

## КОТРАНСПОРТЕРЫ КАТИОНОВ И ХЛОРА: РЕГУЛЯЦИЯ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

©2014 г. С. Н. ОРЛОВ<sup>1,2</sup>, С. В. КОЛЬЦОВА<sup>1</sup>,  
Л. В. КАПИЛЕВИЧ<sup>2,3</sup>, Н. О. ДУЛИН<sup>4</sup>  
и С. В. ГУСАКОВА<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Биологический факультет Московского государственного  
университета им. М.В.Ломоносова, Москва;

<sup>2</sup> Томский государственный университет, Томск;

<sup>3</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск;

<sup>4</sup> Университет г. Чикаго, США.

I. Введение. II. Регуляция активности CCC. III. Физиологическое  
значение. IV. Роль в патогенезе артериальной гипертензии.  
V. Заключение

### I. ВВЕДЕНИЕ

Котранспортеры катионов и хлора (cation-chloride cotransporters – CCC) относятся к группе ионных переносчиков (solute carriers – SLC), осуществляющих перенос ионов через биологические мембраны как по их электрохимическому градиенту, так и против него. В последнем случае энергией служат градиенты котранспортируемых соединений, созданные за счет работы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы и других

---

*Принятые сокращения:* ГМК – клетки гладкой мускулатуры; ПВЯ – паравентрикулярные ядра; СНС – симпатическая нервная система; ЦНС – центральная нервная система; CCC (cation-chloride cotransporters) – котранспортеры хлора и катионов; GABA –  $\gamma$ -аминомасляная кислота; КСС –  $\text{K}^+, \text{Cl}^-$  котранспорт; NCC –  $\text{Na}^+, \text{Cl}^-$  котранспорт; NKCC –  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорт; OSR1 – oxidative stress response киназа; SPAK – Ste20-related praline-alanine-rich киназа; WNK – with no K = лизин киназа.

*Адрес для переписки:* проф. С. Н. Орлов, Биологический факультет МГУ, комн. 169, Воробьевы горы, д. 1, корп. 12. Москва, 199899; sergeinorlov@yandex.ru

Работа выполнена при поддержке грантов Канадского института исследований в области здравоохранения (МОР-81392), Обществ по изучению сердца и почек Канады, РФФИ (№ 09-0073/04, № 14-04-31705), Федеральной целевой программой 2009–2013 гг «Научно-исследовательские кадры инновационной России».

ионных насосов. Эта группа ионных транспортеров включает более 300 генов, организованных в 52 семейства [1]. CCC относятся к SLC12 семейству, представители которого осуществляют симпорт анионов  $\text{Cl}^-$  совместно с катионами  $\text{Na}^+$  и/или  $\text{K}^+$ . SLC12 включает  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  котранспорт (NCC), кодируемый единичным геном (*SLC12A3*),  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  котранспорт (NKCC), кодируемый двумя генами: *SLC12A2* (NKCC1) и *SLC12A1* (NKCC2), и  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  котранспорт (KCC), кодируемый *SLC12A4* (KCC1), *SLC12A5* (KCC2), *SLC12A6* (KCC3) и *SLC12A7* (KCC4). NKCC ингибируется буметанидом, фуросемидом и родственными им соединениями, получивших название петлевых диуретиков по месту их основного действия в почках – восходящий отдел петли Генле. NCC полностью блокируется производными тиазида. В отличие от NKCC и NCC, специфических ингибиторов KCC до сих пор не обнаружено и активность этого переносчика лишь частично уменьшается в присутствии высоких концентраций фуросемида [2].

Сведения о структуре генов, мембранной архитектуре и фармакологии CCC в полной мере рассмотрены в ряде обзоров [2–4]. В этой связи мы сфокусировали нашу статью на анализе систем, принимающих участие в регуляции активности CCC, а также их роли в поддержании водно-солевого гомеостаза и артериального давления. В последнее время появились данные о вовлечении этих переносчиков в канцерогенез [5, 6], патогенез болезней нервной системы [7, 8] и анемий, обусловленных изменением объема и гидротации эритроцитов [9, 10]. В силу ограничения объема эти исследования в нашем обзоре не рассматриваются.

## II. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ CCC

Данные о регуляции экспрессии CCC глюкокортикоидами и другими стимулами, влияющими на транскрипцию генов посредством активации SGK1 киназы (serum-and-glucocorticoid-inducible kinase-1,) были недавно суммированы Лангом и Воелклем [11]. Эпигенетический механизм регуляции экспрессии этих переносчиков частично рассмотрен нами на примере NKCC1 в разделе III. Здесь же мы остановимся на негеномных системах регуляции активности CCC.

### ВТОРИЧНЫЕ ПОСРЕДНИКИ

Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о тканеспецифическом характере регуляции CCC вторичными посредниками [11, 12]. Так, например, в изолированных гладкомышечных клетках

клетках (ГМК) аорты крысы увеличение содержания цАМФ в ответ на активацию  $\beta$ -адренергических рецепторов и аденилатциклазы ингибировало НКСС1, а повышение  $[Ca^{2+}]_i$  в ответ на добавление ионофора увеличивало активность этого переносчика [13–15]. Активация сигнальной системы, опосредованной цГМФ, не влияла на НКСС1, но увеличивала активность КСС в ГМК [16]. В отличие от ГМК, активаторы цАМФ и цГМФ сигнальных систем, также как и хелаторы вне- и внутриклеточного кальция не оказывали существенного влияния на активность НКСС1 в клетках дистального отдела эпителия почечных канальцев из почек собаки (клетки MDCK) [17–19], в то время как в секретирующем эпителии жабр акулы [20] и эпителии воздухопроводящих путей человека [21] цАМФ активировал НКСС1. Известно, что высвобождение диацилглицерола в ответ на активацию рецепторов, сопряженных с ГТФ-связывающими белками, сопровождается увеличением активности протеинкиназы С. Было показано, что активация этого фермента форболовым эфиром не влияет на НКСС1 в ГМК [13], но полностью ингибирует этот переносчик в клетках MDCK [17–19]. Эти данные позволяют предположить, что такие канонические вторичные посредники как цАМФ, цГМФ,  $Ca^{2+}$ , диацилглицерол модулируют активность ССС через взаимодействие с тканеспецифическими элементами сигнальных каскадов нежелезы с самими переносчиками [4]. К таким элементам относятся рассмотренные в следующем разделе протеинкиназы и фосфопротеин фосфатазы.

#### ПРОТЕИНКИНАЗЫ И ФОСФАТАЗЫ

Первые данные о регуляции транспорта ионов посредством фосфорилирования ССС были получены в лаборатории Б. Форбуша. В этих экспериментах было установлено, что увеличение буметанид-чувствительных потоков  $K^+$  в жабрах акулы в ответ на гиперосмотическое сжатие и добавление активатора аденилатциклазы коррелирует с фосфорилированием в НКСС1 остатков серина и треонина [20]. Позднее было предположено, что реципрокная регуляция ССС при изменении объема клеток (сжатие активирует НКСС, но ингибирует КСС) и внутриклеточной концентрации хлора (увеличение  $[Cl^-]_i$  ингибирует НКСС, но активирует КСС) опосредована разнонаправленным действием этих факторов на активность киназ и фосфатаз на фосфорилирование ССС [22–24] (рис. 1).

Хотя ССС содержат консенсусы, которые могут быть фосфорилированы протеинкиназой С, протеинкиназой А, казеиновой киназой II, прямого действия этих канонических протеинкиназ на фосфо-

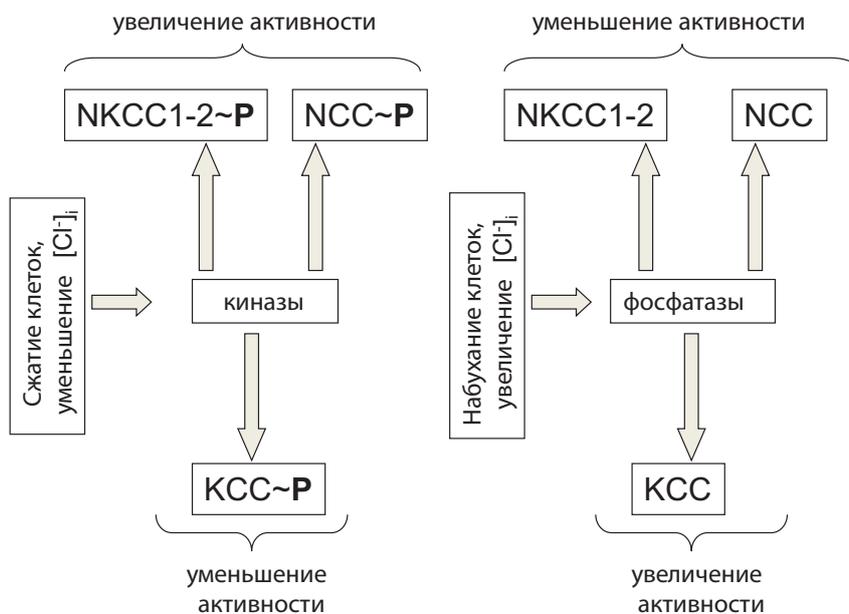


Рис. 1. Регуляция котранспортеров катионов и хлора при изменении объема клеток и внутриклеточной концентрации хлора, опосредованная реципрокным изменением фосфорилирования переносчиков.

рирование CCC, коррелирующее с изменением их транспортной функции до сих пор не обнаружено [2, 25]. Напротив, исследования проведенные в целом ряде лаборатория показали решающую роль в регуляции активности CCC серин-треонин киназами семейства WNK, в которых остаток лизина, присутствующий в других серин-треониновых киназах замещен на цистеин (with no K = лизин) [26, 27], а также SPAK (sterile-20 (Ste20)-related praline-alanine-rich kinase) и OSR1 (oxidative stress response) киназами [28].

