J., Neyses, L., Maier, L. S., Maier, S. K., Renné, T., Schuh, K., & Ritter, O. (2007). Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. *Circulation research*, 100(3), e32–e44.

31. Butler, A. R., Flitney, F. W., & Williams, D. L. (1995). NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends in pharmacological sciences*, 16(1), 18–22.
32. Byrne, J. A., Grieve, D. J., Bendall, J. K., Li, J. M., Gove, C., Lambeth, J. D., Cave, A. C., & Shah, A. M. (2003). Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circulation research*, 93(9), 802–805.
33. Cai, H., Li, Z., Goette, A., Mera, F., Honeycutt, C., Feterik, K., ... & Langberg, J. J. (2002). Downregulation of endocardial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in atrial fibrillation: potential mechanisms for atrial thrombosis and stroke. *Circulation*, 106(22), 2854–2858.
34. Calabrese, V., Cornelius, C., Rizzarelli, E., Owen, J. B., Dinkova-Kostova, A. T., & Butterfield, D. A. (2009). Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), 2717–2739.
35. Calaghan, S. C., Le Guennec, J. Y., & White, E. (2001). Modulation of Ca(2+) signaling by microtubule disruption in rat ventricular myocytes and its dependence on the ruptured patch-clamp configuration. *Circulation research*, 88(4), E32–E37.
36. Calaghan, S., & White, E. (2004). Activation of Na⁺-H⁺ exchange and stretch-activated channels underlies the slow inotropic response to stretch in myocytes and muscle from the rat heart. *The Journal of physiology*, 559(Pt 1), 205–214.
37. Campbell, D. L., Stamler, J. S., & Strauss, H. C. (1996). Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *The Journal of general physiology*, 108(4), 277–293.
38. Cary SP, Winger JA, Derbyshire ER, Marletta MA (2006) Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem. Sci.* 31:231–239.

39. Cary, S. P., Winger, J. A., & Marletta, M. A. (2005). Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(37), 13064–13069.
40. Casadei, B., & Sears, C. E. (2003). Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses. *Progress in biophysics and molecular biology*, *82*(1-3), 67–80.
41. Castro, L. R., Schittl, J., & Fischmeister, R. (2010). Feedback control through cGMP-dependent protein kinase contributes to differential regulation and compartmentation of cGMP in rat cardiac myocytes. *Circulation research*, *107*(10), 1232–1240.
42. Cawley, S. M., Kolodziej, S., Ichinose, F., Brouckaert, P., Buys, E. S., & Bloch, K. D. (2011). sGC α 1 mediates the negative inotropic effects of NO in cardiac myocytes independent of changes in calcium handling. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, *301*(1), H157–H163.
43. Chen, M. S., Xiao, J. H., Wang, Y., Xu, B. M., Gao, L., & Wang, J. L. (2013). Upregulation of TRPC1 contributes to contractile function in isoproterenol-induced hypertrophic myocardium of rat. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *32*(4), 951-959.
44. Chen, P. J., Kuo, L. M., Wu, Y. H., Chang, Y. C., Lai, K. H., & Hwang, T. L. (2020). BAY 41-2272 Attenuates CTGF Expression via sGC/cGMP-Independent Pathway in TGF β 1-Activated Hepatic Stellate Cells. *Biomedicines*, *8*(9), 330.
45. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, *34*(17), i884-i890.
46. Cheng, J., Valdivia, C. R., Vaidyanathan, R., Balijepalli, R. C., Ackerman, M. J., & Makielski, J. C. (2013). Caveolin-3 suppresses late sodium current by

- inhibiting nNOS-dependent S-nitrosylation of SCN5A. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 61, 102-110.
47. Cheng, W., Sun, C., & Zheng, J. (2010). Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein & cell*, 1(9), 802–810.
48. Corey, D. P., García-Añoveros, J., Holt, J. R., Kwan, K. Y., Lin, S. Y., Vollrath, M. A., Amalfitano, A., Cheung, E. L., Derfler, B. H., Duggan, A., Géléoc, G. S., Gray, P. A., Hoffman, M. P., Rehm, H. L., Tamasauskas, D., & Zhang, D. S. (2004). TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*, 432(7018), 723–730.
49. Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), 55–60.
50. Coste, B., Xiao, B., Santos, J. S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K. S., Kim, S. E., Schmidt, M., Mathur, J., Dubin, A. E., Montal, M., & Patapoutian, A. (2012). Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature*, 483(7388), 176–181.
51. Conwell, J. A., Cocalis, M. W., & Erickson, L. C. (1993). EAT to the beat: "ectopic" atrial tachycardia caused by catheter whip. *Lancet (London, England)*, 342(8873), 740.
52. Craelius, W., Chen, V., & el-Sherif, N. (1988). Stretch activated ion channels in ventricular myocytes. *Bioscience reports*, 8(5), 407–414.
53. Damy, T., Ratajczak, P., Robidel, E., Bendall, J. K., Oliviero, P., Boczkowski, J., Ebrahimian, T., Marotte, F., Samuel, J. L., & Heymes, C. (2003). Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(13), 1934–1936.

54. Deng, Y., Qi, H., Ma, Y., Liu, S., Zhao, M., Guo, Z., Jie, Y., Zheng, R., Jing, J., Chen, K., Ding, H., Lv, G., Zhang, K., Li, R., Cheng, H., Zhao, L., Sheng, X., Zhang, M., & Yin, L. (2022). A flexible and highly sensitive organic electrochemical transistor-based biosensor for continuous and wireless nitric oxide detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(34), e2208060119.
55. Devés, R., & Boyd, C. A. (1998). Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiological reviews*, 78(2), 487–545.
56. Dietrich, A., & Gudermann, T. (2014). TRPC6: physiological function and pathophysiological relevance. *Handbook of experimental pharmacology*, 222, 157–188.
57. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(6736), 601–605.
58. Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., & Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *The EMBO journal*, 16(17), 5464–5471.
59. Dyachenko, V., Christ, A., Gubanov, R., & Isenberg, G. (2008). Bending of z-lines by mechanical stimuli: an input signal for integrin dependent modulation of ion channels?. *Progress in biophysics and molecular biology*, 97(2-3), 196–216.
60. Dyachenko, V., Husse, B., Rueckschloss, U., & Isenberg, G. (2009a). Mechanical deformation of ventricular myocytes modulates both TRPC6 and Kir2.3 channels. *Cell calcium*, 45(1), 38–54.
61. Dyachenko, V., Rueckschloss, U., & Isenberg, G. (2009b). Modulation of cardiac mechanosensitive ion channels involves superoxide, nitric oxide and peroxynitrite. *Cell calcium*, 45(1), 55–64.