В геноме человека обнаружены 4 WNK киназы (WNK1–4), находящиеся на хромосомах 12, 9, X и 17, соответственно [25]. Как уже отмечалось выше, у всех представителей этого семейства отсутствует лизин, ответственный за связывание с АТФ во всех других серин-треониновых киназах. Первые указания о вовлечении WNK в регуляцию ионного транспорта были получены при обнаружении мутаций генов *WNK1* и *WNK4* у больных псевдоальдостеронизмом второго типа (pseudohypoaldosteronism type II, PHAII) – редкой формы гипертензии, передающейся по наследству и сопровождающейся гиперкалемией

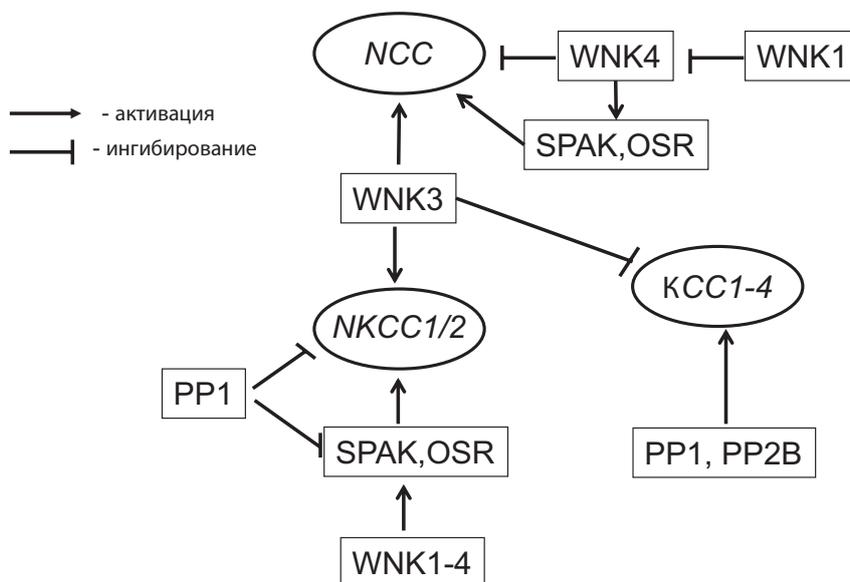


Рис. 2. Схема, показывающая взаимодействие серин-треониновых протеинкиназ и фосфатаз в регуляции активности котранспортеров катионов и хлора.

и метаболическим ацидозом [29]. Так как тиазиды, ингибирующие NCC, являются наиболее эффективными при лечении РНАП, было предположено, что как WNK1, так и WNK4 вовлечены в регуляцию активности этого переносчика. Консервативный домен WNK киназ включает собственно каталитический участок, аутоингибиторный домен и домен, в котором обнаружена мутация WNK4 у больных РНАП.

В опытах на перфорированных ооцитах было установлено, что WNK3 увеличивает активность NCC, NKCC1 и NKCC2 в условиях гипотонического набухания через фосфорилирование 2 остатков треонина, локализованных на их N-концевых участках [30, 31]. Было также отмечено, что в этих же условиях коэкспрессия WNK3 приводила к полной инактивации KCC1–4, которая устранялась при добавлении каликулина А или циклоспорина А – ингибиторов протеинфосфатаз PP1 и PP2B [32] (рис. 2). Эти данные позволяют предположить, что WNK выполняют роль первичного сенсора тех сигналов, которые генерируются при изменении объема клеток и  $[Cl^-]_i$ , и приводят к реципрокной регуляцией NKCC и KCC (рис. 1).

SPAK и OSR1, принадлежащие к семейству киназ млекопитающих, гомологичных Ste20/Sts киназе дрожжей, имеют 90% идентичных

аминокислот в своем каталитическом домене [33]. Эксперименты, проведенные на перфорированных ооцитах, не обнаружили влияния SPAK на активность НКСС1, в то время как экспрессия каталитически неактивной киназы ингибировало НКСС1 и активировало КСС2 [34, 35]. SPAK опосредованная активация переносчика была также обнаружена при исследовании влияния WNK3 на активность НКСС2 [36]. В последующих исследованиях было установлено, что SPAK взаимодействует как с N-концевым фрагментом НКСС1, так и с регуляторным доменом WNK киназ [27, 34, 37]. В другой серии экспериментов было установлено, что активность НКСС в сенсорных нейронах снижена в 2 раза у мышей, лишенных гена *SPAK* (мыши *SPAK<sup>-/-</sup>*) по отношению к контрольным животным. На основании этих данных было предположено, что наряду с прямым влиянием на активность ССС ррегуляция этих переносчиков WNK киназами может быть опосредована через их фосфорилирование SPAK и OSR1 [28, 38] (рис. 2).

Сравнительно недавно было установлено, что в отличие от прямого ингибирующего действия WNK4 на активность NCC, обнаруженного у больных РНАП, активация этого транспортера при действии ангиотензина II опосредована через фосфорилирование WNK4 SPAK/OSR1 [39, 40]. Этот феномен связан, по-видимому, с тем фактом, что WNK1–4 генерируют большое число сплайс-вариантов, выполняющих различные тканеспецифические функции, большинство из которых остаются неизвестными. Не исключено также, что кроме WNK, SPAK и OSR1 в регуляции активности ССС принимают участие и другие не идентифицированные протеинкиназы. В самом деле, было установлено, что увеличение скорости функционирования НКСС1 при действии активатора аденилатциклазы форсколина и при трансфекции SPAK сопровождается фосфорилированием различных остатков треонина в N-концевом фрагменте этого переносчика [41, 42].

### III. ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Механизмы вовлечения ССС в реабсорбцию и секрецию соли клетками эпителия в достаточно полном виде проанализированы в целом ряде обзоров [2–4]. В этой связи мы в этом разделе остановимся на других функциях этих переносчиков, которые не ограничиваются клетками эпителия и имеют общебиологическое значение.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОТВЕТЫ, ОПОСРЕДОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯМИ  
ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ  $Cl^-$

Во всех изученных клетках ССС генерируют как входящие, так и выходящие потоки ионов, и направленность их нетто-потоков зависит как от стехиометрии переноса, так и от трансмембранного градиента котранспортируемых катионов, создаваемых  $Na^+, K^+$ -АТФазой. При стехиометрии переноса 1:1 величина ионных потоков находится в линейной зависимости от концентрации котранспортируемых ионов. Так как  $[Na^+]_o \gg [Na^+]_i$ ,  $[K^+]_i \gg [K^+]_o$ , а  $[Cl^-]_o > [Cl^-]_i$ , нетто-потоки, генерируемые НСС и КСС направлены в клетку и из клетки, соответственно. Более сложная зависимость установлена для НКСС, работающего со стехиометрией  $1Na^+ : 1K^+ : 2Cl^-$ . В этом случае  $[Cl^-]_o^2 \gg [Cl^-]_i^2$  и потому в большинстве типов клеток нетто-поток, опосредованный этим переносчиком, направлен в цитоплазму.

Приведенный выше анализ позволяет предположить, что ССС могут принимать участие в регуляции  $[Cl^-]_i$ , в то время как их влияние на внутриклеточную концентрацию одновалентных катионов несущественно ввиду высокой активности  $Na^+, K^+$ -насоса. В самом деле установлено, что в целом ряде клеток ингибирование НСС и НКСС сопровождается уменьшением  $[Cl^-]_i$ , в то время как ингибирование КСС увеличивает этот параметр [43]. Важно отметить, что в зависимости от относительной активности этих переносчиков  $[Cl^-]_i$  может быть как выше, так и ниже параметра, соответствующего равновесному потенциалу Нернста. Это означает, что в клетках, обогащенных анионными каналами, ССС могут принимать участие в формировании электрического потенциала, а следовательно влиять на весь спектр клеточных функций, контролируемых потенциал-чувствительными белками, локализованными в плазматической мембране клеток. Этот вопрос рассмотрен нами на примере регуляции сокращения клеток ГМК и электрической активности нейронов ингибиторами ССС.

СОКРАЩЕНИЕ И МИОГЕННЫЙ ТОНУС ГМК СОСУДОВ

В отличие от доминирующей роли проводимости плазматической мембраны для  $K^+$  ( $P_K$ ) в формирование электрического сопротивления и потенциала ( $E_m$ ) покоящихся клеток скелетной и сердечной мускулатуры, значения  $P_K$  и  $P_{Cl}$  в ГМК различаются незначительно [44]. Эта особенность предполагает участие соотношения  $[Cl^-]_i/[Cl^-]_o$ , а следовательно и ССС в регуляции  $E_m$  и сопряжения возбуждения и сокращения ГМК. В самом деле, ингибиторы НКСС фуросемид и буметанид уменьшали  $[Cl^-]_i$  [45, 46] и вызывали гиперполяризацию ГМК сосудов крысы [45]. Эти данные позволяли предположить,

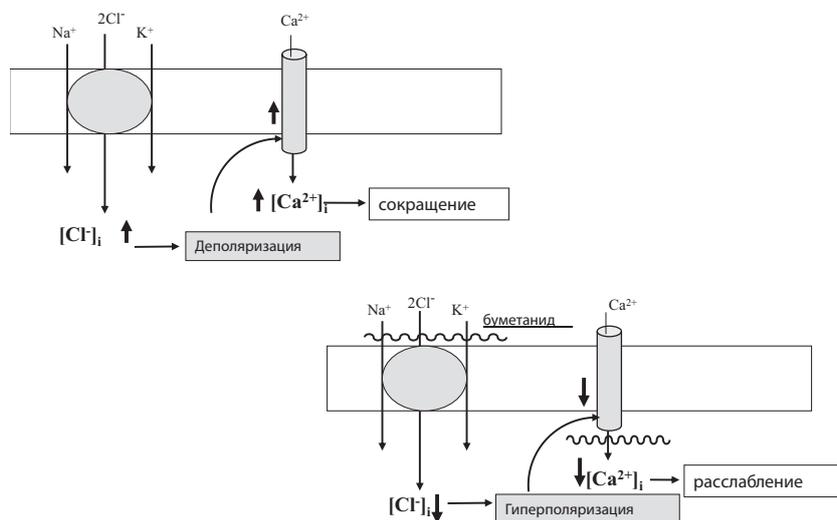


Рис. 3. Механизм вовлечения универсальной изоформы  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорта (NKCC1) в регуляцию сокращения клеток гладкой мускулатуры. NKCC1 способствует увеличению  $[\text{Cl}^-]_i$ , деполаризации ГМК, сарколема которых обогащена анионными каналами, открытию потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$  каналов, увеличению  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  и сокращению. Добавление буметанида и других петлевых диуретиков, ингибирующих NKCC1, приводит к уменьшению  $[\text{Cl}^-]_i$ , гиперполяризации, закрытию потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$  каналов и расслаблению ГМК.

что в основе снижение базального тонуса ГМК, обнаруженного при действии петлевых диуретиков [47–49], а также подавления этими соединениями сокращения полосок гладкой мускулатуры в ответ на умеренное увеличение  $[\text{K}^+]_o$  [46], электрическую стимуляцию [50], добавление гистамина [51], ангиотензина II [52], тромбосана  $\text{A}_2$  [53, 54], окситацина [55, 56], агонистов  $\alpha$ -адренэргических [46, 57–59] и пуринэргических рецепторов [60] является  $\text{Cl}^-$ -зависимая гиперполяризация и снижение активности потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$  каналов L-типа (рис. 3).

Под миогенный тонусом (ответом) понимается уникальное свойство сосудов с диаметром <100–200 мкм: вслед за незначительным увеличением диаметра в ответ на прирост давления заполняющей их жидкости радиус таких сосудов существенно уменьшается. Необходимо отметить, что как кинетика так и абсолютная величина миогенного ответа сосудов различных отделов кровяного русла существенно различается. Миогенный ответ, выявленный в сосудистом русле скелетных мышц, а так же брызжеечных мозговых, почечных и коро-

нарных сосудах играет центральную роль в поддержании постоянства движения крови в пределах микроциркуляторного русла не зависимо от колебаний системного артериального давления [61–63].