62. Dyachenko, V., Rueckschloss, U., & Isenberg, G. (2006). Aging aggravates heterogeneities in cell-size and stress-intolerance of cardiac ventricular myocytes. *Experimental gerontology*, *41*(5), 489–496.
63. Everaerts, W., Nilius, B., & Owsianik, G. (2010). The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Progress in biophysics and molecular biology*, *103*(1), 2–17.
64. Faucherre, A., Kissa, K., Nargeot, J., Mangoni, M. E., & Jopling, C. (2014). Piezo1 plays a role in erythrocyte volume homeostasis. *Haematologica*, *99*(1), 70–75.
65. Feelisch, M. (1991). The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *17*, S25-S33.
66. Feelisch, M., Kotsonis, P., Siebe, J., Clement, B., & Schmidt, H. H. (1999). The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Molecular pharmacology*, *56*(2), 243–253.
67. Fernhoff, N. B., Derbyshire, E. R., & Marletta, M. A. (2009). A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(51), 21602–21607.
68. Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T. W., Kelly, R. A., & Michel, T. (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, *271*(37), 22810–22814.
69. Figueiredo-Freitas, C., Dulce, R. A., Foster, M. W., Liang, J., Yamashita, A. M., Lima-Rosa, F. L., ... & Pinto, J. R. (2015). S-nitrosylation of sarcomeric

- proteins depresses myofilament Ca²⁺ sensitivity in intact cardiomyocytes. *Antioxidants & redox signaling*, 23(13), 1017-1034.
70. Filatova, T., Mitrokhin, V., Kamkina, O., Lovchikova, I., Mladenov, M., & Kamkin, A. (2019). Long-Term IL-2 Incubation-Induced L-type Calcium Channels Activation in Rat Ventricle Cardiomyocytes. *Cardiovascular toxicology*, 19(1), 48–55.
71. Fischmeister, R., Castro, L., Abi-Gerges, A., Rochais, F., & Vandecasteele, G. (2005). Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 142(2), 136–143.
72. Nilius, B., & Flockerzi, V. (Eds.). (2014). *Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels* (Vol. 2). Berlin, Germany:: Springer.
73. Flögel, U., Merx, M. W., Godecke, A., Decking, U. K., & Schrader, J. (2001). Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), 735–740.
74. Fonfria, E., Murdock, P. R., Cusdin, F. S., Benham, C. D., Kelsell, R. E., & McNulty, S. (2006). Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *Journal of receptor and signal transduction research*, 26(3), 159–178.
75. Förstermann, U., & Münzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113(13), 1708–1714.
76. Gao, X., Wu, L., & O'Neil, R. G. (2003). Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathways. *The Journal of biological chemistry*, 278(29), 27129–27137.
77. Garbincius, J. F., & Michele, D. E. (2015). Dystrophin–glycoprotein complex regulates muscle nitric oxide production through mechanoregulation of AMPK

- signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44), 13663-13668.
78. García-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B. S. S., Skidd, P. M., Couet, J., Li, S., ... & Sessa, W. C. (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin: Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25437-25440.
79. Garvey, E. P., Tuttle, J. V., Covington, K., Merrill, B. M., Wood, E. R., Baylis, S. A., & Charles, I. G. (1994). Purification and characterization of the constitutive nitric oxide synthase from human placenta. *Archives of biochemistry and biophysics*, 311(2), 235–241.
80. Gaudet R. (2008). A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Molecular bioSystems*, 4(5), 372–379.
81. Gileadi O. (2014). Structures of soluble guanylate cyclase: implications for regulatory mechanisms and drug development. *Biochemical Society transactions*, 42(1), 108–113.
82. Gödecke, A., Heinicke, T., Kamkin, A., Kiseleva, I., Strasser, R. H., Decking, U. K., Stumpe, T., Isenberg, G., & Schrader, J. (2001). Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts. *The Journal of physiology*, 532(Pt 1), 195–204.
83. Gomes, F. O., Maia, L. B., Loureiro, J. A., Pereira, M. C., Delerue-Matos, C., Moura, I., Moura, J. J. G., & Morais, S. (2019). Biosensor for direct bioelectrocatalysis detection of nitric oxide using nitric oxide reductase incorporated in carboxylated single-walled carbon nanotubes/lipidic 3 bilayer nanocomposite. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 127, 76–86.
84. Gómez, R., Caballero, R., Barana, A., Amorós, I., Calvo, E., López, J. A., Klein, H., Vaquero, M., Osuna, L., Atienza, F., Almendral, J., Pinto, A.,

- Tamargo, J., & Delpón, E. (2009). Nitric oxide increases cardiac IK1 by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circulation research*, 105(4), 383–392.
85. Gómez, R., Núñez, L., Vaquero, M., Amorós, I., Barana, A., de Prada, T., ... & Delpón, E. (2008). Nitric oxide inhibits Kv4. 3 and human cardiac transient outward potassium current (I_{to1}). *Cardiovascular research*, 80(3), 375-384.
86. Gomis, A., Soriano, S., Belmonte, C., & Viana, F. (2008). Hypoosmotic- and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels. *The Journal of physiology*, 586(23), 5633–5649.
87. Gonzalez, D. R., Treuer, A., Sun, Q. A., Stamler, J. S., & Hare, J. M. (2009). S-Nitrosylation of cardiac ion channels. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 54(3), 188–195.
88. Gottlieb, P., Folgering, J., Maroto, R., Raso, A., Wood, T. G., Kurosky, A., Bowman, C., Bichet, D., Patel, A., Sachs, F., Martinac, B., Hamill, O. P., & Honoré, E. (2008). Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 455(6), 1097–1103.
89. Green, S. J., Scheller, L. F., Marletta, M. A., Seguin, M. C., Klotz, F. W., Slayter, M., Nelson, B. J., & Nacy, C. A. (1994). Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunology letters*, 43(1-2), 87–94.
90. Gupta, S., McArthur, C., Grady, C., & Ruderman, N. B. (1994). Role of endothelium-derived nitric oxide in stimulation of Na(+)-K(+)-ATPase activity by endothelin in rabbit aorta. *The American journal of physiology*, 266(2 Pt 2), H577–H582.
91. Hall, C. N., & Garthwaite, J. (2009). What is the real physiological NO concentration in vivo?. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 21(2), 92–103.

92. Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A. K., Piontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V. P., Guggino, W. B., & Germino, G. G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature*, *408*(6815), 990–994.
93. Hattori, Y., Shimoda, S., & Gross, S. S. (1995). Effect of lipopolysaccharide treatment in vivo on tissue expression of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase mRNAs: relationship to nitric oxide synthase. *Biochemical and biophysical research communications*, *215*(1), 148–153.
94. Heymes, C., Vanderheyden, M., Bronzwaer, J. G., Shah, A. M., & Paulus, W. J. (1999). Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, *99*(23), 3009-3016.
95. Hisatsune, C., Kuroda, Y., Nakamura, K., Inoue, T., Nakamura, T., Michikawa, T., Mizutani, A., & Mikoshiba, K. (2004). Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, *279*(18), 18887–18894.
96. Hongo, K., Pascarel, C., Cazorla, O., Gannier, F., Le Guennec, J. Y., & White, E. (1997). Gadolinium blocks the delayed rectifier potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Experimental physiology*, *82*(4), 647–656.
97. Honoré, E., Patel, A. J., Chemin, J., Suchyna, T., & Sachs, F. (2006). Desensitization of mechano-gated K₂P channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(18), 6859–6864.
98. Howard, J., & Bechstetdt, S. (2004). Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Current biology : CB*, *14*(6), R224–R226.
99. Howlett, L. A., Kirton, H. M., Al-Owais, M. M., Steele, D., & Lancaster, M. K. (2022). Action potential responses to changes in stimulation frequency and isoproterenol in rat ventricular myocytes. *Physiological reports*, *10*(2), e15166.