Было установлено, что буметанид уменьшает миогенный тонус брызжеечных артерий [64] и полностью устраняет миогенный ответ афферентных артериол почек [54]. В нашей лаборатории было обнаружено, что ингибирующее действие буметанида, но не ингибитора потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$  каналов L-типа никардипина на миогенный тонус, а также сокращение в ответ на  $\alpha$ -адренергическую стимуляцию отсутствует в брызжеечных артериях, изолированных  $NKCC1^{-/-}$  мышей [64]. Так как  $NKCC2$  в ГМК отсутствует, полученные данные можно рассматривать как доказательство того, что буметанид и другие петлевые диуретики подавляют сокращение и миогенный ответ ГМК сосудов через взаимодействие с универсальной изоформой  $Na^+, K^+, 2Cl^-$  котранспорта  $NKCC1$ .

#### СИНАПТИЧЕСКАЯ ПЕРЕДАЧА

Взаимодействие нейронов контролируется нейротрансмиттерами, которые усиливают или подавляют проведение электрических сигналов. Возбуждающие и ингибирующие нейротрансмиттеры вызывают деполяризацию и гиперполяризацию постсинаптической мембраны, соответственно. Так, например, ионотропные рецепторы глутамата и никотиновые рецепторы ацетилхолина вызывают деполяризацию через увеличение ионного тока, опосредованного каналами, проницаемыми для  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$ , в то время как гиперполяризация связана с увеличением проводимости калиевых каналов в ответ на активацию метаболитных рецепторов ацетилхолина. В отличие от указанных выше нейротрансмиттеров,  $\gamma$ -аминомасляная кислота ( $GABA$ ) вызывает увеличение проницаемости для  $Cl^-$  и других низкомолекулярных анионов через взаимодействие с ионотропными  $GABA_A$  рецепторами. Направленность нетто потока, опосредуемого этими рецепторами, определяется градиентом концентраций хлора и электрическим потенциалом постсинаптической мембраны. Если  $RT/F \times \ln([Cl^-]_o/[Cl^-]_{in}) < E_m$ , то поток хлора будет направлен внутрь клетки, вызывая гиперполяризацию мембраны и ингибируя проведение нервного импульса; в противном случае поток хлора изменяет свое направление и  $GABA_A$  рецепторы выполняют возбуждающую функцию (рис. 4).

Изложенные выше данные позволяют предположить, что соотношение активностей  $NKCC1$  и  $KCC2$ , реализующих входящий и выходящий поток  $Cl^-$ , соответственно, выполняет ключевую роль в

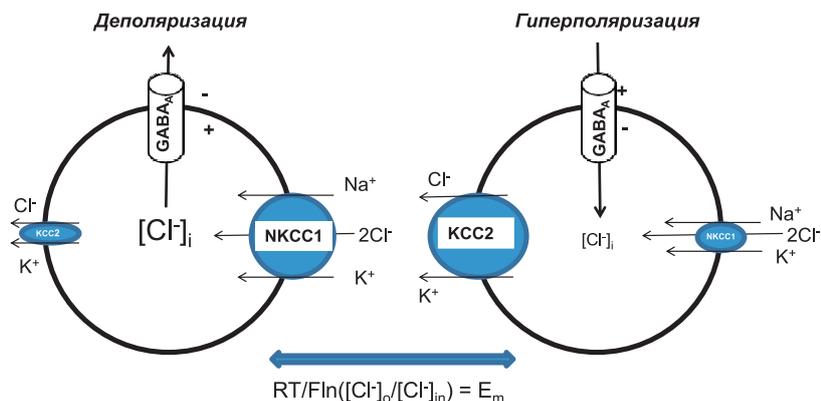


Рис. 4. Механизм вовлечения NKCC1 и KCC2 в функционирование GABA<sub>A</sub> рецепторов. Отличия в размер символов отражают различия в активности ионных переносчиков, вовлеченных в регуляцию [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>. Приведенное уравнение отражает условия, при которых нетто-поток анионов через GABA<sub>A</sub> рецепторы отсутствует.

функционировании GABA<sub>A</sub> рецепторов. В самом деле, уменьшение активности NKCC1, на фоне увеличения активности KCC2 является причиной резкого изменения функциональных свойств GABA<sub>A</sub> рецепторов в центральной нервной системе (ЦНС) млекопитающих в процессе онтогенеза: функционирующие как активирующие в пренатальной стадии, эти рецепторы становятся ингибирующими в первые несколько дней после рождения (для обзора см. [7, 8, 28]). Установлено, что в нейронах головного мозга крыс содержание WNK3 РНК коррелирует с экспрессией KCC2, т.е. достигает своих максимальных значений на 21 день после рождения [30]. В этой связи можно предположить, что именно экспрессия этой киназы определяет рассмотренную выше возрастную особенность функционирования GABA<sub>A</sub> рецепторов.

#### РЕГУЛЯЦИЯ ОБЪЕМА КЛЕТОК

Покоящиеся клетки животных поддерживают свой объем с точностью 1–2% посредством систем, обеспечивающих входящий и выходящий поток осмолитиков и получивших название *regulatory volume increase* (RVI) и *regulatory volume decrease* (RVD), соответственно [65, 66]. В ранних исследованиях, проведенных на эритроцитах млекопитающих, было обнаружено, что сжатие и набухание клеток приводит к активации NKCC и KCC, соответственно [67–69]. В нашей лабо-

ратории было установлено, что RVI в ответ на гиперосмотическое набухание ГМК сосудов опосредован активацией NKCC [15]. Следует особо отметить, что в изосмотических условиях ингибитор этого переносчика буметанид не оказывает существенного влияния на объем ряда клеток, включая фибробласты легких человека, что указывает на то, что в отсутствие внешних стимулов NKCC оказывает сравнительно малый вклад в по отношению к  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазе и другим ион-транспортующим системам в генерацию общего потока осмолитиков. Сравнительно недавно нами было установлено, что на фоне заингибированной убаином  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы добавление буметанида вызывало ~2-кратному увеличению объема фибробластов легких [70]. Это наблюдение означает, что при ингибировании этого фермента и диссипации градиентов одновалентных ионов создается существенный выходящий нетто-поток ионов, опосредованный NKCC1 – единственной изоформой NKCC, экспрессированной в этих клетках. Функциональные последствия нарушения регуляции клеточного объема рассмотрены в ряде обзоров [65, 71, 72]. Патологические последствия нарушения этой регуляторной системы проиллюстрированы нами на примере набухания астроцитов в условиях ишемии головного мозга (см. раздел IV).

#### IV. РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Повышение системного артериального давления крови прослеживается у 25% взрослого населения, что является основным фактором риска осложнений, обуславливающих преждевременную инвалидизацию и смертность, включая инсульт, сердечную недостаточность, болезнь почек [73]. В 2001 году только в США на лечение гипертензии было израсходовано 54 миллиарда долларов [74]. Из общих соображений термодинамики повышение системного артериального давления может быть обусловлено увеличением периферического сопротивления системы кровообращения, частоты сердечного выброса и объема внеклеточной жидкости, который определяется работой почек (рис. 5). В свою очередь, все перечисленные параметры находятся под контролем большого числа гормонов, нейротрансмиттеров и симпатической нервной системы (СНС) [75]. Вовлечение перечисленных выше систем в патогенез гипертензии находит отражение в наборе основных средств, используемых для нормализации артериального давления. К ним относятся диуретики, подавляющие реабсорбцию соли в почках путем ингибирования NKCC2 (фурсемид) и NCC



Рис. 5. Основные системы, принимающие участие в повышении системного артериального давления (САД).

название вторичной гипертензии. В подавляющем же большинстве случаев, получивших в англоязычной литературе название первичной или эссенциальной гипертензии, а в русскоязычной литературе гипертоническая болезнь, причины повышения артериального давления остаются не известны [76]. В настоящем разделе мы рассмотрим данные об участии ССС в патогенезе как вторичной, так и первичной гипертензии.

#### МОНОГЕННЫЕ ФОРМЫ ВТОРИЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И ГИПОТЕНЗИИ

Изученные к настоящему времени моногенные формы гипертензии и гипотензии обусловлены мутациями генов, вовлеченных в регуляцию объема внеклеточной жидкости клетками эпителия почечных канальцев [77, 78]. Это наблюдение согласуется с ключевой ролью почек в долгосрочном поддержании повышенного артериального давления, впервые отмеченного Артуром Гайтоном [79]. Среди этих моногенных болезней три типа мутаций связаны с функционированием

(бендрофлуметиазид), лекарства, вызывающие расслабление сосудов, в том числе ингибиторы ангиотензин превращающего фермента (рамиприл), антагонисты рецепторов ангиотензина II (лозартан), блокаторы  $Ca^{2+}$  каналов (амлодипин) и антагонисты альфа-адренэргических рецепторов (доксазозин), антагонисты бета-адренэргических рецепторов (атенол), подавляющие активность СНС [73].

В ряде случаев причины активации сервомеханизмов долгосрочного повышения артериального давления изучены в достаточно полной мере. К ним относятся гипертензии, обусловленные опухолями надпочечников и почечной недостаточностью, а также моногенные гипертензии, т.е. гипертензии, обусловленные мутацией единичного гена. Эти формы болезни, на долю которых приходится менее 5%, получили

ССС. Так инактивирующие мутации NKCC2 и NCC, отмеченные у больных синдромом Бартера первого типа и синдромом Гительмана, соответственно, приводят к снижению реабсорбции солей в восходящем отделе петли Генле и в дистальном отделе нефрона, что в свою очередь приводит к снижению объема внеклеточной жидкости и к уменьшению системного артериального давления [80, 81]. При обоих заболеваниях, наследуемых по законам классической генетики Менделя, отмечается гипокалемия и алкалоидоз, что является универсальным маркером сниженной реабсорбции соли в этих отделах нефрона. Напротив, гипертензия, отмеченная у больных РНАП, также известной под названием синдрома Гордона, связана с мутациями WNK1 и WNK4, что приводит к активации NCC, увеличению реабсорбции натрия и гиперкалемии [29]. Сведения об участии WNK киназ в регуляции ССС рассмотрены нами в разделе I.

#### ПЕРВИЧНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ

В отличие от рассмотренных выше моногенных синдромов, повышение артериального давления при первичной гипертензии является следствием как генетической предрасположенности, так и внегенных факторов. К последним относится ограниченная физическая активность, ожирение, курение, повышенное потребление соли и алкоголя. В свою очередь, наследуемые факторы связаны с изменениями функционирования 4–5 генов, комбинация которых может быть различна даже в пределах одной популяции [82], что во многом объясняет мозаичную природу патогенеза этой болезни, впервые отмеченной Пикерингом [83].

В середине 1970-х годов, мы начали поиск наследуемых факторов патогенеза гипертензии на примере изучения активности ион-транспортирующих систем плазматической мембраны, используя крыс со спонтанной генетической гипертензией (spontaneously hypertensive rats, SHR и Milan hypertensive strain, MHS), являющихся наиболее адекватной моделью гипертонической болезни человека. В этих исследованиях было установлено, что в случае эритроцитов документированное ранее увеличение проницаемости для одновалентных катионов плазматической мембраны у крыс SHR и MHS [84, 85] обусловлено повышением активности NKCC (для обзора см. [86–90]). На вовлечение этого переносчика в патогенез первичной гипертензии указывали также следующие данные. (I). В эритроцитах гибридов первого поколения, полученных скрещиванием MHS и нормотензивных крыс (Milan normotensive strain, MNS) ( $F_1$  MHSxMNS)

подвергнутых жесткому  $\gamma$ -облучению, активность НКСС была увеличена только после пересадки костного мозга от MHS [91]. Эти данные указывали на то, что увеличенная активность НКСС является наследуемым фактором, нежели результатом долгосрочного воздействия повышенного артериального давления. (2). В эритроцитах гибридов второго поколения, полученных при скрещивании SHR и нормотензивных крыс линии Kyoto-Wistar ( $F_2$  SHR $\times$ WKY), а также  $F_2$  MHS $\times$ MNS активность НКСС коррелировала с величиной артериального давления [91, 92]. (3). Рядом исследователей было установлено, что артериальное давление снижено у  $NKCC1^{-/-}$  мышей [93–95]. Следует отметить, что Киму с соавторами не удалось обнаружить этих различий [96]. Причины этого противоречия остаются неизвестными. (4). Введение селективного ингибитора  $Na^+, K^+, 2Cl^-$  котранспорта буметанида приводило к быстрому снижению артериального давления у контрольных, но не у  $NKCC1^{-/-}$  мышей [58].

Так как  $NKCC1$  является единственной изоформой  $Na^+, K^+, 2Cl^-$  котранспорта, идентифицированной в эритроцитах и ГМК, приведенные выше данные указывали на то, что у животных, являющихся экспериментальной моделью гипертонической болезни человека, повышение активности этого переносчика принимает участие в активации сервомеханизмов, приводящих к долгосрочному повышению артериального давления. В связи с этим возникал вопрос о механизме вовлечения этого переносчика в регуляцию системного артериального давления. Данные приведенные в разделе III, указывают на то, что таким механизмом может быть участие  $NKCC1$  в сокращении ГМК и активности СНС, опосредованное регуляцией  $[Cl^-]_{in}$ . В самом деле, было обнаружено увеличение ингибирующего действия буметанида на сокращение брызжеечных артерий в ответ на активацию фенилэфрином альфа-адренэргических рецепторов у SHR по отношению к нормотензивному контролю [97, 98]. Систематические исследования активности НКСС в ГМК при первичной гипертензии до сих пор не проведены (для обзора см. [86–90]). Было обнаружено, однако, что как в аорте, так и в сердце SHR увеличено содержание мРНК и белка  $NKCC1$  [97]. Возможные механизмы этого явления рассмотрены ниже.

Как уже отмечалось выше, наряду с изменениями ион-транспортующих систем почек и сосудов первичным фактором патогенеза гипертонической болезни является нарушение функционирования ЦНС, что в свою очередь приводит к активации СНС и к долгосрочному поддержанию повышенного артериального давления через ее воздействие на сердечно-сосудистую системы и почки (рис. 6)

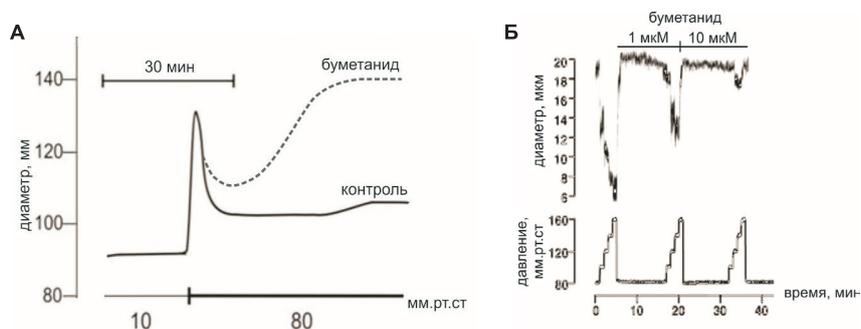


Рис. 6. Влияние буметанида на миогенные ответ брызгеечных сосудов (А) и афферентной артериолы почки крысы (Б) [54, 64].

[99–102]. Эта гипотеза согласуется с многочисленными данными об активации СНС как у больных гипертонической болезнью [99], так и у крыс SHR [103], а также с установлением центральной роли в активации СНС паравентрикулярных ядер (ПВЯ) гипоталамуса [104], гиперактивность которых при первичной гипертензии хорошо документирована [105, 106].

Известно, что возбудимость пресинаптических нейронов ПВЯ активируется возбуждающими глутаматэргическими нейронами и подавляется ингибирующими GABAэргическими нейронами, соответственно [107]. Показано, что в ПВЯ SHR GABAэргическая регуляция снижена [107, 108], но механизмы этого явления до последнего времени оставались не известными. Как отмечалось выше, соотношение ингибирующего и активирующего действия GABA<sub>A</sub> рецепторов определяется внутриклеточной концентрацией хлора, которая в свою очередь зависит от соотношения активностей NKCC1 и KCC2 (рис. 4). В исследованиях, проведенных в Техаском университете было показано, что в ПВЯ SHR электрический потенциал, при котором происходит обратимость тока, опосредованного GABA<sub>A</sub> рецепторами ( $E_{GABA}$ ), сдвинут по отношению к нормотензивным животным на 15 мВ в сторону положительных значений, что соответствует двукратному увеличению  $[Cl^-]_i$  [109]. Так как эти различия равно как и сниженная ингибирующая активность GABA нейронов SHR устранялись при действии низких концентрации буметанида, но не фуросемида, было предположено что увеличение  $[Cl^-]_i$  обусловлено активацией NKCC1 нежели ингибированием KCC2. С этим выводом согласовались данные об увеличении в ПВЯ SHR содержания как мРНК, так и иммунореактивного белка NKCC1, но не KCC2 [109].

Механизмы, приводящие к активации НКСС1 при первичной гипертензии, остаются мало изученными, что, по-видимому, отражает как полигенно-мозаичную природу этой болезни, так и множественные механизмы регуляции активности и экспрессии ССС. Так, например, прирост  $[Ca^{2+}]_i$  активирует, а сАМР ингибирует активность этого переносчика в ГМК [13, 57, 110]. Многочисленные исследования документировали при первичной гипертензии нарушения в обоих сигнальных системах [111, 112]. Ключевая роль WNK, SPAK и OSR1 киназ в регуляции активности ССС, включая НКСС1, НКСС2 и NCC, рассмотрена нами в разделе II, а их участие в регуляции артериального давления продемонстрировано на примере моногенных гипертензий [113, 114] и генетически модифицированных животных [115]. Так Бергайя с сотрудниками сообщили что у *Wnk*<sup>+/-</sup> мышей снижено как фосфорилирование НКСС1, так и прирост артериального давления в ответ на активацию  $\alpha$ -адренэргических рецепторов [116]. Буметанид-чувствительная компонента сокращения сосудов была также снижена у мышей, накаутированных по SPAK [117]. Следует, однако, отметить, что в отличие от моногенных гипертензий мутаций генов ССС и регуляторного каскада WNK/SPAK/OSR1 при первичной гипертензии не обнаружено.

Недавно проведенные исследования показали, что содержания как НКСС1 мРНК, так и НКСС1 белка увеличено в аорте, сердце и нейронах ПВЯ крыс со спонтанной гипертензией [97, 109]. По крайней мере в случае аорты и сердца SHR повышенная экспрессия этого переносчика сопровождается снижением метилирования промотора *NKCC1* гена [97]. Следует также отметить, что метилирование *NKCC1* промотора увеличивалось с возрастом у нормотензивных и не изменялось у гипертензивных животных [98]. Было также установлено, что активность ДНК метилтрансферазы 3В (DNMT3B) в 3 раза выше у 18-ти недельных нормотензивных крыс по сравнению с SHR того же возраста. Эти исследования предполагают, что при экспериментальной модели первичной гипертензии гипометилирование *NKCC1* промотора является следствием снижения активности DNMT3B, что в свою очередь приводит к повышению экспрессии НКСС1, увеличению  $[Cl^-]_i$ , деполяризации ГМК, увеличению сосудистого тонуса и системного артериального давления. Роль эпигенетических факторов в повышении экспрессии НКСС1 в нейронах ПВЯ SHR, определяющих увеличение активности СНС, остается не исследованной. Было обнаружено, однако, что в этих клетках увеличено гликозилирование НКСС1 [109], что, по-видимому, способствует увеличению содержания мембранносвязанного белка, т.е. той его

фракции, которая принимает участие в котранспорте одновалентных ионов и хлора.

#### ОСЛОЖНЕНИЯ, ВЫЗВАННЫЕ ПОВЫШЕНИЕМ СИСТЕМНОГО АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ

Основной причиной преждевременной смертности больных гипертонической болезнью является долгосрочного воздействия повышенного артериального давления на такие органы-мишени как сосуды головного мозга и почек [118]. В первом случае увеличивается вероятность необратимого нарушения кровотока и возникновения инсульта, а во втором – структурные изменения нефрона, приводящие к нарушениям водно-солевого гомеостаза и протеинурии [73].

Так как  $R_{bf} \sim 1/d^4$  где  $R_{bf}$  – сопротивление потоку крови ( $I$ ) и  $d$  – диаметр просвета сосуда [119], роль миогенного тонуса сосудов как созданного природой инструмента защиты органов-мишеней от повышения системного артериального давления изучалось многими исследователями [120]. Было установлено, что длительное подавление миогенного ответа как следствие гипертрофии сосудистой стенки, отмеченное у больных гипертонической болезнью, понижает его чувствительность к изменениям внутрисосудистого давления, в результате чего скачки системного артериального давления передаются в микроциркуляторное русло, инкорпорированное в головной мозг, сердце, сетчатку глаза, почки и другие органы, что приводит к необратимым изменениям в их структурно-функциональной организации [121, 122]. В этой связи действие антигипертензивных препаратов на миогенный тонус сосудов требует обстоятельного изучения.