100. Hu, H., & Sachs, F. (1997). Stretch-activated ion channels in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 29(6), 1511–1523.
101. Hughes M. N. (2008). Chemistry of nitric oxide and related species. *Methods in enzymology*, 436, 3–19.
102. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(24), 9265–9269.
103. Inoue, R., Jensen, L. J., Shi, J., Morita, H., Nishida, M., Honda, A., & Ito, Y. (2006). Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circulation research*, 99(2), 119–131.
104. Ioannidis, I., Bätz, M., Paul, T., Korth, H. G., Sustmann, R., & De Groot, H. (1996). Enhanced release of nitric oxide causes increased cytotoxicity of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine and sodium nitroprusside under hypoxic conditions. *The Biochemical journal*, 318 (Pt 3)(Pt 3), 789–795.
105. Iribe, G., Jin, H., Kaihara, K., & Naruse, K. (2010). Effects of axial stretch on sarcolemmal BKCa channels in post-hatch chick ventricular myocytes. *Experimental physiology*, 95(6), 699–711.
106. Isenberg, G., Kazanski, V., Kondratev, D., Gallitelli, M. F., Kiseleva, I., & Kamkin, A. (2003). Differential effects of stretch and compression on membrane currents and $[Na^+]_c$ in ventricular myocytes. *Progress in biophysics and molecular biology*, 82(1-3), 43–56.
107. Ishida, T., Takahashi, M., Corson, M. A., & Berk, B. C. (1997). Fluid shear stress-mediated signal transduction: how do endothelial cells transduce mechanical force into biological responses?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 811, 12–24..
108. Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Komamura, K., Miyatake, K., & Shigekawa, M. (2003). A novel mechanism of myocyte degeneration involving

- the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *The Journal of cell biology*, 161(5), 957–967.
109. Janssens, S., Pokreisz, P., Schoonjans, L., Pellens, M., Vermeersch, P., Tjwa, M., ... & Bloch, K. D. (2004). Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation research*, 94(9), 1256-1262.
110. Ji, G., Barsotti, R. J., Feldman, M. E., & Kotlikoff, M. I. (2002). Stretch-induced calcium release in smooth muscle. *The Journal of general physiology*, 119(6), 533–544.
111. Jian, Z., Han, H., Zhang, T., Puglisi, J., Izu, L. T., Shaw, J. A., ... & Chen-Izu, Y. (2014). Mechanochemotransduction during cardiomyocyte contraction is mediated by localized nitric oxide signaling. *Science signaling*, 7(317), ra27-ra27.
112. Jiang, F., Wu, K., Yin, K., Zhang, M., Wang, S. Q., Cheng, H., ... & Xiao, B. (2021). The mechanosensitive Piezo1 channel mediates heart mechano-chemo transduction. *Biophysical Journal*, 120(3), 102a-103a.
113. Jiang, F., Yin, K., Wu, K., Zhang, M., Wang, S., Cheng, H., Zhou, Z., & Xiao, B. (2021). The mechanosensitive Piezo1 channel mediates heart mechano-chemo transduction. *Nature communications*, 12(1), 869.
114. Jones, S. P., Greer, J. J., van Haperen, R., Duncker, D. J., de Crom, R., & Lefer, D. J. (2003). Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4891-4896.
115. Kaakinen, M., Reichelt, M. E., Ma, Z., Ferguson, C., Martel, N., Porrello, E. R., ... & Headrick, J. P. (2017). Cavin-1 deficiency modifies myocardial and coronary function, stretch responses and ischaemic tolerance: roles of NOS over-activity. *Basic research in cardiology*, 112, 1-19.

116. Kamkin, A., Kiseleva, I., Husse, B., & Isenberg, G. (2000a). Mechanical activation of currents through non-selective cation channels causes arrhythmias: High sensitivity in myocytes from failing heart. *Pflügers Arch-Europ J Physiol*, 493(6), R308.
117. Kamkin, A., Kiseleva, I., & Isenberg, G. (2000). Stretch-activated currents in ventricular myocytes: amplitude and arrhythmogenic effects increase with hypertrophy. *Cardiovascular research*, 48(3), 409–420.
118. Kamkin, A., Kiseleva, I., & Isenberg, G. (2003a). Ion selectivity of stretch-activated cation currents in mouse ventricular myocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 446(2), 220–231.
119. Kamkin, A., Kiseleva, I., Kircheis, R., & Kositzky, G. (1988). Bioelectric activity of frog atrium cells with non-typical impulse activity. *Abhandlungen der Akademie der Wissenschaften der DDR (Abteilung Mathematik-Naturwissenschaft-Technik)*, 1, 103-106.
120. Kamkin, A., Kiseleva, I., Wagner, K. D., Bohm, J., Theres, H., Günther, J., & Scholz, H. (2003b). Characterization of stretch-activated ion currents in isolated atrial myocytes from human hearts. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 446(3), 339–346.
121. Kamkin, A. G., Kazanski, V. E., Makarenko, E. Y., Lysenko, N. N., Sutiagin, P. V., Bo, T., & Kiseleva, I. S. (2010). Role of nitric oxide in activity control of mechanically gated ionic channels in cardiomyocytes: NO-donor study. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 150(1), 1–5.
122. Kaufmann, R., & Theophile, U. (1967). Automatic-fördernde Dehnungseffekte an Purkinje-Fäden, Pappillarmuskeln und Vorhoftrabekeln von Rhesus-Affen [Autonomously promoted extension effect in Purkinje fibers, papillary muscles and trabeculae carneaе of rhesus monkeys]. *Pflugers Archiv fur die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 297(3), 174–189.

123. Kaufmann, R. L., Lab, M. J., Hennekes, R., & Krause, H. (1971). Feedback interaction of mechanical and electrical events in the isolated mammalian ventricular myocardium (cat papillary muscle). *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 324(2), 100–123.
124. Kawakubo, T., Naruse, K., Matsubara, T., Hotta, N., & Sokabe, M. (1999). Characterization of a newly found stretch-activated K_{Ca}ATP channel in cultured chick ventricular myocytes. *The American journal of physiology*, 276(6), H1827–H1838.
125. Kazanski, V. E., Kamkin, A. G., Makarenko, E. Y., Lysenko, N. N., Sutiagin, P. V., & Kiseleva, I. S. (2010a). Role of nitric oxide in the regulation of mechanosensitive ionic channels in cardiomyocytes: contribution of NO-synthases. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 150(2), 263–267.
126. Kazanski, V., Kamkin, A., Makarenko, E., Lysenko, N., Lapina, N., & Kiseleva, I. (2011). The role of nitric oxide in the regulation of mechanically gated channels in the heart. *Mechanosensitivity and Mechanotransduction*, 109-140.
127. Kazanski, V. E., Kamkin, A. G., Makarenko, E. Y., Lysenko, N. N., Sutiagin, P. V., Bo, T., & Kiseleva, I. S. (2010). Role of nitric oxide in activity control of mechanically gated ionic channels in cardiomyocytes: NO-donor study. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 150(1), 1–5.
128. Kelly, D., Mackenzie, L., Hunter, P., Smaill, B., & Saint, D. A. (2006). Gene expression of stretch-activated channels and mechanoelectric feedback in the heart. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 33(7), 642–648. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW (1996) Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 79(3):363-380.
129. Kelly, R. A., Balligand, J. L., & Smith, T. W. (1996). Nitric oxide and cardiac function. *Circulation research*, 79(3), 363–380.

130. Kerstein, P. C., Jacques-Fricke, B. T., Rengifo, J., Mogen, B. J., Williams, J. C., Gottlieb, P. A., Sachs, F., & Gomez, T. M. (2013). Mechanosensitive TRPC1 channels promote calpain proteolysis of talin to regulate spinal axon outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(1), 273–285.
131. Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods*, 12(4), 357-360.
132. Kippenberger, S., Loitsch, S., Guschel, M., Müller, J., Knies, Y., Kaufmann, R., & Bernd, A. (2005). Mechanical stretch stimulates protein kinase B/Akt phosphorylation in epidermal cells via angiotensin II type 1 receptor and epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry*, 280(4), 3060–3067.
133. Kirstein, M., Rivet-Bastide, M., Hatem, S., Bénardeau, A., Mercadier, J. J., & Fischmeister, R. (1995). Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *The Journal of clinical investigation*, 95(2), 794–802.
134. Kiseleva, I., Kamkin, A., Wagner, K. D., Theres, H., Ladhoff, A., Scholz, H., ... & Lab, M. J. (2000). Mechanoelectric feedback after left ventricular infarction in rats. *Cardiovascular research*, 45(2), 370-378.
135. Knöll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H. M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M. L., ... & Chien, K. R. (2002). The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*, 111(7), 943-955.
136. Knowles, R. G., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal*, 298 (Pt 2)(Pt 2), 249–258.
137. Koh, S. D., Monaghan, K., Sergeant, G. P., Ro, S., Walker, R. L., Sanders, K. M., & Horowitz, B. (2001). TREK-1 regulation by nitric oxide and cGMP-

- dependent protein kinase: an essential role in smooth muscle inhibitory neurotransmission. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 44338-44346.
138. Kohl, P., Bollensdorff, C., & Garry, A. (2006). Effects of mechanosensitive ion channels on ventricular electrophysiology: experimental and theoretical models. *Experimental physiology*, 91(2), 307–321.
139. Köhler, R., Heyken, W. T., Heinau, P., Schubert, R., Si, H., Kacik, M., Busch, C., Grgic, I., Maier, T., & Hoyer, J. (2006). Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(7), 1495–1502.
140. Koitabashi, N., Aiba, T., Hesketh, G. G., Rowell, J., Zhang, M., Takimoto, E., Tomaselli, G. F., & Kass, D. A. (2010). Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(4), 713–724.
141. Kojima I., Nagasawa T., Nilius, B., & Flockerzi, V. (Eds.). (2014). *Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels* (Vol. 2). Berlin, Germany:: Springer.
142. Kovacs, I., & Lindermayr, C. (2013). Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in plant science*, 4, 137.
143. Krepinsky, J. C., Ingram, A. J., Tang, D., Wu, D., Liu, L., & Scholey, J. W. (2003). Nitric oxide inhibits stretch-induced MAPK activation in mesangial cells through RhoA inactivation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(11), 2790-2800.

144. Lab, M. J. (1968). Is there mechano-electric transduction in cardiac muscle? The monophasic action potential of the frog ventricle during isometric and isotonic contraction with calcium deficient perfusions. *S Afr J Med Sci*, 33, 60.
145. Lamberts, R. R., van Rijen, M. H., Sipkema, P., Fransen, P., Sys, S. U., & Westerhof, N. (2002). Increased coronary perfusion augments cardiac contractility in the rat through stretch-activated ion channels. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 282(4), H1334–H1340.
146. Lammerding, J., Kamm, R. D., & Lee, R. T. (2004). Mechanotransduction in cardiac myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1015, 53–70.
147. Leblanc, N., Chartier, D., Gosselin, H., & Rouleau, J. L. (1998). Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle. *The Journal of physiology*, 511 (Pt 2)(Pt 2), 533–548.
148. Leite-Moreira, A. M., Almeida-Coelho, J., Neves, J. S., Pires, A. L., Ferreira-Martins, J., Castro-Ferreira, R., ... & Leite-Moreira, A. F. (2018). Stretch-induced compliance: a novel adaptive biological mechanism following acute cardiac load. *Cardiovascular research*, 114(5), 656-667.
149. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
150. Li XT, Dyachenko V, Zuzarte M, Putzke C, Preisig-Müller R, Isenberg G, Daut J. (2006). The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle. *Cardiovasc Res* 69: 86-97.
151. Liao, X., Liu, J. M., Du, L., Tang, A., Shang, Y., Wang, S. Q., ... & Chen, Q. (2006). Nitric oxide signaling in stretch-induced apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes. *The FASEB Journal*, 20(11), 1883-1885.
152. Liaudet, L., Soriano, F. G., & Szabó, C. (2000). Biology of nitric oxide signaling. *Critical care medicine*, 28(4 Suppl), N37–N52.

153. Liedtke, W., Choe, Y., Martí-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M., & Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, *103*(3), 525–535.
154. Lima, B., Forrester, M. T., Hess, D. T., & Stamler, J. S. (2010). S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circulation research*, *106*(4), 633–646.
155. Liu, B., & Neufeld, A. H. (2001). Nitric oxide synthase-2 in human optic nerve head astrocytes induced by elevated pressure in vitro. *Archives of Ophthalmology*, *119*(2), 240-245.
156. Liu, X., Yao, X., & Tsang, S. Y. (2020). Post-Translational Modification and Natural Mutation of TRPC Channels. *Cells*, *9*(1), 135.
157. Lu, Z., Gao, J., Zuckerman, J., Mathias, R. T., Gaudette, G., Krukenkamp, I., & Cohen, I. S. (2007). Two-pore K⁺ channels, NO and metabolic inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*, *363*(1), 194–196.
158. Ma, R., Seifi, M., Papanikolaou, M., Brown, J. F., Swinny, J. D., & Lewis, A. (2018). TREK-1 Channel Expression in Smooth Muscle as a Target for Regulating Murine Intestinal Contractility: Therapeutic Implications for Motility Disorders. *Frontiers in physiology*, *9*, 157.
159. Maas, O., Donat, U., Frenzel, M., Rütz, T., Kroemer, H. K., Felix, S. B., & Krieg, T. (2008). Vardenafil protects isolated rat hearts at reperfusion dependent on GC and PKG. *British journal of pharmacology*, *154*(1), 25–31.
160. Marletta M. A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, *78*(6), 927–930.
161. Martin, E., Berka, V., Sharina, I., & Tsai, A. L. (2012). Mechanism of binding of NO to soluble guanylyl cyclase: implication for the second NO binding to the heme proximal site. *Biochemistry*, *51*(13), 2737–2746.