Нифедипин, амлодипин, дилтиазем и другие ингибиторы потенциал-чувствительных  $Ca^{2+}$  каналов L-типа вызывают долгосрочное понижение системного артериального давления и занимают второе место на рынке антигипертензивных лекарств. Считается, что гематоэнцефалический барьер защищает сосуды головного мозга от действия этих лекарств. Однако, такого рода защита отсутствует в случае почек и других органов-мишеней. В этой связи следует отметить, что в медицинской литературе накапливается все больше данных, свидетельствующих о развитии почечной и сердечной недостаточности у больных гипертонией и получающих  $Ca^{2+}$  антагонисты [122–126]. Исследования, проведенные как *in vivo*, так и *in vitro* свидетельствуют о том, что развитие почечной недостаточности при лечении гипертонической болезни кальциевыми антагонистами обусловлено ингибированием миогенного ответа афферентой артериолы почечных клубочков. В самом деле, в отличие

от брызжеечных артерий, обладающих медленно развивающимся миогенным ответом, который приводит лишь к частичной нормализации внутреннего диаметра в ответ на увеличение давления на 70 mmHg (рис. 6А), миогенный ответ афферентной артериолы почек развивается за десятки миллисекунд и приводит к снижению диаметра на 20–30% в ответ на прирост давления на 20 mmHg (рис. 6Б). В отличие от ГМК афферентной артериолы, обогащенных  $\text{Ca}^{2+}$  каналами L-типа, их содержание в эфферентной артериолы незначительно [127]. В этой связи можно предположить, что ингибирование миогенного ответа  $\text{Ca}^{2+}$  антагонистами приводит к увеличению давления в локальном микроциркуляторном русле почек вопреки снижению системного артериального давления. В самом деле, эксперименты *in vivo* показали, что эти соединения приводят не к уменьшению, а напротив к увеличению скорости гломерулярной фильтрации (для обзора см. [128–130]).

Для изучения роли миогенного ответа в функционировании почек, Лотзенхизер с соавторами разработал модель изолированной перфузируемой почки, которая позволяет исследовать особенности микроциркуляторной системы этого органа в отсутствие воздействия на нее юктагломерулярного аппарата [54]. С помощью этой модели было установлено, что буметанид, полностью подавляет миогенный ответ афферентной артериолы почек крысы (рис. 6Б). Результаты этих исследований, рассмотренные в совокупности с данными об отсутствии миогенного ответа у *Nkcc1*<sup>-/-</sup> мышей [64], позволили нам предположить, что увеличенная активность НКСС1, документированная при первичной гипертензии на примере эритроцитов, защищает почки от разрушающего воздействия повышения артериального давления, в то время как хроническое использование фуросемида и других ингибиторов НКСС ускоряет развитие почечной недостаточности, в том числе протеинурии [89, 90, 131]. Иными словами, высокая активность НКСС1 в ГМК афферентной артериолы обеспечивает постоянство почечного кровотока в условиях повышения системного артериального давления, обусловленного увеличенной активностью этого переносчика в брызжеечных артериях и других сосудах, принимающих участие в формировании периферического сопротивления большого круга кровообращения (рис. 7). Эта гипотеза согласуется с 4-х-кратным увеличением частоты почечных осложнений у больных гипертензией негроидной расы, в эритроцитах которых активность НКСС1 в 2–3 раза ниже по сравнению с больными кавказской расы [131, 132]. Относительная роль  $\text{Ca}^{2+}$  каналов и НКСС1 в развитии миогенного ответа в коронарных сосудах и в микроциркуляторном русле ЦНС остается не изученной.

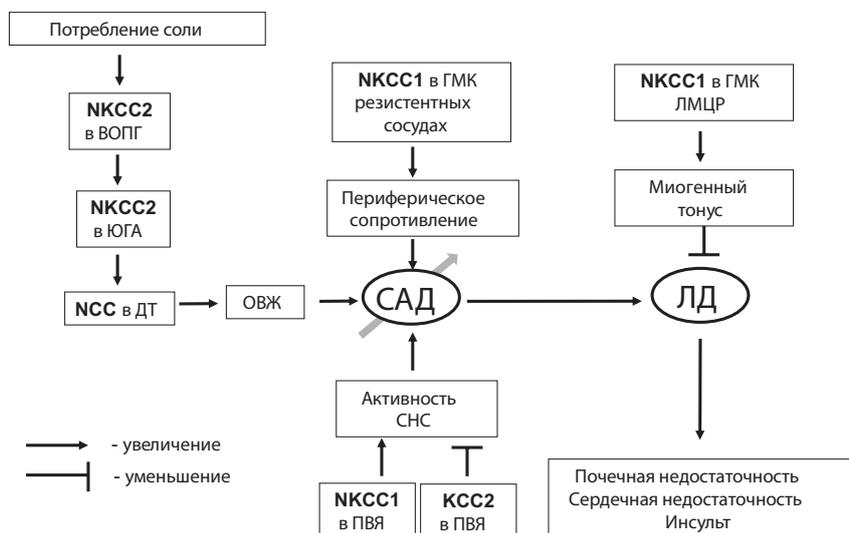


Рис. 7. Механизмы вовлечения котранспортеров хлора и одновалентных катионов в патогенез гипертонической болезни и ее сердечно-сосудистых и почечных осложнений.

ВОПГ – восходящий отдел петли Генле; ЮГА – юкстагломерулярный аппарат; ДТ – дистальный отдел нефрона; ОВЖ – объем внеклеточной жидкости; СНС – симпатическая нервная система; ПВЯ – паравентрикулярные ядра; ЛМЦР – локальное микроциркуляторное русло; САД – системное артериальное давление; ЛД – локальное давление. Другие сокращения приведены в тексте.

Одним из последствий даже краткосрочного ухудшения кровообращения в сосудах головного мозга является ишемия, приводящая к необратимым нарушениям нейрональной функции. При исследовании механизма нейротоксического действия ишемии было установлено, что снижение парциального давления кислорода приводит к набуханию астроцитов и выбросу из них глутамата и других нейротрансмиттеров, вызывающих вход  $\text{Ca}^{2+}$  и смерть нейронов [133, 133, 134]. Было установлено, что в условия гипоксии и гипоглициемии *in vitro* буметанид подавляют набухание астроцитов, выброс из них нейротрансмиттеров [135] и гибель нейронов гиппокампуса [136]. Более того, как  $[\text{K}^+]_o$ -индуцированное набухание, так и выброс нейротрансмиттеров в условиях ишемии был снижен в астроцитах  $\text{NKCC1}^{-/-}$  мышей [137], что указывает на активацию NKCC1 как причину набухания астроцитов. Мы обнаружили, что в ГМК активность NKCC резко снижается при увеличении  $[\text{HCO}_3^-]_o$  [138]. Таким образом, в условиях гипоксии активация NKCC1

может быть следствием ацидоза, приводящего к снижению  $[\text{HCO}_3^-]$  в цереброспинальной жидкости. Гипоксия также сопровождается резким падением внутриклеточного содержания АТФ, что в свою очередь приводит к ингибированию  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы [139]. Как было показано нами ранее, ингибирование  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы способствует инвертированию нетто-потоков ионов, опосредованных  $\text{NKCC1}$ , и набуханию клеток [70]. Таким образом, для выяснения относительной роли  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -насоса и  $\text{NKCC1}$  в регуляции объема астроцитов в условиях ишемии требует проведения дальнейших исследований.

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные, рассмотренные в обзоре, позволяют сделать следующие выводы.

*Первое*, транспорт одновалентных ионов через клетки эпителия, а также регуляция объема клеток и внутриклеточной концентрации хлора и объема клеток являются основными функциями ССС. В клетках эпителия почечных канальцев реабсорбция соли и осмотически связанной воды осуществляется  $\text{NKCC2}$  и  $\text{NCC}$ , в то время как объем клеток находится под тканеспецифическим контролем всех 7 идентифицированных ССС. В клетках гладкой мускулатуры основное участие в регуляции  $[\text{Cl}^-]_i$  выполняет  $\text{NKCC1}$ , в то время как в нейронах этот параметр регулируется как  $\text{NKCC1}$ , так и  $\text{KCC2}$ .

*Второе*, регуляция активности ССС при действии самых разнообразных стимулов, включая изменения объема клеток, осуществляется серин-треониновыми киназами  $\text{WNK}$ ,  $\text{SPAK}$  и  $\text{OSR1}$  и фосфатазами  $\text{PP1}$  и  $\text{PP2B}$ . Прямого влияния канонических протеинкиназ, активируемых цАМФ, цГМФ, диациллицером и  $\text{Ca}^{2+}$ , на фосфорилирование ССС не обнаружено.

*Третье*, выявлены несколько редких моногенных болезней, при которых повышение и понижение давления является следствием мутаций  $\text{NKCC2}$  и  $\text{NCC}$  и нарушения функционирования этих переносчиков в клетках эпителия почечных канальцев. При первичной гипертензии выявлена активация  $\text{NKCC1}$  в клетках ГМК резистентных сосудов и в нейронах ПВЯ, что приводит к увеличению периферического сопротивления системы большого круга кровообращения и активации СНС, соответственно. В обоих случаях эти изменения опосредованы увеличением  $[\text{Cl}^-]_i$  и деполяризацией плазматической мембраны.

Четвертое, фуросемид и другие петлевые диуретики снижает системное артериальное давление за счет ингибирования NKCC2 в восходящем отделе петли Генле и NKCC1 в ГМК резистентных сосудов. Однако, эти же соединения подавляют миогенный ответ ГМК микроциркуляторного русла почек и головного мозга, увеличивая тем самым риск возникновения почечных и церебральных осложнений.

Не смотря на большой прогресс, достигнутый в этой сфере медико-биологических исследований, нерешенными остаются следующие вопросы. (i) Какова природа сенсора, воспринимающего сигнал об изменении объема клетки и передающего его на объем-чувствительные WNK киназы? (ii) Ограничено ли функциональное значение SPAK/OSR1/WNK сигнального каскада регуляцией активности CCC? Каков механизм SPAK/OSR1-независимой регуляции CCC WNK киназами? (iii) В культуре ГМК и в изолированных сосудах NKCC1 активируется такими вазоконстрикторами как фенилэфрин и ангиотензин II, и ингибируется вазодилаторами, чье действие опосредовано через активацию системы цАМФ [13, 57]. Вовлечена ли эта реципрокная регуляция NKCC1 в изменения сосудистого тонуса указанными выше соединениями? (iv) Регулируется ли SPAK/OSR1/WNK системой ренин-ангиотензин-альдостерон и другими гормонами, вовлеченными в поддержание повышенного артериального давления? (v) Ключевая роль NKCC1 в регуляции миогенного ответа ГМК афферентной артериолы почек твердо установлена. Каково относительное участие NKCC1 в регуляции миогенного ответа ГМК микроциркуляторного русла головного мозга и других органов-мишеней? (vi) Эксперименты *in vitro* показали, что петлевые диуретики могут быть использованы как инструмент, усиливающий ингибиторную функцию GABA<sub>A</sub> рецепторов. В какой мере гематоэнцефалический барьер проницаем для диуретиков? Иными словами, могут ли эти соединения равно как и модуляторы сигнальной системы SPAK/OSR1/WNK быть использованы для воздействия на активность симпатической нервной системы?