162. Martinac, B. (2008). *Sensing with ion channels*. Berlin; Heidelberg: Springer.
163. Massion, P. B., & Balligand, J. L. (2003). Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *The Journal of physiology*, 546(Pt 1), 63–75.
164. Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Essin, K., Gollasch, M., & Gudermann, T. (2008). Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *The EMBO journal*, 27(23), 3092–3103.
165. Merrillees N. C. (1974). The fine structure of the sinus node in the rat. *Advances in cardiology*, 12(0), 34–44.
166. Michel, T., & Smith, T. W. (1993). Nitric oxide synthases and cardiovascular signaling. *The American journal of cardiology*, 72(8), 33C–38C.
167. Miki, T., & Seino, S. (2005). Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 38(6), 917–925.
168. Mori, Y., Wakamori, M., Miyakawa, T., Hermosura, M., Hara, Y., Nishida, M., Hirose, K., Mizushima, A., Kurosaki, M., Mori, E., Gotoh, K., Okada, T., Fleig, A., Penner, R., Iino, M., & Kurosaki, T. (2002). Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca(2+) entry and Ca(2+) release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 195(6), 673–681.
169. Mosqueira, M., Konietzny, R., Andresen, C., Wang, C., & H A Fink, R. (2021). Cardiomyocyte depolarization triggers NOS-dependent NO transient after calcium release, reducing the subsequent calcium transient. *Basic research in cardiology*, 116(1), 18.

170. Mujoo, K., Sharin, V. G., Bryan, N. S., Krumenacker, J. S., Sloan, C., Parveen, S., Nikonoff, L. E., Kots, A. Y., & Murad, F. (2008). Role of nitric oxide signaling components in differentiation of embryonic stem cells into myocardial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18924–18929.
171. Mullershausen, F., Russwurm, M., Thompson, W. J., Liu, L., Koesling, D., & Friebe, A. (2001). Rapid nitric oxide-induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme. *The Journal of cell biology*, 155(2), 271–278.
172. Murgatroyd, F. D., & Camm, A. J. (1993). Atrial arrhythmias. *The Lancet*, 341(8856), 1317-1322.
173. Nadler, M. J., Hermosura, M. C., Inabe, K., Perraud, A. L., Zhu, Q., Stokes, A. J., Kurosaki, T., Kinet, J. P., Penner, R., Scharenberg, A. M., & Fleig, A. (2001). LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*, 411(6837), 590–595.
174. Nagasaki, A., Gotoh, T., Takeya, M., Yu, Y., Takiguchi, M., Matsuzaki, H., Takatsuki, K., & Mori, M. (1996). Coinduction of nitric oxide synthase, argininosuccinate synthetase, and argininosuccinate lyase in lipopolysaccharide-treated rats. RNA blot, immunoblot, and immunohistochemical analyses. *The Journal of biological chemistry*, 271(5), 2658–2662.
175. Naruse, K., Tang, Q. Y., & Sokabe, M. (2009). Stress-Axis Regulated Exon (STREX) in the C terminus of BK(Ca) channels is responsible for the stretch sensitivity. *Biochemical and biophysical research communications*, 385(4), 634–639.
176. Nathan, C., & Xie, Q. W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78(6), 915–918.

177. Nesin V., Tsiokas L., Nilius, B., & Flockerzi, V. (Eds.). (2014). *Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels* (Vol. 2). Berlin, Germany:: Springer.
178. Niu, W., & Sachs, F. (2003). Dynamic properties of stretch-activated K⁺ channels in adult rat atrial myocytes. *Progress in biophysics and molecular biology*, 82(1-3), 121-135.
179. Núñez, L., Vaquero, M., Gómez, R., Caballero, R., Mateos-Cáceres, P., Macaya, C., Iriepa, I., Gálvez, E., López-Farré, A., Tamargo, J., & Delpón, E. (2006). Nitric oxide blocks hKv1.5 channels by S-nitrosylation and by a cyclic GMP-dependent mechanism. *Cardiovascular research*, 72(1), 80–89.
180. Oancea, E., Wolfe, J. T., & Clapham, D. E. (2006). Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow. *Circulation research*, 98(2), 245–253.
181. Ohtani, H., Katoh, H., Tanaka, T., Saotome, M., Urushida, T., Satoh, H., & Hayashi, H. (2012). Effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition pore and thiol-mediated responses in cardiac myocytes. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 26(2), 95–101.
182. Ong, E. C., Nesin, V., Long, C. L., Bai, C. X., Guz, J. L., Ivanov, I. P., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Humphrey, M. B., & Tsiokas, L. (2013). A TRPC1 protein-dependent pathway regulates osteoclast formation and function. *The Journal of biological chemistry*, 288(31), 22219–22232.
183. Ortiz, P. A., Hong, N. J., & Garvin, J. L. (2001). NO decreases thick ascending limb chloride absorption by reducing Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter activity. *American journal of physiology. Renal physiology*, 281(5), F819–F825.
184. Palmer, C. P., Aydar, E., & Djamgoz, M. B. (2005). A microbial TRP-like polycystic-kidney-disease-related ion channel gene. *The Biochemical journal*, 387(Pt 1), 211–219. Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC (1999)

- Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 43(3):509-520.
185. Papapetropoulos, A., Rudic, R. D., & Sessa, W. C. (1999). Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovascular research*, 43(3), 509–520.
186. Patel, A. J., Honoré, E., Kohl, P., Sachs, F., & Franz, M. R. (2005). Potassium-selective cardiac mechanosensitive ion channels. *Cardiac Mechano-Electric Feedback and Arrhythmias. Elsevier Saunders*, 11-20.
187. Patel, A. J., Honoré, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., & Lazdunski, M. (1998). A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *The EMBO journal*, 17(15), 4283-4290.
188. Paulus W. J. (2001). The role of nitric oxide in the failing heart. *Heart failure reviews*, 6(2), 105–118.
189. Paulus, W. J., Vantrimpont, P. J., & Shah, A. M. (1995). Paracrine coronary endothelial control of left ventricular function in humans. *Circulation*, 92(8), 2119–2126.
190. Pavlovic, D., Hall, A. R., Kennington, E. J., Aughton, K., Boguslavskyi, A., Fuller, W., ... & Shattock, M. J. (2013). Nitric oxide regulates cardiac intracellular Na⁺ and Ca²⁺ by modulating Na/K ATPase via PKC ϵ and phospholemman-dependent mechanism. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 61, 164-171.
191. Peluffo R. D. (2007). L-Arginine currents in rat cardiac ventricular myocytes. *The Journal of physiology*, 580(Pt.3), 925–936.
192. Petroff, M. G. V., Kim, S. H., Pepe, S., Dessy, C., Marbán, E., Balligand, J. L., & Sollott, S. J. (2001). Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca²⁺ release in cardiomyocytes. *Nature cell biology*, 3(10), 867-873.

193. Phillips J.E., Burch G.E. (1964). Management of cardiac arrest. *American Heart Journal*, 67, 265–277.
194. Pinsky, D. J., Patton, S., Mesaros, S., Brovkovich, V., Kubaszewski, E., Grunfeld, S., & Malinski, T. (1997). Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circulation research*, 81(3), 372–379.
195. Portal, R. W., Robinson, B. F., & Leatham, A. G. (1963). Notes on Cardiac Resuscitation, Including External Cardiac Massage. *British medical journal*, 1(5331), 636–641.
196. Praetorius, H. A., & Spring, K. R. (2005). A physiological view of the primary cilium. *Annual review of physiology*, 67, 515–529.
197. Pravdic, D., Vlastic, N., Cavar, I., & Bosnjak, Z. J. (2012). Effect of nitric oxide donors S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine, spermine NONOate and propylamine propylamine NONOate on intracellular pH in cardiomyocytes. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 39(9), 772–778.
198. Prendergast, B. D., Sagach, V. F., & Shah, A. M. (1997). Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart. *Circulation*, 96(4), 1320–1329.
199. Prosser, B. L., Ward, C. W., & Lederer, W. J. (2011). X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6048), 1440–1445.
200. Prysyzhna, O., Burgoyne, J. R., Scotcher, J., Grover, S., Kass, D., & Eaton, P. (2016). Phosphodiesterase 5 Inhibition Limits Doxorubicin-induced Heart Failure by Attenuating Protein Kinase G I α Oxidation. *The Journal of biological chemistry*, 291(33), 17427–17436.
201. Pye, M. P., & Cobbe, S. M. (1992). Mechanisms of ventricular arrhythmias in cardiac failure and hypertrophy. *Cardiovascular research*, 26(8), 740–750.
202. Ramachandran, J., & Peluffo, R. D. (2017). Threshold levels of extracellular l-arginine that trigger NOS-mediated ROS/RNS production in cardiac

- ventricular myocytes. *American journal of physiology. Cell physiology*, 312(2), C144–C154.
203. Rannou, F., Richette, P., Benallaoua, M., François, M., Genries, V., Korwin-Zmijowska, C., ... & Poiraudou, S. (2003). Cyclic tensile stretch modulates proteoglycan production by intervertebral disc annulus fibrosus cells through production of nitrite oxide. *Journal of cellular biochemistry*, 90(1), 148-157.
204. Reilly, S. N., Liu, X., Carnicer, R., Recalde, A., Muszkiewicz, A., Jayaram, R., ... & Casadei, B. (2016). Up-regulation of miR-31 in human atrial fibrillation begets the arrhythmia by depleting dystrophin and neuronal nitric oxide synthase. *Science translational medicine*, 8(340), 340ra74-340ra74
205. Riccio, A., Medhurst, A. D., Mattei, C., Kellsell, R. E., Calver, A. R., Randall, A. D., Benham, C. D., & Pangalos, M. N. (2002). mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain research. Molecular brain research*, 109(1-2), 95–104.
206. Richards, M. A., Simon, J. N., Ma, R., Loonat, A. A., Crabtree, M. J., Paterson, D. J., Fahlman, R. P., Casadei, B., Fliegel, L., & Swietach, P. (2020). Nitric oxide modulates cardiomyocyte pH control through a biphasic effect on sodium/hydrogen exchanger-1. *Cardiovascular research*, 116(12), 1958–1971.
207. Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. G., Feil, R., Hofmann, F., & Beavo, J. A. (2002). Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(5), 3310–3317.
208. Schmidt, H. H., & Walter, U. (1994). NO at work. *Cell*, 78(6), 919-925.
209. Schmidt, H. H., Smith, R. M., Nakane, M., & Murad, F. (1992). Ca²⁺/calmodulin-dependent NO synthase type I: a biopteroflavoprotein with Ca²⁺/calmodulin-independent diaphorase and reductase activities. *Biochemistry*, 31(12), 3243–3249.

210. Schott, E. (1920). Über Ventrikelstillstand (Adam-Stokes' sche Anfälle) nebst Bemerkungen über andersartige Arrhythmien passagerer Natur.(On ventricular standstill [Stokes-Adams attacks] and other arrhythmias of temporary nature.). *Dt Arch klin Med*, 211.
211. Sears, C. E., Ashley, E. A., & Casadei, B. (2004). Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component?. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 359(1446), 1021–1044.
212. Seddon, M., Shah, A. M., & Casadei, B. (2007). Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovascular research*, 75(2), 315–326.
213. Sellman, J. E., DeRuisseau, K. C., Betters, J. L., Lira, V. A., Soltow, Q. A., Selsby, J. T., & Criswell, D. S. (2006). In vivo inhibition of nitric oxide synthase impairs upregulation of contractile protein mRNA in overloaded plantaris muscle. *Journal of Applied Physiology*, 100(1), 258-265.
214. Seo, K., Rainer, P. P., Lee, D. I., Hao, S., Bedja, D., Birnbaumer, L., ... & Kass, D. A. (2014). Hyperactive adverse mechanical stress responses in dystrophic heart are coupled to transient receptor potential canonical 6 and blocked by cGMP–protein kinase G modulation. *Circulation research*, 114(5), 823-832.
215. Shah, A. M., & MacCarthy, P. A. (2000). Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacology & therapeutics*, 86(1), 49–86.
216. Shahidullah, M., & Delamere, N. A. (2006). NO donors inhibit Na,K-ATPase activity by a protein kinase G-dependent mechanism in the nonpigmented ciliary epithelium of the porcine eye. *British journal of pharmacology*, 148(6), 871–880.
217. Sharif-Naeini, R., Dedman, A., Folgering, J. H., Duprat, F., Patel, A., Nilius, B., & Honoré, E. (2008). TRP channels and mechanosensory transduction:

- insights into the arterial myogenic response. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 456(3), 529–540.
218. Shaul, P. W., Smart, E. J., Robinson, L. J., German, Z., Yuhanna, I. S., Ying, Y., ... & Michel, T. (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to Plasmalemmal Caveolae (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(11), 6518-6522.
219. Shen, W., Hintze, T. H., & Wolin, M. S. (1995). Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation*, 92(12), 3505–3512.
220. Shen, W., Xu, X., Ochoa, M., Zhao, G., Wolin, M. S., & Hintze, T. H. (1994). Role of nitric oxide in the regulation of oxygen consumption in conscious dogs. *Circulation research*, 75(6), 1086–1095.
221. Shi, J., Geshi, N., Takahashi, S., Kiyonaka, S., Ichikawa, J., Hu, Y., Mori, Y., Ito, Y., & Inoue, R. (2013). Molecular determinants for cardiovascular TRPC6 channel regulation by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *The Journal of physiology*, 591(11), 2851–2866.
222. Shim, A. L., Mitrokhin, V. M., Gorbacheva, L. R., Savinkova, I. G., Pustovit, K. B., Mladenov, M. I., & Kamkin, A. G. (2017a). Kinetics of Mechanical Stretch-Induced Nitric Oxide Production in Rat Ventricular Cardiac Myocytes. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 163(5), 583–585.
223. Shim, A. L., Mitrokhin, V. M., Kazanski, V. E., Mladenov, M. I., & Kamkin, A. G. (2017). Discrete Stretch Eliminates Electrophysiological Dose-Dependent Effects of Nitric Oxide Donor SNAP in Rat Atrium. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 163(6), 705–709.
224. Shimoda, L. A., Welsh, L. E., & Pearse, D. B. (2002). Inhibition of inwardly rectifying K(+) channels by cGMP in pulmonary vascular endothelial cells.