От ответа на эти вопросы зависит не только наши знания о путях взаимодействия биохимических сигнальных систем с системами поддержания ионного гомеостаза и объема клетки. Эти исследования должны привести к разработке новых средств для нормализации артериального давления, которые будут лишены побочных эффектов, связанных с ингибированием транспорта ионов в клетках эпителия и миогенного ответа ГМК. В самом деле, используемые в настоящее время лекарства обладают одинаковым средством к NKCC1 и

НКСС2. Так как кажущееся сродство этих переносчиков как к фуросемиду, так и к буметаниду возрастает по мере увеличения их активности [140], ингибирование высокоактивного НКСС2, а следовательно и диуретическое действие этих соединений, должно доминировать по отношению к их сосудорасширяющему эффекту. Длительное использование этих соединений также нежелательно в связи с ингибированием НКСС1 в эпителии внутреннего уха, что сопровождается потерей слуха [141, 142]. Таким образом разработка тканеспецифических ингибиторов СПАК и других регуляторов ССС представляется более рациональным подходом антигипертензивной терапии.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Hediger, M.A., Romero, M.F., Peng, J.-B., Rolfs, A., Takanaga, H., Bruford, E.A. (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathophysiological and therapeutic implications of human membrane transport protein, *Pfluger Archiv – European Journal of Physiology*, **447**, 465–468.
- Gamba, G. (2005) Molecular physiology and pathophysiology of electro-neutral cation-chloride cotransporters, *Physiological Reviews*, **85**, 423–493.
- Orlov, S.N., Mongin, A.A. (2007) Salt sensing mechanisms in blood pressure regulation and hypertension, *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology*, **293**, H2039–H2053.
- Markadieu, N., Delpire, E. (2014) Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters, *Pfluger Archiv – European Journal of Physiology*, **466**, 91–105.
- Garzon-Mudvi, T., Schiapparelli, P., ap Rhys, C., Guerrero-Cazares, H., Smith, C., Kim, D.-H., Kone, L., Farber, H., Lee, D.Y., An, S.S., Levchenko, A., Quinones-Hinojosa, A. (2012) Regulation of brain tumor dispersal by NKCC1 through a novel role in focal adhesion regulation, *PLoS Biology*, **10**, e1001320.
- Chen, Y.-F., Chou, C.-Y., Ellory, J.C., Shen, M.-R. (2010) The emerging role of KCl cotransport in tumor biology, *American Journal of Translation Research*, **2**, 345–355.
- Kahle, K.T., Staley, K.J., Nahed, B.V., Gamba, G., Hebert, S.C., Lifton, R.P., Mount, D.B. (2008) Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease, *Nature – Clinical and Practical Neurology*, **4**, 490–503.
- Loscher, W., Puskarjov, M., Kaila, K. (2013) Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments, *Neuropharmacology*, **69**, 62–74.
- Rust, M.B., Alper, S.L., Rudhard, Y., Shmukler, B.E., Vicente, R., Brugnara, C., Trudel, M., Jentsch, T.J., Hubner, C.A. (2007) Disruption of erythroid K-Cl cotransporters alters erythrocyte volume and partially rescues erythrocyte dehydration in SAD mice, *Journal of Clinical Investigation*, **117**, 1708–1717.
- Rinehart, J., Gulcicek, E.E., Joiner, C.H., Lifton, R.P., Gallagher, P.G. (2010) Determinants of erythrocyte hydration. *Current Opinions in Haematology*, **17**, 191–197.

11. Lang, F., Voelkl, J. (2013) Therapeutic potential of serum and glucocorticoid inducible kinase inhibition, *Expert Opinion in Investigation of Drugs*, **22**, 701–714.
12. Gagnon, F., Hamet, P., Orlov, S.N. (1999) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump and Na<sup>+</sup>-coupled ion carriers in isolated mammalian kidney epithelial cells: regulation by protein kinase C, *Canadian Journal of Physiology Pharmacology*, **77**, 305–319.
13. Orlov, S.N., Resink, T.J., Bernhardt, J., Buhler, F.R. (1992) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> co-transport in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: baseline activity and regulation, *Journal of Hypertension*, **10**, 733–740.
14. Smith, J.B., Smith, L. (1987) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransport in cultured vascular smooth muscle cells: stimulation by angiotensin II and calcium ionophores, inhibition by cyclic AMP and calmodulin antagonists, *Journal of Membrane Biology*, **99**, 51–63.
15. Orlov, S.N., Tremblay, J., Hamet, P. (1996) Cell volume in vascular smooth muscle is regulated by bumetanide-sensitive ion transport, *American Journal of Physiology*, **270**, C1388–C1397.
16. Adragna, N., White, R.E., Orlov, S.N., Lauf, P.K. (2000) K<sup>-</sup>Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: possible implication in vasodilation, *American Journal of Physiology*, **278**, C381–C390.
17. Gagnon, F., Orlov, S.N., Tremblay, J., Hamet, P. (1998) Complete inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup> cotransport in Madin-Darby canine kidney cells by PMA-sensitive protein kinase C, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1369**, 233–239.
18. Gagnon, F., Dulin, N.O., Tremblay, J., Hamet, P., Orlov, S.N. (1999) ATP-induced inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup> cotransport in Madin-Darby canine kidney cells: lack of involvement of known purinoceptor-coupled signaling pathways, *Journal of Membrane Biology*, **167**, 193–204.
19. Orlov, S.N., Dulin, N.O., Gagnon, F., Gekle, M., Douglas, J.G., Schwartz, J.H., Hamet, P. (1999) Purinergic regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup> cotransport and MAP kinases is limited to C11-MDCK cells resembling intercalated cells from collecting ducts, *Journal of Membrane Biology*, **172**, 225–234.
20. Lytle, C., Forbush, 3rd, B. (1992) The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation, *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 25438–25443.
21. Grubb, B.R., Pace, A.J., Lee, E., Koller, B.H., Boucher, R.C. (2001) Alterations in airway ion transport in NKCC1-deficient mice, *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, **281**, C615–C623.
22. Lytle, C. (1997) Activation of avian erythrocyte Na-K-Cl cotransport by cell shrinkage, cAMP, fluoride, calyculin-A involves phosphorylation at common sites, *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 15069–15077.
23. Lytle, C. (1998) A volume-sensitive protein kinase regulates the Na-K-Cl cotransporter in duck red blood cells, *American Journal of Physiology*, **274**, C1002–C1010.
24. Lytle, C., McManus, T. (2002) Coordinate modulation of Na-K-2Cl cotransport and K-Cl cotransport by cell volume and chloride, *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, **283**, C1422–C1431.
25. Kahle, K.T., Rinehart, J., Ring, A., Gimenez, I., Gamba, G., Hebert, G., Lifton, R.P. (2006) WNK protein kinase modulate cellular Cl<sup>-</sup> flux altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters, *Physiology*, **21**, 326–335.
26. Dowd, B.F., Forbush, B. (2003) PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of

- the Na-K-Cl cotransporter (NKCK1), *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 27347–27353.
27. Piechotta, K., Lu, J., Delpire, E. (2002) Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative response 1 (OSR1), *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 50812–50819.
  28. Delpire, E., Austin, T.M. (2010) Kinase regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransport in primary neurons, *Journal of Physiology (L)*, **588**, 3365–3373.
  29. Wilson, F.H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K.A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D.V., Lipkin, G.W., Achard, J.M., Feely, M.P., Dussil, B., Berland, Y., Unwin, R.J., Mayan, H., Simon, D.B., Farfel, Z., Jeunemaitre, X., Lifton, R.P. (2001) Human hypertension caused by mutations in WNK kinases, *Science*, **293**, 1107–1112.
  30. Kahle, K.T., Rinehart, J., de los Heros, P., Louvi, A., Meade, P., Vazquez, N., Hebert, S.C., Gamba, G., Gimenez, I., Lifton, R.P. (2005) WNK3 modulates transport of Cl<sup>-</sup> in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **102**, 16783–16788.
  31. Rinehart, J., Kahle, K.T., de los Heros, P., Vazquez, N., Meade, P., Wilson, F.H., Hebert, S.C., Gimenez, I., Gamba, G., Lifton, R.P. (2005) WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC? renal cation-Cl<sup>-</sup> cotransporters required for normal blood pressure homeostasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **102**, 16777–16782.
  32. de los Heros, P., Kahle, K.T., Rinehart, J., Bobadilla, N.A., Vazquez, N., San Cristobal, P., Mount, D.B., Lifton, R.P., Hebert, S.C., Gamba, G. (2006) WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via phosphatase-dependent pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **103**, 1976–1981.
  33. Delpire, E. (2009) The mammalian family of sterile2p-like protein kinases, *Pfluger Archiv – European Journal of Physiology*, **458**, 953–967.
  34. Piechotta, K., Garbarini, N.J., England, R., Delpire, E. (2003) Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter in the nervous system: Evidence for a scaffolding role of the kinase, *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 52848–52856.
  35. Gagnon, K.B., England, R., Delpire, E. (2006) Volume sensitivity of cation-Cl<sup>-</sup> cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: SPAK and WNK4, *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, **290**, C134–C142.
  36. Ponce-Coria, J., San-Cristobal, P., Kahle, K.T., Vazquez, N., Pacheco-Alvarez, D., de los Heros, P., Juarez, P., Munoz, E., Michel, G., Bobadilla, N.A., Gimenez, I., Lifton, R.P., Hebert, S.C., Gamba, G. (2008) Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **105**, 8458–8463.
  37. Delpire, E., Gagnon, K.B. (2007) Genome-wide analysis of SPAK/OSR1 binding motifs, *Physiological Genomics*, **28**, 223–231.
  38. Richardson, C., Alessi, D. (2008) The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signaling pathway, *Journal of Cell Science*, **121**, 3293–3304.
  39. Castaneda-Bueno, M., Cervantes-Perez, L.G., Vazquez, N., Uribe, N., Kantesaria, S., Morla, L., Bobadilla, N.A., Alessi, D.R., Gamba,

- G. (2012) Alteration of the renal Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **109**, 7929–7934.
40. Castaneda-Bueno, M., Gamba, G. (2012) Mechanisms of sodium-chloride cotransporter modulation by angiotensin II, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, **21**, 516–522.
41. Darman, R.B., Forbush, B. (2002) A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1, *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 37542–37550.
42. Vitari, A.C., Thastrup, J., Rafigi, F.H., Deak, M., Morrice, N.A., Karlsson, H.K., Alessi, D.R. (2006) Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1, *Biochemical Journal*, **397**, 223–231.
43. Alvarez-Leefmans, F.J. (2001) Intracellular chloride regulation. In: *Cell Physiology Source Book. A Molecular Approach*, edited by N. Sperelakis, pp. 301–318. Academic, San Diego, CA.
44. Chipperfield, A.R., Harper, A.A. (2001) Chloride in smooth muscle, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **74**, 175–221.
45. Davis, J.P.L., Chipperfield, A.R., Harper, A.A. (1993) Accumulation of intracellular chloride by (Na-K-Cl) cotransport in rat arterial smooth muscle is enhanced in deoxycorticosterone acetate (DOCA)/salt hypertension, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **25**, 233–237.
46. Anfinogenova, Y.J., Baskakov, M.B., Kovalev, I.V., Kilin, A.A., Dulin, N.O., Orlov, S.N. (2004) Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransport, intracellular Cl<sup>-</sup> and L-type Ca<sup>2+</sup> channels, *Pflügers Archiv*, **449**, 42–55.
47. Barthelmebs, M., Stephan, D., Fontaine, C., Grima, M., Imbs, J.L. (1994) Vascular effects of loop diuretics: an in vivo and in vitro study in the rat, *Naunyn-Schmiedeberg's Archive of Pharmacology*, **349**, 209–216.
48. Lavalley, S.L., Iwamoto, L.M., Claybaugh, J.R., Dressel, M.V., Sato, A.K., Nakamura, K.T. (1997) Furosemide-induced airway relaxation in guinea pigs: relation to Na-K-2Cl cotransporter function, *American Journal of Physiology*, **273**, L211–L216.
49. Tian, R., Aalkjaer, C., Andreasen, F. (1990) Mechanisms behind the relaxing effect of furosemide on the isolated rabbit ear artery, *Pharmacology and Toxicology*, **67**, 406–410.
50. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Анфиногенова Я.Д., Бородин Я.Л., Килин А.А., Миноченко И.Л., Попов А.Г., Капилевич В.Л., Медведев М.А. и Орлов С.Н. (2003) Действие ингибитора Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> котранспорта буметанида на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки, *Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины*, **136**, (8), 145–149.
51. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А., Миноченко И.Л., Килин А.А., Анфиногенова Я.Д., Бородин И.В., Гусакова С.В., Попов А.Г., Капилевич Л.В. и Орлов С.Н. (2008) Роль Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> котранспорта и проницаемости клеточной мембраны для хлора в регуляции электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки мезатоном и гистамином, *Российский Физиологический Журнал*, **93**, 306–317.