- American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 283(2), L297–L304.
225. Shvets, E., Ludwig, A., & Nichols, B. J. (2014). News from the caves: update on the structure and function of caveolae. *Current opinion in cell biology*, 29, 99-106.
226. Sideris D. A. (1987). The importance of blood pressure in the emergence of arrhythmias. *European heart journal*, 8 Suppl D, 129–131.
227. Sidi, S., Friedrich, R. W., & Nicolson, T. (2003). NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5629), 96–99.
228. Singer, D. H., Ten Eick, R. E., & DeBoer, A. A. (1973). Electrophysiologic correlates of human atrial tachyarrhythmias. In *Cardiac arrhythmias* (pp. 97-111). Grune & Stratton New York.
229. Singh, K., Balligand, J. L., Fischer, T. A., Smith, T. W., & Kelly, R. A. (1996). Regulation of Cytokine-inducible Nitric Oxide Synthase in Cardiac Myocytes and Microvascular Endothelial Cells: ROLE OF EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASES 1 AND 2 (ERK1/ERK2) AND STAT1 α (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 1111-1117.
230. Sips, P. Y., Brouckaert, P., & Ichinose, F. (2011). The alpha1 isoform of soluble guanylate cyclase regulates cardiac contractility but is not required for ischemic preconditioning. *Basic research in cardiology*, 106(4), 635–643.
231. Spassova, M. A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., & Gill, D. L. (2006). A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16586–16591.
232. Stamler J. S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78(6), 931–936.

233. Stasch, J. P., Becker, E. M., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowski, K., Feurer, A., Gerzer, R., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., Schröder, H., Schroeder, W., Stahl, E., Steinke, W., Straub, A., & Schramm, M. (2001). NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature*, 410(6825), 212–215.
234. Stasch, J. P., Schmidt, P., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowski, K., Haerter, M., Heil, M., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., Schramm, M., Schroeder, W., Schröder, H., Stahl, E., Steinke, W., & Wunder, F. (2002). NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *British journal of pharmacology*, 136(5), 773–783.
235. Strijdom, H., Chamane, N., & Lochner, A. (2009). Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovascular journal of Africa*, 20(5), 303–310.
236. Strotmann, R., Harteneck, C., Nuppenmacher, K., Schultz, G., & Plant, T. D. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nature cell biology*, 2(10), 695–702.
237. Suárez, J., Torres, C., Sánchez, L., del Valle, L., & Pastelín, G. (1999). Flow stimulates nitric oxide release in guinea pig heart: role of stretch-activated ion channels. *Biochemical and biophysical research communications*, 261(1), 6–9.
238. Such-Miquel, L., Del Canto, I., Zarzoso, M., Brines, L., Soler, C., Parra, G., Guill, A., Alberola, A., Such, L., & Chorro, F. J. (2018). Effects of S-Nitrosoglutathione on Electrophysiological Manifestations of Mechanoelectric Feedback. *Cardiovascular toxicology*, 18(6), 520–529.
239. Suchyna, T. M., Johnson, J. H., Hamer, K., Leykam, J. F., Gage, D. A., Clemo, H. F., Baumgarten, C. M., & Sachs, F. (2000). Identification of a peptide toxin from *Grammostola spatulata* spider venom that blocks cation-

- selective stretch-activated channels. *The Journal of general physiology*, 115(5), 583–598.
240. Taglialatela, M., Pannaccione, A., Iossa, S., Castaldo, P., & Annunziato, L. (1999). Modulation of the K(+) channels encoded by the human ether-a-gogo-related gene-1 (hERG1) by nitric oxide. *Molecular pharmacology*, 56(6), 1298–1308.
241. Takahashi, K., Hayashi, S., Miyajima, M., Omori, M., Wang, J., Kaihara, K., ... & Sokabe, M. (2019). L-type calcium channel modulates mechanosensitivity of the cardiomyocyte cell line H9c2. *Cell Calcium*, 79, 68-74.
242. Takahashi, S., Lin, H., Geshi, N., Mori, Y., Kawarabayashi, Y., Takami, N., Mori, M. X., Honda, A., & Inoue, R. (2008). Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *The Journal of physiology*, 586(17), 4209–4223.
243. Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Valenzuela, C., & Delpón, E. (2004). Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovascular research*, 62(1), 9–33.
244. Tastan, H., Abdallah, Y., Euler, G., Piper, H. M., & Schlüter, K. D. (2007). Contractile performance of adult ventricular rat cardiomyocytes is not directly jeopardized by NO/cGMP-dependent induction of pro-apoptotic pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42(2), 411–421.
245. Tatsumi, R., Hattori, A., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., & Allen, R. E. (2002). Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Molecular biology of the cell*, 13(8), 2909–2918.
246. Terrenoire, C., Lauritzen, I., Lesage, F., Romey, G., & Lazdunski, M. (2001). A TREK-1-Like potassium channel in atrial cells inhibited by β -Adrenergic stimulation and activated by volatile anesthetics. *Circulation research*, 89(4), 336-342.

247. Timmermann, V., Dejgaard, L. A., Haugaa, K. H., Edwards, A. G., Sundnes, J., McCulloch, A. D., & Wall, S. T. (2017). An integrative appraisal of mechano-electric feedback mechanisms in the heart. *Progress in biophysics and molecular biology*, 130, 404-417.
248. Torres-Narváez, J. C., Mondragón, L.delV., Varela López, E., Pérez-Torres, I., Díaz Juárez, J. A., Suárez, J., & Hernández, G. P. (2012). Role of the transient receptor potential vanilloid type 1 receptor and stretch-activated ion channels in nitric oxide release from endothelial cells of the aorta and heart in rats. *Experimental and clinical cardiology*, 17(3), 89–94.
249. Trochu, J. N., Bouhour, J. B., Kaley, G., & Hintze, T. H. (2000). Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of cardiac oxygen metabolism: implications in health and disease. *Circulation research*, 87(12), 1108–1117.
250. Tsang, M. Y., Cowie, S. E., & Rabkin, S. W. (2004). Palmitate increases nitric oxide synthase activity that is involved in palmitate-induced cell death in cardiomyocytes. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 10(1), 11–19.
251. Ueda, K., Valdivia, C., Medeiros-Domingo, A., Tester, D. J., Vatta, M., Farrugia, G., Ackerman, M. J., & Makielski, J. C. (2008). Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27), 9355–9360.
252. Vaidyanathan, R., Vega, A. L., Song, C., Zhou, Q., Tan, B., Berger, S., ... & Eckhardt, L. L. (2013). The interaction of caveolin 3 protein with the potassium inward rectifier channel Kir2. 1: physiology and pathology related to long qt syndrome 9 (LQT9). *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17472-17480.
253. Van der Wees, C. G. C., Bax, W. H., Van Der Valk, E. J. M., & Van Der Laarse, A. (2006). Integrin stimulation induces calcium signalling in rat

- cardiomyocytes by a NO-dependent mechanism. *Pflügers Archiv*, 451, 588-595.
254. Van Wagoner, D. R., & Lamorgese, M. (1994). Ischemia potentiates the mechanosensitive modulation of atrial ATP-sensitive potassium channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 723, 392–395.
255. Vejlstup, N. G., Bouloumie, A., Boesgaard, S., Andersen, C. B., Nielsen-Kudsk, J. E., Mortensen, S. A., Kent, J. D., Harrison, D. G., Busse, R., & Aldershvile, J. (1998). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 30(6), 1215–1223.
256. Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 387-417.
257. Vennekens R. (2011). Emerging concepts for the role of TRP channels in the cardiovascular system. *The Journal of physiology*, 589(Pt 7), 1527–1534.
258. Vila-Petroff, M. G., Younes, A., Egan, J., Lakatta, E. G., & Sollott, S. J. (1999). Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circulation research*, 84(9), 1020–1031.
259. Voets, T., Prenen, J., Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Wissenbach, U., Bödding, M., Droogmans, G., & Nilius, B. (2002). Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *The Journal of biological chemistry*, 277(37), 33704–33710.
260. Vulcu, S. D., Wegener, J. W., & Nawrath, H. (2000). Differences in the nitric oxide/soluble guanylyl cyclase signalling pathway in the myocardium of neonatal and adult rats. *European journal of pharmacology*, 406(2), 247–255.
261. Walker, R. G., Willingham, A. T., & Zuker, C. S. (2000). A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2229–2234.

262. Wang, H., Kohr, M. J., Wheeler, D. G., & Ziolo, M. T. (2008). Endothelial nitric oxide synthase decreases beta-adrenergic responsiveness via inhibition of the L-type Ca²⁺ current. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 294(3), H1473–H1480.
263. Wang, P., Wei, M., Zhu, X., Liu, Y., Yoshimura, K., Zheng, M., ... & Ono, K. (2021). Nitric oxide down-regulates voltage-gated Na⁺ channel in cardiomyocytes possibly through S-nitrosylation-mediated signaling. *Scientific Reports*, 11(1), 11273.
264. Wang, Y., Wagner, M. B., Joyner, R. W., & Kumar, R. (2000). cGMP-dependent protein kinase mediates stimulation of L-type calcium current by cGMP in rabbit atrial cells. *Cardiovascular research*, 48(2), 310–322.
265. Wildhirt, S. M., Dudek, R. R., Suzuki, H., Pinto, V., Narayan, K. S., & Bing, R. J. (1995). Immunohistochemistry in the identification of nitric oxide synthase isoenzymes in myocardial infarction. *Cardiovascular research*, 29(4), 526–531.
266. William, M., Vien, J., Hamilton, E., Garcia, A., Bundgaard, H., Clarke, R. J., & Rasmussen, H. H. (2005). The nitric oxide donor sodium nitroprusside stimulates the Na⁺–K⁺ pump in isolated rabbit cardiac myocytes. *The Journal of physiology*, 565(3), 815-825.
267. Williams, J. C., Armesilla, A. L., Mohamed, T. M., Hagarty, C. L., McIntyre, F. H., Schomburg, S., Zaki, A. O., Oceandy, D., Cartwright, E. J., Buch, M. H., Emerson, M., & Neyses, L. (2006). The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex. *The Journal of biological chemistry*, 281(33), 23341–23348.
268. Wissenbach, U., Bödding, M., Freichel, M., & Flockerzi, V. (2000). Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS letters*, 485(2-3), 127–134.

269. Wit A., Rosen M., Josephson M., Wellens H. (1984). Cellular electrophysiology of cardiac arrhythmias. Tachycardias: Mechanisms, Diagnosis, Treatment. Philadelphia: Lea and Febiger, 9–100.
270. Wong, T. Y., Juang, W. C., Tsai, C. T., Tseng, C. J., Lee, W. H., Chang, S. N., & Cheng, P. W. (2018). Mechanical stretching simulates cardiac physiology and pathology through mechanosensor Piezo1. *Journal of clinical medicine*, 7(11), 410.
271. Xu, K. Y., Huso, D. L., Dawson, T. M., Brecht, D. S., & Becker, L. C. (1999). Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 657–662.
272. Yang, X. C., & Sachs, F. (1989). Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science (New York, N.Y.)*, 243(4894 Pt 1), 1068–1071.
273. Yoshida, T., Das, N. A., Carpenter, A. J., Izadpanah, R., Kumar, S. A., Gautam, S., Bender, S. B., Siebenlist, U., & Chandrasekar, B. (2020). Minocycline reverses IL-17A/TRAF3IP2-mediated p38 MAPK/NF- κ B/iNOS/NO-dependent cardiomyocyte contractile depression and death. *Cellular signalling*, 73, 109690.
274. Zawieja, S. D., Gasheva, O., Zawieja, D. C., & Muthuchamy, M. (2016). Blunted flow-mediated responses and diminished nitric oxide synthase expression in lymphatic thoracic ducts of a rat model of metabolic syndrome. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 310(3), H385–H393.
275. Zhan, R., Wang, F., Wu, Y., Wang, Y., Qian, W., Liu, M., ... & Luo, G. (2018). Nitric oxide induces epidermal stem cell de-adhesion by targeting integrin β 1 and Talin via the cGMP signalling pathway. *Nitric Oxide*, 78, 1-10.

276. Zhang, J., & Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20), 9382–9385.
277. Zhang, Y. H., Dingle, L., Hall, R., & Casadei, B. (2009). The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the positive inotropic response to mechanical stretch in the mammalian myocardium. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(7), 811–817.
278. Zhang, Y. H., Youm, J. B., Sung, H. K., Lee, S. H., Ryu, S. Y., Ho, W. K., & Earm, Y. E. (2000). Stretch-activated and background non-selective cation channels in rat atrial myocytes. *The Journal of physiology*, 523 Pt 3(Pt 3), 607–619.
279. Zhang, J. S., Kraus, W. E., & Truskey, G. A. (2004). Stretch-induced nitric oxide modulates mechanical properties of skeletal muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(2), C292-C299.
280. Zhang, Q., Scholz, P. M., Pilzak, A., Su, J., & Weiss, H. R. (2007). Role of phospholamban in cyclic GMP mediated signaling in cardiac myocytes. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 20(1-4), 157–166.
281. Ziolo M. T. (2008a). The fork in the nitric oxide road: cyclic GMP or nitrosylation?. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 18(3), 153–156.
282. Ziolo, M. T., Kohr, M. J., & Wang, H. (2008b). Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 45(5), 625–632.
283. Zweier, J. L., Wang, P., Samouilov, A., & Kuppusamy, P. (1995). Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nature medicine*, 1(8), 804–809.