52. Stanke, F., Devillier, P., Breant, D., Chavanon, O., Sessa, C., Bricca, G., Bessard, G. (1998) Furosemide inhibits angiotensin II-induced contraction on human vascular smooth muscle, *British Journal of Clinical Pharmacology*, **46**, 571–575.
53. Stanke-Labesque, F., Craciowski, J.L., Bedouch, P., Chavanon, O., Magne, J.L., Bessard, G., Devillier, P. (2000) Furosemide inhibits thromboxane A<sub>2</sub>-induced contraction in isolated human internal artery and saphenous vein, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **35**, 531–537.
54. Wang, X., Breaks, J., Loutzenhiser, K., Loutzenhiser, R. (2007) Effects of inhibition of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter on myogenic and angiotensin II responses of the rat afferent arteriole, *American Journal of Physiology – Renal Physiology*, **292**, F999–F1006.
55. Mozhayeva, M.G., Bagrov, Y.Y. (1995) The inhibitory effects of furosemide on Ca<sup>2+</sup> influx pathways associated with oxytocin-induced contractions of rat myometrium, *General Physiology and Biophysics*, **14**, 427–436.
56. Mozhayeva, M.G., Bagrov, Y.Y., Ostretsova, I.B., Gillespie, J.I. (1994) The effect of furosemide on oxytocin-induced contractions of the rat myometrium, *Experimental Physiology*, **79**, 661–667.
57. Akar, F., Skinner, E., Klein, J.D., Jena, M., Paul, R.J., O'Neill, W.C. (1999) Vasoconstrictors and nitrovasodilators reciprocally regulate the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter in rat aorta, *American Journal of Physiology*, **276**, C1383–C1390.
58. Garg, P., Martin, C., Elms, S.C., Gordon, F.J., Wall, S.M., Garland, C.J., Sutliff, R.L., O'Neill, W.C. (2007) Effect of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 on systematic blood pressure and smooth muscle tone, *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology*, **292**, H2100–H2105.
59. Palacios, J., Espinoza, F., Munita, C., Cifuentes, F., Michea, L. (2006) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter is implicated in gender differences in the response of the rat aorta to phenylephrine, *British Journal of Pharmacology*, **148**, 964–972.
60. Koltsova, S.V., Maximov, G.V., Kotelevtsev, S.V., Lavoie, J.L., Tremblay, J., Grygorczyk, R., Hamet, P., Orlov, S.N. (2009) Myogenic tone in mouse mesenteric arteries: evidence for P2Y receptor-mediated, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup> cotransport-dependent signaling, *Purinergic Signaling*, **5**, 343–349.
61. Davis, M.J., Hill, M.A. (1999) Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response, *Physiological Reviews*, **79**, 387–423.
62. Hill, M.A., Davis, M.J., Meininger, G.A., Potocnik, S.J., Murphy, T.V. (2006) Arteriolar myogenic signaling mechanisms: implications for local vascular functions, *Clinical Hemorheology Microcirculation*, **34**, 67–79.
63. Schubert, R., Mulvany, M.J. (1999) The myogenic response: established facts and attractive hypothesis, *Clinical Sciences*, **96**, 313–326.
64. Koltsova, S.V., Kotelevtsev, S.V., Tremblay, J., Hamet, P., Orlov, S.N. (2009) Excitation-contraction coupling in resistant mesenteric arteries: evidence for NKCC1-mediated pathway, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **379**, 1080–1083.
65. Lang, F., Busch, G., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Haussinger, D. (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms, *Physiological Reviews*, **78**, 247–306.

66. Mongin, A.A., Orlov, S.N. (2001) Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor, *Pathophysiology*, **8**, 77–88.
67. Orlov, S.N., Pokudin, N.I., Kotelevtsev, Yu.V., Gulak, P.V. (1989) Volume-dependent regulation of ion transport and membrane phosphorylation in human and rat erythrocytes, *Journal of Membrane Biology*, **107**, 105–117.
68. Adragna, N., Di Fulvio, M., Lauf, P.K. (2004) Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes, *Journal of Membrane Biology*, **201**, 109–137.
69. Orlov, S.N. (1994) Ion transport across erythrocyte membrane: mechanisms and volume-dependent regulation, *Soviet Scientific Reviews F Physiology and General Biology*, **8**, 1–48.
70. Koltsova, S.V., Akimova, O.A., Orlov, S.N., Dulin, N.O. (2013) Both Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup> cotransport contribute to cell volume control in human lung fibroblasts, *Бюллетень Сибирской Медицины*, **12**, 42.
71. Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., Pedersen, S.F. (2009) Physiology of cell volume regulation in vertebrates, *Physiological Reviews*, **89**, 193–277.
72. Orlov, S.N., Platonova, A.A., Hamet, P., Grygorczyk, R. (2013) Cell volume and monovalent ion transporters: their role in the triggering and progression of the cell death machinery, *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, **305**, C361–C372.
73. O'Shaughnessy, K.M., Karet, F.E. (2006) Salt handling in hypertension, *Annual Reviews of Nutrition*, **26**, 343–365.
74. Balu, S., Thomas, J. (2006) Incremental expenditure of treating hypertension in the United States, *American Journal of Hypertension*, **19**, 810–816.
75. Guyton, A.C. Arterial pressure and hypertension. 1980. Philadelphia, WB Saunders Co.
76. Постнов Ю.В. и Орлов С.Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. 1987. Москва, Медицина.
77. Lifton, R.P., Gharavi, A.G., Geller, D.S. (2001) Molecular mechanisms of human hypertension, *Cell*, **104**, 545–556.
78. Lifton, R.P. (2005) Genetic dissection of human blood pressure variation: common pathways from rare phenotypes, *Harvey Lectures*, **100**, 71–101.
79. Guyton, A.C. (1991) Blood pressure control – special role of the kidney and body fluids, *Science*, **252**, 1813–1816.
80. Simon, D.B., Karet, F.E., Hamdan, J.M., Di Pietro, A., Sanjad, S.A., Lifton, R.P. (1996) Bartter's syndrome, hypokalemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutation of Na-K-2Cl cotransporter NKCC2, *Nature Genetics*, **13**, 183–188.
81. Simon, D.B., Nelson-Williams, C., Bia, J., Ellison, D., Karet, F.E., Molina, A.M., Vaara, I., Iwata, F., Cushner, M., Koolen, M., Gainza, F.J., Gitelman, H.J., Lifton, R.P. (1996) Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter, *Nature Genetics*, **12**, 24–30.
82. Hamet, P., Pausova, Z., Adarichev, V., Adaricheva, K., Tremblay, J. (1998) Hypertension: genes and environment, *Journal of Hypertension*, **16**, 397–418.
83. Pickering, G.W. (1964) Systematic arterial pressure. In: Circulation of the blood. Men and ideas, edited by A.P.Fishman, et al, pp. 487–541. London.

84. Jones, A.W. (1973) Altered ion transport in vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. Influence of aldosterone, norepinephrine and angiotensin, *Circulation Research*, **33**, 563–572.
85. Postnov, Yu.V., Orlov, S.N., Shevchenko, A.S., Adler, A.M. (1977) Altered sodium permeability, calcium binding and Na-K-ATPase activity in the red blood cell membrane in essential hypertension, *Pflugers Archiv – European Journal of Physiology*, **371**, 263–269.
86. Postnov, Yu.V., Orlov, S.N. (1985) Ion transport across plasma membrane in primary hypertension, *Physiological Reviews*, **65**, 904–945.
87. Orlov, S.N., Adragna, N., Adarichev, V.A., Hamet, P. (1999) Genetic and biochemical determinants of abnormal monovalent ion transport in primary hypertension, *American Journal of Physiology*, **276**, C511–C536.
88. Garay, R.P., Alda, O. (2007) What can we learn from erythrocyte Na-K-Cl cotransporter NKCC1 in human hypertension, *Pathophysiology*, **14**, 167–170.
89. Orlov, S.N., Tremblay, J., Hamet, P. (2010) NKCC1 and hypertension: a novel therapeutic target involved in regulation of vascular tone and renal function, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, **19**, 163–168.
90. Orlov, S.N., Koltsova, S.V., Tremblay, J., Baskakov, M.B., Hamet, P. (2012) NKCC1 and hypertension: role in the regulation of vascular smooth muscle contractions and myogenic tone, *Annals of Medicine*, **44**, S111–S118.
91. Bianchi, G., Ferrari, P., Trizio, P., Ferrandi, M., Torielli, L., Barber, B.R., Polli, E. (1985) Red blood cell abnormalities and spontaneous hypertension in rats. A genetically determined link, *Hypertension*, **7**, 319–325.
92. Котелевцев Ю.В., Орлов С.Н., Покудин Н.И., Агнаев В.М. и Постнов Ю.В. (1987) Генетический анализ наследуемости Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ко-транспорта, содержания кальция в эритроцитах и артериального давления у F2 гибридов спонтанно гипертензивных нормотензивных крыс, *Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины*, **103**, 456–458.
93. Flagella, M., Clarke, L.L., Miller, M.L., Erway, L.C., Giannella, R.A., Andriga, A., Gawenis, L.R., Kramer, J., Duffy, J.J., Doetschman, T., Lorenz, J.N., Yamoah, E.N., Cardell, E.L., Shull, G.E. (1999) Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf, *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 26946–26955.
94. Meyer, J.W., Flagella, M., Sutliff, R.L., Lorenz, J.N., Nieman, M.L., Weber, G.S., Paul, R.J., Shull, G.E. (2002) Decreased blood pressure and vascular smooth muscle tone in mice lacking basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter, *American Journal of Physiology*, **283**, H1846–H1855.
95. Wall, S.M., Knepper, M.A., Hassel, K.A., Fischer, M.P., Shodeinde, A., Shin, W., Pham, T.D., Meyer, J.W., Lorenz, J.N., Beierwaltes, W.H., Dietz, J.R., Shull, G.E., Kim, Y.-H. (2006) Hypotension in NKCC1 null mice: role of the kidney, *American Journal of Physiology – Renal Physiology*, **290**, F409–F416.
96. Kim, S.M., Eisner, C., Faulhaber-Walter, R., Mizel, D., Wall, S.M., Briggs, J.P., Schnermann, J. (2008) Salt sensitivity of blood pressure in NKCC1-deficient mice, *American Journal of Physiology – Renal Physiology*, **295**, F1230–F1238.
97. Lee, H.-A., Baek, I., Seok, Y.M., Yang, E., Cho, H.-M., Lee, D.-Y., Hong, S.H., Kim, I.K. (2010) Promoter hypomethylation upregulates

- Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter 1 in spontaneously hypertensive rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **396**, 252–257.
98. Cho, H.-M., Lee, H.-A., Kim, H.Y., Han, H.S., Kim, I.K. (2011) Expression of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter is epigenetically regulated during postnatal development of hypertension, *American Journal of Hypertension*, **12**, 1286–1293.
99. Mancia, G., Grassi, G., Giannattasio, C., Seravalle, G. (1999) Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage, *Hypertension*, **34**, 724–728.
100. Schlaich, M.P., Lambert, E., Kaye, D.M., Krozowski, Z., Campbell, D.J., Lambert, G., Hastings, J., Aggarwal, A., Esler, M.D. (2004) Sympathetic augmentation in hypertension: role of nerve firing, norepinephrine reuptake, and angiotensin neuromodulation, *Hypertension*, **43**, 169–175.
101. Huang, B.S., Amin, M.S., Leenen, F.H.H. (2006) The central role of the brain in salt-sensitive hypertension, *Current Opinions in Cardiology*, **21**, 295–394.
102. Leenen, F.H.H. (2010) The central role of the brain aldosterone-«ouabain» pathway in salt-sensitive hypertension, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1802**, 1132–1139.
103. Judy, W.V., Watanabe, A.M., Henry, P.D., Besch, H.R., Murphy, W.R., Hockel, G.M. (1976) Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rats, *Circulation Research*, **38**, 21–29.
104. Pyner, S., Coote, J.H. (2000) Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord, *Neuroscience*, **100**, 549–556.
105. Allen, A.M. (2002) Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone, *Hypertension*, **39**, 275–280.
106. Li, D.P., Pan, H.L. (2007) Glutamatergic inputs in the hypothalamic paraventricular nucleus maintain sympathetic vasomotor tone in hypertension, *Hypertension*, **49**, 916–925.
107. Li, D.P., Pan, H.L. (2007) Role of GABAA and GABAB receptors in paraventricular nucleus in control sympathetic vasomotor tone in hypertension, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, **320**, 615–626.
108. Li, D.P., Pan, H.L. (2006) Plasticity of GABAergic control of hypothalamic presympathetic neurons in hypertension, *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology*, **290**, H1110–H1119.
109. Ye, Z.-Y., Li, D.-P., Byun, H.S., Li, L., Pan, H.-L. (2012) NKCC1 upregulation disrupts chloride homeostasis in the hypothalamus and increases neuronal-sympathetic drive in hypertension, *Journal of Neuroscience*, **32**, 8560–8568.
110. Jiang, G., Cobbs, S., Klein, J.D., O'Neill, W.C. (2003) Aldosterone regulates the Na-K-Cl cotransporter in vascular smooth muscle, *Hypertension*, **41**, 1131–1135.
111. Orlov, S.N., Li, J.-M., Tremblay, J., Hamet, P. (1995) Genes of intracellular calcium metabolism and blood pressure control in primary hypertension, *Seminar in Nephrology*, **15**, 569–592.
112. Hamet, P., Orlov, S.N., Tremblay, J. (1995) Intracellular signalling mechanisms in hypertension. In: Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment, edited by J.H.Laragh, et al, pp. 575–608. Raven Press, New York.

113. Kahle, K.T., Rinehart, J., Giebisch, G., Gamba, G., Hebert, S.C., Lifton, R.P. (2008) A novel protein kinase signaling pathway essential for blood pressure regulation in humans, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **19**, 91–95.
114. Susa, K., Kita, S., Iwamoto, T., Yang, S.-S., Lin, S.-H., Ohta, A., Sohara, E., Rai, T., Sasaki, S., Alessi, D.R., Uchida, S. (2012) Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels, *Clinical and Experimental Nephrology*, **16**, 530–538.
115. Rafiqi, F.H., Zuber, A.M., Glover, M., Richardson, C., Fleming, S., Jovanovic, A., O'Shaughnessy, K.M., Alessi, D.R. (2010) Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure, *EMBO Molecular Medicine*, **2**, 63–75.
116. Bergaya, S., Faure, S., Baudrie, V., Rio, M., Escoubet, B., Bonnin, P., Henrion, D., Loirand, G., Achard, J.M., Jeunemaitre, X., Hadchouel, J. (2011): WNK1 regulates vasoconstriction and blood pressure response to  $\alpha$ 1-adrenergic stimulation in mice, *Hypertension*, **58**, 439–445.
117. Yang, S.-S., Lo, Y.-F., Wu, C.-C., Lin, S.-W., Yeh, C.-J., Chu, P., Sytwu, H.-K., Uchida, S., Sasaki, S., Lin, S.-H. (2010) SPAK-knockout mice manifest Gitelman syndrome and impaired vasoconstriction, *Journal of American Society of Nephrology*, **21**, 1868–1877.
118. Janardhan, V., Qureshi, A.I. (2004) Mechanisms of ischemic brain injury, *Current Cardiology Reports*, **6**, 117–123.
119. Folkow, B. (2010) Cardiovascular «remodeling» in rat and human: time axis, extent, and in vivo relevance, *Physiology*, **25**, 264–265.
120. Loutzenhiser, R., Griffin, K., Williamson, G., Bidani, A. (2006) Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms, *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **290**, R1153–R1167.
121. Liu, Y., Gutterman, D.D. (2009) Vascular control in humans: focus on the coronary microcirculation, *Basic Research in Cardiology*, **104**, 211–227.
122. Bidani, A., Griffin, K.A., Williamson, G., Wang, X., Loutzenhiser, R. (2009) Protective importance of the myogenic response in the renal circulation, *Hypertension*, **54**, 393–398.
123. Nathan, S., Pepine, C.J., Bakris, G.L. (2005) Calcium antagonists: effects on cardio-renal risk in hypertensive patients, *Hypertension*, **46**, 637–642.
124. Griffin, K.A., Picken, M.M., Bakris, G.L., Bidani, A.K. (1999) Class differences in the effects of calcium channel blockers in the rat remnant kidney model, *Kidney International*, **55**, 1849–1860.
125. Bakris, G.L., Toto, R.D., McCullough, P.A., Rocha, R., Purkayastha, D., Davis, P. (2008) Effect of different ACE inhibitor combinations on albuminuria: results of the GUARD study, *Kidney International*, **73**, 1303–1309.
126. Shibata, M.C., Leon, H., Chatterley, T., Dorgan, M., Vandermeer, B. (2010) Do calcium channel blockers increase the diagnosis of heart failure with hypertension?, *American Journal of Cardiology*, **106**, 228–235.
127. Hansen, P.B., Jensen, B.L., Andreasen, D., Scott, O. (2001): Differential expression of T- and L-type

- voltage-dependent calcium channels in renal resistance vessels, *Circulation Research*, **89**, 630–638.
128. Loutzenhiser, R., Epstein, M. (1990) The renal hemodynamic effects of calcium antagonists. In: Calcium antagonists and the kidney, edited by M. Epstein, et al, pp. 33–74. Hanley & Belfus, Inc., Philadelphia.
129. Hayashi, K., Homma, K., Wakino, S., Tokuyama, H., Sugano, N., Saruta, T., Itoh, H. (2010) T-Type channel blockage as a determinant of kidney protection, *Keio Journal of Medicine*, **59**, 84–95.
130. Inscho, E.W., Cook, A.K., Imig, J.D., Vial, C., Evans, R.J. (2003) Physiological role for P2X1 receptors in renal microvascular autoregulatory behavior, *Journal of Clinical Investigation*, **112**, 1895–1905.
131. Orlov, S.N. (2005) Decreased Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup> cotransport and salt retention in Blacks: a provocative hypothesis, *Journal of Hypertension*, **23**, 1929–1930.
132. Orlov, S.N., Gossard, F., Pausova, Z., Akimova, O.A., Tremblay, J., Grim, C.E., Kotchen, J.M., Kotchen, T.A., Gaudet, D., Cowley, A., Hamet, P. (2010) Decreased NKCC1 activity in erythrocytes from African-Americans with hypertension and dyslipidemia, *American Journal of Hypertension*, **23**, 321–326.
133. Khodorov, B. (2004) Clutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **86**, 279–351.
134. Mongin, A.A. (2007) Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm, *Pathophysiology*, **14**, 183–193.
135. Su, G., Kintner, D.B., Sun, D. (2002) Contribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup> cotransporter to high-K<sup>+</sup>-induced swelling and EAA release in astrocytes, *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, **282**, C1136–C1146.
136. Busse, S., Breder, J., Dinkel, K., Reymann, K.G., Schroder, U.H. (2005) Inhibitors of cation-chloride-cotransporters affect hypoxic/hypoglycemic injury in hippocampal slices, *Brain Research*, **194**, 116–121.
137. Su, G., Kintner, D.B., Flagella, M., Shull, G.E., Sun, D. (2002) Astrocytes from Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup> cotransporter-null mice exhibit absence of swelling and decrease in EAA release, *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, **282**, C1147–C1160.
138. Koltsova, S.V., Luneva, O.G., Lavoie, J.L., Tremblay, J., Maksimov, G.V., Hamet, P., Orlov, S.N. (2009) HC03-dependent impact of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup> cotransport in vascular smooth muscle excitation-contraction coupling, *Cellular Physiology and Biochemistry*, **23**, 407–414.
139. Williams, R.S., Benjamin, I.J. (2000) Protective responses in the ischemic myocardium, *Journal of Clinical Investigation*, **106**, 813–818.
140. Hannaert, P., Alvarez-Guerra, M., Pirot, D., Nazaret, C., Garay, R.P. (2002) Rat NKCC2/NKCC1 cotransport selectivity for loop diuretic drugs, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **365**, 193–199.
141. Delpire, E., Lu, J., England, R., Dull, C., Thorne, T. (1999) Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter, *Nature Genetics*, **22**, 192–195.

142. Lang, F., Vallon, V., Knipper, M., Wangemann, P. (2007) Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney, *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, **293**, C1187–C1208.